

Naturstoffe aus chinesischen
Mangrovenpflanzen - Untersuchung der
insektiziden, tumorhemmenden und vor UV-
Licht schützenden Aktivitäten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mirko Bayer

aus Ulm

Düsseldorf

2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch
Korreferent: PD Dr. Günter Schmahl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2009

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch

am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Für meine Freundin Kristina – Danke für alles!

Summary

Most compounds from mangrove plants have so far been primarily investigated in order to elucidate their chemical structures, whereas their bioactivities were analyzed only rudimentarily. The primary aim of this thesis was focused on the different bioactivities of mangrove plant derived natural products.

In order to look for insecticidal substances, leaf and wood samples of 15 mangrove species were collected, extracted with methanol and tested for their insecticidal activities. For this examination, a culture of the polyphagous pest insect *Spodoptera littoralis* (Boisduvall, Lepidoptera: Noctuidae) was used. The extracts of the mangrove plants *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae), *Lumnitzera littorea* (Combretaceae) and *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) were identified as the most active ones. Out of these crude extracts, several natural products could be isolated, which showed different bioactivities against *Spodoptera littoralis*.

Ellagic acid, which could be isolated from the wood of *Sonneratia alba* showed a strong deterrent effect on *Spodoptera littoralis* at a concentration of about 100 ppm (0.01%). At a concentration of about 300 ppm (0.03%) the survival rate was reduced by 50% and at a concentration of about 100 ppm (0.01%) the average weight of the insects was reduced by 50%. Different methylated derivatives of ellagic acid were isolated from *Sonneratia alba*, too. In comparison to ellagic acid, the bioactivities of the methylated derivatives were reduced.

In the literature, ellagic acid was described as an ATP competitive inhibitor for protein kinases. Due to this information, ellagic acid and the different methylated derivatives were examined on their ability to inhibit 24 different human tumour related protein kinases. Based on the different derivatives of ellagic acid and some commercial available related compounds, a structure-activity relationship could be determined. Ellagic acid appeared to be a broad band inhibitor on all protein kinases. The lowest IC₅₀ value was observed at a concentration of 250 nM.

From the leaves of *Rhizophora apiculata* two rare coumarylated triterpenes were isolated. The compounds *E*- and *Z*-coumaroyl-lupeol showed weak bioactivities against *Spodoptera littoralis* in respect to the weight reduction and medium strong inhibitory potentials on human protein kinases. *E*- and *Z*-coumaroyl-lupeol showed strong inhibitory bioactivities on the UVA1 induced transcription induction of the cell membrane bound protein ICAM-1, which is involved in several important immunological reactions. For this ICAM-1 bioassay further lupeol derivatives, like acetyl-lupeol, benzoyl-lupeol or cinnamoyl-lupeol were obtained by partial synthesis.

In leaves of *Lumnitzera littorea* β -sitosterol could be identified as the bioactive natural product against *Spodoptera littoralis*. At a concentration of 300 ppm (0.03%), β -sitosterol induced a dramatic developmental alteration. Development of treated insects was significantly slower and the weight was significantly reduced. The oviposition of the adult insects that were treated during their larval stage with β -sitosterol was reduced to 45% compared to controls. The fertility of the eggs was reduced to 0.3 %.

β -Sitosterol was also used for the UVA1 induced ICAM-1 assay. Commercial β -sitosterol and cholesterol were used for the synthesis of benzoic and cinnamonic acid esters. The cytotoxicity of 30 μ M β -sitosterol, 30 μ M benzoyl- β -sitosterol and 30 μ M cinnamoyl- β -cholesterol against keratinocytes was similar. About the same toxicity was registered following application of 30 μ M cholesterol. In comparison to β -sitosterol, the cytotoxicity of cholesterol was eliminated by an esterification with benzoic or cinnamonic acid.

In order to compare the insecticidal activities of the mangrove plant derived natural products, known insecticidal natural products were isolated and tested under the same conditions.

Zusammenfassung

Viele Inhaltsstoffe von Mangrovenpflanzen wurden bislang hauptsächlich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur untersucht, deren Bioaktivitäten aber nur rudimentär zur Kenntnis genommen. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Naturstoffe aus Mangrovenpflanzen auf ihre verschiedenen Bioaktivitäten hin zu prüfen.

Um insektizide Substanzen zu identifizieren wurden von 15 Mangrovenarten Proben von Blättern und Zweigen gesammelt, Rohextrakte hergestellt und diese auf ihre insektizide Wirkung hin untersucht. Für diese ausgedehnten Untersuchungen wurde das Schadinsekt *Spodoptera littoralis* (Boisduvall, Lepidoptera: Noctuidae) verwendet.

Für die aus *Sonneratia alba* isolierten Ellagsäure konnte nachgewiesen werden, dass sie im Konzentrationsbereich von 100 ppm (0,01%) einen starken fraßhemmenden Effekt auf *Spodoptera littoralis* besitzt. Bei einer Konzentration von 300 ppm (0,03%) sank die Überlebensrate um 50% und bei einer Konzentration von 100 ppm (0,01%) sank das durchschnittliche Gewicht der Insekten um 50%. Verschiedene methylierte Derivate der Ellagsäure wurden ebenfalls aus den Zweigen von *Sonneratia alba* isoliert, deren Bioaktivitäten auf *Spodoptera littoralis* jedoch im Vergleich zu Ellagsäure schwächer waren.

Ellagsäure wurde in der Literatur als ATP kompetitiver Inhibitor für eine Proteinkinase aus Mais beschrieben. Dieser Befund wurde zum Anlass genommen, Ellagsäure und die verschiedenen methylierten Derivate hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkungen auf 24 verschiedene tumorrelevante humane Proteinkinasen zu untersuchen. Anhand der verschiedenen Ellagsäurederivate und einigen kommerziell erworbenen Analoga konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden. Ellagsäure stellte sich als Breitbandinhibitor auf alle untersuchten Proteinkinasen heraus. Der kleinste gemessene IC₅₀ Wert lag bei 250 nM.

Aus den Blättern von *Rhizophora apiculata* wurden zwei seltene coumaroylierte Triterpene isoliert. Die Substanzen *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol zeigten leichte Bioaktivität auf *Spodoptera littoralis* hinsichtlich einer

Gewichtsreduktion, mittelstarke hemmende Wirkung auf wenige verschiedene tumorrelevante humane Proteinkinasen, aber eine starke Hemmung auf die UVA1 induzierte Transkriptionsinduktion des zellmembrangebundenen und für immunologische Reaktionen wichtigen Rezeptorproteins ICAM-1. Für diesen ICAM-1 Biotest wurden weitere Lupeolderivate semisynthetisch hergestellt. Hierzu zählen Acetyl-Lupeol, Benzoyl-Lupeol und Zinnamoyl-Lupeol.

Aus *Lumnitzera littorea* konnte β -Sitosterol als bioaktiver Sekundärstoff isoliert werden. β -Sitosterol zeigte auf *Spodoptera littoralis* eine dramatische entwicklungsmodifizierende Aktivität im Konzentrationsbereich von 300 ppm (0,03%). Die behandelten Insekten entwickelten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant langsamer und die Gewichte wurden signifikant reduziert. Die Eiablage der adulten Falter, die während ihres Larvenstadiums mit 300 ppm β -Sitosterol gefüttert wurden, war um etwa 55% reduziert. Die abgelegten Eier waren zudem zu 99,7% steril.

β -Sitosterol floss auch in den ICAM-1 Biotest ein. Neben β -Sitosterol wurde auch Cholesterol getestet. Von β -Sitosterol, sowie von Cholesterol wurden semisynthetisch Benzoessäure- und Zimtsäureester hergestellt. Auffallend hierbei war, dass die Zytotoxizität bei einer Konzentration von 30 μ M von β -Sitosterol, Benzoyl- β -Sitosterol und Zinnamoyl- β -Sitosterol auf Keratinozyten identisch war. Ebenso wurde eine Zytotoxizität von Cholesterol bei einer Konzentration von 30 μ M festgestellt. Diese wurde jedoch im Vergleich zu β -Sitosterol durch die Veresterung mit Benzoessäure und Zimtsäure aufgehoben.

Zum Vergleich der hier vorgestellten bioaktiven Substanzen auf die Insektenart *Spodoptera littoralis* wurden botanische Insektizide isoliert, deren Bioaktivitäten bereits hinreichend in der Literatur beschrieben sind.

Inhaltsübersicht

1. EINLEITUNG	1
1.1. WIRKSTOFFE AUS DER NATUR	1
1.2. NATURSTOFFE IM ANWENDUNGSBEREICH	2
1.2.1. Beispiele für Zytostatika	2
1.2.2. Beispiel für UV-schützende Wirkung von Naturstoffen	3
1.2.3. Beispiel für Insektizide	4
1.3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	8
1.3.1. Folgende Bioaktivitäten wurden untersucht	9
<hr/>	
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. PFLANZEN- UND TIERMATERIAL	11
2.1.1. Mangroven	11
2.1.1.1. Vorkommen der untersuchten Mangrovenpflanzen	11
2.1.1.2. Mangrovenarten für den ersten Testscreen	13
2.1.2. Nicht mangrovenassoziierte Pflanzen als Vergleich zur Untersuchung der insektiziden Aktivität	16
2.1.2.1. <i>Aglaia</i> (<i>Aglaia duppereana</i> , Meliaceae)	16
2.1.2.2. <i>Ryania</i> (<i>Ryania speciosa</i> , Flacourtiaceae)	17
2.2. INSEKTEN	18
2.2.1. <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduvall, Lepidoptera: Noctuidae)	18
2.3. BIOASSAYS	18
2.3.1. Bioassay-guided-Isolation (BAGI)	18
2.3.2. Insektenbioassay	19
2.3.2.1. Durchführung der Bioassays	19
2.3.2.1.1. Herstellung des Kunstfutters	19
2.3.2.1.2. Herstellung der Bioassayansätze	20
2.3.2.1.3. Durchführung eines Wahlversuches	21
2.3.2.1.4. Spezielle Durchführung des Insektentests	22
2.3.2.1.5. Vorteil des Bioassays an kompletten Insekten	22
2.3.2.2. Statistische Auswertung der Insektenbioassays	23
2.3.2.2.1. Folgendes Formelwerk wurde verwendet	23
2.3.2.2.2. Statistische Signifikanz	24

2.4.	SYNTHESEN VON ACETYL-, ZINNAMOYL- UND BENZOYL-DERIVATEN	24
2.4.1.	Acetylierung von Lupeol	24
2.4.2.	Benzoylierung von β -Sitosterol, Cholesterol und Lupeol	25
2.4.3.	Zinnamoylierung von β -Sitosterol, Cholesterol und Lupeol	26
2.5.	PROTEINKINASE-BIOASSAY	28
2.6.	WEITERE BIOASSAYS	29
2.6.1.	Zellkulturassays an murinen Krebszellen	29
2.6.2.	UV-Schutz-Testung	30
2.6.3.	Toxikologische Untersuchungen	31
2.7.	PHYTOCHEMISCHE METHODEN	32
2.7.1.	Flüssig/Flüssig-Extraktion	32
2.7.2.	Vacuumflüssigchromatographie (Vacuum liquid chromatography (VLC))	32
2.7.3.	Säulenchromatographie	34
2.7.3.1.	Silica (Kieselgel)	34
2.7.3.2.	Sephadex	34
2.7.3.3.	DIOL	35
2.7.4.	Dünnschichtchromatographie (DC)	35
2.7.5.	Präperative Dünnschichtchromatographie (PDC)	36
2.7.6.	Semipräparative HPLC	36
2.7.7.	Präparative HPLC	37
2.7.8.	Analytische HPLC	37
2.7.9.	HPLC Quantifizierung von Ellagsäurederivaten	38
2.7.10.	Abschätzung des Gehaltes von Taraxerolderivaten in <i>Rhizophora stylosa</i> mittels $^1\text{H-NMR}$	39
2.7.11.	HPLC-MS	41
2.7.12.	EI-MS	42
2.7.13.	NMR	42
2.7.14.	Optische Drehung	42
2.8.	VERWENDETE GERÄTE	44
2.9.	CHEMIKALIEN	44
2.10.	SONSTIGE VER- UND GEBRAUCHSMITTEL	45
2.11.	PC-PROGRAMME	45

3. ERGEBNISSE	46
3.1. ELLAGSÄUREDERIVATE AUS ZWEIGEN VON <i>SONNERATIA ALBA</i>	46
3.1.1. Isolierung und Strukturaufklärung	46
3.1.2. Quantifizierungsergebnisse	54
3.1.3. Insektenbioassayergebnisse	55
3.1.3.1. Fraßhemmender Effekt von Ellagsäure	55
3.1.3.2. Langzeitversuch mit Ellagsäure	56
3.1.3.3. Fütterungsversuch mit verschiedenen Ellagsäurekonzentrationen	56
3.1.3.4. Gewichtsreduzierender Effekt von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure auf <i>Spodoptera littoralis</i>	57
3.1.4. Kinaseinhibitionsassay	58
3.1.5. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y Lymphomazellen	66
3.1.6. Tumorzellinhibitionsassay an verschiedenen humanen Zelllinien	67
3.2. STEROLE	69
3.2.1. β -Sitosterol	69
3.2.2. Semiquantitative Gehaltserfassung	72
3.2.3. Insektenbioassayergebnisse	73
3.2.3.1. Langzeittest	73
3.2.3.2. Insektizider Vergleich zwischen β -Sitosterol, Cholesterol, 5 α -Cholestan-3 β -ol und 5 α -Cholestan	78
3.2.4. Kinaseinhibitionsassay	79
3.2.5. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y Lymphomazellen	80
3.2.6. Semisynthetische Sterolderivate	80
3.3. <i>E</i> -COUMAROYL-LUPEOL UND <i>Z</i> -COUMAROYL-LUPEOL	84
3.3.1. Insektenbioassayergebnisse	91
3.3.2. Kinaseinhibitionsassay	92
3.3.3. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y Lymphomazellen	93
3.3.4. Semisynthetische Lupeol-Derivate	94
3.4. <i>E</i> -COUMAROYL-TARAXEROL UND <i>Z</i> -COUMAROYL-TARAXEROL	98
3.4.1. Semiquantitative Gehaltserfassung	103
3.5. UV-ASSAY MIT TRITERPENDERIVATEN UND STEROLDERIVATEN HINSICHTLICH REDUZIERTER ICAM-1 EXPRESSION	106
3.6. WEITERE TESTREIHEN MIT TRITERPENEN	118
3.6.1. NF κ B Inhibition durch Lupeol und Ursolsäure	118
3.6.2. Zytotoxische Triterpene – Dammarenolsäure und ihre Derivate	120

3.7.	WEITERE INSEKTIZIDE NATURSTOFFE	125
3.7.1.	Didehydroaglaiastatin aus den Blüten von <i>Aglaia duppereana</i>	125
3.7.2.	Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin aus Zweigen von <i>Ryania speciosa</i>	127
3.8.	WEITERE NATURSTOFFE AUS MANGROVEN	131
3.8.1.	<i>Heritiera littoralis</i>	131
3.8.1.1.	Tilirosid aus den Blättern von <i>Heritiera littoralis</i>	131
3.8.1.2.	Heritol, Heritonin und Vallapin aus den Zweigen von <i>Heritiera littoralis</i>	135

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE **141**

4.1.	INSEKTENBIOASSAYS	141
4.1.1.	Ellagsäure	141
4.1.2.	β -Sitosterol	144
4.1.3.	<i>E</i> - und <i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol und <i>E</i> - und <i>Z</i> -Coumaroyl-Taraxerol	150
4.1.4.	Heritol, Heritonin und Vallapin	154
4.1.5.	Didehydroaglaiastatin	155
4.1.6.	Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin	156
4.2.	GENERELLE CHEMISCH-ÖKOLOGISCHE BETRACHTUNG	159
4.3.	KINASEN- UND ZELLKULTURINHIBITIONSASSAYS	163
4.3.1.	Ellagsäure	163
4.3.2.	β -Sitosterol	170
4.3.3.	<i>E</i> - und <i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	171
4.4.	INHIBIERUNG DER UVA1-INDUZIERTEN ICAM-1 EXPRESSION	173
4.4.2.	Möglicher Wirkmechnismus der ICAM-1 Expressionsunterdrückung	177
4.6.	ZYTOTOXISCHER ASSAY MIT DAMMARENOLSÄUREDERIVATEN	185

5. BIOGENETISCHER ZUSAMMENHANG DER ISOLIERTEN SUBSTANZEN **188**

6. LITERATURVERZEICHNIS **193**

7. ANHANG **217**

7.1. SUBSTANZTABELLEN	217
7.2. ROHDATEN DER QUANTIFIZIERUNGEN	220
7.2.1. Quantifizierung von Ellagsäurederivaten in Zweigen von <i>Sonneratia alba</i> (Sonneratiaceae)	220
7.2.2. Quantifizierung von Taraxerolderivaten in den Blättern von <i>Rhizophora stylosa</i> (Rhizophoraceae)	222
7.3. TABELLARISCHE AUFLISTUNGEN DER INSEKTENBIOASSAYERGEBNISSE	223
7.4. NMR SPEKTREN	235
7.4.1. NMR Spektren der Ellagsäurederivate	235
7.4.2. NMR Spektrum von β -Sitosterol	239
7.4.3. NMR Spektren von <i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol, <i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol, <i>Z</i> -Coumaroyl-Taraxerol und <i>E</i> -Coumaroyl-Taraxerol	240
7.4.4. NMR Spektren der semisynthetischen Lupeol-, Cholesterol- und β -Sitosterol – Derivate	243
7.4.5. NMR Spektren der insektiziden Vergleichssubstanzen	250
7.4.6. Weitere Naturstoffe aus Mangroven	253
7.5. KOOPERATIONSPARTNER	257
7.6. ABKÜRZUNGEN	259
7.7. DANKSAGUNGEN	262
7.9. LEBENSLAUF	264
7.8. ERKLÄRUNG	265

1. Einleitung

1.1. Wirkstoffe aus der Natur

Sessile Organismen wie Pflanzen sind ständig verschiedenen abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Aufgrund ihrer Unfähigkeit durch Standortwechsel auf diese Faktoren zu reagieren, haben Pflanzen im Laufe der Evolution verschiedene molekulare Mechanismen entwickelt, ihr Gewebe vor schädigenden Umweltfaktoren zu schützen.

Diese molekularen Mechanismen können auf Proteinebene stattfinden, indem z.B. in die Zellmembran integrierte Ionentransporter den Elektrolyshaushalt einer Pflanze regulieren [Wong *et al.* 2007], damit trotz extremer Umweltbedingungen immer physiologisch optimale Bedingungen innerhalb des Organismus' herrschen.

Eine weitere Möglichkeit, sich gegen Stressfaktoren zu schützen, ist die Biosynthese von sekundären Pflanzenstoffen, die verschiedenste Schutzmechanismen entfalten können.

Diese Naturstoffe können entweder eingelagert werden, oder auch wie im Falle von Carotinoidderivaten bei Tomaten auf die Oberfläche sezerniert werden, um das darunter liegende Gewebe vor zu starker UV-Strahlung zu schützen [Ralley *et al.* 2004]. Den durch Carotinoidderivate vermittelten UV-Schutz versucht man sich auch im humanmedizinischen Bereich zu Nutze zu machen [Sies und Stahl 2004].

Naturstoffe, die gegen Insektenbefall schützen, können wie im Falle von jungen Solanaceenfrüchten entwicklungsabhängig in verschiedenen Organen eingelagert werden, in denen im frühen Entwicklungsstadium zuweilen eine nicht zu unterschätzende Konzentration an Nikotin nachzuweisen ist [Siegmond *et al.* 1999]. Auch der Transport von Alkaloiden ist einem komplexen Transportsystem unterworfen, sodass die Organe in

denen die Naturstoffe synthetisiert werden, teilweise weit entfernt von Organen liegen, in die die Naturstoffe eingelagert werden [Shitan und Yazaki 2007].

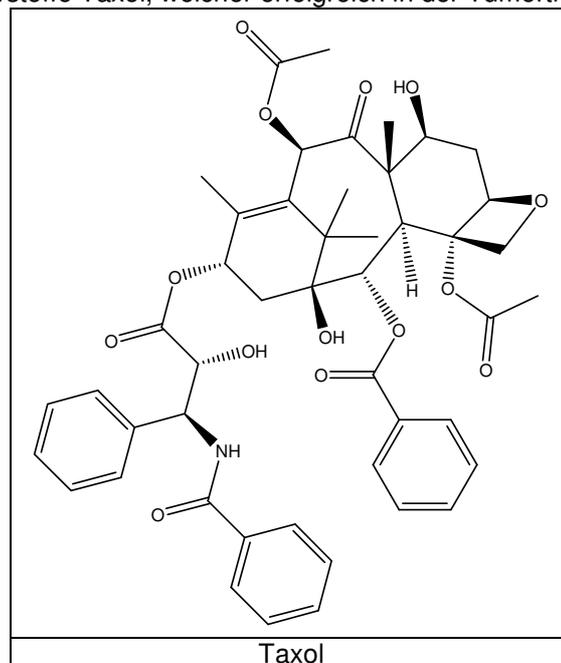
Andere sekundäre Pflanzenstoffe werden jedoch erst nach Notwendigkeit synthetisiert. Die dafür notwendigen Enzyme werden erst nach Kontakt mit bestimmten Elicitoren bestimmter Schädlinge wie Pilzen, Bakterien oder Insekten transkribiert und translatiert [Zhao *et al.* 2005; Alvarez 2000; Kandoth *et al.* 2007].

1.2. Naturstoffe im Anwendungsbereich

1.2.1. Beispiele für Zytostatika

Für die Krebstherapie werden immer neue Strukturen und Wirkstoffe gesucht. Dabei lassen sich durchaus auch im Pflanzenreich Naturstoffe finden, die eine zytostatische Wirkung entfalten. Hierzu gehört z.B. Taxol [Rowinsky *et al.* 1990] (Tab. 1.2.1.).

Tab. 1.2.1: Der Naturstoffe Taxol, welcher erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt wird

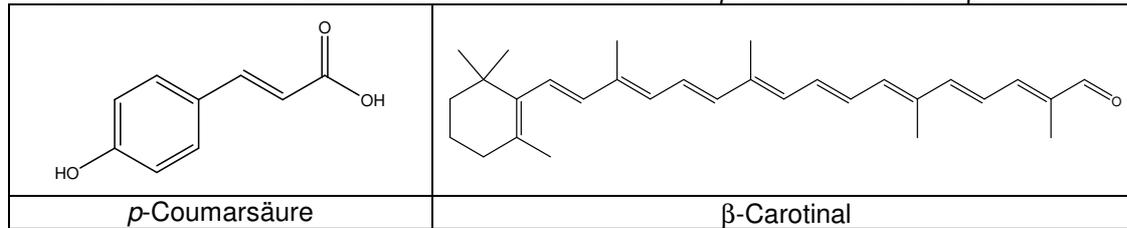


Für die Erforschung und Entdeckung zytostatischer Substanzen gibt es mehrere verschiedene prinzipielle Vorgehensweisen.

Zum einen kann die Toxizität direkt an Krebszellkulturen verschiedener Organe untersucht werden (*in vitro*), oder es können Inhibitionsassays durchgeführt werden, die die inhibitorischen Aktivitäten direkt an bestimmten Targets bestimmen. Hierzu werden meist Proteine verwendet, die sich als besonders gute Angriffspunkte (Pharmatargets) in der Krebstherapie herausgestellt haben, weil die Hemmung dieser Proteine eine sich schnell teilende Zelle entweder sofort tötet, die krankhafte Proliferation inhibiert oder diese Proteine im Rahmen der Ontogenese hochreguliert sind und bei deren Hemmung das Krebszellwachstum verlangsamt oder verhindert werden kann.

1.2.2. Beispiel für UV-schützende Wirkung von Naturstoffen

Die UV-Belastung ist in vielen Teilen der Welt aufgrund des geografischen Breitengrades oder aufgrund der geografischen Nähe zu Bereichen, in denen die Ozonschicht geschädigt ist, sehr hoch. Das UV-Licht wird in drei Wellenlängenbereiche eingeteilt: UVA, UVB und UVC. UVB und UVA dringen in fast unveränderter Intensität bis zur Erdoberfläche durch die Atmosphäre durch und können Auslöser für Sonnenbrände und Hautkrebs sein [Leiter und Garbe 2008]. Insofern erscheint es zweckmäßig, Substanzen zu finden, die auf die Haut aufgetragen einen erhöhten Schutz vor UVB und UVA Strahlung bewirken. In Sonnenschutzmitteln können bereits anorganische Verbindungen, wie Titandioxid oder auch organische Verbindungen, wie Carotinoide [Sies und Stahl 2004] oder *p*-Coumarsäure [Lodovici *et al.* 2003] enthalten sein (Tab. 1.2.2.). Es ist ebenso bekannt, dass eine erhöhte UVB Belastung in Pflanzen eine erhöhte Biosyntheserate von *p*-Coumarsäure induziert [Rozema *et al.* 2001]. Anorganische sowie organische Substanzen bewirken entweder eine Absorption oder eine Reflexion des UV-Lichts. In beiden Fällen wird durch die Applikation verschiedener Substanzen versucht, die Haut vor eindringendem UV-Licht zu schützen.

Tab. 1.2.2.: Zwei UV-Licht absorbierenden Substanzen: *p*-Coumarsäure und β -Carotinal

Organische, UV-Licht-absorbierende Substanzen, sind typischer Weise dadurch charakterisiert, dass ihre Absorptionsmaxima im Bereich des UVA, UVB oder UVC Lichtes liegen. Um diese physikalische Eigenschaft zu besitzen, müssen diese Substanzen idealer Weise ein konjugiertes π -Elektronensystem von mehreren konjugierten Doppelbindungen und/oder Aromaten besitzen.

Ein weiterer Schritt in Richtung UV-Schutz der zweiten Generation ist die Erforschung von Substanzen, die in das Hautgewebe eindringen können, um dort bestimmte Signaltransduktionskaskaden zu hemmen, die unter Umständen krankhafte Reaktionen des Hautgewebes begünstigen könnten.

1.2.3. Beispiel für Insektizide

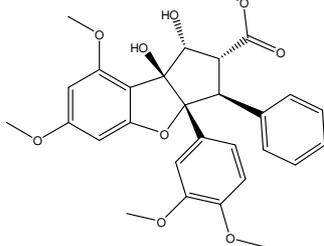
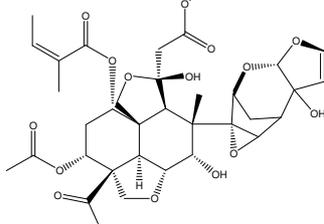
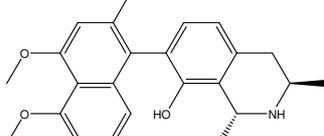
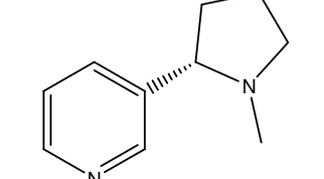
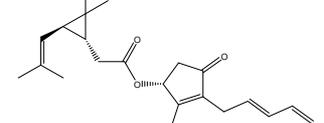
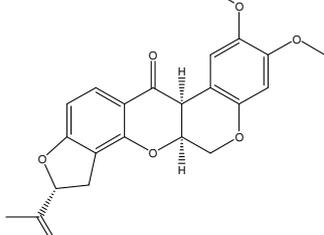
Durch den Befall von Insekten werden große Teile der Erntemenge vernichtet [Hosny *et al.* 1986]. Der dadurch entstehende Kapazitätsausfall an Erntemenge besitzt eine nicht zu unterschätzende sozioökonomische Bedeutung. Nicht nur der Bestand an Nahrungsmittelpflanzen ist gefährdet, sondern auch der Bestand anderer Nutzpflanzen (Hanf für Zellstoff, Raps für Biodiesel), deren Anbauflächen aber wiederum mit der Kulturfläche der Nahrungsmittelpflanzen konkurrieren. Um die gleiche oder eine gesteigerte Nahrungsmittelmenge für den Markt zu produzieren, muss somit pro Flächeneinheit eine immer höhere Ertragsleistung erzielt werden. Für das Erreichen dieses Zieles spielen mehrere Faktoren eine wichtige Rolle. Zu diesen Faktoren zählt die Pflanzenernährung einerseits, andererseits aber auch Schädlingsbekämpfungsmittel gegen Pilze, Bakterien, Insekten und andere Schädlinge. Für Menschen in den Industrienationen hat ein

Ernteausschlag meist lediglich eine finanzielle Bedeutung, in den meisten Ländern der dritten Welt ist ein Ernteausschlag, sofern es sich um Nahrungsmittel handelt, jedoch lebensbedrohlich. Für den kommerziellen Einsatz von Insektiziden werden neben den nicht der Natur nachempfundenen Substanzen auch Naturstoffe verwendet, die teilweise wiederum als Leitstrukturen für die Synthese neuer Substanzen fungieren.

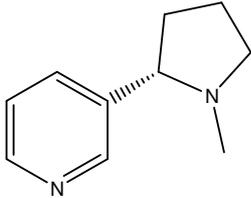
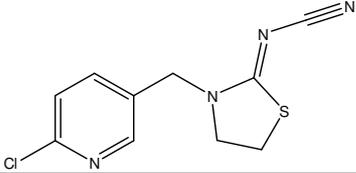
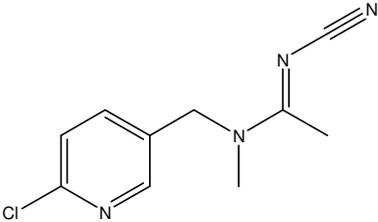
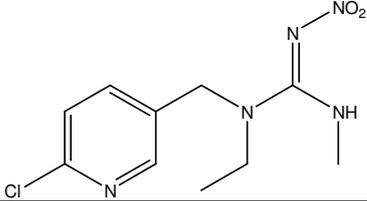
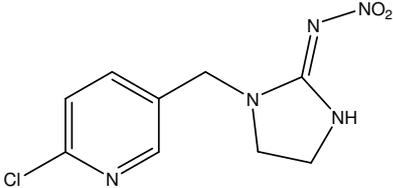
Ein klassisches Beispiel hierfür ist Nikotin, welches in Form eines Nikotin – Ölsäure Komplexes ausgebracht werden kann [Casanova *et al.* 2002]. Zudem fungiert Nikotin als Leitstruktur für die Synthese neuer Insektizide, deren Ziel es ist, im Gegensatz zu Nikotin, nur mit insektenspezifischen Strukturelementen des nikotinergeren Rezeptors zu interagieren, um eine Toxizität für Wirbeltiere, insbesondere für Menschen auszuschließen [Millar und Denholm 2007] (Tab. 1.2.3.a).

Auch Azadirachtin [Ley *et al.* 1993], die Naturstoffe des Neembaumes können kommerziell als Extrakt eingesetzt werden [Coria *et al.* 2008]. Dennoch sind im Fall von Azadirachtin noch keine nennenswerten Syntheseergebnisse zu verzeichnen, sodass Azadirachtin eher einen kleinen Marktanteil einnimmt. Dennoch sind erste Erfolge zu verzeichnen, Azadirachtin biotechnologisch über Zellkulturen zu gewinnen [Satdive *et al.* 2007]. Weitere aus Naturstoffquellen erstmals entdeckte Substanzen sind Rotenonderivate aus der Wurzel des Barbascotrauches oder Pyrethroide aus den Blütenböden von verschiedenen Chrysanthemenarten (Tab. 1.2.3.b). Rotenon besitzt neben einer starken insektiziden Aktivität [Cabizza *et al.* 2004] auch ichthyotoxische [Teixeira *et al.* 1984] und zytotoxische Aktivitäten gegen verschiedene humane Krebszelllinien [Blaskó *et al.* 1989]. Nicht nur letale Insektizide, sondern auch Repellenzien sind aus der Natur bekannt. Durch die fraßhemmenden Eigenschaften von Naturstoffen werden Fraßinsekten ferngehalten, diese aber jedoch nicht nachhaltig geschädigt. Ein gut charakterisiertes Repellent ist das Zimtöl, das schon in sehr geringen Konzentrationen eine repellente Wirkung auf Insekten entfaltet [Zhu *et al.* 2006].

Tab. 1.2.3.a: Beispiele für Naturstoffe mit stark ausgeprägter insektizider Wirkung

3'-Methoxy-Rocaglamidsäure-Methylester		[Schneider <i>et al.</i> 2000]
Azadirachtin		[Ley <i>et al.</i> 1993]
Dioncophyllin A		[Bringmann <i>et al.</i> 1997]
Nikotin		[Millar und Denholm 2007]
Pyrethrin I		[Elliott <i>et al.</i> 1965]
Rotenon		[Cabizza <i>et al.</i> 2004]

Tab. 1.2.3.b: Synthetische Nikotinanaloga [aus Millar und Denholm 2007]

Naturstoff		Beispiele für synthetische Analoga
<p>Nikotin</p>		<p>Thiacloprid</p> 
		<p>Acetamiprid</p> 
		<p>Nitenpyram</p> 
		<p>Imidacloprid</p> 

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, aus Mangrovenpflanzen der südchinesischen Insel Hainan bioaktive Naturstoffe zu isolieren. Mangroven sind eine ökologische und keine phylogenetisch einheitliche Pflanzengruppe. Pflanzen aus allen Familien werden als Mangroven bezeichnet, sofern sie in tropischer Küstennähe in den Gezeitenzonen angesiedelt sind. Viele Mangroven stehen mit ihren Wurzeln direkt im salzhaltigen Wasser. Der hohe Salzgehalt des Wassers stellt einen besonderen abiotischen Stressfaktor für diese Pflanzen dar. Diesem Salzstress können Mangroven mithilfe von Proteinen [Wong *et al.* 2007] oder Sekundärstoffen wie Sterolen entgegenwirken, die bei erhöhtem Salzstress in den Wurzeln vermehrt eingelagert werden [Oku *et al.* 2003].

Da viele Mangrovenpflanzen sehr selten sind und außergewöhnliche Sekundärstoffe bilden können, stellen sie eine interessante Quelle für die pflanzliche Naturstoffchemie dar. Von vielen Mangrovenpflanzen sind traditionelle Verwendungszwecke der einheimischen Bevölkerung bekannt [Bandaranayake 1998]. Neben den klassischen Verwendungszwecken der Holzbestandteile als Baumaterialien sind aber auch hochspezifische Verwendungszwecke wie die humane männliche Sterilitätsinduktion durch den Verzehr der Blätter von *Lumnitzera racemosa* bekannt [Bandaranayake 1998].

Zunächst wurden in dieser Arbeit die Zweige und Blätter von 15 zufällig ausgewählten Mangrovenarten (siehe Kapitel 2.1.1.2.) getrennt untersucht und auf Bioaktivität hin gescreent. Der primäre Screen wurde hinsichtlich der Bioaktivität auf Insekten durchgeführt. Nachdem durch Bioassay-Guided-Isolation (BAGI) die bioaktiven Naturstoffe isoliert und identifiziert werden konnten, wurden diese Substanzen auch in anderen Testsystemen auf ihre Bioaktivitäten hin untersucht, um neben den insektiziden Wirkungen unter Umständen neue biologische Aktivitäten beschreiben zu können.

1.3.1. Folgende Bioaktivitäten wurden untersucht

Da das Hauptziel dieser Arbeit darin bestand, neue Bioaktivitäten für Substanzen aus Mangrovenpflanzen zu beschreiben, flossen die Substanzen in folgende Bioassays ein. Diese Bioassays wurden gezielt ausgewählt, da im Zusammenhang dieser Substanzen keinerlei Daten hinsichtlich dieser Bioaktivitäten bekannt waren.

- Bioaktivität auf Insekten: Als Bioaktivität wird hierunter nicht nur eine letale Aktivität gezählt, sondern auch eine stark gewichtsreduzierende, entwicklungsmodifizierende oder fraßhemmende Aktivität. Zum Vergleich wurden klassische insektizide Naturstoffe isoliert und getestet.

- UV-Schutz: Über eine UVA1 induzierte Signaltransduktionskaskade, deren Ursprung membrangebundene Ceramide sind, werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Transkription des membrangebundenen Rezeptors ICAM-1 regulieren [IUF aktuell 01/2002]. Der ICAM-1 Rezeptor ist auch unter dem Namen CD54 bekannt, und spielt eine Rolle in der Immunantwort [Sligh *et al.* 1993]. ICAM-1 vermittelte Entzündungsreaktion können das zentrale Nervensystem [Miklossy *et al.* 2006] oder den respiratorischen Trakt bei Asthma [van de Stolpe und van der Saag 1996] betreffen. Diese durch den ICAM-1 Rezeptor vermittelte Aktivität ist mit ein Grund für Sonnenbrände und andere UV-Licht abhängige Entzündungsreaktionen, die bis hin zu malignen Melanomen führen können [Roland *et al.* 2007; Weishaupt *et al.* 2007; Donadio *et al.* 2002]. Die direkte Korrelation zwischen UV Belastung und der Expression von ICAM-1 kann genutzt werden, um die Bioaktivität von Substanzen hinsichtlich ihrer ICAM-1 Hemmung zu untersuchen. Demnach kann nach der Applikation bestimmter Substanzen die verminderte Expression von ICAM-1 mittels Polymerasekettenreaktion bestimmt werden. Für diesen Zweck wird ein ICAM-1 mRNA spezifisches Primerpaar eingesetzt. Die dadurch amplifizierte Menge an DNA ist ein

direktes Maß für die ICAM-1 Expression. Um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung abzuleiten, wurden entweder synthetische Analoga kommerziell erworben oder verschiedene Derivate im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert, die in die verschiedenen Bioassays eingeflossen sind.

- Tumortherapie: Einige Substanzen wurden hinsichtlich ihres anwendbaren Potentials für die Tumortherapie untersucht. Zum einen wurde auf inhibitorische Wirkung an rekombinant hergestellten menschlichen Kinasen getestet. Zum anderen wurden die Substanzen direkt auf Zelllinien appliziert, um ihre Wirkungen im zellulären System zu untersuchen. Aus dem Vergleich dieser beiden Ansätze sollen Schlüsse gezogen werden.

- Weiter wurden einige Terpene hinsichtlich ihrer antiphlogistischen Aktivität untersucht.

Zudem wurden für Interpretationen bezüglich der chemischen Ökologie wurden die Konzentrationen einiger Substanzen in den Stammpflanzen semiquantativ bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzen- und Tiermaterial

2.1.1. Mangroven

2.1.1.1. Vorkommen der untersuchten Mangrovenpflanzen

Proben verschiedener Mangrovenpflanzen wurden im Mangrovengarten auf der südchinesischen Inselprovinz Hainan gesammelt (Abb. 2.1.1.1.b). Hainan ist eine Insel im Südchinesischen Meer und zugleich die südlichste Provinz der Volksrepublik China, die seit 1988 den Status einer Sonderentwicklungszone hat. Hainan dehnt sich vom 18° - 20° nördlicher Breite und vom 108° - 111° östlicher Länge aus (Abb. 2.1.1.1.a). Die Fläche von Hainan ist vergleichbar mit der Fläche von Nordrhein-Westfalen (ca. 34.000 Quadratkilometer).



Abb. 2.1.1.1.a: Die geografische Lage der chinesischen Inselprovinz Hainan an deren Nordküste das Mangrovenpflanzenmaterial gesammelt wurde (Quelle: CIA World Factbook)



Abb. 2.1.1.1.b: Impressionen aus dem Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan (M. Bayer, April 2006)

2.1.1.2. Mangrovenarten für den ersten Testscreen

Tab. 2.1.1.2.a: Nach insektiziden Inhaltsstoffen gescreente Mangrovenarten
(Phylogenetische Einordnung nach [<http://plants.usda.gov/>])

Pflanzenname	Familie
<i>Avicennia marina</i> (FORSSK.) VIERH.	Acanthaceae
<i>Barringtonia racemosa</i> (L.) SPRENG.	Lecythidaceae
<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> (L.) LAM.	Rhizophoraceae
<i>Bruguiera sexangula</i> (LOUR.) POIR.	Rhizophoraceae
<i>Kandelia candel</i> (L.)	Rhizophoraceae
<i>Laguncularia racemosa</i> (GAERTN.)	Combretaceae
<i>Lumnitzera racemosa</i> (WILLD.)	Combretaceae
<i>Lumnitzera littorea</i> (GAUDICH.)	Combretaceae
<i>Pluchea indica</i> (LESS.)	Asteraceae
<i>Rhizophora apiculata</i> (BLUME.)	Rhizophoraceae
<i>Rhizophora mucronata</i> (LAM.)	Rhizophoraceae
<i>Sonneratia alba</i> (SM.)	Sonneratiaceae
<i>Sonneratia caseolaris</i> (L.) ENGL.	Sonneratiaceae
<i>Sonneratia ovata</i> (BAKER.)	Sonneratiaceae
<i>Xylocarpus granatum</i> (J.KOENIG)	Meliaceae

Von jeder Pflanze (Tab. 2.1.1.2.a) wurden etwa 40 g Frischgewicht Blätter und/oder Zweige gesammelt, in Düsseldorf gefriergetrocknet und mittels Methanol Rohextrakte hergestellt. Die Identifizierung der Pflanzen dieser Sammlung und der Pflanzen für die Herstellung der Großextrakte geschah durch Prof. Lin Peng von der Xiamen University. Vergleichsproben sind unter dem Aktenvermerk M-011 an der Universität Peking eingelagert.

Um eine erste Auswahl zu treffen, welche Organe bestimmter Mangrovenarten sich für die Suche nach insektiziden bzw. bioaktiven Substanzen eignen, wurden methanolische Extrakte verschiedener Organe verschiedener Mangrovenarten hergestellt (jeweils aus 1 g Trockengewicht). Dieser Extrakt wurde in einer Konzentration von 2200 ppm (10 mg Absolutgewicht eines methanolischen Extraktes (Berechnung siehe Tab. 2.3.2.1.2)) in einen Insektentest eingebracht. Die Ergebnisse dieses Testes wurden hinsichtlich der Überlebensrate und der Gewichtsrate ausgewertet (Abb. 2.1.2.2.a und Abb. 2.1.1.2.b).

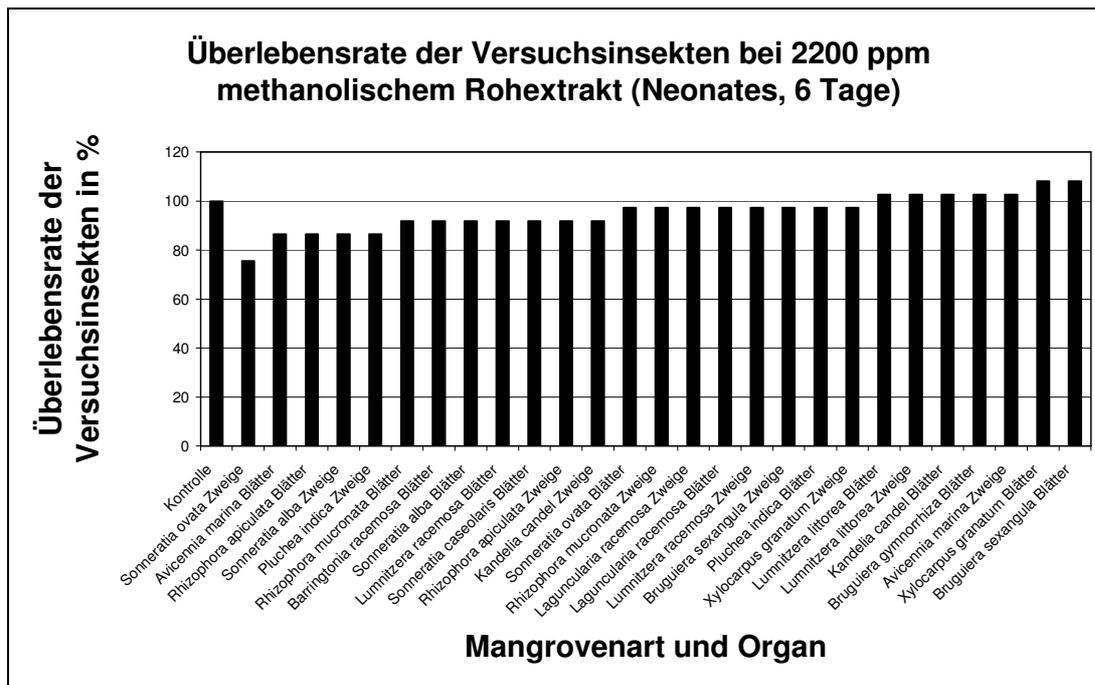


Abb. 2.1.1.2.a: Überlebensrate der Versuchsinsekten nach einem ersten Screeningversuch mit dem methanolischen Rohextrakt verschiedener Organe verschiedener Mangrovenarten

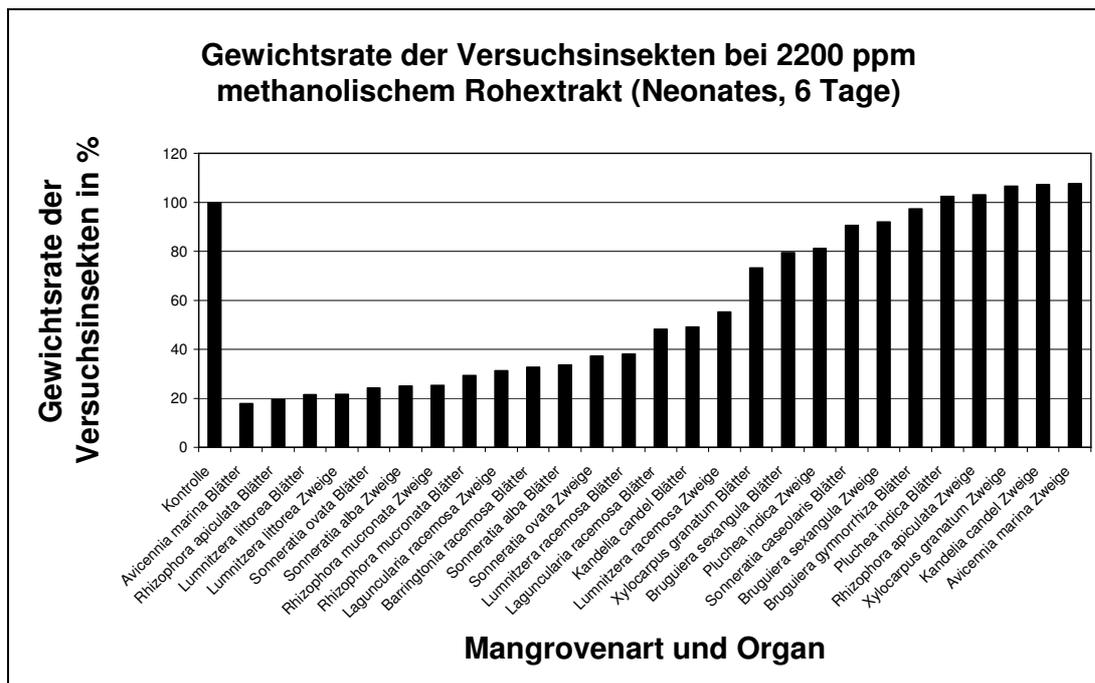


Abb. 2.1.1.2.b: Gewichtsrate der Versuchsinsekten nach einem ersten Screeningversuch mit dem methanolischen Rohextrakt verschiedener Organe verschiedener Mangrovenarten

Die Reduktion der Lebensrate war in allen Testansätze nicht als signifikant anzusehen, deshalb wurde als Auswahlkriterium die Gewichtsrate herangezogen, um bestimmte Pflanzen für Großextrakte auszuwählen.

Um die Bioaktivität auf Substanzgruppen und nicht auf den Gesamtextrakt zu reduzieren, wurden von diesen Pflanzenproben die Rohextrakte erst durch flüssig/flüssig Extraktion und anschließend durch säulenchromatografische Schritte fraktioniert. Dabei konnte festgestellt werden, dass durch das Auftrennen des Rohextraktes der Blätter von *Avicennia marina* die Bioaktivität verloren ging.

Zur Auswahl standen demnach die Blätter von *Rhizophora apiculata* und von *Lumnitzera littorea*, die Blätter von *Sonneratia ovata*, die Zweige von *Sonneratia alba* sowie die Zweige und Blätter von *Rhizophora mucronata*.

Im Frühjahr 2006 wurde eine Expedition in den Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gestartet, mit dem Ziel Proben von *Rhizophora apiculata* (Blätter), *Lumnitzera littorea* (Blätter), *Sonneratia ovata* (Blätter), *Sonneratia alba* (Zweige) und *Rhizophora mucronata* (Blätter) zu sammeln. Jedoch war es nur möglich, Proben von *Rhizophora apiculata* (Blätter), *Lumnitzera littorea* (Blätter) und *Sonneratia alba* (Zweige) zu sammeln, um das frische Pflanzenmaterial anschließend an der Universität Peking unter Leitung von Prof. Dr. Wenhan Lin mittels 90%igem Ethanol zu extrahieren. Dazu wurden die Blätter der Mangroven (jeweils etwa 4,5 kg Frischgewicht) im frischen Zustand in etwa 0,5 cm² große Stücke mittels einer Schere zerschnitten und anschließend in einem Plastikeimer dreimal mit jeweils 10 Liter 90%igem Ethanol über Nacht extrahiert. Die etwa 5 kg Zweige (Frischgewicht) wurden mittels einer kleinen Gartenmaschine in kleinere Stücke von etwa 1 cm Länge und etwa 2 mm Breite und Tiefe zerschnitten. Anschließend wurden die Holzstückchen wie auch die zerschnittenen Blätter in einem Plastikeimer dreimal mit jeweils 10 Liter 90%igem Ethanol über Nacht extrahiert.

Tab. 2.1.1.2.b: Taxonomie der Mangrovenpflanzen, von denen im April 2006 etwa 4,5 kg Frischgewicht gesammelt wurde (Phylogenetische Einordnung nach [<http://plants.usda.gov/>])

<p>Blätter von <i>Rhizophora apiculata</i></p> <p>Phylogenetische Einordnung:</p> <p>Reich: Plantae Unterreich: Tracheobionta Überabteilung: Spermatophyta Abteilung: Magnoliophyta Klasse: Magnoliopsida Unterklasse: Rosidae Ordnung: Rhizophorales Familie: Rhizophoraceae Gattung: Rhizophora Art: <i>Rhizophora apiculata</i> (BLUME.)</p>	<p>Blätter von <i>Lumnitzera littorea</i></p> <p>Phylogenetische Einordnung:</p> <p>Reich: Plantae Unterreich: Tracheobionta Überabteilung: Spermatophyta Abteilung: Magnoliophyta Klasse: Magnoliopsida Unterklasse: Rosidae Ordnung: Myrtales Familie: Combretaceae Gattung: Lumnitzera Art: <i>Lumnitzera littorea</i> (GAUDICH.)</p>
<p>Zweige von <i>Sonneratia alba</i></p> <p>Phylogenetische Einordnung:</p> <p>Reich: Plantae Unterreich: Tracheobionta Überabteilung: Spermatophyta Abteilung: Magnoliophyta Klasse: Magnoliopsida Unterklasse: Magnoliidae Ordnung: Magnoliales Familie: Sonneratiaceae Gattung: Sonneratia Art: <i>Sonneratia alba</i> (SM.)</p>	

2.1.2. Nicht mangrovenassoziierte Pflanzen als Vergleich zur Untersuchung der insektiziden Aktivität

2.1.2.1. *Aglaia* (*Aglaia duppereana*, Meliaceae)

Arten der Gattung *Aglaia* sind im indochinesischen Gebiet beheimatet. Die Blüten und Blätter dieser Pflanzen werden aufgrund ihrer entzündungshemmenden Inhaltsstoffe in der traditionellen vietnamesischen Medizin in Form von Tee verabreicht. Die antiphlogistisch wirkenden Naturstoffe sind dieselben, die auch als insektizide Naturstoffe identifiziert wurden [Proksch *et al.* 2005; Baumann *et al.* 2002]. Hierbei handelt es sich

um die Rocaglamide, die sich biosynthetisch wahrscheinlich aus Flavonoiden und Cinnamoylamiden ableiten [Nugroho *et al.* 1999]. Die Gattung *Aglaia* ist wie der Neembaum ebenfalls ein Vertreter der Familie der Mahagoniegewächse (Meliaceae).

Die insektizide Wirkung dieser Substanzen ist schon für viele verschiedene Rocaglamidderivate beschrieben worden [Duong NT, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Rocaglamidderivat aus den Blüten von *Aglaia duppereana* isoliert und im Insektizidbioassay eingesetzt, um die Aktivität der aus Mangroven isolierten Substanzen in Relation zu schon bekannten insektiziden Naturstoffen zu stellen. Auch wenn sich bei der Totalsynthese von Rocaglamiden noch keine Erfolge verzeichnen lassen, die einen großflächigen Einsatz dieser Naturstoffe begünstigen würden, werden in Vietnam verdünnte ethanolische Extrakte von *Aglaia*-Pflanzenteilen in Kombination mit Saponinen als Lösungsvermittler auf Felder ausgebracht, um das Erntegut vor Insektenbefall zu schützen. Dieser Erfolg spricht für sich, aber vor einem großflächigen Einsatz dieser *Aglaia*-Extrakte ist im Sinne des Schutzes vor großflächiger Abholzung dieser Bäume zu warnen.

Die hier verwendeten Blüten von *Aglaia duppereana* wurden in Vietnam im Dezember 2006 gesammelt. Die Identifizierung wurde von Dr. Tran Ngoc Ninh, BSc. Nguyen Kim Dao und Dr. Nguyen Trong Son vorgenommen und eine Probe wurde am Institut für Chemie an der Vietnamese Academy of Science in Hanoi eingelagert.

2.1.2.2. *Ryania* (*Ryania speciosa*, Flacourtiaceae)

Ryania ist eine in Mittel- und Südamerika beheimatete Pflanzengattung aus der Familie der Flacourtiaceae. Ihre Inhaltsstoffe, die Diterpenalkaloidderivate vom Typ des Ryanodins sind namensgebend für den muskulär vorkommenden Ryanodinrezeptor, von dem es je nach Muskelzellentyp 3 verschiedene Untertypen gibt [Sutko *et al.* 1997]. Das insektizide Potential von Ryanodinderivaten wurde Mitte des 20. Jahrhunderts entdeckt [Rogers *et al.* 1948]. Die Grundstruktur mit mehr als

10 Stereozentren wurde bereits 1970 mittels Röntgenstrukturkristallografie absolut bestimmt [Srivastava und Przybylska 1970].

2.2. Insekten

2.2.1. *Spodoptera littoralis* (Boisduvall, Lepidoptera: Noctiudae)

Spodoptera littoralis ist ein polyphager Schädling, der im gesamten europäischen und asiatischen Mittelmeerraum, aber auch vor allem in Afrika und Nordafrika beheimatet ist. Die Baumwolleneule ist polyresistent gegen viele Insektizide und sehr robust. Somit stellt diese Schadinsektenart ein optimales Testsystem für die Erforschung von Insektiziden dar. Von den in diesem System als insektizid identifizierten Stoffen kann aufgrund der Robustheit von *Spodoptera littoralis* angenommen werden, dass diese Substanzen auch für andere, nicht derart robuste Schadinsektenarten toxisch sind.

2.3. Bioassays

2.3.1. Bioassay-guided-Isolation (BAGI)

Die Methode der Bioassay-guided-Isolation (BAGI) wird angewendet, um gezielt Inhaltsstoffe mit insektizider Wirkung zu isolieren. Zuerst werden die Rohextrakte mit einer relativ hohen Konzentration von 2200 ppm gescreent. Bei festgestellter Bioaktivität werden die Rohextrakte in *n*-Hexan, Ethylacetat und Wasser durch flüssig-flüssig Extraktion aufgeteilt und jede Fraktion erneut einem Insektizidtest unterzogen. Hierbei wird eine um die Hälfte reduzierte Konzentration eingesetzt (1100 ppm). Die dann sich als wiederum aktive Fraktion herausgestellten Phasen werden weiter mithilfe säulenchromatografischer Methoden aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen,

die meist noch Stoffgemische darstellen, werden wiederum einem Insektizidtest unterzogen. Dabei wird die Konzentration auf 550 ppm reduziert. Weitere säulenchromatografische Aufreinigungsschritte und Bioassays führen letztendlich zu den Reinsubstanzen, mit denen nach der Strukturaufklärung Bioassays in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden.

2.3.2. Insektenbioassay

Die insektizide Wirkung wird an der polyphagen Schädlingsart *Spodoptera littoralis* untersucht, die in weiten Teilen der Welt für Ernteauffälle verantwortlich ist [Hosny *et al.* 1986]. Von dieser Art ist auch bekannt, dass sie resistent gegenüber verschiedenen Insektiziden ist, die auf andere Schädlingsarten toxische Wirkungen in geringen Konzentrationen entfalten.

2.3.2.1. Durchführung der Bioassays

2.3.2.1.1. Herstellung des Kunstfutters

600 g weiße Bohnen werden über Nacht in 1600 mL Leitungswasser zum Quellen gebracht. Am nächsten Tag werden die gequollenen Bohnen mit einem Mixer zu einem homogenen Brei zerkleinert und es werden 8 Päckchen Hefe, 12 g Nipagin, 12 g Vitamin C und 4 mL Formaldehyd hinzugegeben. Die Bohnenmasse wird gut durchmengt und auf mehrere 500 mL Bechergläser verteilt, die 48 Stunden bei -80 °C eingefroren werden. Anschließend werden die Gläser mit der gefrorenen Bohnenmasse für insgesamt eine Woche in die Gefriertrocknungsanlage gestellt. Danach wird die getrocknete Bohnenmasse mit einer Drogenmühle zu feinem Pulver gemahlen, welches bei -20 °C eingelagert wird.

2.3.2.1.2. Herstellung der Bioassayansätze

0,735 g der gemahlene Bohnenmasse werden in einen kleinen Plastiktopf (Urinbecher) abgewogen. Die zu testende Substanzmenge wird in 1500 μL Methanol, Ethylacetat oder *n*-Hexan gelöst und auf das Pulver gegeben, sodass das gesamte Pulver vom Lösungsmittel bedeckt ist. Zum Trocknen wird das Töpfchen über Nacht unter dem Abzug deponiert. Das angetrocknete Pulver wird am nächsten Tag mit einem sauberen Spatel wieder aufgelockert und pulverisiert. Über eine Stocklösung (0,532 mg/mL) werden 1,41 mL (0,75 mg) Gentamycinsulfat auf das Pulver gegeben. Über eine weitere Stocklösung (35,455 mg/mL) wird Agar aufgeköcht und jeweils 2,2 ml (78 mg) in jedes Plastiköpfchen abgefüllt. Danach wird die komplette Masse mit einem sauberen Glasstab (20 cm Länge, 4 mm Durchmesser) gut durchmengt. Nach etwa 15 min ist der Agar fest und die Probe bereit für den Bioassay (Tab. 2.3.2.1.2.).

Tab. 2.3.2.1.2.: Basierend auf der beschriebenen Durchführung des Insektizidbioassays können folgende Einwaagen bzw. Konzentrationen berechnet werden

0,1	mg	=	22	ppm	0,735 mg gefriergetrocknetes Raupenfutter + 0,75 mg Gentamycin in 1,41 mL Wasser + 78 mg Agar in 2,2 mL Wasser + Substanz: Mittelwerte aus Kochversuchen = 4,65 g pro Futterstück \uparrow Basis für alle Konzentrationsberechnungen: 4,65 g pro Futterstück	20	ppm	=	0,09	mg
0,2	mg	=	43	ppm		40	ppm	=	0,19	mg
0,3	mg	=	65	ppm		60	ppm	=	0,28	mg
0,4	mg	=	86	ppm		80	ppm	=	0,37	mg
0,5	mg	=	108	ppm		100	ppm	=	0,47	mg
0,6	mg	=	129	ppm		120	ppm	=	0,56	mg
0,7	mg	=	151	ppm		140	ppm	=	0,65	mg
0,8	mg	=	172	ppm		160	ppm	=	0,74	mg
0,9	mg	=	194	ppm		180	ppm	=	0,84	mg
1	mg	=	215	ppm		200	ppm	=	0,93	mg
1,1	mg	=	237	ppm		220	ppm	=	1,02	mg
1,2	mg	=	258	ppm		240	ppm	=	1,12	mg
1,3	mg	=	280	ppm		260	ppm	=	1,21	mg
1,4	mg	=	301	ppm		280	ppm	=	1,30	mg
1,5	mg	=	323	ppm		300	ppm	=	1,40	mg
1,6	mg	=	344	ppm		320	ppm	=	1,49	mg
1,7	mg	=	366	ppm		340	ppm	=	1,58	mg
1,8	mg	=	387	ppm		360	ppm	=	1,67	mg
1,9	mg	=	409	ppm		380	ppm	=	1,77	mg
2	mg	=	430	ppm		400	ppm	=	1,86	mg
2,1	mg	=	452	ppm		420	ppm	=	1,95	mg
2,2	mg	=	473	ppm		440	ppm	=	2,05	mg
2,3	mg	=	495	ppm		460	ppm	=	2,14	mg
2,4	mg	=	516	ppm		480	ppm	=	2,23	mg
2,5	mg	=	538	ppm		500	ppm	=	2,33	mg
2,6	mg	=	559	ppm		520	ppm	=	2,42	mg
2,7	mg	=	581	ppm		540	ppm	=	2,51	mg

2,8	mg	=	602	ppm		560	ppm	=	2,60	mg
2,9	mg	=	624	ppm		580	ppm	=	2,70	mg
3	mg	=	645	ppm		600	ppm	=	2,79	mg
3,1	mg	=	667	ppm		620	ppm	=	2,88	mg
3,2	mg	=	688	ppm		640	ppm	=	2,98	mg
3,3	mg	=	710	ppm		660	ppm	=	3,07	mg
3,4	mg	=	731	ppm		680	ppm	=	3,16	mg
3,5	mg	=	753	ppm		700	ppm	=	3,26	mg
3,6	mg	=	774	ppm		720	ppm	=	3,35	mg
3,7	mg	=	796	ppm		740	ppm	=	3,44	mg
3,8	mg	=	817	ppm		760	ppm	=	3,53	mg
3,9	mg	=	839	ppm		780	ppm	=	3,63	mg
4	mg	=	860	ppm		800	ppm	=	3,72	mg
4,1	mg	=	882	ppm		820	ppm	=	3,81	mg
4,2	mg	=	903	ppm		840	ppm	=	3,91	mg
4,3	mg	=	925	ppm		860	ppm	=	4,00	mg
4,4	mg	=	946	ppm		880	ppm	=	4,09	mg
4,5	mg	=	968	ppm		900	ppm	=	4,19	mg
4,6	mg	=	989	ppm		920	ppm	=	4,28	mg
4,7	mg	=	1011	ppm		940	ppm	=	4,37	mg
4,8	mg	=	1032	ppm		960	ppm	=	4,47	mg
4,9	mg	=	1054	ppm		980	ppm	=	4,56	mg
5	mg	=	1075	ppm		1000	ppm	=	4,65	mg
5,1	mg	=	1097	ppm		1020	ppm	=	4,74	mg
5,2	mg	=	1118	ppm		1040	ppm	=	4,84	mg
5,3	mg	=	1140	ppm		1060	ppm	=	4,93	mg
5,4	mg	=	1161	ppm		1080	ppm	=	5,02	mg
5,5	mg	=	1183	ppm		1100	ppm	=	5,12	mg
5,6	mg	=	1204	ppm		1120	ppm	=	5,21	mg
5,7	mg	=	1226	ppm		1140	ppm	=	5,30	mg
5,8	mg	=	1247	ppm		1160	ppm	=	5,40	mg
5,9	mg	=	1269	ppm		1180	ppm	=	5,49	mg
6	mg	=	1290	ppm		1200	ppm	=	5,58	mg

Allgemeine Formeln zu Berechnung:

$$\text{mg in ppm: } f(x) = x \cdot \text{mg} \cdot 215 \frac{\text{ppm}}{\text{mg}}$$

$$\text{ppm in mg: } f(x) = x \cdot \text{ppm} \cdot \frac{1}{215} \cdot \frac{\text{mg}}{\text{ppm}}$$

2.3.2.1.3. Durchführung eines Wahlversuches

Wie in 2.3.2.1.2. beschrieben, wird jeweils ein Futterstück mit und ein Futterstück ohne zutestender Substanz hergestellt. Die beiden Futterstücke werden in einer genügend großen Dose in ca. 6 cm Entfernung voneinander

platziert. Danach werden 10 etwa 15-20 Tage alte Raupen in die Mitte zwischen den beiden Futterstück platziert und die Dose für 16 Stunden in den Inkubator (26°C, 16h Licht) gestellt. Nach Beendigung des Biotestes wird das Verum und das Placebo Futterstück aus der Dose herausgenommen, von den Futter- und Kotkrümeln mit einem Pinsel befreit, bei -80°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das Ursprungsgewicht eines dieser Futterstücke beträgt im gefriergetrockneten Zustand 754,55 mg. Anhand dieses Ursprungsgewichtes kann ermittelt werden, wie viel die Insekten von jedem Futterstück gefressen haben und diese verzehrte Menge wird im Verhältnis zueinander als Faktor ausgerechnet und grafisch dargestellt.

2.3.2.1.4. Spezielle Durchführung des Insektentests

Die mit dem Futter hergestellten Plastiköpfchen werden jeweils mit 10 Neonates bestückt und mit Parafilm und einem Fliegengitterstoff verschlossen. Die Insektentests werden in einem Brutschrank bei 26°C und 16 Stunden Licht am Tag inkubiert. Nach 6 Tagen werden die Raupen aus jedem Versuchsansatz genommen und einzeln auf einer Milligrammwaage gewogen. Anhand der notierten Gewichte können statistische Werte berechnet werden.

2.3.2.1.5. Vorteil des Bioassays an kompletten Insekten

Substanzen werden industriell häufig an isolierten Proteintargets oder Insektenzellkulturen getestet. Dadurch wird der gesamte Metabolismus des Körpers außer Acht gelassen und dies ist wahrscheinlich mit ein Grund, warum viele Substanzen, die an isolierten Targets eine Wirkung zeigten nicht weiter bioaktiv sind, sobald sie am ganzen Insekt getestet werden. Des Weiteren können hierbei auch Substanzen erforscht werden, die über einen noch unbekanntem Mechanismus agieren, von dem noch kein Proteintarget isoliert wurde. Weiter können auch unspezifische Aktionsmöglichkeiten wie

der Einfluss auf die Membrandynamik erforscht werden. In dem hier durchgeführten Test werden die Substanzen am ganzen Insekt untersucht. Zellkultur und Enzymbioassays wären hierbei nur noch relevant, um das genaue Target zu ermitteln.

2.3.2.2. Statistische Auswertung der Insektenbioassays

2.3.2.2.1. Folgendes Formelwerk wurde verwendet

Tab. 2.3.2.2.1.: MS-Excel Arbeitsblatt Programmierung für die Auswertung des Bioassays

	A	B	C
1		Kontrollgruppe	Konzentration/Substanz 1
2	Raupe 1		
3	Raupe 2		
4	Raupe 3		
5	Raupe 4		
6	Raupe 5		
7	Raupe 6		
8	Raupe 7		
9	Raupe 8		
10	Raupe 9		
11	Raupe 10		
12			
13	Mittelwert	=MITTELWERT(B2:B11)	=MITTELWERT(C2:C11)
14	Stabw	=STABW(B2:B11)	=STABW(C2:C11)
15	SEM	=B14/WURZEL(ZÄHLENWENN(B2:B11;">0"))	=C14/WURZEL(ZÄHLENWENN(C2:C11;">0"))
16	%Gew	100	=C13*100/\$B\$13
17	%Überlebende	100	=ZÄHLENWENN(C2:C11;">0")*\$B\$17/ZÄHLENWENN(B2:B11;">0")
18	T-Test zur Kontrolle		=WURZEL((C13-\$B\$13)^2)/(WURZEL((C14^2+\$B\$14^2)/10))
19			
20	T-Test Signifikanz		
21	>0,99	2,878	=WENN(C18>\$B\$21;"++";"--")
22	>0,98	2,552	=WENN(C18>\$B\$22;"++";"--")
23	>0,95	2,101	=WENN(C18>\$B\$23;"++";"--")

2.3.2.2.2. Statistische Signifikanz

Die Auswertung erfolgte durch das Programm Excel der Microsoft Cooperation. Die Einzelgewichte der Insekten werden notiert, die Standardabweichung berechnet und darauf basierend der Standardfehler des Mittelwertes ermittelt. Die Signifikanz der verschiedenen Versuchsansätze wird mit Hilfe des T-Testes im Vergleich zu Kontrollgruppe überprüft [Lozán und Kausch 1998].

- * >95%ige Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe
- ** >98%ige Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe
- *** >99%ige Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe

2.4. Synthesen von Acetyl-, Zinnamoyl- und Benzoyl-Derivaten

2.4.1. Acetylierung von Lupeol

Um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hinsichtlich der ICAM-1 Expressionsunterdrückung (Kapitel 3.5.) untersuchen zu können, wurde Acetyl-Lupeol synthetisiert. Für diese Reaktion werden 20 mg Lupeol in 1 mL Pyridin in einem Eppendorff-Cup gelöst und es werden 0,5 mL Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird die Mischung in einen 20 mL Scheidetrichter überführt, 6 mL Wasser mit einem pH Wert von 4 und Dichlormethan hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln wird die untere Dichlormethanphase abgenommen. Die Dichlormethanphase wird 3-mal gegen jeweils 6 mL Wasser mit einem pH Wert von 4 ausgeschüttelt. Anschließend wird die Dichlormethanphase eingedampft und das Produkt mittels NMR bestätigt. Diese Reaktion ist modifiziert nach Becker *et al.* 1993 (S. 423). Die Struktur wurde mittels NMR bestätigt.

Erzielte Ausbeute:

Einsatz:	20 mg	=	0,047 mMol	Lupeol
Ausbeute:	11,3 mg	=	0,024 mMol	Acetyl-Lupeol
Rate:	51%			

2.4.2. Benzoylierung von β -Sitosterol, Cholesterol und Lupeol

Um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hinsichtlich der ICAM-1 Expressionsunterdrückung (Kapitel 3.5.) untersuchen zu können, wurden Benzoyl-Lupeol, Benzoyl- β -Sitosterol und Benzoyl-Cholesterol synthetisiert. Für diese Reaktionen werden 25 mg des Triterpens oder des Steroids in einem 10 mL Rundkolben in 3 mL Pyridin gelöst, anschließend werden 2 mL Benzoylchlorid unter Rühren und Eiskühlung hinzugegeben. Das Gemisch wird unter Rückfluss 2 Stunden lang erhitzt. Das Gemisch wird nach Abkühlung in 10 mL Eiswasser abfiltriert und in einem 100 mL Scheidetrichter mit 30 mL Methanol und 30 mL *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die hieraus entstandene *n*-Hexan-Phase wird weitere 2-mal gegen 30 mL 90% Methanol ausgeschüttelt, sowie die Methanolphase 2-mal gegen 30 mL *n*-Hexan. Die vereinigten *n*-Hexan Phasen werden in einem 100 mL Rundkolben zur Trockene eingedampft. Der trockene Rückstand wird unter Ultraschall in soviel Methanol gelöst (je nach Substanz etwa 20-50 mL), dass eine Suspension entsteht. Diese Suspension wird unter Rückfluss erhitzt, sodass sich eine klare Lösung bildet. Falls sich beim Sieden noch ungelöste Teile in der Lösung befinden, wird vorsichtig durch den Rückflusskühler Methanol hinzugegeben, bis sich alle Substanz gerade löst. Nach dem Sieden wird die Lösung möglichst langsam abgekühlt, damit sich während des Prozesses der Umkristallisation möglichst große Kristalle bilden können. Die methanolische Lösung mit den Kristallkeimen wird über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wird die Lösung abgenutscht, der Kolben sowie der Filter mit eiskaltem Methanol nachgewaschen. Die Kristalle werden gesammelt und die Struktur mittels NMR bestätigt. Die Reaktion ist eine

Variation der Einhorn-Variante, wie in der Literatur beschrieben [Becker *et al.* 1993]. Die Strukturen wurden mittels NMR bestätigt.

Erzielte Ausbeuten:

Einsatz:	25 mg	=	0,059 mMol	Lupeol
Ausbeute:	7,2 mg	=	0,014 mMol	Benzoyl-Lupeol
Rate:	23%			

Einsatz:	25 mg	=	0,065 mMol	Cholesterol
Ausbeute:	8,3 mg	=	0,017 mMol	Benzoyl-Cholesterol
Rate:	26%			

Einsatz:	25 mg	=	0,060 mMol	β -Sitosterol
Ausbeute:	9,4 mg	=	0,018 mMol	Benzoyl- β -Sitosterol
Rate:	30%			

2.4.3. Zinnamoylierung von β -Sitosterol, Cholesterol und Lupeol

Um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hinsichtlich der ICAM-1 Expressionsunterdrückung (Kapitel 3.5.) untersuchen zu können, wurden Zinnamoyl- β -Sitosterol, Zinnamoyl-Cholesterol und Zinnamoyl-Lupeol synthetisiert. Für diese Reaktionen werden ca. 4 g Zinnamoylchlorid im Trockenschrank bei 100 °C verflüssigt. 25 mg des Triterpens oder Steroids werden in einem 10 mL Rundkolben in 3 mL Pyridin gelöst und unter Eiskühlung werden 2 mL des verflüssigten Zinnamoylchlorids hinzugegeben. Hierbei entsteht oft ein Feststoff im Reaktionsansatz, der sich aber wieder bei der 2-stündigen Erhitzung unter Rückfluss restlos löst. Anschließend wird der Reaktionsansatz in einen Behälter mit Eiswasser abgefiltert. Der im Filter zurückbleibende Rückstand wird in Dichlormethan gelöst und mit der Eiswasserphase vereint. Die Eiswasserphase wird 3-mal mit dem gleichen Volumen Dichlormethan ausgeschüttelt, die Dichlormethanphase 3-mal mit dem gleichem Volumen Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten

Dichlormethanphasen werden eingedampft und in *n*-Hexan aufgelöst. Diese *n*-Hexan-Phase wird 3-mal gegen das gleiche Volumen Methanol (95%) ausgeschüttelt. Anschließend werden die vereinigten *n*-Hexanphasen eingedampft. Der trockene Rückstand wird unter Ultraschall in soviel Methanol angelöst (je nach Substanz etwa 20-50 mL), dass eine Suspension entsteht. Diese Suspension wird unter Rückfluss erhitzt, sodass sich eine klare Lösung bildet. Falls sich beim Sieden noch ungelöste Teile in der Lösung befinden, wird vorsichtig durch den Rückflusskühler Methanol hinzugegeben, bis sich alle Substanz gerade löst. Nach dem Sieden wird die Lösung möglichst langsam abgekühlt, damit sich während des Prozesses der Umkristallisation möglichst große Kristalle bilden können. Die methanolische Lösung mit den Kristallen wird über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wird die Lösung abgenutscht, der Kolben sowie der Filter mit eiskaltem Methanol nachgewaschen. Die Kristalle werden gesammelt und die Struktur mittels NMR bestätigt. Die Reaktion ist eine Variation der Einhorn-Variante, wie in der Literatur beschrieben [Becker *et al.* 1993]. Die Strukturen wurden mittels NMR bestätigt.

Erzielte Ausbeuten:

Einsatz:	25 mg	=	0,059 mMol	Lupeol
Ausbeute:	3,9 mg	=	0,007 mMol	Zinnamoyl-Lupeol
Rate:	12%			
Einsatz:	25 mg	=	0,065 mMol	Cholesterol
Ausbeute:	4,9 mg	=	0,090 mMol	Zinnamoyl-Cholesterol
Rate:	15%			
Einsatz:	25 mg	=	0,060 mMol	β-Sitosterol
Ausbeute:	6,1 mg	=	0,018 mMol	Zinnamoyl-β-Sitosterol
Rate:	19%			

2.5. Proteinkinase-Bioassay

Die ProQinase GmbH in Freiburg ist ein Spin Off Unternehmen der Klinik für Tumorbiologie, das sich auf Enzymbioassays spezialisiert hat. Humane Proteinkinasen, die eine tumorrelevante Bedeutung besitzen, werden dort rekombinant hergestellt und in *in vitro* Inhibitionsassays eingesetzt (Tab. 2.5.). Somit kann ein direkter Vergleich angestellt werden, ob aktive Substanzen spezifisch auf nur einige oder unspezifisch auf alle Kinase inhibitorisch wirken.

Tab. 2.5.: Liste der humanen Proteinkinasen deren Hemmung durch verschiedene Substanzen getestet wurde

Abgekürzte Schreibweise der Kinase	Ausformulierte Bezeichnung der Kinase	Einfluss auf folgenden Bereich der Tumorentstehung
EGF-R	Epidermal growth factor receptor	Angiogenese
TIE2	Angiopoietin receptor 2	Angiogenese
VEGF-R2	Vascular endothelial growth factor receptor 2	Angiogenese
VEGF-R3	Vascular endothelial growth factor receptor 3	Angiogenese
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Apoptose
ARK5	Aurora related kinase 5	Apoptose
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3	Apoptose
FAK	Focal adhesion kinase	Metastasierung
INS-R	Insuline receptor	Metastasierung
SRC	proto ontogenic tyrosine kinase	Metastasierung
Aurora-A	Aurora kinase A	Proliferation
Aurora-B	Aurora kinase B	Proliferation
B-RAF-VE	v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1	Proliferation
CDK2/CycA	Cyclin dependent kinase 2	Proliferation
CDK4/CycD1	Cyclin dependent kinase 4	Proliferation
CK2-alpha1	Casein kinase	Proliferation
COT	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	Proliferation
EPHB4	Ephrin B 4 receptor	Proliferation
ERBB2	endothelial growth factor receptor	Proliferation
IGF-1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Proliferation
MET	Mesenchymal-epithelial transition factor	Proliferation
PDGFR-beta	Platelet-derived growth factor receptor beta Untereinheit	Proliferation
PLK1	Polo-like-kinase-1	Proliferation
SAK	Snk/Pik AKIN Kinase	Proliferation

Vorteil dieser Testreihen ist die Tatsache, dass mit humanen Enzymen gearbeitet wird und keine Enzyme aus anderen Organismen verwendet werden. Es kann targetorientiert geforscht werden und die Wirkung kann evtl. auf bestimmte Kinasen eingegrenzt werden. Für das Ziel, Wirkstoffe für die humane Krebstherapie zu entwickeln, ist es essentiell, die Substanzen an humanen Targets und nicht an Targets anderer Spezies zu untersuchen.

Der Nachteil dieses Testverfahrens ist, dass keinerlei Daten zur Kinetik der Substanz erhoben werden können. Andere Aspekte, wie die Membrangängigkeit der Substanzen können ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

2.6. Weitere Bioassays

2.6.1. Zellkulturassays an murinen Krebszellen

Diese Testreihen werden an der Johannes Gutenberg Universität Mainz am Institut für Physiologische Chemie in der Abteilung Angewandte Molekularbiologie unter Leitung von Prof. W.E.G. Müller durchgeführt.

Dieser Test stellt einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn zu den Ergebnissen an isolierten Proteintargets dar, denn in diesen Testreihen werden die Substanzen mittels muriner Krebszelllinien auf ihre Bioaktivität hin untersucht. Die ergänzende Aussagefähigkeit ist jedoch begrenzt, denn es ist ungewiss, ob diese Krebszelllinien über die gleichen Targets verfügen, an denen die Substanzen direkt getestet worden sind, oder ob die Substanzen im Rahmen des Zellmetabolismus' abgebaut oder modifiziert werden, was sich ebenfalls auf die Bioaktivität auswirken könnte.

2.6.2. UV-Schutz-Testung

Am An-Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH der Heinrich Heine Universität Düsseldorf im Arbeitskreis von Frau PD Dr. Susanne Grether-Beck wurden verschiedene Naturstoffe darauf getestet, ob diese eine UVA1 schützende Wirkung auf Keratinozyten entfalten können. Der UV-Schutz basiert darauf, dass Keratinozyten auf eine Belastung durch UVA1 mit einer erhöhten Expression des zellulären Oberflächenproteins ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) reagieren. Der Mechanismus ist weitgehend noch unverstanden, aber eine Rolle für die erhöhte Expression stellen membrangebundene Ceramide dar, die bei UV-Stress aus der Membran herausgelöst werden und in eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade münden, durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die wiederum die Transkriptionsrate des ICAM-1 Genes erhöhen. Der Oberflächenrezeptor ICAM-1 ist auch unter der Bezeichnung CD54 bekannt. An ihn binden zytotoxische T-Zellen, die wiederum Nekrosen und weitere Entzündungsreaktionen auslösen, welche eine typische Symptomatik für Sonnenbrände darstellen. Weiter ist bekannt, dass eine Überexpression des ICAM-1 Rezeptors in degenerativen neuronalen Erkrankungen und Asthma involviert ist. Leider kann bei diesem Bioassay nicht genau determiniert werden, an welchen Stellen die Substanzen die Signaltransduktion beeinflussen und somit zur Herunterregulierung der Expression von ICAM-1 führen. Denkbar sind Angriffspunkte in oder an den Zellmembranen, den Proteinsignalkaskaden oder den Transkriptionsfaktoren. Die Expression wird durch eine Polymerasekettenreaktion der mRNA von ICAM-1 untersucht. Die Menge der amplifizierten DNA ist proportional zur transkribierten mRNA und somit zur ICAM-1 Transkriptionsinduktion.

2.6.3. Toxikologische Untersuchungen

Weitere toxikologische Untersuchungen werden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Yvonne Chovolou am Institut für Toxikologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Neben den zytotoxischen Ergebnissen, basierend auf einem MTT Assay [Mosmann 1983], können weitere Untersuchungen hinsichtlich der TNF α induzierten NF κ B Antwort durchgeführt werden, die einen Schluss auf die antiphlogistischen Wirkungen einiger Substanzen zulassen (Abb. 2.6.3).

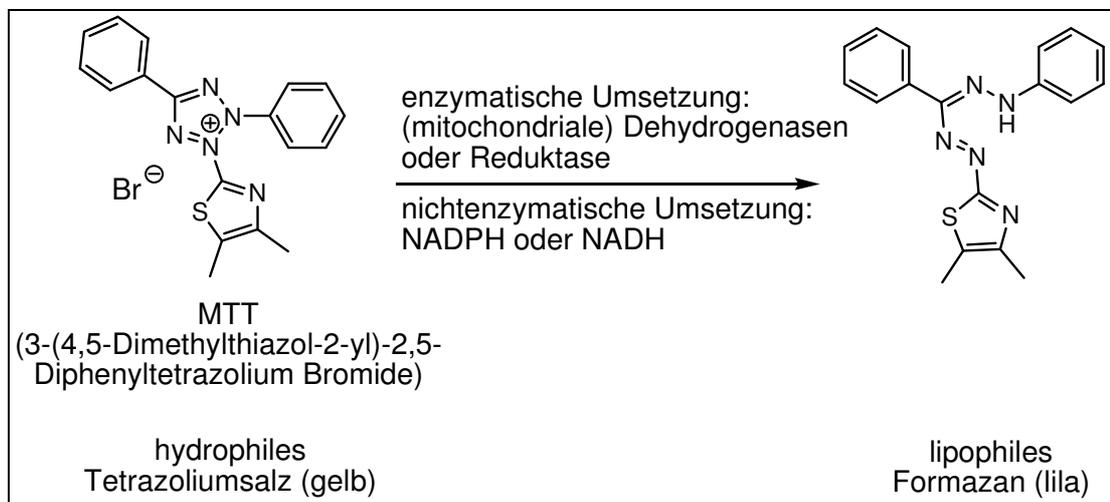


Abb. 2.6.3: Die zellatmungsbedingte Umsetzung vom MTT als Maß für die Zellviabilität

Der NF κ B-Assay wurde indirekt über einen Reporterassay durchgeführt. Es wurde untersucht, ob NF κ B die Transkription eines Reportergenes induzieren kann. Hierfür wurde die SEAP (secreted form of human alkaline phosphatase) als Reporterprodukt eingesetzt. Da dieses Enzym sekretiert wird, konnte anhand der Phosphataseaktivität im umgebenden Medium festgestellt werden, ob aktiviertes NF κ B im Zellkern vorliegt.

2.7. Phytochemische Methoden

2.7.1. Flüssig/Flüssig-Extraktion

Rohextrakte können mittels Ausschütteln in einem Scheidetrichter in verschiedene Lösungsmittelphasen aufgetrennt werden. Die verschiedenen Substanzen verteilen sich je nach Polarität. (Abb. 2.7.1.)

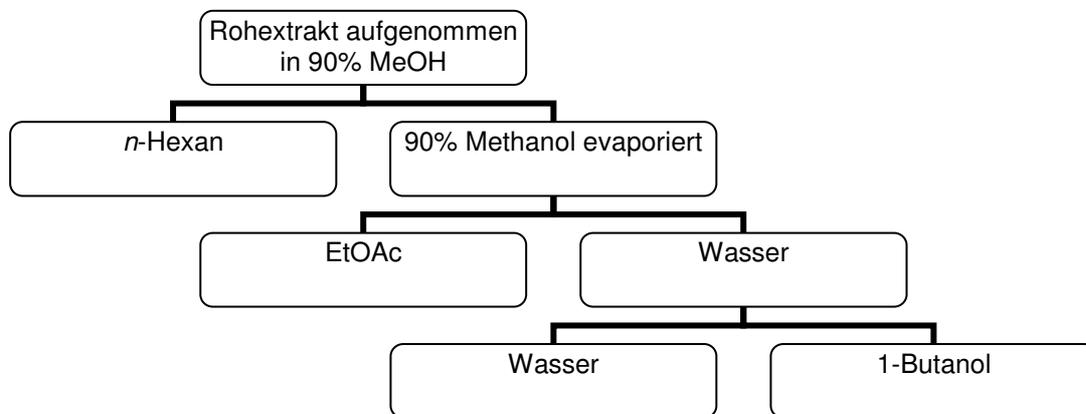


Abb. 2.7.1.: Prinzip der Flüssig/Flüssig Extraktion

Aus pflanzlichen Extrakten reichern sich in der *n*-Hexan Phase vor allem Chlorophyllderivate, Fettsäuren, Wachse und Terpene mit wenigen polaren funktionellen Gruppen an. In der Ethylacetatphase sammeln sich vor allem mittelpolare Substanzen wie Flavonoide an. In der Wasserphase befinden sich nach dem Ausschütteln vor allem Zucker, in der Butanolphase glycosylierte Substanzen.

2.7.2. Vacuumflüssigchromatographie (Vacuum liquid chromatography (VLC))

Durch die VLC kann ein Rohextrakt seiner Polarität nach grob vorfraktioniert werden. Bevorzugt sind die Materialien Silica und DIOL. Hierzu

wird eine Glassäule großen Durchmessers (ca. 5-10 cm) mit der trockenen stationären Phase befüllt (ca. 20 cm hoch). Auf diese Phase wird der auf die stationäre Phase eingetrocknete Extrakt (1 g Extrakt auf 1 g stationäre Phase) geschichtet. Zum Schluss wird die Säule mit Watte nach oben hin ausgekleidet, damit das hereinfließende Lösungsmittel die Schichten nicht aufwirbelt. Der untere Teil der Glassäule besitzt einen Schliff, an dem ein Kolben befestigt werden kann und oberhalb des Schliffes der Säule befindet sich ein seitlicher Vakuumsaugstutzen, durch den die Säule unter Vakuum gesetzt werden kann, damit das Lösungsmittel schnell durch die Säule in den Kolben gesaugt werden kann. Bei Silica und DIOL Material wird mit der unpolarsten Mischung begonnen und somit von unpolar nach polar eluiert. Jedes Lösungsmittelgemisch wird in einem separaten Kolben aufgefangen. (Tab. 2.7.2.)

Tab. 2.7.2.: Folgende Lösungsmittelgemische sind für die Bearbeitung bestimmter Fraktionen mittels VLC von Nutzen (die angegebenen Volumina beziehen sich auf 10 g Extrakt)

			<i>n</i> -Hexan	EtOAc	ml	
Butanol / Wasser Fraktionen	Ethylacetat Fraktionen	<i>n</i> -Hexan Fraktionen	1.	1	0	200
			2.	9	1	200
			3.	8	2	200
			4.	7	3	200
			5.	6	4	200
			6.	5	5	200
			7.	4	6	200
			8.	3	7	200
			9.	2	8	200
			10.	1	9	200
			11.	0	1	200
			EtOAc	MeOH	200	
			MeOH	H ₂ O	200	
			12.	9	1	200
			13.	8	2	200
			14.	7	3	200
			15.	6	4	200
			16.	5	5	200
			17.	4	6	200
			18.	3	7	200
			19.	2	8	200
			20.	1	9	200
			21.	0	1	200
			22.	9	1	200
			23.	8	2	200
			24.	7	3	200
			25.	6	4	200
			26.	5	5	200
			27.	4	6	200
			28.	3	7	200
			29.	2	8	200
			30.	1	9	200
			31.	0	1	200

2.7.3. Säulenchromatographie

Mittels Säulenchromatographie können Substanzgemische effektiv aufgetrennt werden. Hierzu wird eine Glassäule mit der 50fachen Gewichtsmenge an Säulenmaterial, bezogen auf die aufzutrennende Fraktion bestückt (bei Silica und DIOL). Das Säulenmaterial wird in dem für die Auftrennung optimalen Substanzgemisch gelöst und in die Säule gefüllt. Hierzu können Materialien wie Sephadex, Silica oder DIOL verwendet werden.

2.7.3.1. Silica (Kieselgel)

Hierzu wurde Kieselgel 32-63, 60 der Firma ICN Biomedicals GmbH verwendet. Die Auftrennung anhand von Kieselgel beruht auf Polarität. Das sehr polare Kieselgel als stationäre Phase und unpolarere Lösungsmittel als mobile Phase können eine sehr gute Auftrennung bewirken. Problematisch ist die Verwendung von Silicagel bei basischen Alkaloiden, da durch die Säurefunktionen des Silicagels die basischen Stickstoffatome der Alkaloide protoniert werden können, wodurch die Alkaloide fortan als Salz vorliegend und nur noch schwer bis gar nicht mehr zu eluieren sind.

2.7.3.2. Sephadex

Durch eine Säulenchromatographie mittels Sephadexmaterial (Sephadex LH 20 der Firma Sigma) lassen sich Substanzen ihrer Größe nach auftrennen. Kleinere Moleküle werden stärker vom Säulenmaterial retardiert als größere. Da neben der Größenausschlusschromatographie aber auch Absorptionseffekte der Auftrennung zu Grunde liegen, kann es zuweilen schwer sein, das Auftrennverhalten anhand dieses Materials vorherzubestimmen. Als Fließmittel eignen sich hierbei Gemische aus Methanol und Dichlormethan.

2.7.3.3. DIOL

LiChroprep® DIOL der Firma Merck ist eine Alternative zu Silicagel, da es über keine sauren funktionellen Gruppen verfügt und aufgrund seiner amphiphilen Molekularstruktur eine sehr gute Auftrennungsleistung im mittelpolaren Bereich besitzt. Als besonders effektive Fließmittel eignen sich Gemische aus *n*-Hexan und Aceton.

2.7.4. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie hat ihren primären Anwendungsbereich in der Optimierung der Fließmittelgemische für eine anschließende Säulenchromatographie. Nach dem DC-Lauf wird mittels UV-Lampe bei 254 nm und 366 nm die Fluoreszenzlösung bzw. die Eigenfluoreszenz betrachtet. Folgende Sprühreagenzien wurden verwendet, um die Substanzen zu detektieren:

Anisaldehyd/Schwefelsäure:

42,5 mL Methanol, 5 mL Eisessig, 2,5 mL konz. Schwefelsäure, 0,25 mL Anisaldehyd

Dragendorff:

Lösung I: 20 g Weinsäure in 80 mL destilliertem Wasser gelöst, dazu 1,7 g Bismut Subnitrat

Lösung II: 35 g Kaliumiodid werden in 80 mL destilliertem Wasser gelöst

Lösung I und II werden vereint und gefiltert und ergeben Lösung III

Um das Sprühreagenz zu erhalten werden 10 mL der Lösung III in 90 mL 20%iger Weinsäurelösung gelöst

2.7.5. Präperative Dünnschichtchromatographie (PDC)

Bei der PDC werden Substanzen auf der gesamten Bandbreite einer DC-Platte aus Aluminium aufgetragen und mit einem optimalen Lösungsmittelsystem über 20 cm hinweg laufen gelassen. Nach Beendigung des Laufes werden die Banden unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm oder 366 nm markiert und anschließend mit einer Schere ausgeschnitten. Alternativ kann bei nicht unter UV Licht sichtbaren Substanzen ein äußerer ca. 1 cm breiter Streifen abgeschnitten werden und mit verschiedenen Sprühreagenzien behandelt werden. Nach Entwicklung wird dieser Streifen wieder an die restliche DC angelegt, um die Laufhöhe auf der nicht entwickelten DC zu markieren. Nach dem Ausschneiden der Streifen werden diese in ca. 5 mm breite Stücke zerschnitten und mit Methanol ausgewaschen. Nach mehrmaligem Auswaschen wird eines der DC Stücke erneut mittels Sprühreagenz oder UV-Licht untersucht, ob die komplette Substanz ausgewaschen werden konnte, andernfalls wird der Waschvorgang wiederholt. Um eventuelle Silicarückstände zu entfernen wird die Lösung filtriert und evaporiert.

2.7.6. Semipräparative HPLC

Mittels der semipräparativen HPLC können kleinere Substanzmengen effektiv aufgetrennt werden. Die maximale Menge sollten etwa 30 mg sein, da bei jedem Durchgang maximal etwa 2-3 mg Substanz auf die Säule aufgetragen werden kann. Fließmittelgemische aus Methanol und 0,1% TFA haltigem NANOpur Wasser sind hocheffektiv, um eine optimale Auftrennung mit der Reversed Phase Säule zu gewährleisten. Die UV-Wellenlänge kann auf einen substanzspezifischen Bereich eingestellt werden und gleichzeitig kann mit einem Schreiber das Chromatogramm dokumentiert werden. Je nach Anforderung wurden verschiedene Gradienten verwendet, d.h. es kann an dieser Stelle kein Standardgradient angegeben werden.

Folgendes Gerät wurde verwendet:

Pumpe	LaChrom L-7100, Merck/ Hitachi
Vorsäule	Eurospher 100-C18, Knauer
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Detektor	LaChrom L-7400, Merck/ Hitachi
Schreiber	Chromato-Integrator D-2000, Merck/ Hitachi
Flussrate	5 mL/min

2.7.7. Präparative HPLC

Die Verwendung der präparativen HPLC ist vor allem für größere Substanzmengen geeignet, da hier für einen Durchlauf bis zu 50 mg auf die Säule aufgetragen werden kann. Genau wie bei der semipräparativen HPLC können Fließmittelgemische aus Methanol und 0,1% TFA haltigem NANOpur Wasser für eine optimale Trennung verwendet werden. Je nach Anforderung wurden verschiedene Gradienten verwendet, d.h. es kann an dieser Stelle kein Standardgradient angegeben werden.

Folgendes Gerät wurde verwendet:

Pumpe	Varian, PrepStar 218
Vorsäule	Eurospher 100-C18, Knauer
Säule	Varian Dynamax (250 × 4.6 mm, ID and 250 × 21.4 mm, ID), gepackt mit Microsorb 60-8 C-18, mit integrierter Vorsäule
Detektor	Varian, ProStar 320 UV-Vis detector
PC-gestützte Software	Varian Star (V.6)
Flussrate	20 mL/min

2.7.8. Analytische HPLC

Um die Zusammensetzungen verschiedener Proben zu untersuchen, wurden diese mittels einer HPLC (High Performance Liquid Chromatography

(Hochleistungsflüssigchromatographie))-Anlage mit Diodenarraydetektor untersucht. Als stationäre Phase diente eine Säule mit Reversed Phase Säulenmaterial (RP-18) (Länge 10 cm, Durchmesser 4 mm). Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und NANOpur Wasser mit einem durch Phosphorsäure eingestellten pH-Wert von 2,00. Die Substanzen wurden mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert.

Der Standardgradient hatte folgende Programmierung:

Zeit [min]	Methanol	NANOpur Wasser pH 2
0	10 %	90 %
5	10 %	90 %
35	100 %	0 %
45	100 %	0 %
50	10 %	90 %
60	10 %	90 %

Folgendes Gerät wurde verwendet:

Probeninjektionssystem	ASI-100, Dionex
Pumpe	P 580, Dionex
Säulenofen	STH 585, Dionex
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Detektor	UVD 340 S, Dionex
PC-gestützte Software	Chromeleon V6.3

2.7.9. HPLC Quantifizierung von Ellagsäurederivaten

Mittels dieser semiquantiven Bestimmung konnten Ellagsäurederivate im Kernholz und in der Rinde von *Sonneratia alba* erfasst werden. Kommerziell bezogene Ellagsäure wurde als Vergleichssubstanz eingesetzt. Die HPLC verfügte über eine RP-18 Säule und es wurde mit einem isokratischen System (100% MeOH) und einer Flussrate von 1 mL/min eluiert.

Eine Stammlösung mit der Konzentration von 0,1 mg Ellagsäure pro 1 mL wurde mittels HPLC untersucht. Als Referenz wurde das arithmetische Mittel der Peakflächen von fünf Injektionen (jeweils 20 µL) verwendet (12463773 Einheiten). Die Standardabweichungen waren so gering, dass sie vernachlässigt wurden.

Mit einer Konzentration von 2 mg Extrakt pro mL wurden die zu vermessenden Proben ebenfalls fünf Mal auf die auf die Säule gegeben (jeweils 10 µL), um aus den gemessenen Peakflächen das arithmetische Mittel zu berechnen.

Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der verschiedenen Ellagsäurederivate wurden folgende Korrekturfaktoren mathematisch ermittelt: Ellagsäure = 1, 3-Methyl-O-Ellagsäure = 0,96, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure = 0,92 und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure = 0,88.

Die Rückberechnung erfolgte über einen klassischen Dreisatz. Nach der Vermessung des externen Standards, konnte errechnet werden, welche Absorbtionsfläche 0,1 mg/mL Ellagsäure (auf 10 µL Injektionsvolumen bezogen) hat. Bei 2 mg Extrakt pro mL (10 µL Injektionsvolumen) konnte der absolute Gehalt der Ellagsäurederivate pro 2 mg Extrakt bestimmt werden. Dieser Gehalt wurde anhand der ermittelten Gewichte der einzelnen Fraktionierungsschritte bis auf das Trocken- bzw. Frischgewicht zurückgerechnet.

2.7.10. Abschätzung des Gehaltes von Taraxerolderivaten in *Rhizophora stylosa* mittels ¹H-NMR

Mittels einer ¹H-NMR basierten Methode konnte der Gehalt an *Z*-Coumaroyl-Taraxerol, *E*-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol in den Fraktionen der Blattkutikulafraktion von *Rhizophora stylosa* bestimmt werden.

Zunächst wurde der Extrakt mittels klassischer Fraktionierungsverfahren, wie der Säulechromatographie getrennt. Die Anwesenheit von Triterpenen konnte mittels Anisaldehyd Sprühreagenz

nachgewiesen werden. Die Kutikulafraktion wurde weiter aufgetrennt und die Fraktionen mittels $^1\text{H-NMR}$ vermessen.

Die Quantifizierung der Taraxerolderivate geschah anhand der Integrationswerte und der chemischen Verschiebungen der Protonen.

Um zunächst die Gesamtheit der Taraxerolderivate in ein Verhältnis zu den Fettsäuren zu stellen, wurden die Integrationen der Protonen an Position 15 (Struktur von Taraxerol siehe Kapitel 3.4.) (chemische Verschiebung von 5,51 ppm ($^1\text{H-NMR}$ Tabelle siehe Kapitel 3.4.)) in ein Verhältnis zu den Integrationen der Fettsäuren gestellt. Idealerweise wurde in den Taraxerol-haltigen Fraktionen nur Fettsäuren und keine anderen Substanzen gefunden (aus Gründen der Vereinfachung wurde als mittlere Kettenlänge der Fettsäuren 18 angenommen).

Um weiter das Verhältnis zwischen Taraxerol und mit Coumarsäure verestertem Taraxerol zu bestimmen, wurde die Integration der Protonen an Position 3 bestimmt (unverestert: 3,2 ppm; mit *p*-Coumarsäure verestert: 4,52 ppm ($^1\text{H-NMR}$ Tabelle siehe Kapitel 3.4.)).

Um zuletzt das Verhältnis zwischen *E*-Coumaroyl-Taraxerol und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol zu bestimmen, wurden die Integrationen der Doppelbindungsprotonen der *E*-Coumaroyl-Taraxerol oder *Z*-Coumarsäurebestandteil zur Hilfe genommen, die jeweils anhand der Kopplungskonstanten identifiziert werden konnten.

Rückberechnung:

Zwecks Rückberechnung wurden zuerst die Verhältnisse aller Taraxerolderivate zu den Fettsäuren auf die Fraktion rückberechnet, diese Fraktion wiederum bis auf den Gesamtextrakt. Somit konnte zunächst der Gehalt aller Taraxerolderivate bestimmt werden.

Das Verhältnis der Taraxerolderivate zueinander wurde anhand der ermittelten Werte hinsichtlich der chemischen Verschiebung an Position 3 sowie der Veresterung mit Coumarsäure berechnet.

Alle prozentualen Werte wurden anschließend über die ermittelten Gewichte der Fraktionierungsschritte bis auf das Frischgewicht rückberechnet.

2.7.11. HPLC-MS

Durch die Kopplung eines Hochleistungsflüssigchromatographiegerätes mit einem Elektronenspray-Massenspektrometer können die eluierten Substanzen auf ihr Molekulargewicht hin untersucht werden. Durch das MS/MS Verfahren können zudem die Fragmente der einzelnen Substanzen untersucht werden. Die Datenausgabe erfolgt anhand eines UV-Spektrums, sowie der Massenspektren im positiven bzw. negativen Modus. Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol bzw. Acetonitril und NANOPur Wasser mit einem 0,1%igen Zusatz von Ameisensäure. Flussrate betrug 0,4 mL/min.

Der Standardgradient hatte folgende Programmierung:

Zeit [min]	Methanol bzw. Acetonitril	NANOPur Wasser mit 0,1%iger Ameisensäure
0	10 %	90 %
2	10 %	90 %
35	100 %	0 %
45	100 %	0 %
47	10 %	90 %
60	10 %	90 %

Folgendes Gerät wurde verwendet:

Probeninjektionssystem	G 1313 A ALS 1100, Agilent
Pumpe	Edwards 30, BOC
Säule	Knauer Eurospher 100; C-18A
Detektor	G 1315 B DAD 1100, Agilent
Massenspektrometer	Finnigan LCQDeca, Thermoquest
Ionenquelle	ESI, Thermoquest
PC-gestützte Software	Xcalibur, Version 1.3

2.7.12. EI-MS

Bei der Molekülmassenermittlung durch die Electron Impact Massenspektrometrie wird die Probe bei einer bestimmten Temperatur verdampft und in einem Vakuum direkt durch einen Ionenstrahl ionisiert. Nach der Ionisierung werden die Moleküle und die Fragmente in einem Magnetfeld beschleunigt und nach ihrer Masse aufgetrennt.

Dieses Gerät wird von Dr. Tommes am Institut für Organische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf betrieben. Das dort verwendete Gerät ist ein Finnegan MAT 8200.

Im Gegensatz zur HPLC-MS ist diese Methode vor allem für die Analyse von Steroidderivaten und Triterpenen gut geeignet.

2.7.13. NMR

Bei der Nuclear Magnetic Resonance Spektrometry (NMR) werden die in einem deuterierten Lösungsmittel gelösten Substanzproben in ein starkes Magnetfeld eingebracht. Bei der ^1H NMR werden die chemischen Verschiebungen der Protonen gemessen. Die chemische Verschiebung wird als δ in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten als J in Hertz (Hz). Die Messungen für diese Arbeit erfolgten zum einen am Institut für Anorganische Chemie unter Leitung von Dr. Peters an einem Bruker DRX-500 Gerät, sowie an dem gleichen Gerätetyp unter Leitung von Prof. Dr. Deng an der Normal University in Beijing.

2.7.14. Optische Drehung

Moleküle mit chiralen Zentren können polarisiertes Licht abhängig von Schichtdicke, Temperatur, Lösungsmittel und Konzentration mit einem determinierten Winkel drehen. Die Drehwerte der Moleküle lassen Schlüsse auf die Stereochemie zu, indem sie mit den bekannten Literaturwerten verglichen werden. Da die optische Drehung immer abhängig von

Lösungsmittel und Temperatur ist, werden die in der Literatur genannten Parameter verwendet. Als Lichtquelle des Perkin 241 MC Polarimeters wird eine Natriumlampe mit einer konstanten Wellenlänge von 589 nm (Natrium-D-Linie) verwendet. Gemessen wurde mit einer Schichtdicke von 10 cm und einer Temperatur von 20 °C. Als Vergleichsstandard wird (+)-Rutin (1% in Ethanol mit einem theoretischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +12,4^\circ$ verwendet. Über einen Dreisatz, in dem der theoretische Drehwert von (+)-Rutin, der gemessene Drehwert von (+)-Rutin und der gemessene Drehwert der Substanz eingehen, kann der reele Drehwert der untersuchten Verbindung nach folgender Formel bestimmt werden.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\text{gemessener_Drehwert_von_Rutin}}{\text{Soll - Drehwert_von_Rutin}(+12,4^\circ)} \cdot \text{gemessener_Drehwert_der_Substanz}$$

2.8. Verwendete Geräte

-80 °C Gefriertruhe	Forma Scientific
Brutschrank für die Kulturhaltung	Memmert GmbH & Co. KG
Brutschrank für Insektenbioassays	Rubbarth Apparate GmbH
Fraktionssammler	Retriever II, ISCO
Gefriertrocknung	Lyovac GT2, Steris
Gefriertruhe	Siemens-Elektrogeräte GmbH
Heizplatte mit Rührer	IKA-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG
Injektionsspritzen für präperative HPLC	Hamilton
Kühlschränke	Privileg, Quelle GmbH
Mixer	IKA-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG
Mixer 8010E	Waring Commercial, Torrington
Rotationsverdampfer	Rotavapor R200, Büchi
Trockenschrank	Kelvitron, Heraeus
Ultraschallbad	Sonorex RK 510S, Bandelin
UV-Betrachter	Camag
Waage Typ BL 1500 (d = 100 mg)	Sartorius AG
Waage Typ RC210P (d = 0,01 mg)	Sartorius AG
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus

2.9. Chemikalien

Deuterierte Lösungsmittel für NMR	Uvasol, Merck
DIOL-Material 0,025-0,04 mm	Merck
Formaldehyd	Fluka
Gentamycinsulfat	Serva Electrophoresis
HPLC Lösungsmittel	LiChroSolv HPLC grade, Merck
Lösungsmittel für Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie	Bezogen als technische Lösungsmittel aus dem Chmikalienlager der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und anschließend an institutsinternen Destillationsapparaturen aufgereinigt
Nipagin M	Fluka
RP-18 Säulenmaterial	Merck
Saccharose	Aro
Sephadex LH-20 0,25-0,1 mm	Merck
Silicagel 0,04 – 0,063 mm	Merck
Spektroskopische Lösungsmittel für die Drehwertbestimmung	Sigma-Aldrich
Vitamin C	Caelo
Benzoylchlorid	Fluka

Zinnamoylchlorid	Fluka
Essigsäureanhydrid	Fluka
Pyrridin	Fluka

Chemikalien, die unverändert in Bioassays eingegangen sind, sind aus Gründen der lexikalischen Semantik in Kapitel 7.1. aufgelistet.

2.10. Sonstige Ver- und Gebrauchsmittel

10 L Eimer	Curver
Agar für Raupenkultur	Caelo
Atemschutzmaske für die Arbeit an der Insektenkultur	3M Europe
Baumwolle	Holsatia
Filterpapier für die Eiablage	VWR
Fliegengitter	Tesa
Glasstäbe 200mm x 4 mm	Glasbläserei, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Gummibänder zum Verschließen der Urinbecher für Insektenbioassays	Herlitz
Hefe	Bella Back
Kochtopf	WMF
Parafilm	VWR
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pinsel, um Neonates zu picken	Herlitz
Schneebesens	WMF
Uhrfederstahlpinzette zum Greifen der Insekten	VWR
Urinbecher für Insektenbioassays	Roth
Weißer Bohnen	Müller's Mühle

2.11. PC-Programme

Textverarbeitung, Präsentation, Tabellenkalkulation	Microsoft Office 2003
Zeichenprogramm für Strukturformeln	ChemDraw Ultra 8.0, Cambridge Soft
Nachschlagewerk für Naturstoffe	ACDLabs 11.0 Freeware Dictionary of Natural Products, Chapman & Hall
Online-Suche nach Veröffentlichungen	Pubmed SciFinder Scholar
NMR Software	Bruker Software, MestReNova

3. Ergebnisse

3.1. Ellagsäurederivate aus Zweigen von *Sonneratia alba*

Aus den Zweigen der Mangrovenspezies *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae) wurden verschiedene Derivate der Ellagsäure isoliert, deren Strukturen aufgeklärt und deren insektezide Aktivitäten untersucht wurden. Die insektizide Wirkung wurde anhand von Insektenversuchen nach jedem Fraktionierungsschritt verfolgt und konnte schließlich in einer Fraktion lokalisiert werden, aus der Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure mittels semipräparativer HPLC isoliert werden konnten (Tab. 3.1.1.a). Anschließend wurden diese vier Reinsubstanzen auf ihre Bioaktivität einzeln getestet.

Diese vier Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit aus *Sonneratia alba* erstmals isoliert. Ellagsäure ist im Pflanzenreich weit verbreitet, 3-Methyl-O-Ellagsäure kommt unter anderem in vielen Eukalyptus Spezies vor [DNP]. 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure ist Bestandteil vieler Arten der Gattung *Euphorbia* aus der Familie der Euphorbiaceae (Wolfsmilchgewächse) und der Gattung der Vogelknöteriche (*Polygonum*) aus der Familie der Polygonaceae (Knöterichgewächse) [DNP]. 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure ist Bestandteil einzelner Arten der Riemenblumengewächse (Loranthaceae), (*Psittacanthus cucularis*) und Arten der Tupelogewächse (Nyssaceae) (*Diplopanax stachynthus*) [DNP].

Ellagsäurederivate mit anderen Methoxylierungsmustern (Nasutin B und Nasutin C) kommen in der Haemolymphe der Termitenart *Nasutitermes exitiosus* vor [DNP]

3.1.1. Isolierung und Strukturaufklärung

Auf der folgenden Seite ist das Isolierungsschema von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure dargestellt (Abb. 3.1.1.a).

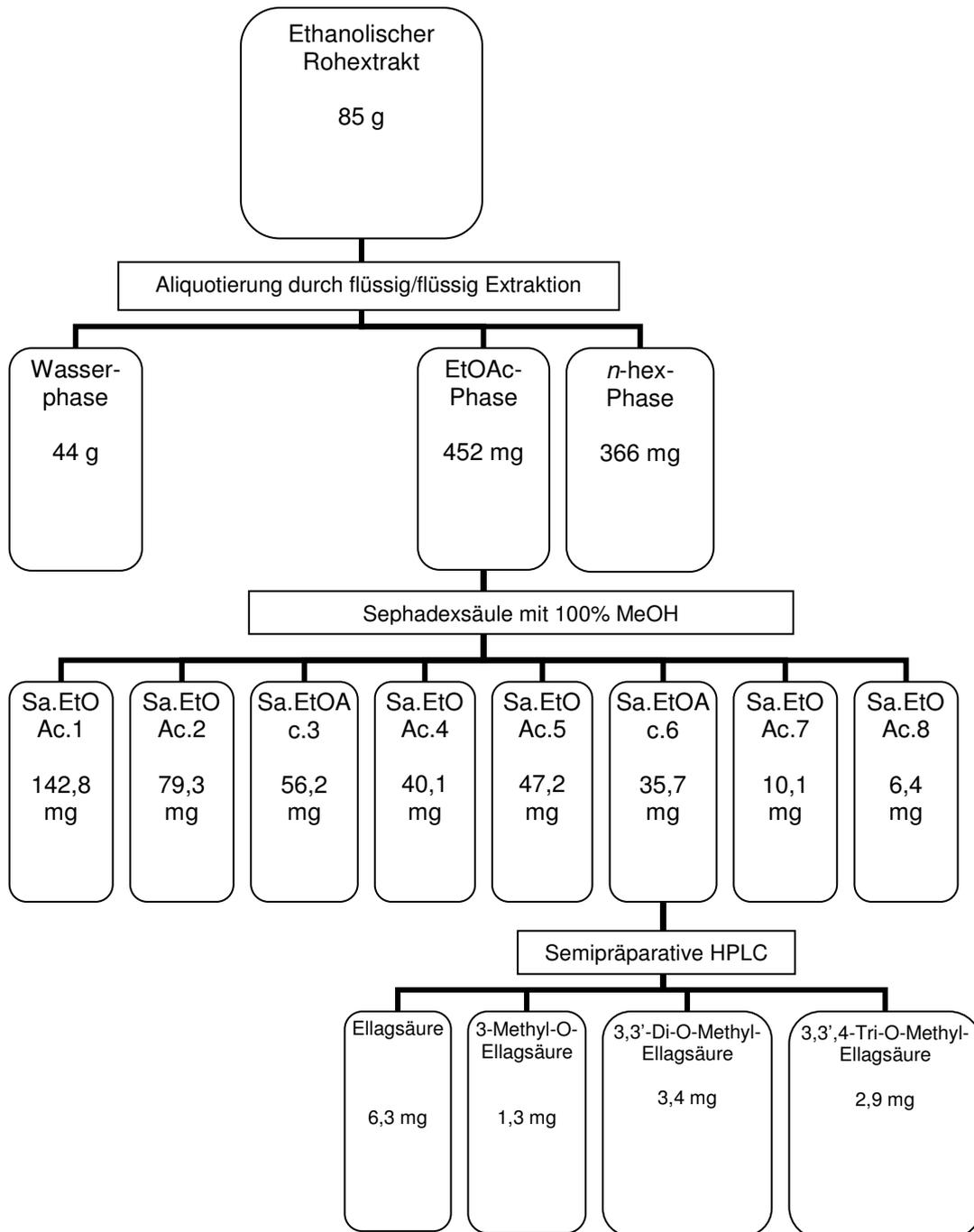


Abb. 3.1.1.a: Isolierungsschema von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure aus den Zweigen von *Sonneratia alba*

Die Zweige von *Sonneratia alba* wurden im April 2006 im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt. Anschließend wurde im Labor von Prof. Dr. Wenhan Lin an der Universität Peking ein Rohextrakt mit etwa 90%igem Ethanol hergestellt. Dieser Rohextrakt wurde nach Düsseldorf transportiert und dort in 90%igem Methanol unter Ultraschall wieder aufgelöst und gefiltert. Die 90%ige

Methanollösung wurde in einem Scheidetrichter gegen *n*-Hexan mehrmals ausgeschüttelt. Die so gewonnene Methanolphase wurde eingedampft und der Rückstand wieder in einem Gemisch aus Wasser und Ethylacetat unter Ultraschall gelöst. Die Wasserphase wurde mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphase wurde wiederum mehrmals gegen Wasser ausgeschüttelt. Von der *n*-Hexan-, den vereinigten Ethylacetat- und den vereinigten Wasserphasen wurde jeweils ein Insektenbiotest mit gleicher Konzentration von 1100 ppm durchgeführt. Nachdem die Bioaktivität in der Ethylacetatphase lokalisiert werden konnten, wurde diese mittels einer Sephadexsäule weiter aufgetrennt. Dadurch konnten die Ellagsäurederivate von den anderen Bestandteilen effektiv getrennt werden. Es erwies sich als sehr schwierig, die einzelnen Ellagsäurederivate voneinander mittels einer Säulenchromatographie zu trennen. Jedoch konnten diese Derivate durch die substanzspezifische UV-Absorption im HPLC System detektiert werden (Abb. 3.1.1.b; Abb. 3.1.1.c) und mittels der präparativen HPLC getrennt und aufgereinigt werden.

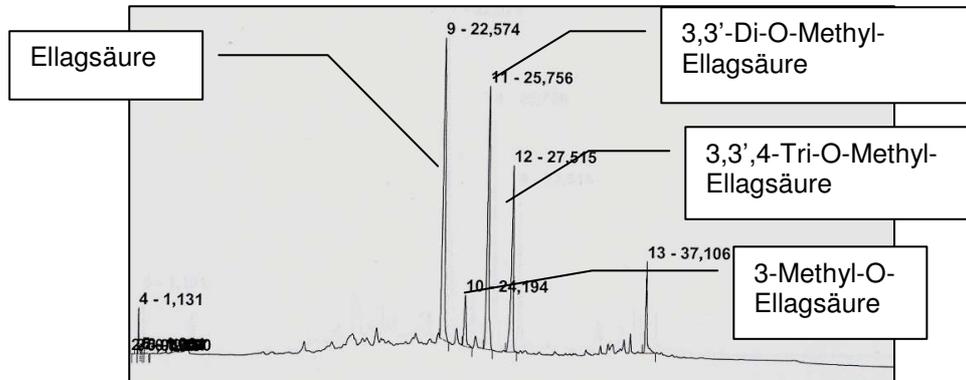


Abb. 3.1.1.b: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat Phase von *Sonneratia alba* (Standardgradient (Kapitel 2.7.8.)) mit Retentionszeiten: Ellagsäure: 22,574 min; 3-Methyl-O-Ellagsäure: 24,195 min; 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure: 25,515 min; 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure: 27,515 min

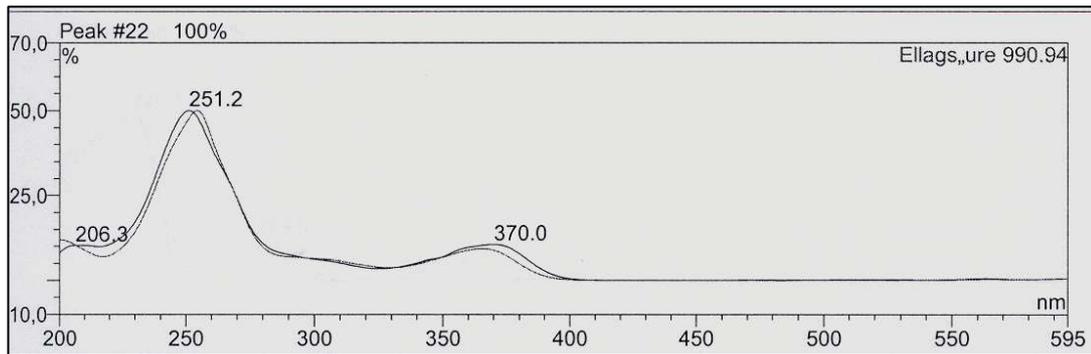


Abb. 3.1.1.c: Typisches UV-Spektrum (analytische HPLC mit Diodenarray Detektor) von Ellagsäure (helle Linie im Hintergrund als Vergleich zu kommerziell erworbener Ellagsäure)

Ein Nachweis für das Vorhandensein von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure, 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure konnte durch die Anwendung der Massenspektrometrie erbracht werden. Im negativen Modus konnten eindeutig die sich abspaltenden Methylgruppen nachgewiesen werden (Abb. 3.1.1.d; Abb. 3.1.1.e; Abb. 3.1.1.f; Abb. 3.1.1.g). Je nach Methylierungsgrad variiert die Anzahl der sich abspaltenden Methylgruppen, welche an der Massendifferenz von jeweils 15 erkannt werden können. Bei Ellagsäure ist das Molekulargewicht von 302 g/mol erkennbar, bei 3-Methyl-O-Ellagsäure wird ein Fragment mit der Masse von 15 abgespalten, bei 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure werden zwei Fragmente mit den Massen von 15 abgespalten und bei 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure werden ebenfalls zwei Fragmente mit den Massen von jeweils 15 abgespalten. Jedoch ist bei 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure die Gesamtmasse 344 g/mol, was auf eine dreifache Methylierung der Ellagsäure hinweist.

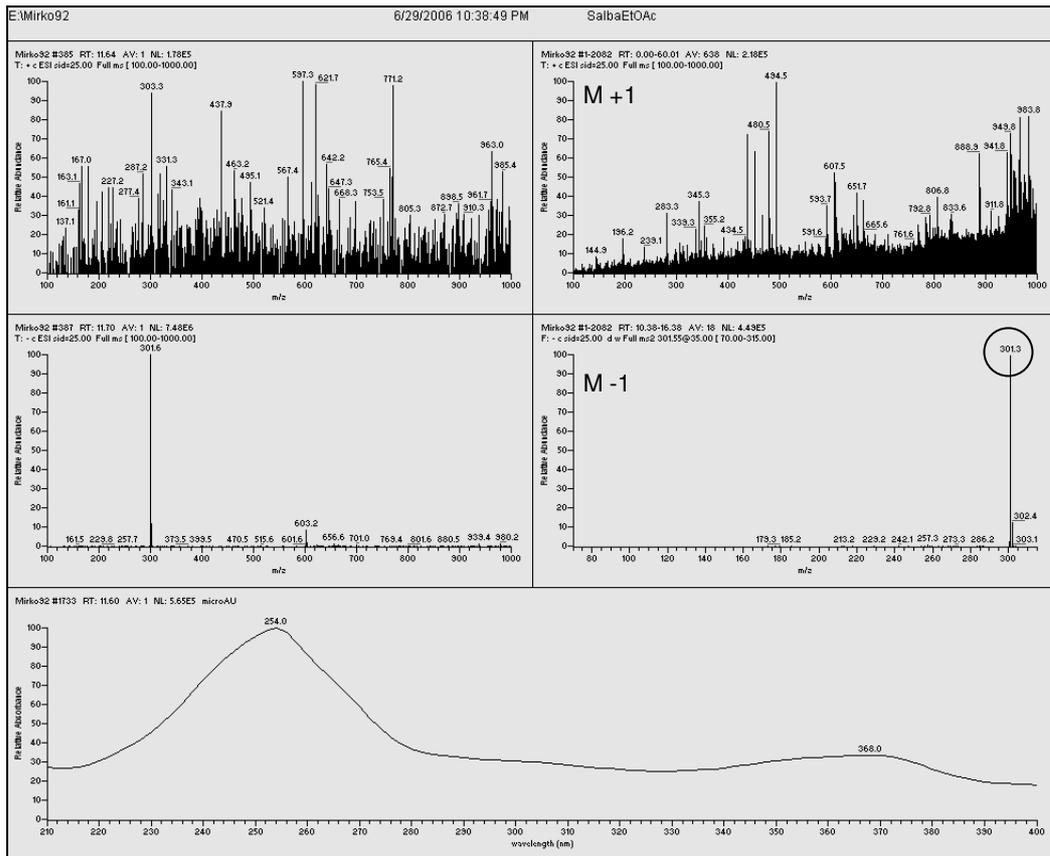


Abb. 3.1.1.d: LC-MS Spektrum und UV-Spektrum (unten) von Ellagsäure (MG 302 g/mol)

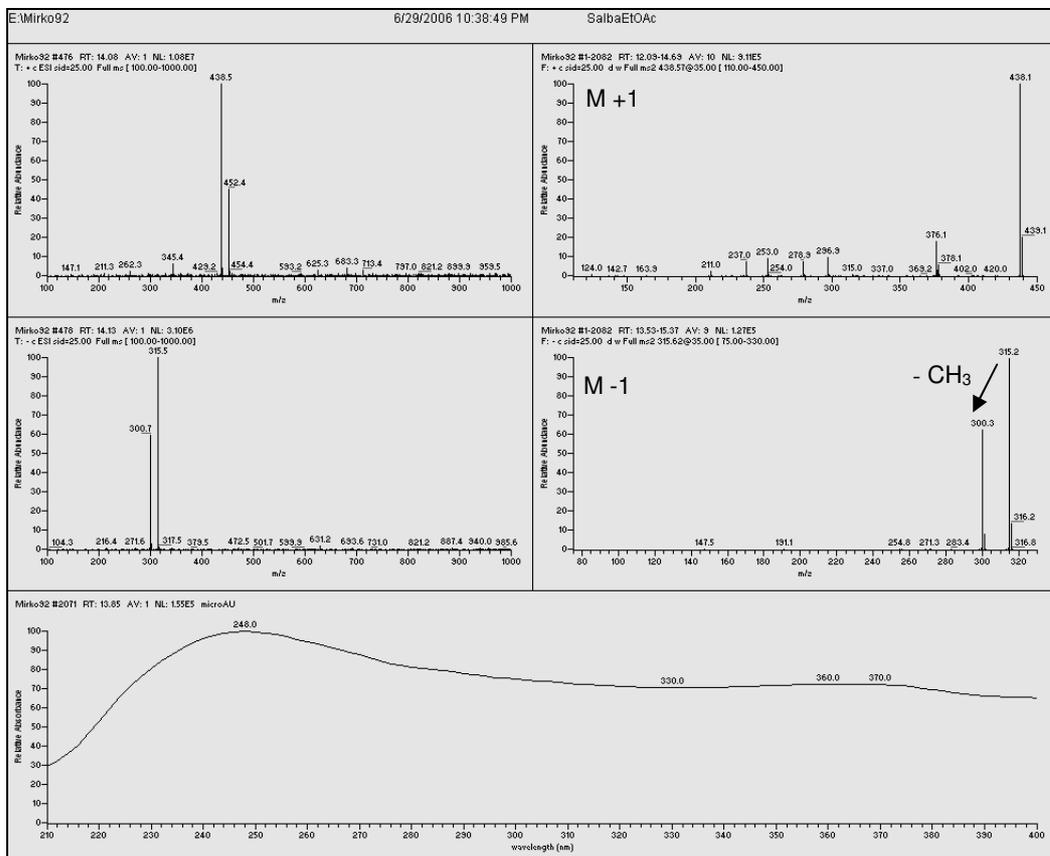


Abb. 3.1.1.e: LC-MS Spektrum und UV-Spektrum (unten) von 3-Methyl-O-Ellagsäure (MG 316 g/mol)

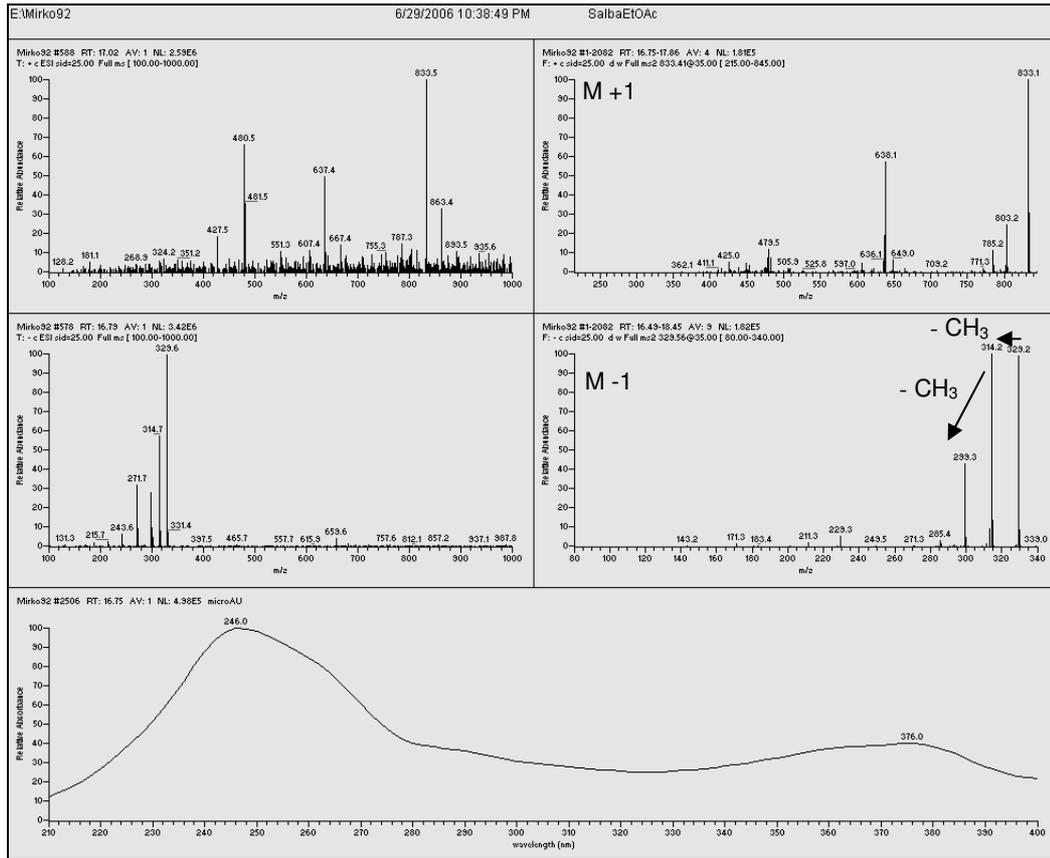


Abb. 3.1.1.f: LC-MS Spektrum und UV-Spektrum (unten) von 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure (MG 330 g/mol)

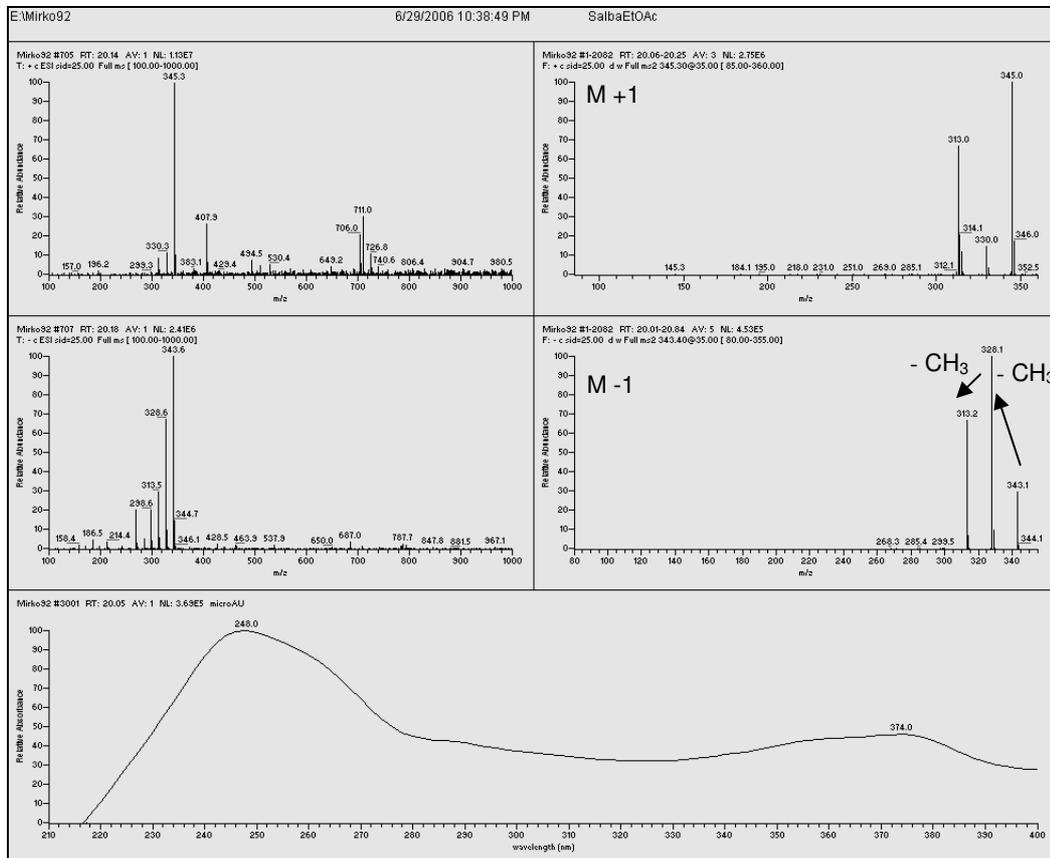
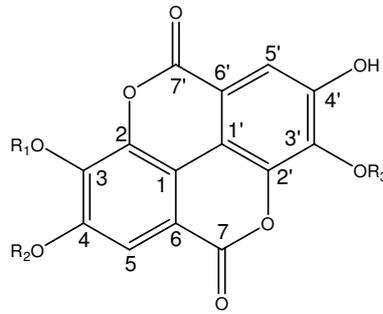


Abb. 3.1.1.g: LC-MS Spektrum und UV-Spektrum (unten) von 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure (MG 344 g/mol)

Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC konnten Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure isoliert und identifiziert werden (Abb. 3.1.1.h; Tab. 3.1.1.a). Die NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. abgebildet.



Nummerierung nach [Li *et al.* 1999]

	R1	R2	R3	Molekulargewicht in g/mol
Ellagsäure	H	H	H	302
3-Methyl-O-Ellagsäure	CH ₃	H	H	316
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	CH ₃	H	CH ₃	330
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	CH ₃	CH ₃	CH ₃	344

Abb. 3.1.1.h: Strukturen von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure

Tab. 3.1.1.a: ¹HNMR-Daten von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure

Proton an Kohlenstoff Nr.	Ellagsäure		3-Methyl-O-Ellagsäure		3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	
	δ (m) MeOH- <i>d</i> ₄ 500 MHz	NOE MeOH- <i>d</i> ₄ 600 MHz	δ (m) DMSO- <i>d</i> ₆ 500 MHz	NOE MeOH- <i>d</i> ₄ 600 MHz	δ (m) MeOH- <i>d</i> ₄ 500 MHz	NOE MeOH- <i>d</i> ₄ 600 MHz	δ (m) MeOH- <i>d</i> ₄ 500 MHz	NOE MeOH- <i>d</i> ₄ 600 MHz
5	7,45 (s)	-	7,52 (s)	-	7,54 (s)	-	7,62 (s)	X
5'	7,45 (s)	-	7,57 (s)	-	7,54(s)	-	7,53 (s)	-
3 O-CH ₃	-	-	4,01 (s)	-	4,03 (s)	-	4,05 (s)	-
3' O-CH ₃	-	-	-	-	4,03 (s)	-	4,03 (s)	-
4 O-CH ₃	-	-	-	-	-	-	3,99 (s)	X
4' O-CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-

Bei Ellagsäure zeigte sich nur ein Peak im ¹HNMR Spektrum bei 7,45 ppm. Dieser einzige Peak basiert auf den beiden aromatischen Protonen, die aufgrund der Symmetrie des Moleküls die gleichen chemischen Verschiebungen besitzen. In den anderen drei Fällen konnten die Methoxygruppen eindeutig anhand der Integrationen und den chemischen Verschiebungen von etwa 3,8 – 4,0 ppm bestimmt werden (Tab. 3.1.1.a). Die

Positionen der Methoxygruppen konnten erst eindeutig durch die Aufnahme eines NOE (Nuclear Overhauser Effect) ^1H NMR Spektrums eindeutig bestimmt werden. Hierzu wird mit der Frequenz einer Methoxygruppe eingestrahlt und beobachtet, ob eine durch den Raum verlaufende Korrelation zu einem der beiden aromatischen Protonen besteht. Nur im Fall von 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure konnte solch eine Korrelation für eine der drei Methoxygruppen beobachtet werden (Abb. 3.1.1.i). Für die anderen beiden Methoxygruppe von 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure, sowie für die beiden Methoxygruppen von 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und für die eine Methoxygruppe von 3-Methyl-O-Ellagsäure konnte in keinem Fall eine solche NOE-Korrelation zu Proton 5 bzw. 5' festgestellt werden. Demnach ergab sich für die Substanzen 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3-Methyl-O-Ellagsäure nur eine mögliche Struktur.

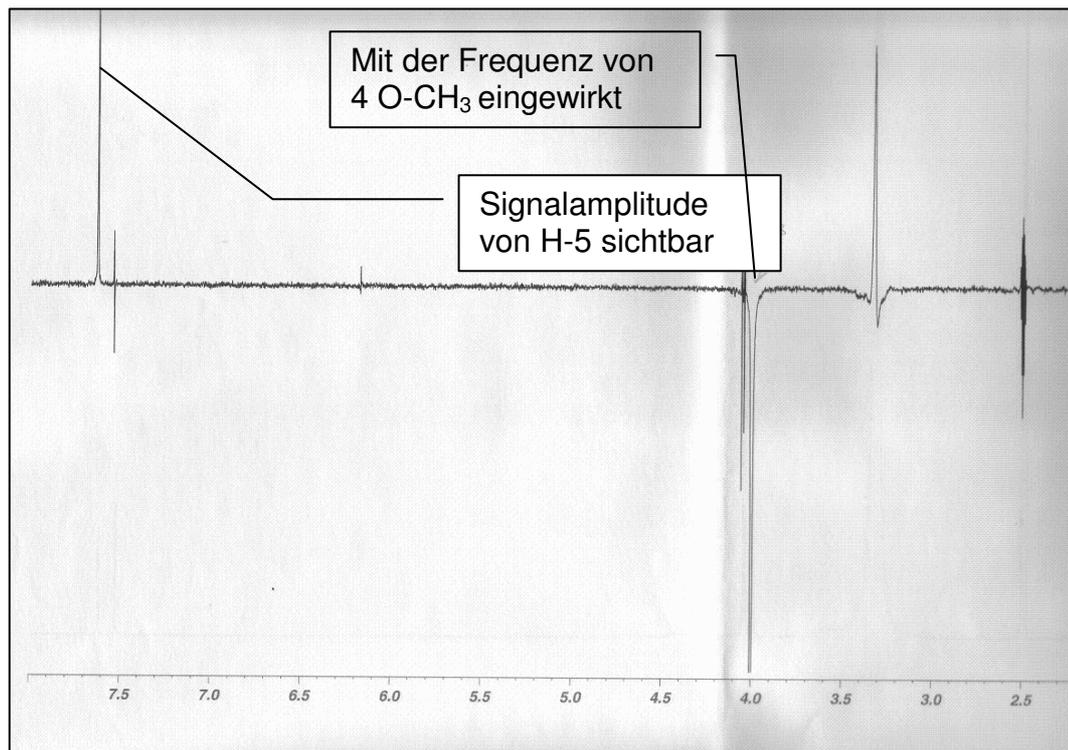


Abb. 3.1.1.i: NOE Korrelation von 4-OCH₃ zum Proton an Position 5 von 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure

3.1.2. Quantifizierungsergebnisse

Im Folgenden sind die Quantifizierungsergebnisse für Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure in Zweigen von *Sonneratia alba* dargestellt. Im März 2008 wurden Zweige von *Sonneratia alba* im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt. Zuerst wurde von den Zweigen die Rinde entfernt, um anschließend die Rinde und den Kernholzbestandteil durch eine HPLC-gestützte Quantifizierung getrennt zu untersuchen. Folgende Werte konnten dabei ermittelt werden (Abb. 3.1.2.):

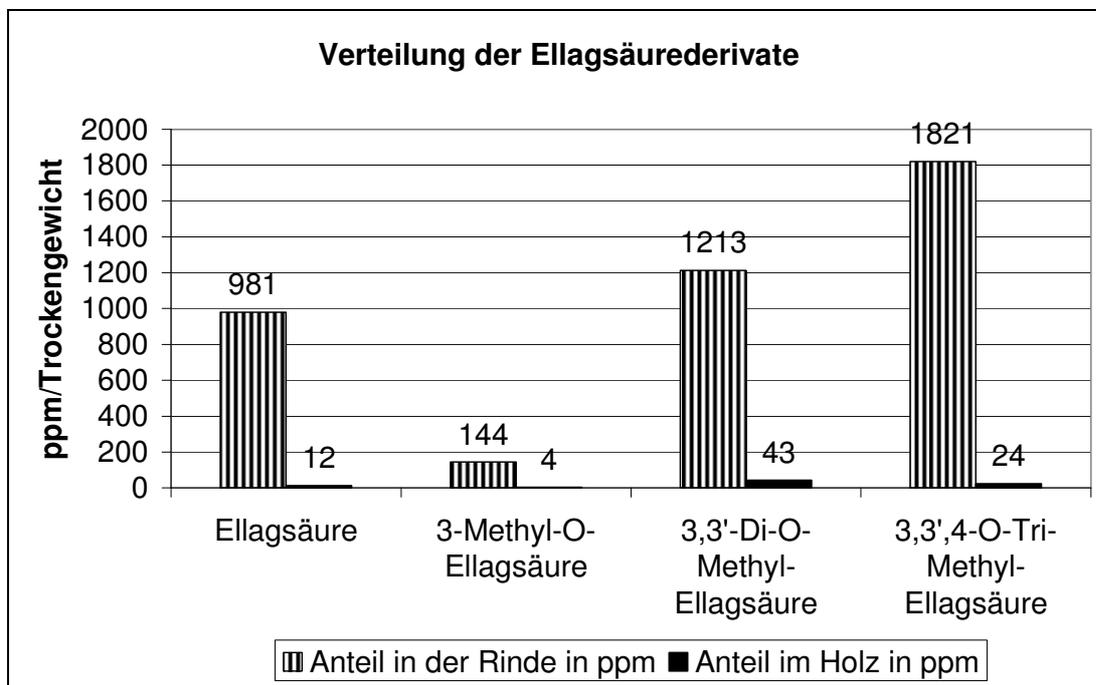


Abb. 3.1.2.: Quantitative Verteilung der Ellagsäurederivat in der Rinde und im Kernholz von *Sonneratia alba*

In der grafischen Darstellung (Abb. 3.1.2.) der semiquantitativen Gehaltserfassung der Ellagsäurederivate in Zweigen von *Sonneratia alba* ist zu erkennen, dass der Hauptanteil der Verbindungen in der Rinde akkumuliert.

3.1.3. Insektenbioassayergebnisse

Im Folgenden ist die Wirkung von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure auf *Spodoptera littoralis* (Boisduvall (Lepidoptera: Noctuidudae)) dargestellt.

3.1.3.1. Fraßhemmender Effekt von Ellagsäure

Um den fraßhemmenden Effekt von Ellagsäure zu untersuchen, wurde ein Wahlversuch durchgeführt. Bei einer Konzentration von 100 ppm Ellagsäure wird von den Insekten 2,5-mal mehr Futter ohne Ellagsäure verzehrt, als das ellagsäurehaltige Futter. Bei 80 ppm und bei 60 ppm wird immer noch etwa 2-mal mehr vom Futter ohne Ellagsäure gegessen. Erst bei einer Konzentration unterhalb von 40 ppm ist keine eindeutige Präferenz für die ellagsäurefreie Nahrung mehr zu erkennen. (Abb. 3.1.3.1.).

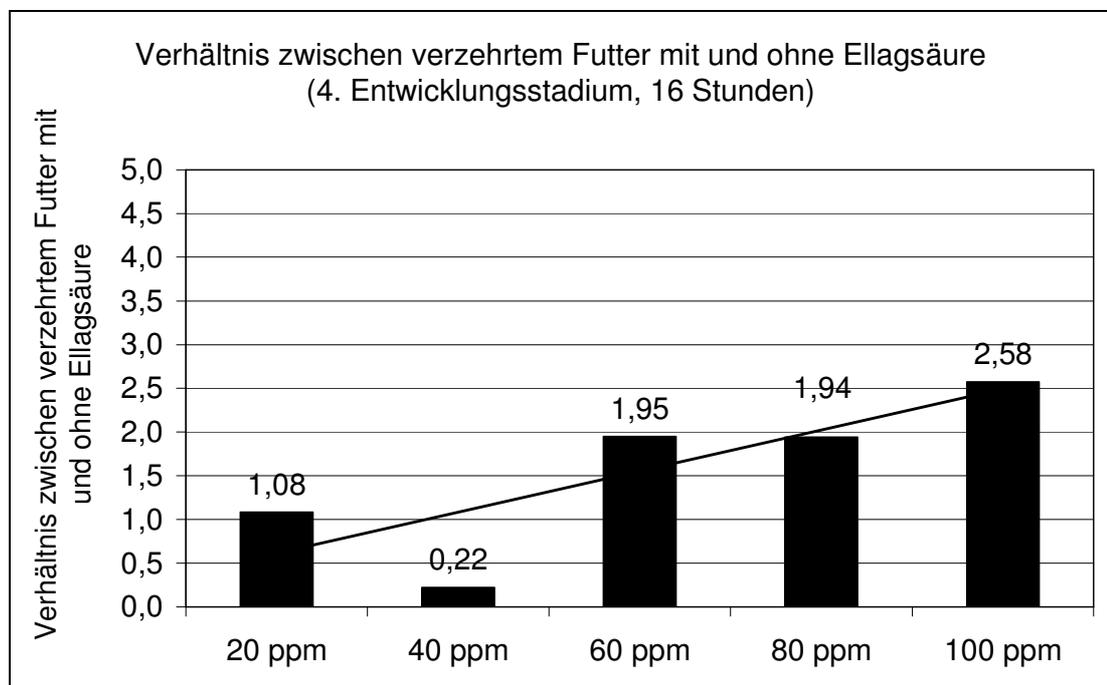


Abb. 3.1.3.1.: Repellenter Effekt von Ellagsäure auf *Spodoptera littoralis*

3.1.3.2. Langzeitversuch mit Ellagsäure

Durch einen Langzeitversuch sollte geklärt werden, wie *Spodoptera littoralis* auf eine 20-tägige Fütterung mit Ellagsäure in einer Konzentration von 20 ppm reagiert (Abb. 3.1.3.2.). Im Folgenden ist zu erkennen, dass selbst eine solch geringe Konzentration an Ellagsäure einen starken Effekt auf das Gewicht und die Überlebensrate hat. Hierzu wurden Neonates verwendet, die sich bis zu ihrem 20. Lebenstag entweder auf ellagsäurefreiem oder ellagsäurehaltigem Futter entwickeln konnten (Abb. 3.1.3.2.).

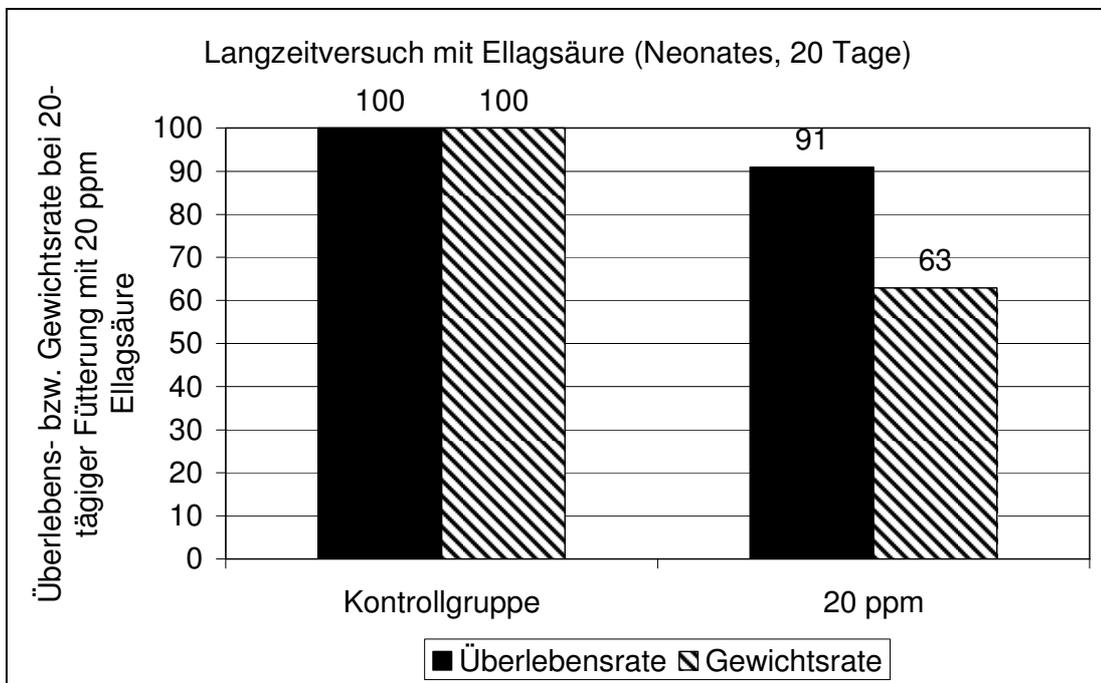
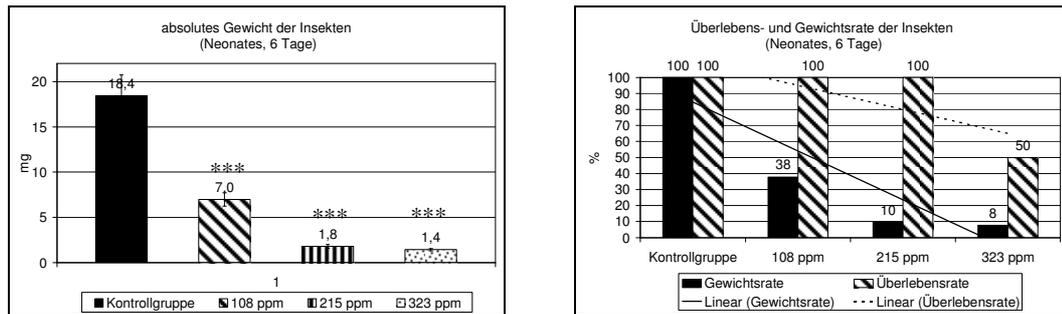


Abb. 3.1.3.2.: Langzeitversuch mit Ellagsäure: Wirkung aus *Spodoptera littoralis* bei einer Konzentration von 20 ppm

3.1.3.3. Fütterungsversuch mit verschiedenen Ellagsäurekonzentrationen

Ein weiterer Versuch sollte Aufschluss darüber geben, wie die Überlebens- bzw. Gewichtsrate von *Spodoptera littoralis* bei Fütterung unterschiedlicher Ellagsäurekonzentrationen ausfallen. Hierzu wurden Neonates verwendet, die sich entweder in einer Kontrollgruppe oder in einer der verschiedenen ellagsäurereichen Versuchansätze entwickeln konnten.

Nach der Signifikanzberechnung konnte gezeigt werden, dass alle Durchschnittsgewichte basierend auf ihren Standardabweichungen zu $p > 99\%$ signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausfallen (Abb. 3.1.3.3.). Bei einer Konzentration von 323 ppm zeigte sich zudem eine letale Wirkung. Somit kann der IC_{50} Wert mit etwa 90 ppm und der LC_{50} Wert mit etwa 320 ppm angegeben werden.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

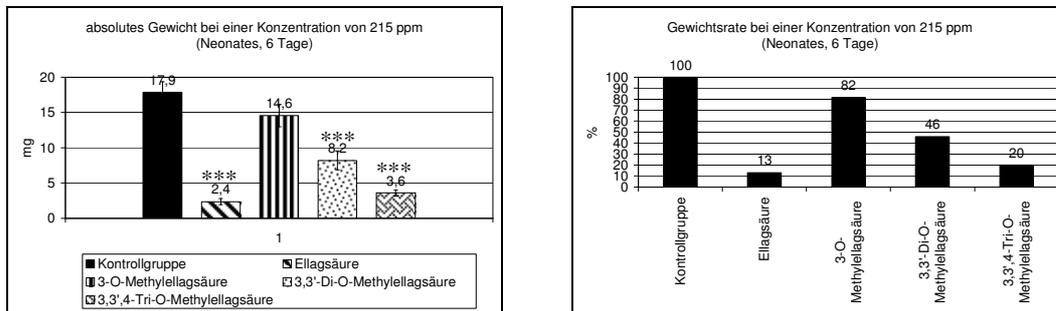
* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.1.3.3.: Wirkung von Ellagsäure auf *Spodoptera littoralis* bei Konzentrationen von 108 ppm, 215 ppm und 323 ppm

3.1.3.4. Gewichtsreduzierender Effekt von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure auf *Spodoptera littoralis*

Für Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure wurden die gewichtsreduzierende Wirkung auf *Spodoptera littoralis* ermittelt. Als einheitliche Konzentration wurde für diesen Test 215 ppm gewählt, da aus Vorversuchen hervorging, dass in diesem Konzentrationsbereich die Differenzierbarkeit der Bioaktivitäten aller vier Substanzen am optimalsten ist. Das gewichtsreduzierende Potential von 3-Methyl-O-Ellagsäure ist nicht signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch kann für alle anderen drei Substanzen eine signifikante Gewichtsreduktion mit $p > 99\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden. Es ist ersichtlich, dass Ellagsäure das stärkste gewichtsreduzierende Potential aufweist und 3-Methyl-O-Ellagsäure das schwächste Potential (Abb. 3.1.3.4.) aller methylierten Ellagsäurederivate besitzt. Bei der Konzentration von 215 ppm

wurde jedoch bei keiner der Substanzen ein zusätzlicher letaler Effekt bemerkt.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.1.3.4.: Gewichtsreduzierender Effekt von Ellagsäure, 3-Methyl-O-Ellagsäure, 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure auf *Spodoptera littoralis* bei einer Konzentration von 215 ppm

3.1.4. Kinaseinhibitionsassay

In den folgenden Versuchen wird das inhibitorische Potential von Ellagsäure, der bereits erwähnten Ellagsäuremethylether, weiterer Ellagsäurederivate und verschiedener synthetischer Verbindungen, die in der Ellagsäure als Teilstrukturen enthalten sind auf humane tumorrelevante Proteinkinasen untersucht. Ein Anhaltspunkt für eine solche Bioaktivität lieferte eine Literaturstelle [Cozza *et al.* 2006].

Zuerst jedoch wurde die ellagsäurereiche Ethylacetatfraktion diesem Test unterzogen. Die Abkürzungen der Enzyme sind im Methodenteil aufgelistet.

Zu erkennen ist, dass der Extrakt nicht auf alle Enzyme gleich stark inhibitorisch wirkt, sondern sich die Aktivität (IC_{50} -Werte) über eine komplette Bandbreite von 7 $\mu\text{g/mL}$ bis hin zu 119 $\mu\text{g/mL}$ erstreckt (Tab. 3.1.4.a).

Tab. 3.1.4.a: Bioaktivität des Ethylacetatextraktes von *Sonneratia alba* auf verschiedene humane tumorrelevante Proteinkinasen: IC₅₀ Werte des Ethylacetatextraktes in µg/mL

	AKT1	ARK5	Aurora-A	Aurora-B	B-RAF-VE	CDK2/CycA	CDK4/CycD1	CK2-alpha1
<i>S. alba</i> EtOAc	80	54	83	72	75	119	80	90
	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK	IGF1-R	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3
<i>S. alba</i> EtOAc	30	73	81	87	7	17	20	44
	FLT3	INS-R	MET	PDGFR-beta	COT	PLK1	SAK	TIE2
<i>S. alba</i> EtOAc	60	80	70	84	70	85	14	87

In einem weiteren Bioassay (Tab. 3.1.4.b) wurden die IC₅₀ Werte der Reinsubstanzen ermittelt. In der oberen Spalte ist jeweils die IC₅₀ Konzentration in µg/mL angegeben. Der untere Zahlenwert ist der daraus resultierende IC₅₀ Wert in µM. Jedes nicht beschriftete Feld ist ein Versuchsansatz ohne messbare Bioaktivität.

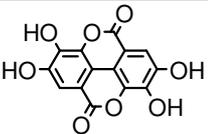
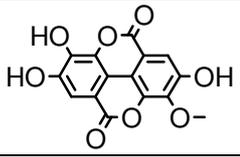
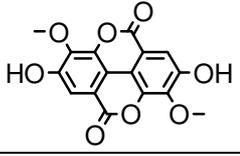
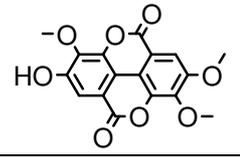
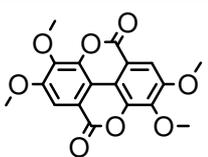
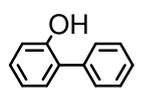
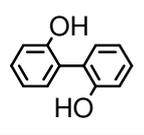
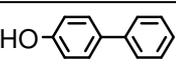
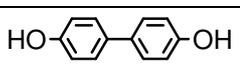
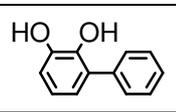
Aus diesen Experimenten ist ersichtlich, dass Ellagsäure die einzige Substanz ist, die alle Enzyme hemmen konnte. Die Bandbreite erstreckt sich von etwa 250 nM bis hin zu etwa 16 µM, was einem Unterschied von einem Faktor 64 entspricht. Die mittlere Hemmkonzentration von Ellagsäure liegt bei etwa 2,31 µM.

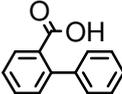
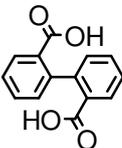
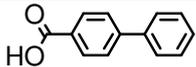
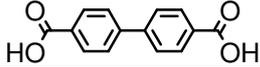
Die Aktivität von 3-Methyl-O-Ellagsäure ist schon deutlich reduziert, denn es können zum einen nicht mehr alle Enzyme gehemmt werden und zum anderen werden die Enzyme, die noch gehemmt werden nicht in dem Maße stark gehemmt, wie es Ellagsäure vermag.

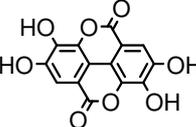
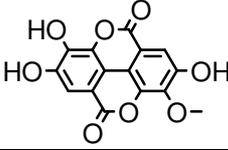
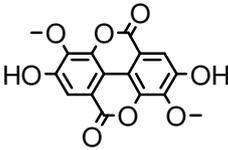
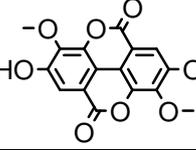
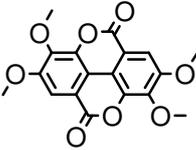
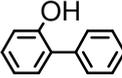
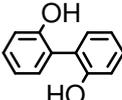
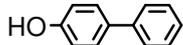
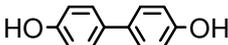
Bei der Anwesenheit einer weiteren Methylgruppe (3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure) ist die gesamte Aktivität verschwunden. Ebenso können keine Aktivitäten im Fall von den beiden möglichen dreifach methylierten Ellagsäurederivaten oder der vierfach methylierten Form mehr verzeichnet werden.

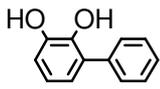
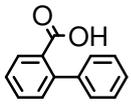
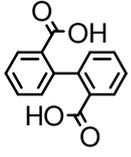
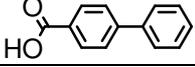
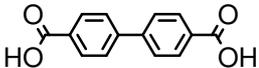
Auch die biphenolischen kommerziell erhältlichen Teilstrukturen von Ellagsäure sind bis auf 2,3-Dihydroxy-Biphenyl alle inaktiv. Letztere Substanz zeigt bei manchen Enzymen eine Aktivität. Zurückzuführen ist diese Bioaktivität auf das *o*-Dihydroxysystem, welches essentiell für die Wirkung ist.

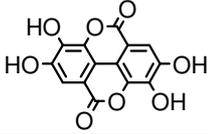
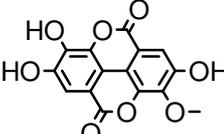
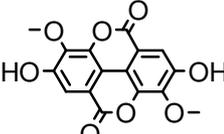
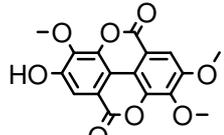
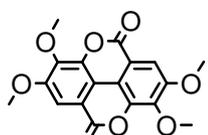
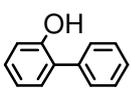
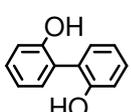
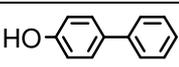
Tab. 3.1.4.b: Bioaktivität verschiedener Ellagsäurederivate und synthetische Teilstrukturen auf humane tumorrelevante Proteinkinasen: Oberer Zahlenwert: IC₅₀ Konzentration in g/L; Unterer Zahlenwert: IC₅₀ Konzentration in µM

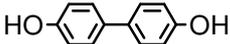
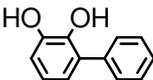
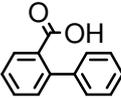
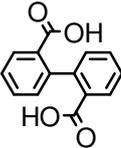
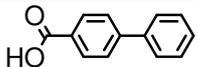
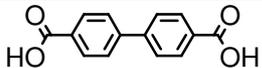
Name	Struktur	MG	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK
Ellagsäure		302,2	2,10E-07	5,50E-07	1,10E-06	9,40E-07
IC ₅₀ Wert in µM			0,69	1,82	3,64	3,11
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3	8,20E-06			
IC ₅₀ Wert in µM			24,83			
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				
Tetramethylellagsäure		358,3				
2-Phenyl-Phenol		186,2				
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				

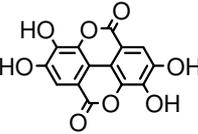
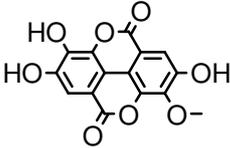
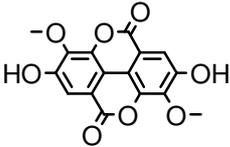
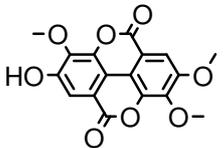
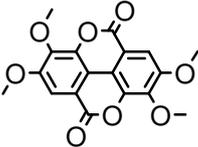
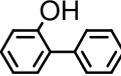
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				

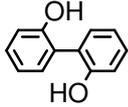
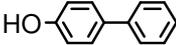
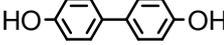
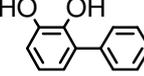
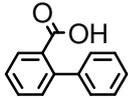
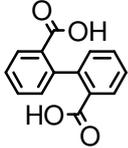
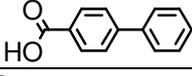
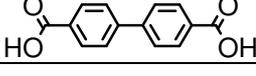
Name	Struktur	MG	IGF-1-R	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3
Ellagsäure		302,2	7,50E-08	2,40E-07	2,40E-07	4,60E-07
IC ₅₀ Wert in µM			0,25	0,79	0,79	1,52
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3	4,10E-06	6,00E-06	7,20E-06	9,80E-06
IC ₅₀ Wert in µM			12,41	18,17	21,80	29,67
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				
Tetramethylellagsäure		358,3				
2-Phenyl-Phenol		186,2				
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				

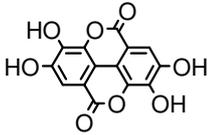
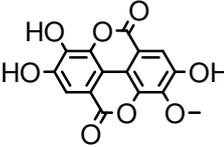
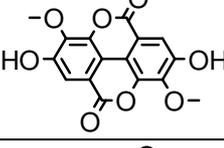
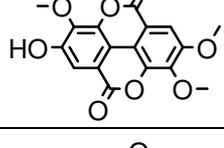
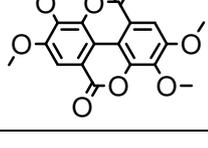
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2		4,20E-06	9,30E-06	
IC ₅₀ Wert in µM				22,56	49,94	
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				

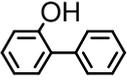
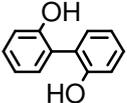
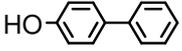
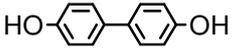
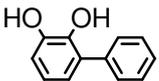
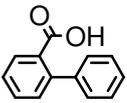
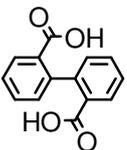
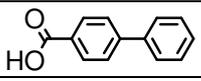
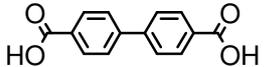
Name	Struktur	MG	AKT1	ARK5	Aurora-A	Aurora-B
Ellagsäure		302,2	1,00E-06	1,50E-07	7,50E-07	7,60E-07
IC ₅₀ Wert in µM			3,31	0,50	2,48	2,51
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3				
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				
Tetramethylellagsäure		358,3				
2-Phenyl-Phenol		186,2				
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				

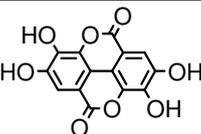
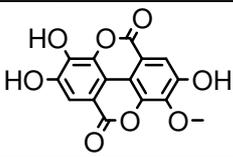
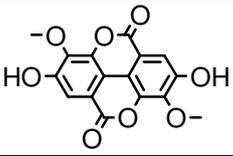
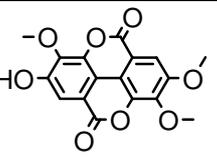
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2			2,10E-06	2,40E-06
IC ₅₀ Wert in µM					11,28	12,89
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				

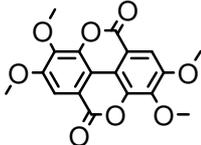
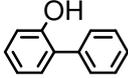
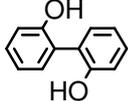
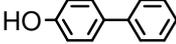
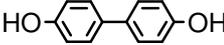
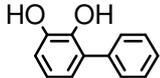
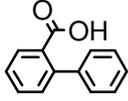
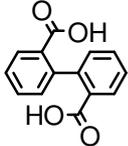
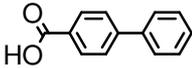
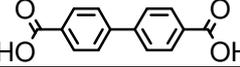
Name	Struktur	MG	CDK2/ CycA	CDK4/ CycD1	CK2- alpha1	FLT3
Ellagsäure		302,2	1,00E-06	3,30E-07	5,00E-06	1,00E-07
IC ₅₀ Wert in µM			3,31	1,09	16,55	0,33
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3				
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				
Tetramethylellagsäure		358,3				
2-Phenyl-Phenol		186,2				

2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				9,90E-06
IC ₅₀ Wert in µM						53,17
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				

Name	Struktur	MG	INS-R	MET	PDGFR-beta	PLK1
Ellagsäure		302,2	1,00E-07	1,70E-07	3,90E-07	1,00E-06
IC ₅₀ Wert in µM			0,33	0,56	1,29	3,31
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3				
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				
Tetramethylellagsäure		358,3				

2-Phenyl-Phenol		186,2				
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				

Name	Struktur	MG	SAK	TIE2	COT	B-RAF-VE
Ellagsäure		302,2	7,80E-08	9,00E-07	7,10E-07	5,30E-07
IC50 Wert in µM			0,26	2,98	2,35	1,75
3-Methyl-O-Ellagsäure		330,3	2,70E-06		9,40E-06	
IC50 Wert in µM			8,18		28,46	
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure		330,0				
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure		344,3				

Tetramethylellagsäure		358,3				
2-Phenyl-Phenol		186,2				
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl		170,2				
4-Phenyl-Phenol		186,2				
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl		186,2				
2,3-Dihydroxy-Biphenyl		186,2	6,90E-06	3,00E-06		
IC ₅₀ Wert in µM			37,05	16,11		
Biphenyl-2-Carbonsäure		198,2				
Diphensäure		242,2				
Biphenyl-4-Carbonsäure		198,2				
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure		242,2				
Ohne Füllung/keinen Wert	Sehr schwache oder keine Aktivität					
hellgrau	Schwache Aktivität					
dunkelgrau	Mittelstarke Aktivität					
schwarz	Starke Aktivität					

3.1.5. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y

Lymphomazellen

Um die tumorrelevante Hemmung von Ellagsäure und ihrer methylierten Derivate weiter zu untersuchen, wurden die Substanzen auch auf ein zelluläres System appliziert. Bei allen Versuchen wurde eine Konzentration von 10 µg/mL gewählt. In der rechten Spalte ist diese Konzentration in molare Konzentration umgerechnet. In diesem Versuch ist

zu erkennen, dass das inhibitorische Potential von Ellagsäure am zellulären System bei Weitem nicht in dem Maße ausgeprägt ist, wie an den verschiedenen tumorrelevanten Kinasen (Tab. 3.1.5.). Weiter können keine Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die Aktivität auf murine Lymphomazellen erhoben werden, da die Aktivitäten nicht mit den aus den Proteinkinaseuntersuchungen korrelieren.

Tab. 3.1.5.: Wachstumsinhibition verschiedener phenolischer Substanzen auf murine Lymphomazellen (L5178Y)

Name	MG	L5178Y Wachstum Kontrolle = 100%	Inhibierung in %	10 µg/mL = x µM
Ellagsäure	302,2	14,0	86	33,1
3-Methyl-O-Ellagsäure	316,2	56,2	43,8	31,6
3,3'-Di-O-Methyl- Ellagsäure	330,3	83,0	17	30,3
3,3',4-Tri-O-Methyl- Ellagsäure	344,3	100,3	-0,3	29
2-Phenyl-Phenol	170,2	100,9	-0,9	58,8
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl	186,2	41,0	59	53,7
4-Phenyl-Phenol	170,2	80,5	19,5	58,8
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl	186,2	5,4	94,6	53,7
2,3-Dihydroxy-Biphenyl	186,2	42,0	58	53,7
Biphenyl-2-Carbonsäure	198,2	96,4	3,6	50,4
Diphensäure	242,2	89,8	10,2	41,3
Biphenyl-4-Carbonsäure	198,2	78,7	21,3	50,4
Biphenyl-4,4'- Dicarbonsäure	242,2	107,9	-7,9	41,3

3.1.6. Tumorzellinhibitionsassay an verschiedenen humanen Zelllinien

Um die inhibitorische Wirkung von Ellagsäure auf humane Krebszelllinien zu untersuchen, wurde Ellagsäure im Rahmen eines MTT-Assays gegenüber verschiedenen Zelllinien untersucht. Es wurden Konzentrationen von 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM gewählt.

Die Wirkung auf folgende Zelllinien wurde untersucht

HepG2 humane Leberkarzinomzellen

MCF7 humane Brustkrebszelllinien

HCT116 humane Darmkrebszellen

Folgende Viabilitätsdaten konnten ermittelt werden:

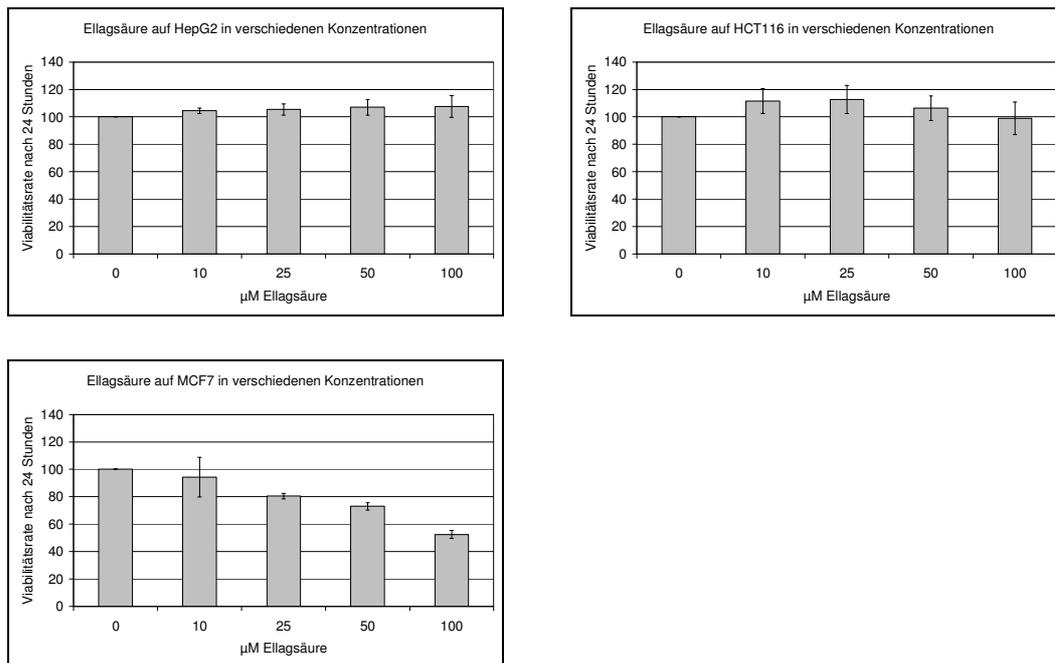


Abb. 3.1.6.: Inhibitorische Wirkung von Ellagsäure auf verschiedene humane Krebszelllinien

In Abb. 3.1.6. ist grafisch dargestellt, dass nur die humane Brustkrebszelllinie MCF7 gehemmt wird. Der IC_{50} Wert für diese inhibitorische Wirkung liegt bei etwa 100 µM.

Die Zelllinien HepG2 und HCT116 werden mit keiner der gewählten Konzentrationen von Ellagsäure in ihrer Viabilität gehemmt.

3.2. Sterole

3.2.1. β -Sitosterol

Aus der Mangrovenart *Lumnitzera littorea* (Combretaceae) konnte mittels BAGI aus der *n*-Hexan-Phase der Blätter β -Sitosterol als die im Hinblick auf die Schadinsektenart *Spodoptera littoralis* bioaktive Komponente identifiziert werden (Abb. 3.2.1.a). Im April 2006 wurden etwa 4,5 kg Blattmaterial von *Lumnitzera littorea* im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt und im Labor von Prof. Dr. Wenhan Lin an der Universität in Peking ein Rohextrakt mittels 90%igem Ethanol hergestellt. Dieser Rohextrakt wurde in Deutschland wieder komplett in 90%igem Methanol gelöst, gefiltert und mittels Scheidetrichter der lipophile, in *n*-Hexan lösliche Teil extrahiert. Die eingedampfte *n*-Hexan-Phase wurde mit einer auf Silicagel basierenden VLC getrennt. In der Fraktion, die mit dem Lösungsmittelgemisch von 7:3 *n*-Hexan:Ethylacetat eluiert wurde, konnte die Bioaktivität festgestellt werden (Abb. 3.2.1.a). Diese Fraktion wurde mittels einer auf DIOL-Material basierenden Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch von 6:4 *n*-Hexan:Aceton getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels DC auf Reinheit und anhand von Insektentests auf Bioaktivitäten hin getestet. Nachdem eine bioaktive Fraktion mit nur einer Komponente gefunden wurde, wurde die isolierte Substanz als β -Sitosterol eindeutig mittels $^1\text{HNMR}$ und EI-MS identifiziert. Zur Bestätigung der biologischen Aktivität des isolierten β -Sitosterols wurde der Insektenbioassay mit kommerziell erhältlichem β -Sitosterol wiederholt und bestätigt.

β -Sitosterol ist ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Phytosterol. Hinsichtlich der Isolierung aus *Lumnitzera littorea* kann festgehalten werden, dass aus dieser Pflanzenart dieses Phytosterol erstmals isoliert wurde. Aufgrund des nahezu ubiquitären Vorkommens von β -Sitosterol im Pflanzenreich, nimmt dieser Befund jedoch eine untergeordnete Rolle ein.

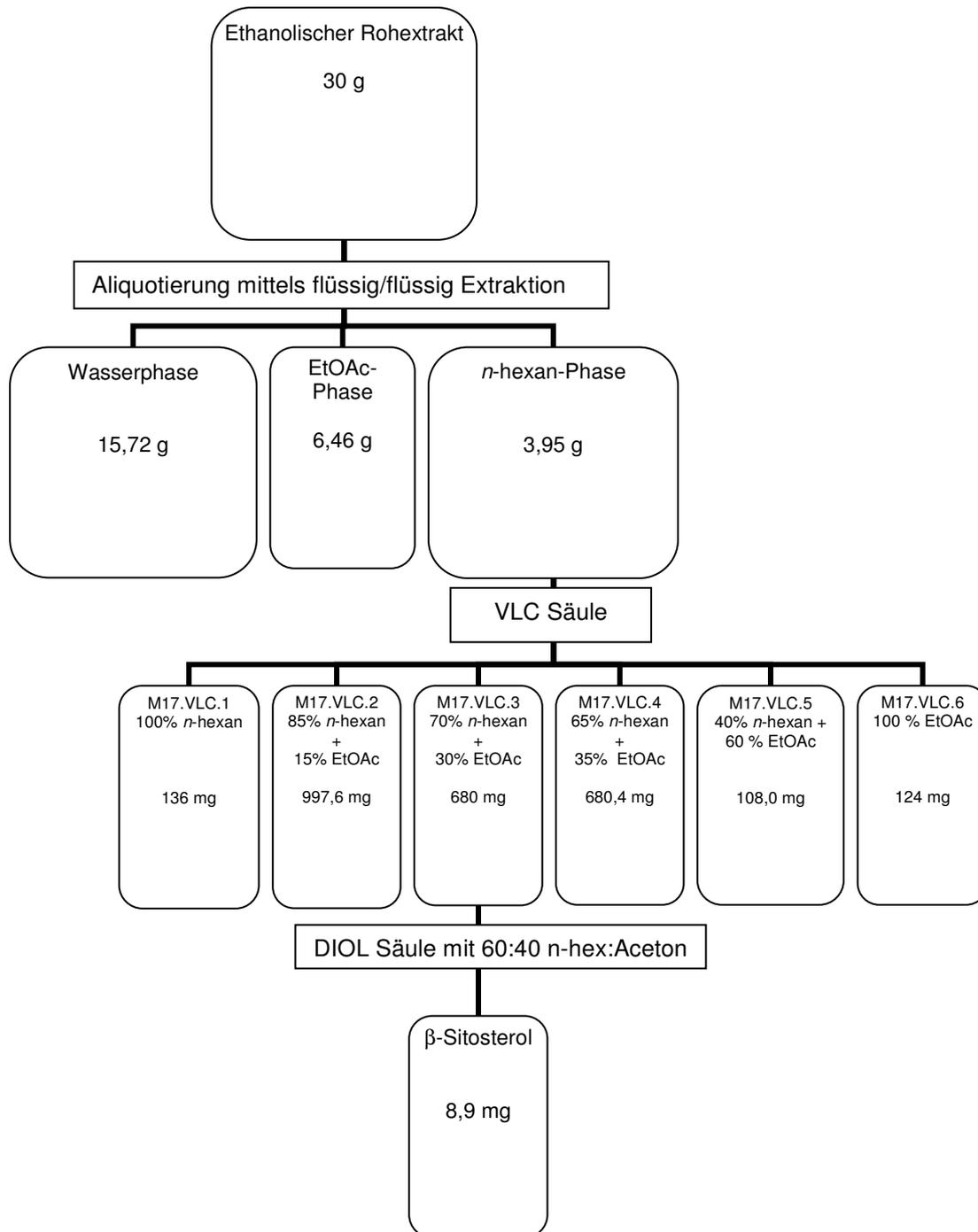
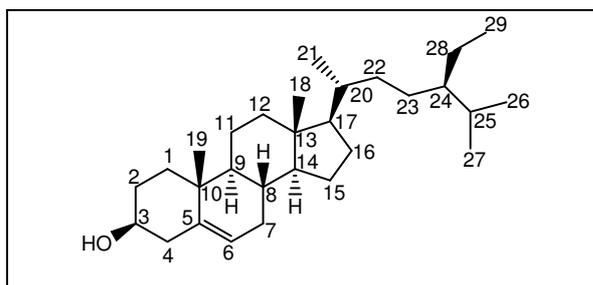


Abb. 3.2.1.a: Isolierungsschema von β -Sitosterol aus den Blättern von *Lumnitzera littorea*

Nachdem β -Sitosterol isoliert werden konnte, wurde eine ^1H NMR Messung durchgeführt. Im Vergleich zu den Literaturwerten ist zu erkennen, dass es sich aufgrund der Verschiebungen der Protonen an der Position 3 und an der Position 6, sowie an den Methylgruppen an den Positionen 18, 19, 21, 26, 27 und 29 eindeutig um β -Sitosterol handelt (Tab. 3.2.1.a; Abb. 3.2.1.b). Das NMR-Spektrum ist in Kapitel 7.4. abgebildet.

Tab. 3.2.1.a: Charakteristische ^1H NMR-Daten von β -Sitosterol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	[Greca <i>et al.</i> 1990] CDCl_3 400 MHz	β -Sitosterol CDCl_3 500 MHz
	$\delta\text{H(m, JHz)}$	$\delta\text{H(m, JHz)}$
3	3,52 (1H m)	3,52 (1H m)
6	5,35 (1H m)	5,35 (1H m)
18	0,69 (3H s)	0,68 (3H s)
19	1,01 (3H s)	1,01 (3H s)
21	0,92 (3H d $J=6,4$)	0,93 (3H d $J=3,7$)
26	0,83 (3H d $J=6,9$)	0,83 (3H d $J=7,2$)
27	0,81 (3H d $J=6,9$)	0,81 (3H d $J=7,2$)
29	0,85 (3H t $J=7,8$)	0,85 (3H t $J=7,8$)

Abb.3.2.1.b: β -Sitosterol

Durch das Molekulargewicht konnte die Struktur weiter bestätigt werden. Da die LC-MS Methode für die Strukturaufklärung aufgrund fehlender Ionisierung des β -Sitosterols im ESI-Verfahren nicht geeignet war, wurde ein EI-MS Spektrum dieser Substanz aufgenommen (Abb. 3.2.1.c). Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Substanz um β -Sitosterol handelt, da dasselbe Spektrum mit kommerziell erworbenem β -Sitosterol erhalten werden konnte.

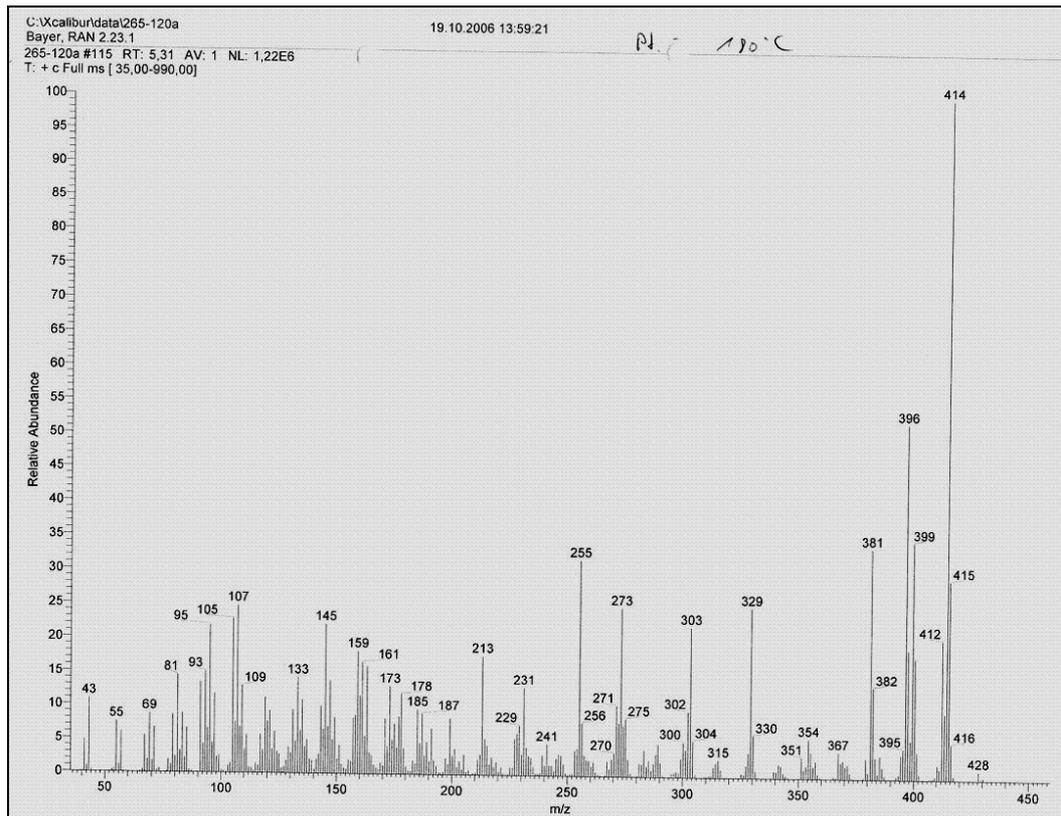


Abb. 3.2.1.c: EI-MS Spektrum von β -Sitosterol

3.2.2. Semiquantitative Gehaltserfassung

Um einen semiquantitativen Eindruck über die Konzentration von β -Sitosterol im Blattgewebe der Pflanzen der Gattung *Lumnitzera* zu gewinnen, wurden im März 2008 etwa 50 g Frischmaterial von *Lumnitzera racemosa* im Mangroviengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt und mittels DC semiquantitativ bestimmt (Abb. 3.2.2.). Als Vergleichsstandard wurde kommerziell erhältlichliches β -Sitosterol verwendet.

Der Anteil von β -Sitosterol bezogen auf das Frischgewicht konnte nach Auswertung der Dünnschichtchromatographie auf ca. 450 ppm berechnet werden. Die stoffliche Zusammensetzung der Kutikula ist mit der des Blattgewebes identisch und zusammen beträgt sie nur etwa 2% des Frischgewichtes.

Folgender Gehalt konnte dabei ermittelt werden:

	Anteil bezogen auf das Frischgewicht
Kutikula	0,3%
Gewebe	1,8%

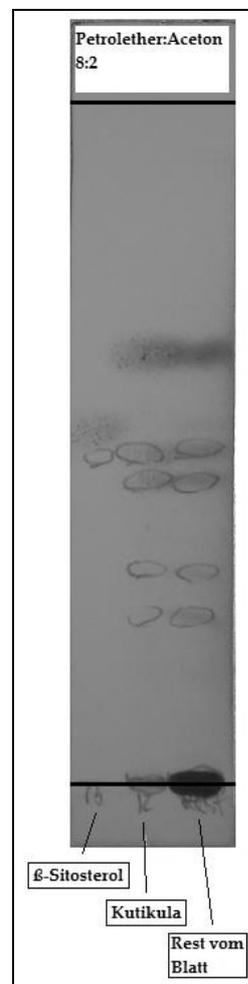


Abb. 3.2.2.: β -Sitosterol Nachweis mittels DC in den Blättern von *Lumnitzera racemosa*

3.2.3. Insektenbioassayergebnisse

3.2.3.1. Langzeittest

Um die entwicklungsbeeinflussende Wirkung von β -Sitosterol auf die Raupen der Insektenart *Spodoptera littoralis* zu untersuchen, wurden jeweils 10 Neonates mit normalem Standardfutter oder mit β -Sitosterol-haltigem Futter (300 ppm) aufgezogen. Ab dem 6. Lebenstag wurden alle Raupen alle 24 Stunden einzeln gewogen, um eine Gewichtsverlaufskurve für beide

Gruppen erstellen zu können. Das letzte Gewicht der Kontrollgruppe konnte am 19. Tag gemessen werden, da ab diesem Zeitpunkt alle Raupen ins Puppenstadium übergegangen waren. Bei der Verumgruppe konnten die letzten noch nicht verpuppten Raupen am 21. Tag beobachtet werden. Es ist zu erkennen, dass die Entwicklungsdauer durch die ständige Fütterung mit 300 ppm β -Sitosterol verlängert, sowie das Gewicht verringert wird (Abb. 3.2.3.1.a).

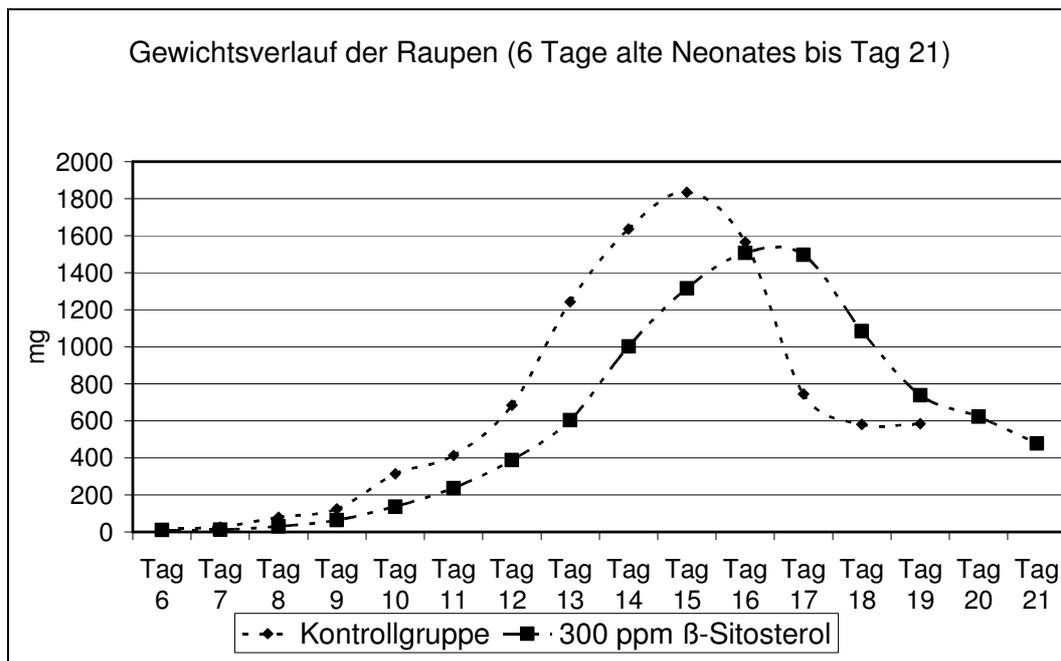


Abb. 3.2.3.1.a: Gewichtsverlauf der Larven von *Spodoptera littoralis* bei ständiger Fütterung mit 300 ppm β -Sitosterol

Im Folgenden sind die einzelnen Gewichtsverlaufkurven der Kontrollgruppe (Abb. 3.2.3.1.b) und der Verumgruppe (Abb. 3.2.3.1.c) dargestellt. Jeweils sind die Standardabweichungen des Mittelwertes, sowie die Signifikanz der Fütterung mit β -Sitosterol zu der Fütterung ohne β -Sitosterol dargestellt. Die durchschnittlichen Gewichte der sich entwickelnden Raupen unterscheiden sich bis auf den Wert des 16. Tages statistisch signifikant mit $p > 99\%$, da an diesem Tag das abnehmende Gewicht der Kontrollgruppe den Kurvenverlauf der mit β -Sitosterol gefütterten Insekten schneidet. Weiter ist zu erkennen, dass es am 19., 20. und 21. Tag keine signifikanten Abweichungen mehr gibt. Hier konnten keine Signifikanzen mehr berechnet werden, da zu diesen Zeitpunkten alle Kontrollinsekten

schon in das Puppenstadium übergegangen waren. An allen anderen Tagen konnte eine Signifikanz von $p > 99\%$ errechnet werden (T-Test).

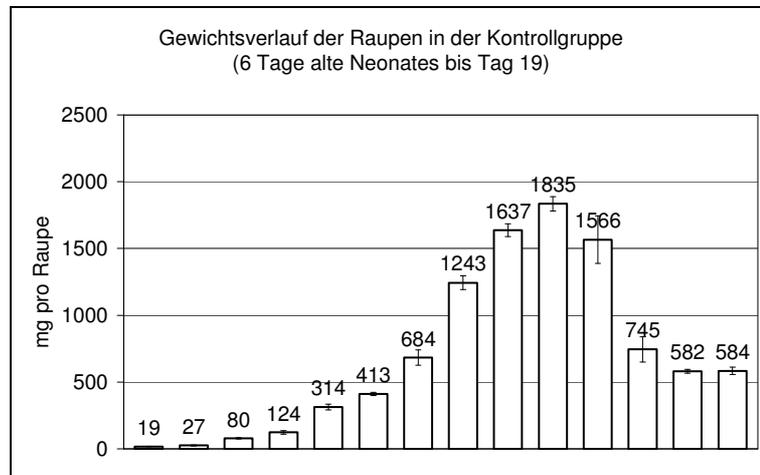
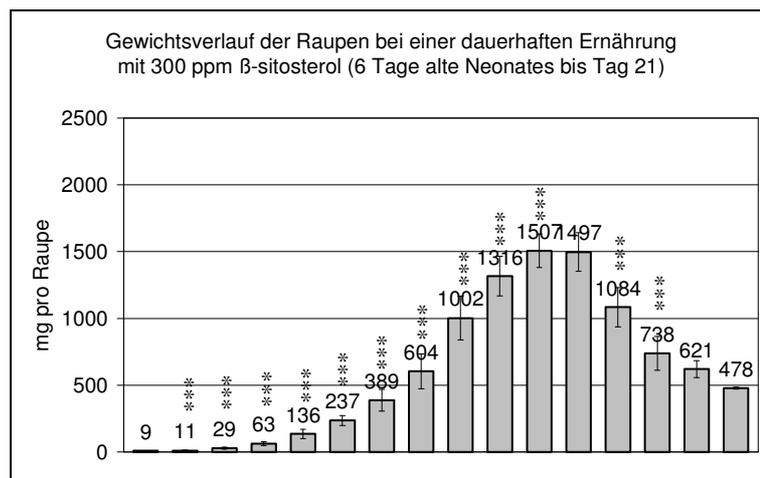


Abb. 3.2.3.1.b: Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe im Langzeit β -Sitosterol Versuch



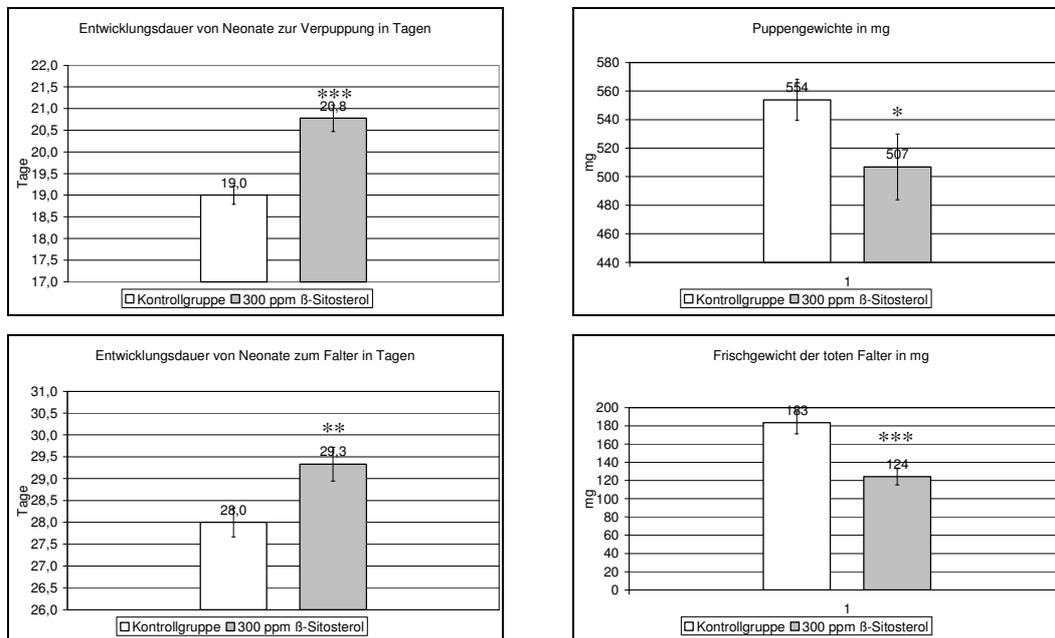
Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.2.3.1.c: Gewichtsverlauf der Verumgruppe im Langzeit β -Sitosterol Versuch

Ferner konnten Daten bezüglich der Entwicklungsdauer vom Schlüpfen bis zur Verpuppung, der Puppengewichte, der Entwicklungsdauer vom Neonate bis zum adulten Falter sowie der Gewichte der adulten Falter, die nach der Eiablage tot aufgefunden wurden (Abb. 3.2.3.1.d), erhoben werden. Es ist zu erkennen, dass bei Fütterung mit 300 ppm β -Sitosterol die Entwicklungsdauer von Neonates zu Puppen, sowie von Neonates zu Faltern mit einer Signifikanz von $p > 98\%$ um etwa 10% verlängert wurde. Die Gewichte der Puppen der mit 300 ppm β -Sitosterol behandelten

Insektengruppe waren signifikant ($p > 95\%$) reduziert, die Gewichte der Falter ebenfalls signifikant ($p > 99\%$) reduziert.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.2.3.1.d: Langzeit β -Sitosterol Versuch: Entwicklungsdauer der Insekten und Gewichte der Puppen bzw. der Falter im Vergleich zur Kontrollgruppe

Nachdem die adulten Falter jeder Gruppe zusammengebracht wurden, konnte die Menge der abgelegten Eier ermittelt werden, indem die abgelegten Eigelege gewogen wurden. Die Gelege der beiden Gruppen wurden getrennt von einander inkubiert und anschließend die daraus geschlüpften Neonates der nächsten Generation gezählt. Es ist ersichtlich, dass die Falter, die während ihres Puppenstadiums mit 300 ppm β -Sitosterol gefüttert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa 55% weniger Eier legten. Aus den gelegten Eiern schlüpfen bei der Kontrollgruppe etwa 1000 Neonates, bei der Verumgruppe nur 3 Neonates. Dies bedeutet eine Fertilitätsreduktion um 99,7%. (Abb. 3.2.3.1.e).

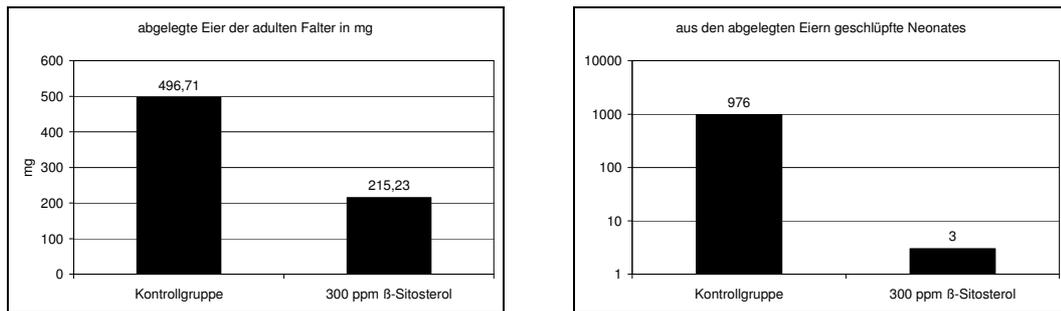


Abb. 3.2.3.1.e: Langzeit β -Sitosterol Versuch: Abgelegte Eier der Placebo und Verum Gruppe und die aus den abgelegten Eiern geschlüpften Neonates

Im Folgenden werden Aufnahmen der adulten Falter gezeigt. Phänotypisch ist makroskopisch keine Veränderung zu sehen. Die markantere Flügelstellung der Falter bei der Verumgruppe ist das einzige Merkmal, das in einigen Fällen phänotypisch verändert ist (Abb. 3.2.3.1.f; Abb. 3.2.3.1.g), welches aber nicht zwangsläufig auf die Fütterung mit β -Sitosterol zurückzuführen sein muss.



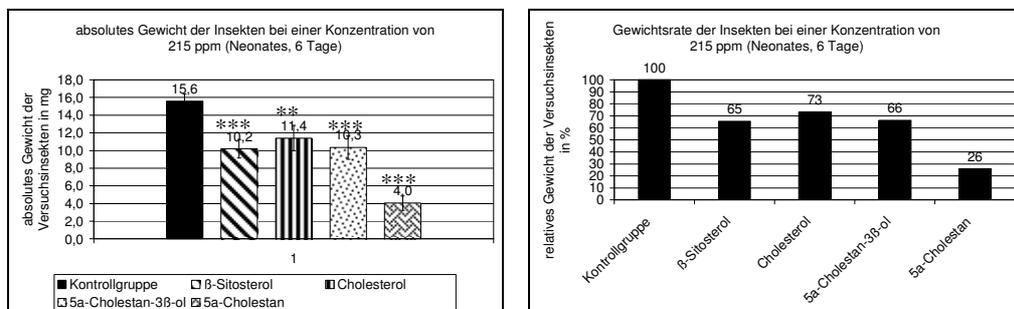
Abb. 3.2.3.1.f: Langzeit β -Sitosterol Versuch: Phänotypische Merkmale der Kontrollgruppe (oben) und der Verumgruppe (unten)



Abb. 3.2.3.1.g: Langzeit β -Sitosterol Versuch: Phänotypische Merkmale der Kontrollgruppe (oben) und der Verumgruppe (unten)

3.2.3.2. Insektizider Vergleich zwischen β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan

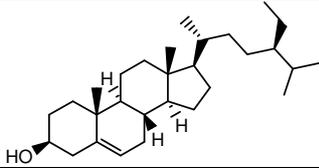
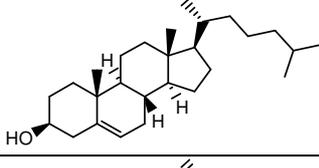
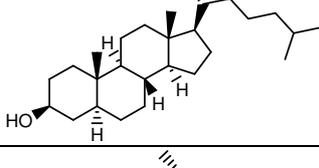
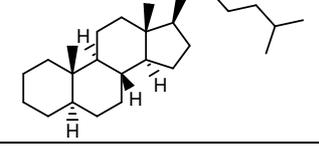
Um einen weiteren Vergleich der insektizider Aktivität zwischen β -Sitosterol und anderen kommerziell erhältlichen Steroiden (Tab. 3.2.3.2.) zu erhalten, wurden Kurzzeittests über 6 Tage hinweg mit Neonates durchgeführt. β -Sitosterol, Cholesterol und 5α -Cholestan- 3β -ol besitzen ungefähr die gleiche Wirkung, wohingegen aber 5α -Cholestan eine etwas stärkere gewichtsreduzierende Wirkung besitzt (Abb. 3.2.3.2.).



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:
 * >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.2.3.2.: Vergleich der Wirkung zwischen β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 3α -Cholestan auf Neonates von *Spodoptera littoralis*

Tab. 3.2.3.2.: Strukturen von β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan

β -Sitosterol	
Cholesterol	
5α -Cholestan- 3β -ol	
5α -Cholestan	

3.2.4. Kinaseinhibitionsassay

β -Sitosterol wurde weiter auf die Fähigkeit hin untersucht, humane tumorrelevante Proteinkinasen zu hemmen. Die folgende Tabelle zeigt ein breites Spektrum von verschiedenen Kinasen, anhand derer diese Bioaktivität untersucht wurde. Die nicht ausgefüllten Stellen in der Tabelle bedeuten, dass hier keine Hemmung beobachtet werden konnte. Es werden nur 3 der insgesamt 24 untersuchten Kinase gehemmt. Die stärkste Hemmung wird bei einem IC_{50} Wert von $8,68 \mu\text{M}$ beobachtet, die beiden schwächeren weisen einen IC_{50} Wert von etwa $20 \mu\text{M}$ auf ($18,81 \mu\text{M}$ und $22,91 \mu\text{M}$) (Tab. 3.2.4.).

Tab. 3.2.4: Bioaktivität von β -Sitosterol auf humane tumorrelevante Proteinkinasen: Oberer Zahlenwert: IC_{50} Konzentration in g/L; Unterer Zahlenwert: IC_{50} Konzentration in μM

Name	MG	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK	IGF-1-R	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3	AKT1	ARK5	Aurora-A
β -Sitosterol	414,71					9,50E-06	3,60E-06					
	IC_{50} Wert in μM					22,91	8,68					

Name	MG	Aurora-B	PAK4	PDK1	CDK2/CycA	CDK4/CycD1	CK2-alpha1	FLT3	INS-R	MET	PDGFR-beta	PLK1	SAK	TIE2	COT	B-RAF-VE
β -Sitosterol	414,71															7,80E-06
	IC ₅₀ Wert in μ M															18,81

3.2.5. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y Lymphomazellen

Anhand einer Zellkultur von murinen Lymphomazellen wurde der Effekt von β -Sitosterol auf intakte Zellen getestet. β -Sitosterol und 5α -Cholestan entfalten keine Zytotoxizität. Die Toxizität von Cholesterol und 5α -Cholestan- 3β -ol ist relativ gering (Tab. 3.2.5.).

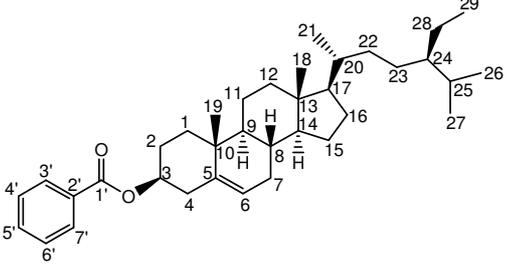
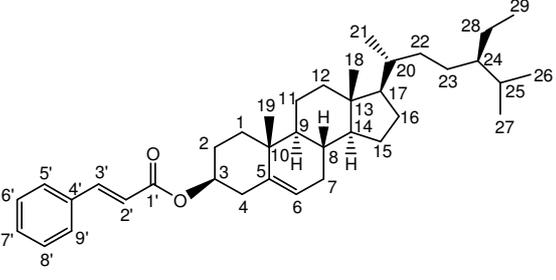
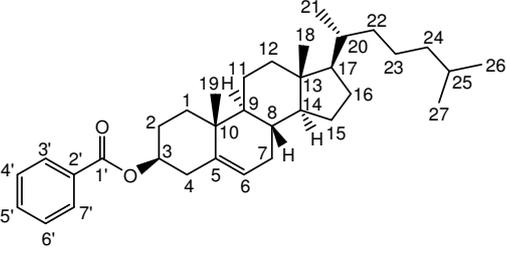
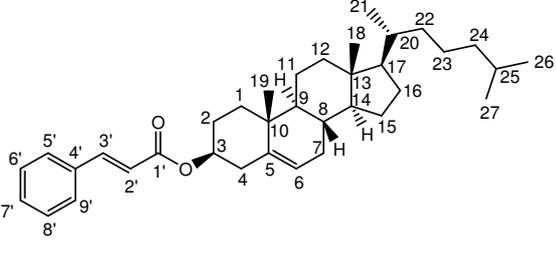
Tab. 3.2.5.: Inhibition von β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan auf murine Lymphomazellen (L5178Y)

Name	MG	L5178Y Wachstum Kontrolle = 100%	Inhibierung in %	10 μ g/ml = x μ M
β -Sitosterol	414,7	102,5	-	24,1
Cholesterol	386,7	84,4	15,6	25,9
5α -Cholestan- 3β -ol	388,7	95,5	4,5	25,7
5α -Cholestan	372,7	106,9	-	26,8

3.2.6. Semisynthetische Sterolderivate

Für den ICAM-1 Expressionsunterdrückungsbioassay (Kapitel 3.5.) wurden für die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung Derivate verschiedener Sterole synthetisiert (Tab. 3.2.6.a). Von β -Sitosterol, sowie von Cholesterol wurden jeweils Benzoyl- und Zinnamoyl-Ester synthetisiert. Als Ausgangssubstanz dienten kommerziell erhältliche Steroide und Benzoylchlorid sowie Zinnamoylchlorid (siehe Kapitel 2.4.). Die NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. abgebildet.

Tab. 3.2.6.a: Synthetisierte Derivate von β -Sitosterol und Cholesterol

Benzoyl- β -Sitosterol	
Zinnamoyl- β -Sitosterol	
Benzoyl-Cholesterol	
Zinnamoyl-Cholesterol	

Da die Ausgangsstoffe β -Sitosterol und Cholesterol kommerziell erworben wurden, besteht kein Zweifel an deren Strukturen. Dennoch wurden ^1H NMR Spektren aufgenommen, um deren Strukturen zu bestätigen.

Im Fall von Benzoyl- β -Sitosterol (Tab. 3.2.6.b) ist das aromatische AA'BB'C Spinsystem des aromatischen Esters bei einer Verschiebung zwischen 7,4 und 8,0 ppm zu erkennen.

Tab. 3.2.6.b: Charakteristische ¹HNMR-Daten von Benzoyl-β-Sitosterol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Benzoyl-β-Sitosterol CDCl ₃ 500 MHz
	δH(m, J/Hz)
3	4,88 (1H m)
6	5,42 (1H m)
18	0,69 (3H m)
19	1,7 (3H s)
21	0,93 (3H d J=6,6 Hz)
26	0,84 (3H d J=6,9 Hz)
27	0,82 (3H d J=6,9 Hz)
29	0,86 (3H t J=3(7,2;5,1) Hz)
3'7'	8,0 (2H dd J=1,5(1,6);5,0 Hz)
4'6'	7,43 (2H t J=7,5 Hz)
5'	7,54 (1H t J=7,5 Hz)

Bei Zinnamoyl-β-Sitosterol (Tab. 3.2.6.c) lassen sich die Protonen der *E*-konfigurierten Doppelbindung mit einer Kopplungskonstante von 15,75 Hertz erkennen. Zudem erscheinen die Protonen 5', 6', 7', 8' und 9' als AA'BB'C System, was typisch für den unsubstituierten Aromaten einer Zimtsäure ist.

Tab. 3.2.6.c: Charakteristische ¹HNMR-Daten von Zinnamoyl-β-Sitosterol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Zinnamoyl-β-Sitosterol CDCl ₃ 500 MHz
	δH(m, J/Hz)
3	4,78 (1H m)
6	5,41 (1H m)
18	0,69 (3H m)
19	1,05 (3H s)
21	0,93 (3H d J=6,3 Hz)
26	0,83 (3H d J=3,8 Hz)
27	0,81 (3H d J= 6,9 Hz)
29	0,85 (3H t J=1,9(7,5;4,7) Hz)
2'	6,43 (1H d J=16,1 Hz)
3'	7,67 (1H d J=15,7 Hz)
5'9'	7,52 (2H m)
6'7'8'	7,38 (3H m)

Bei Benzoyl-Cholesterol (Tab. 3.2.6.d) lässt sich wie bei Benzoyl-β-Sitosterol das aromatische AA'BB'C Spinsystem der veresterten

Benzoessäure erkennen, welches im Tieffeldbereich von etwa 7,5 bis 8,0 ppm erscheint.

Tab. 3.2.6.d: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Benzoyl-Cholesterol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Benzoyl-Cholesterol CDCl_3 500 MHz
	$\delta\text{H(m, JHz)}$
3	4,86 (1H, m)
6	5,42 (1H m)
18	0,69 (3H s)
19	1,07 (3H s)
21	0,92 (3H d $J=6,6$ Hz)
26	0,86 (3H d $J=2,2$ Hz)
27	0,87 (3H d $J=2,2$ Hz)
3'7'	8,04 (2H d $J=7,2$)
4'6'	7,43 (2H m)
5'	7,54 (1H t $J=7,2(7,5)$ Hz)

Bei Zinnamoyl-Cholesterol (Tab. 3.2.6.e) lässt sich wie bei Zinnamoyl- β -Sitosterol eine *E*- konfigurierte Doppelbindung (Kopplungskonstante von etwa 16 Hz) mit den chemischen Verschiebungen von 6,43 und 7,67 ppm erkennen, sowie das aromatische AA'BB'C System im Bereich von 7,5 bis 8,0 ppm erkennen.

Tab. 3.2.6.e: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Zinnamoyl-Cholesterol

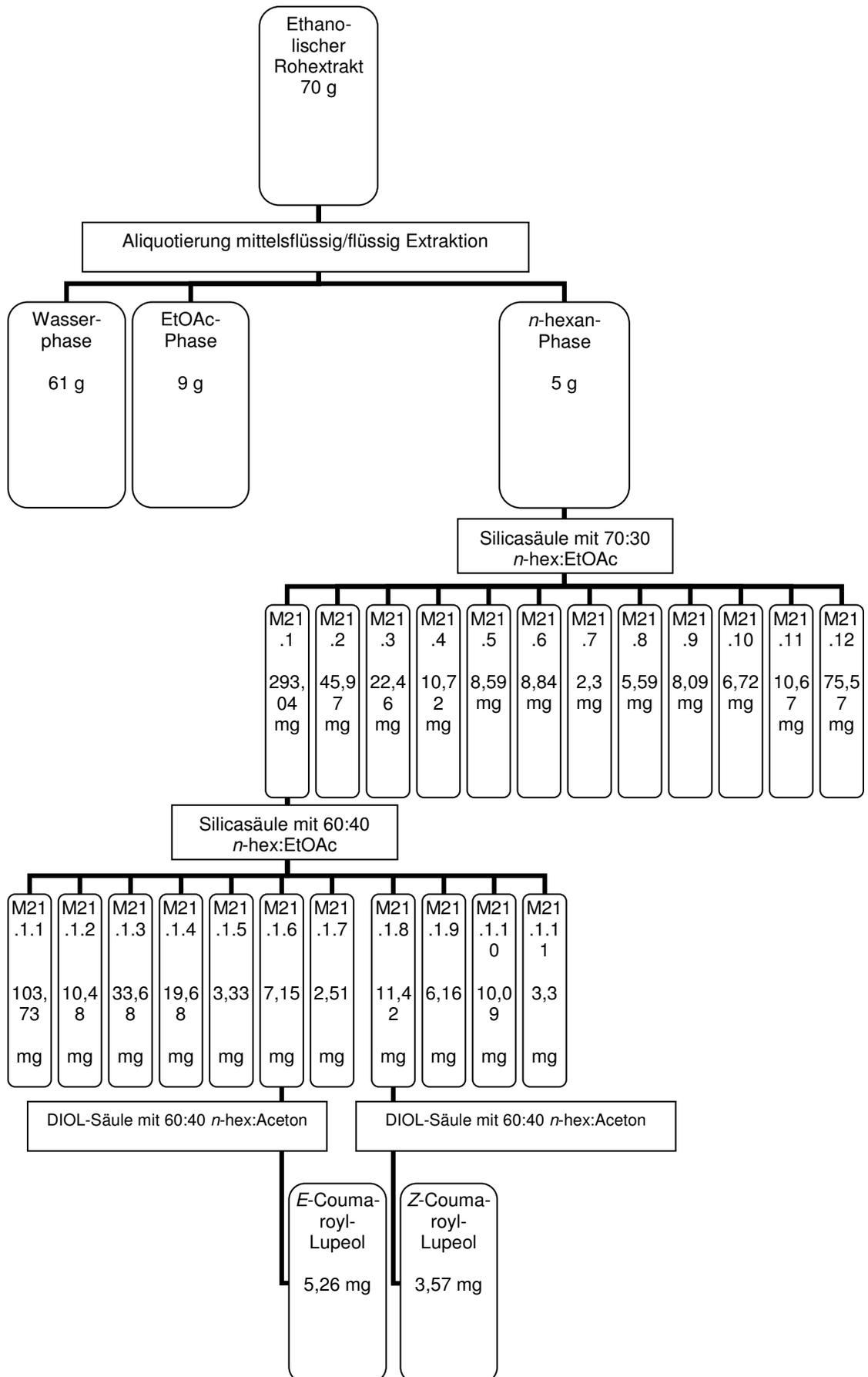
Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Zinnamoyl-Cholesterol CDCl_3 500 MHz
	$\delta\text{H(m, JHz)}$
3	4,75 (1H m)
6	5,41 (1H m)
18	0,69 (3H s)
19	1,05 (3H s)
21	0,91 (3H d $J=6,3$ Hz)
26	0,86 (3H d $J=1,2$ Hz)
27	0,87 (3H d $J=1,2$ Hz)
2'	6,43 (1H d $J=16,1$ Hz)
3'	7,67 (1H d $J=16,0$ Hz)
5'9'	7,52 (2H m)
6'7'8'	7,38 (3H m)

3.3. *E*-Coumaroyl-Lupeol und *Z*-Coumaroyl-Lupeol

In dem lipophilen Blattextrakt (*n*-Hexan-Phase) der Mangrovenart *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) wurde in Vorversuchen eine insektizide Aktivität festgestellt. Im April 2006 wurden etwa 4,5 kg frisches Blattmaterial von *Rhizophora apiculata* im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt. Das frische Blattmaterial wurde zerschnitten und mit 90%igem Ethanol mehrmals extrahiert. Dieser an der Universität Peking hergestellte Rohextrakt wurde im Labor in Düsseldorf wieder mit 90% Methanol gelöst, gefiltert und im Scheidetrichter gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Das folgende Isolierungsschema zeigt, wie aus diesem *n*-Hexan Extrakt die *E*- und *Z*- Isomere des Coumaroyl-Lupeols isoliert werden konnten (Abb. 3.3.a; Tab. 3.3.b). Die Isolierung wurde anhand von Insektentests gezielt vorangetrieben, bis bioaktive Fraktionen mit nur einer Komponente erhalten werden konnten.

Lupeol ist das im Pflanzenreich meist verbreitete pentazyklische Triterpen [DNP]. Die Veresterung von Lupeol mit Coumarsäuren ist im Pflanzenreich weniger häufig anzutreffen, was sich wahrscheinlich auf eine spezielle genetische und somit proteome Disposition zurückzuführen lässt. Nur sehr wenige Pflanzen sind dafür bekannt, Coumaroyl-Lupeol zu enthalten. *E*-Coumaroyl-Lupeol ist Bestandteil einer Akazienart (*Acacia trineura*), *Z*-Coumaroyl-Lupeol ein Bestandteil der Art *Diospyros maritima*, einer Art der Gattung *Diospyros*, welche zu den Ebenholzgewächsen (Ebenaceae) gehört [DNP].

Aus der Art *Rhizophora apiculata* wurden im Rahmen dieser Arbeit *E*-Coumaroyl-Lupeol und *Z*-Coumaroyl-Lupeol erstmals isoliert. Aus der Schwesterart *Rhizophora mangle* wurde Coumaroyl-Lupeol jedoch bereits beschrieben [Williams 1999].

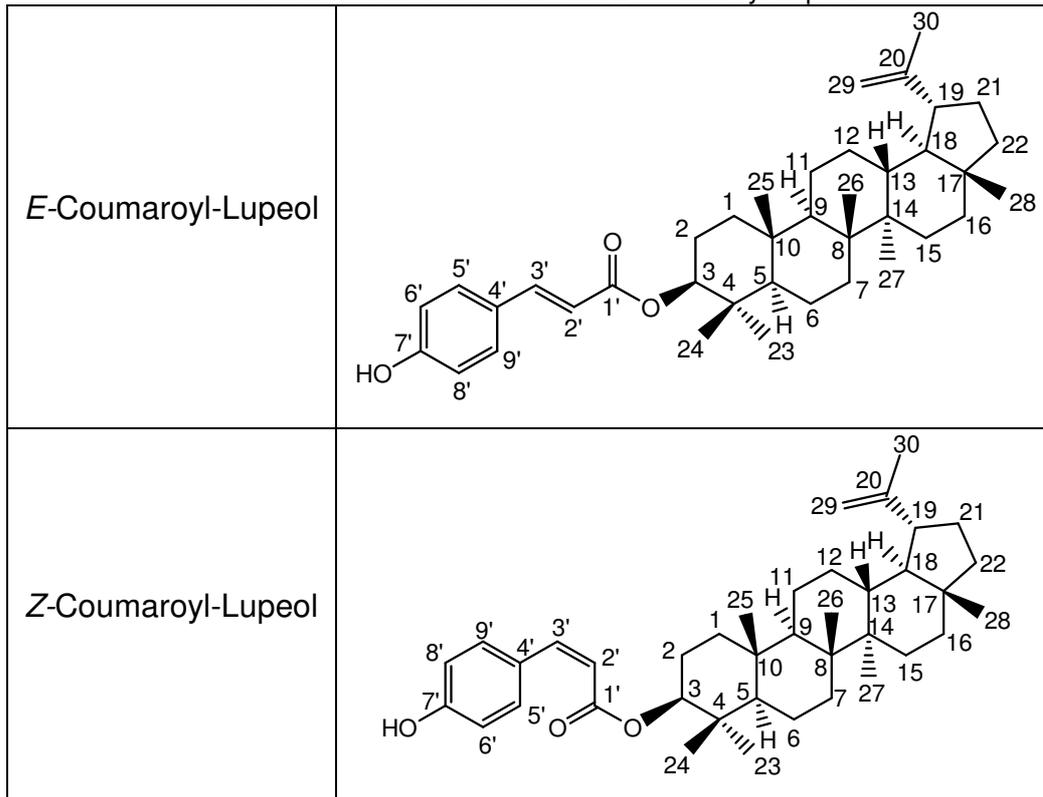


Tab. 3.3.a: Isolierungsschema von Z- und E-Coumaroyl-Lupeol aus den Blättern von *Rhizophora apiculata*

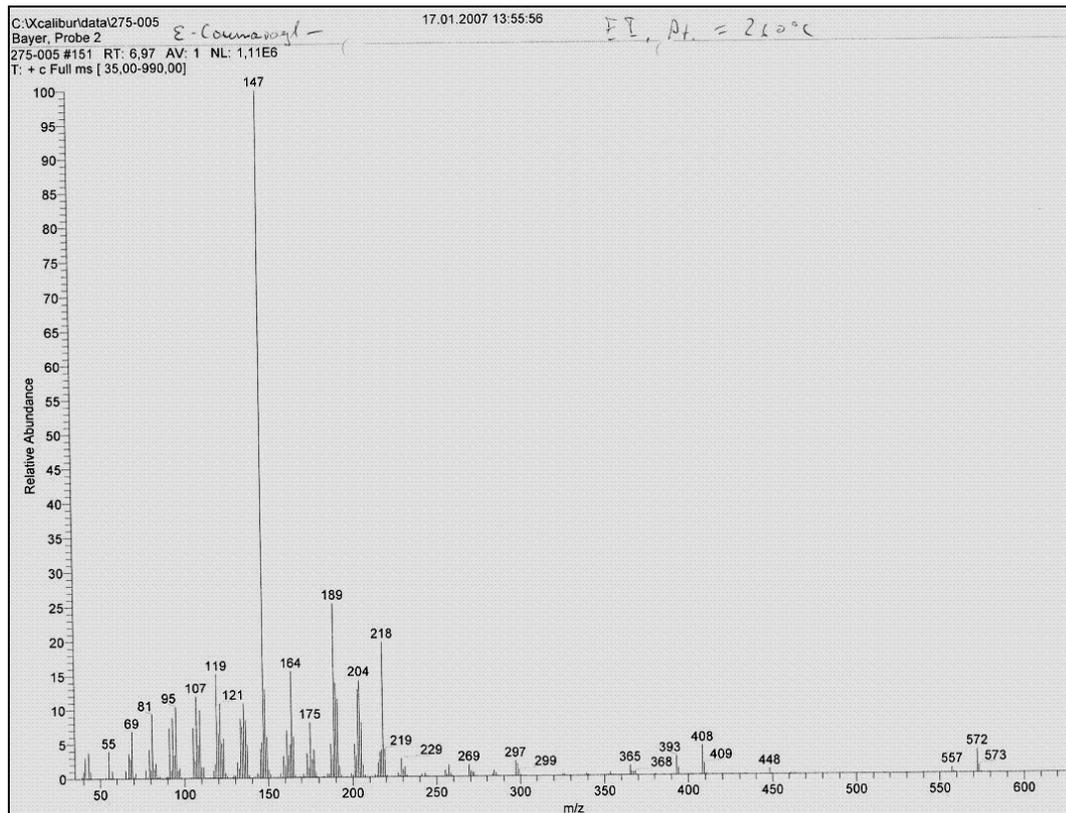
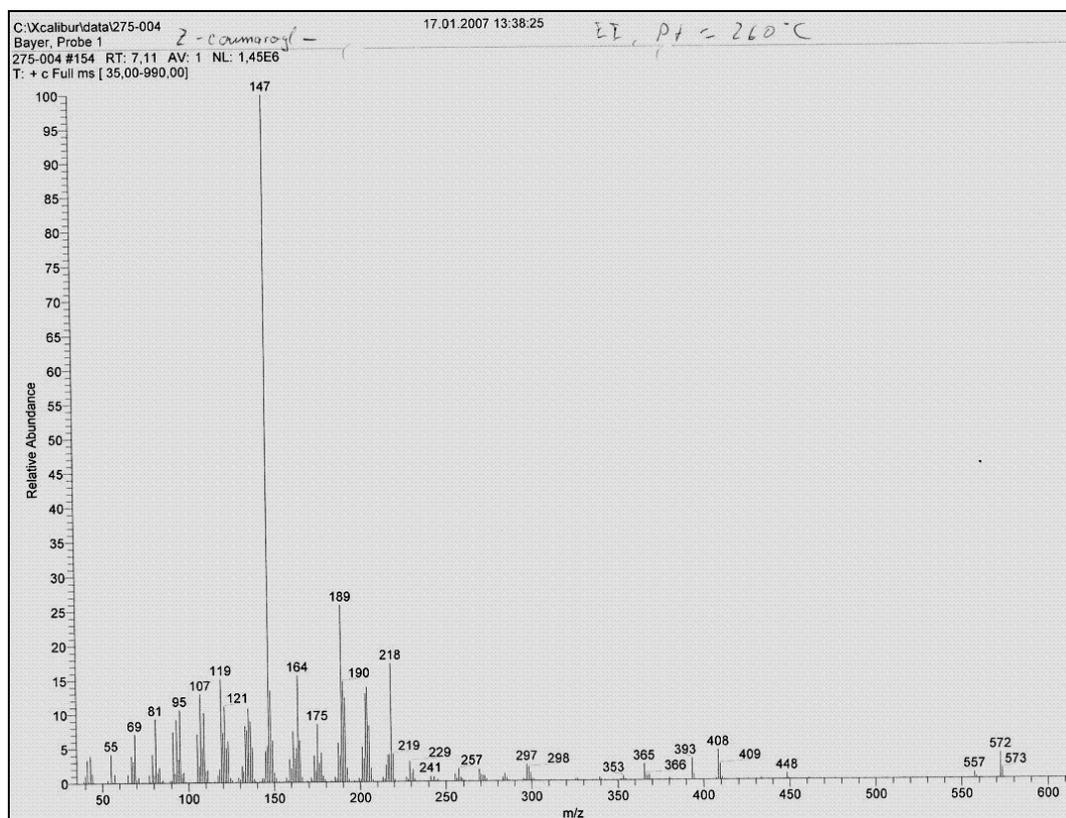
Der NMR Datenvergleich (Tab. 3.3.a) der beiden isomeren Lupeolester mit Werten für Lupeol aus der Literatur bestätigt die Strukturen der Triterpenanteile. Dass an Position 3 dieses Triterpen eine Esterfunktion vorliegt, ist aus der tieffeldverschobenen chemischen Verschiebung des Protons an Position 3 ersichtlich. Ursprünglich besitzt dieses Proton eine Verschiebung von etwa 3,2 ppm. Nach Veresterung wird dieses Proton um mehr als ein ppm tieffeldverschoben. Es kann sogar ein Unterschied der chemischen Verschiebung des Protons an Position 3 bei den *E*- und *Z*-Isomeren gezeigt werden. Bei *Z*-Coumaroyl-Lupeol besitzt dieses Proton eine Verschiebung von 4,42 ppm, bei *E*-Coumaroyl-Lupeol eine Verschiebung von 4,49 ppm. Neben den Methylgruppen und deren Verschiebungen an den Positionen 23, 24, 25, 26, 27, 28 und 30 sind ebenfalls die beiden Protonen an der Methylengruppe an Position 29 charakteristisch für Lupeolderivate. Anhand der gemessenen Proben konnte gezeigt werden, dass eines der beiden Methylenprotonen in ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von etwa 2 Hz aufspalten ist. Dieser Effekt ist auf einen *W*-Effekt zwischen dem der Methylgruppe an Position 30 abgewandten Protons und den Methylgruppenprotonen an Position 30 zurückzuführen. Die Signale der aromatischen Protonen zwischen 6,5 und 8 ppm weisen auf ein aromatisches AA'BB' System hin, welches im unveresterten Lupeol nicht vorliegt, was darauf hindeutet, dass diese Protonen zur angeesterten *p*-Coumarsäure gehört. Die Protonen der Doppelbindung der *p*-Coumarsäure an Position 2' und 3' geben Aufschluss über die Stereochemie der Doppelbindung. Durch die Kopplungskonstanten kann bestimmt werden, ob es sich um eine *Z*- oder *E*-Stellung handelt. Die Kopplung von 12,9 Hz weist auf eine *Z*-Stellung und die Kopplung von 15,8 Hz auf eine *E*-Stellung hin. Die NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. dargestellt.

Tab. 3.3.a: ¹H-NMR-Daten von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol im Vergleich zu Literaturwerten

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Lupeol [Aratanechemuge <i>et al.</i> 2004] CD ₃ OD 500 MHz		Z-Coumaroyl-Lupeol in DMSO- <i>d</i> ₆ 500 MHz		<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol in DMSO- <i>d</i> ₆ 500 MHz	
	δ H(m, JHz) Proton 1	δ H(m, JHz) Proton 2	δ H(m, JHz) Proton 1	δ H(m, JHz) Proton 2	δ H(m, JHz) Proton 1	δ H(m, JHz) Proton 2
1	1,65 (1H m)	0,9 (1H m)	1,64 (1H m)	0,9 (1H m)	1,64 (1H m)	0,9 (1H m)
2	1,59 (1H m)	1,67 (1H m)	1,6 (1H m)	1,67 (1H m)	1,6 (1H m)	1,67 (1H m)
3	3,2 (1H dd J=11,5; 5,0 Hz)		4,42 (1H dd J=6,3(5,7); 10,1 Hz)		4,49 (1H dd J=4,7; 11,4 Hz)	
5	0,68 (1H m)		0,72 (1H m)		0,72 (1H m)	
6	1,4 (1H m)	1,5 (1H m)	1,37 (1H m)	1,42 (1H m)	1,37 (1H m)	1,42 (1H m)
7	1,32 (1H m)	1,42 (1H m)	1,3 (1H m)	1,4 (1H m)	1,3 (1H m)	1,4 (1H m)
9	1,29 (1H m)		1,29 (1H m)		1,29 (1H m)	
11	1,2 (1H m)	1,4 (1H m)	1,2 (1H m)	1,4 (1H m)	1,2 (1H m)	1,4 (1H m)
12	1,07 (1H m)	1,68 (1H m)	1,06 (1H m)	1,64 (1H m)	1,06 (1H m)	1,64 (1H m)
13	1,68 (1H m)		1,64 (1H m)		1,64 (1H m)	
14						
15	1 (1H m)	1,68 (1H m)	0,99 (1H m)	1,68 (1H m)	0,99 (1H m)	1,68 (1H m)
16	1,37 (1H m)	1,48 (1H m)	1,37 (1H m)		1,37 (1H m)	
18	1,37 (1H m)		1,37 (1H m)		1,37 (1H m)	
19	2,38 (1H ddd J=5,6; 11,0; 11,0 Hz)		2,36 (1H ddd J=5,4(6,0); 8,0(8,0); 13,7 Hz)		2,36 (1H ddd J=5,4(6,0); 8,0(8,0); 13,7 Hz)	
21	1,37 (1H m)	1,92 (1H m)	1,37 (1H m)	1,92 (1H m)	1,37 (1H m)	1,92 (1H m)
22	1,37 (1H m)	1,19 (1H m)	1,37 (1H m)	1,19 (1H m)	1,37 (1H m)	1,19 (1H m)
23	0,97 (3H s)		0,97 (3H s)		0,97 (3H s)	
24	0,76 (3H s)		0,76 (3H s)		0,76 (3H s)	
25	0,83 (3H s)		0,82 (3H s)		0,82 (3H s)	
26	1,03 (3H s)		1,03 (3H s)		1,03 (3H s)	
27	0,94 (3H s)		0,95 (3H s)		0,95 (3H s)	
28	0,79 (3H s)		0,8 (3H s)		0,8 (3H s)	
29	4,54 (1H brs)	4,67 (1H brs)	4,54 (1H brs)	4,68 (1H d J=2,2 Hz)	4,55 (1H brs)	4,69 (1H d J=1,9 Hz)
30	1,68 (3H s)		1,68 (3H s)		1,68 (3H s)	
2'			5,72 (1H d J=12,9 Hz)		6,35 (1H d J=15,8 Hz)	
3'			6,83 (1H d J=12,9 Hz)		7,52 (1H d J=15,8 Hz)	
5', 9'			7,61 (2H d J=8,5 Hz)		7,55 (2H d J=8,5 Hz)	
6', 8'			6,73 (2H d J=8,5 Hz)		6,76 (2H d J=8,5 Hz)	
7' – OH			9,86 (1H brs)		9,99 (1H brs)	

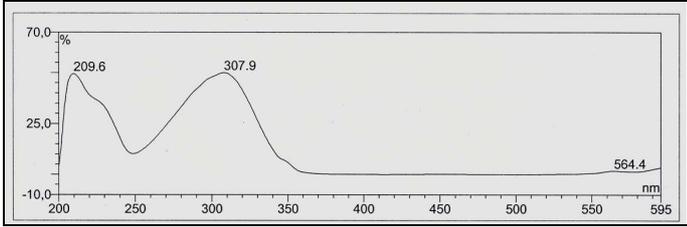
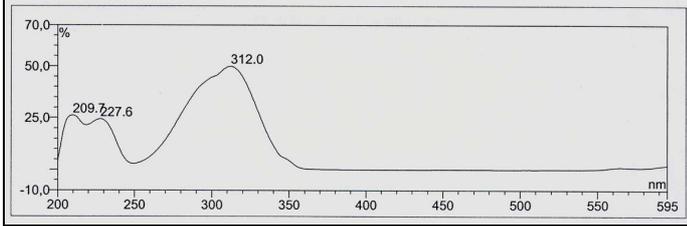
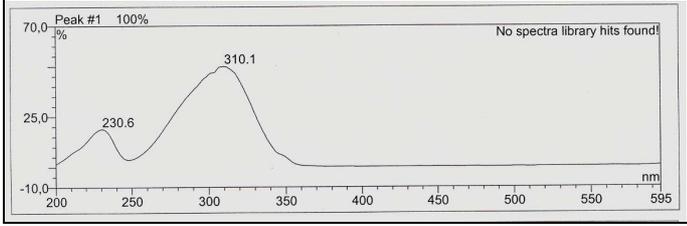
Tab. 3.3.b: Strukturen von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol

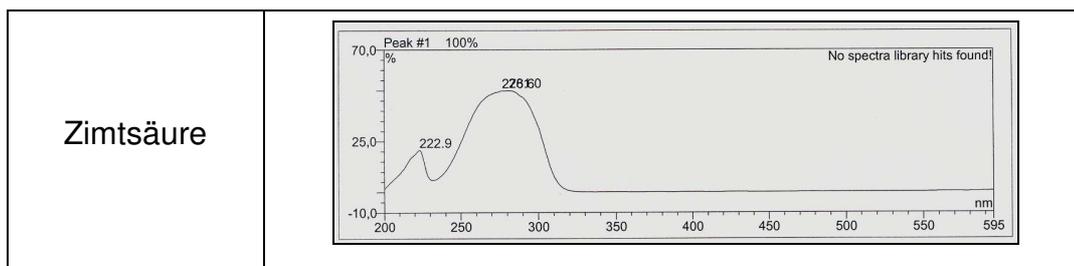
Bei den beiden *E*- und *Z*- Isomeren von Coumaroyl-Lupeol erwies sich die Methode der LC-MS zur Massenbestimmung nicht als zweckmäßig, da stets nur der Coumarsäurerest zu erkennen war. Deshalb wurde die endgültige Massenbestimmung mittels EI-MS durchgeführt (Abb. 3.3.b; Abb. 3.3.c). In beiden Fällen konnte dieselbe Masse von 572 g/mol bestimmt werden. Der stark sichtbare Peak bei der Masse von 147 stellt das *E*- bzw. *Z*-Isomer des 4-Hydroxyphenyl-acrylaldehyd Ions dar, welches unter Abspaltung der Hydroxygruppe an der Säurefunktion der *p*-Coumarsäure entsteht. Der Peak mit der Masse von 164 stellt die komplette *p*-Coumarsäure dar.

Abb. 3.3.b: EI-MS Spektrum von *E*-Coumaroyl-LupeolAbb. 3.3.c: EI-MS Spektrum von *Z*-Coumaroyl-Lupeol

Durch den Vergleich der UV-Absorptionsspektren (Tab. 3.3.c) kann weiter bestätigt werden, dass an der einzigen Hydroxygruppe des Triterpens an Position 3 eine *p*-Coumarsäure verestert sein muss. Es sind die UV-Spektren von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol, sowie von *p*-Coumarsäure und Zimtsäure dargestellt. Bei den Coumaroyl-Lupeol-Derivaten ist die *p*-Coumarsäure aufgrund ihrer aromatischen und konjugierten Struktur die einzige chromophore Teilstruktur, die im langwelligeren Bereich von über 250 nm absorbiert. Dies ist auch der Grund, weshalb das UV-Spektrum nahezu ähnlich dem der reinen *p*-Coumarsäure ist. Im Vergleich dazu hat die Zimtsäure ihr UV-Absorptionsmaximum bei etwa 280 nm, wohingegen *p*-Coumarsäure das UV-Absorptionsmaximum bei etwa 310 nm hat. Dieser Unterschied ist auf die para substituierte Hydroxygruppe der *p*-Coumarsäure zurückzuführen, durch die der Chromophor erweitert wird und somit das UV-Absorptionsmaximum in den langwelligeren Bereich verschoben wird. Dieser Vergleich beweist erneut, dass die an Lupeol veresterte Struktur eine *p*-Coumarsäure ist.

Tab. 3.3.c: Vergleich der UV-Spektren von *Z*-Coumaroyl-Lupeol, *E*-Coumaroyl-Lupeol, *p*-Coumarsäure und Zimtsäure (DAD-HPLC)

<p><i>Z</i>-Coumaroyl-Lupeol (RTSG = 43,011 min)</p>	
<p><i>E</i>-Coumaroyl-Lupeol (RTSG = 45,302 min)</p>	
<p><i>p</i>-Coumarsäure</p>	



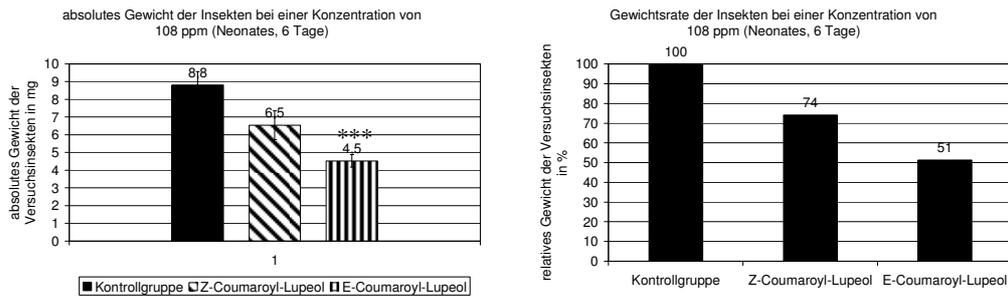
Um die Stereochemie von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol zu bestätigen, wurden die optische Drehungen gemessen (Tab. 3.3.d). Basierend auf Literaturwerten aus dem Dictionary of Natural Products wurden die Versuchsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel, Schichtdicke, Konzentration) nachgestellt und es wurden annähernd die gleichen optischen Drehwerte wie in der Literatur erhalten. Die minimalen Abweichungen lassen sich auf Verunreinigungen zurückführen.

Tab. 3.3.d: Vergleich der optischen Drehwerte von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol mit Literaturdaten

	[DNP]	Gemessen
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	$[\alpha]_D^{25} + 240^\circ$ ($c=0,005$ in CHCl_3)	$[\alpha]_D^{25} + 233,6^\circ$ ($c=0,005$ in CHCl_3)
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	$[\alpha]_D^{20} + 35,2^\circ$ ($c=0,01$ in CHCl_3)	$[\alpha]_D^{20} + 37,2^\circ$ ($c=0,01$ in CHCl_3)

3.3.1. Insektenbioassayergebnisse

Die Isolierung der beiden Coumaroyl-Lupeol-Isomere wurde durch ihre insektizide Aktivität gezielt unterstützt. Im folgenden Diagramm ist das gewichtsreduzierende Potential von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol dargestellt (Abb. 3.3.1.) Auffällig ist, dass die Bioaktivität des *E*-Isomers stärker ist, als die des *Z*-Isomers. Des Weiteren ist nur *E*-Coumaroyl-Lupeol signifikant bioaktiv im Vergleich zu Kontrollgruppe. Im Fall von *Z*-Coumaroyl-Lupeol liegt die Signifikanz unter 95%, im Fall von *Z*-Coumaroyl-Lupeol aber bei $p > 99\%$.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.3.1: Bioaktivität von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol auf *Spodoptera littoralis*

3.3.2. Kinaseinhibitionsassay

E- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol wurden auf ihre Bioaktivitäten hinsichtlich der Hemmung von humanen tumorrelevanten Proteinkinasen untersucht (Abb. 3.3.2.). Von den 24 hier untersuchten Proteinkinasen hemmt *E*-Coumaroyl-Lupeol insgesamt 11 der Proteinkinasen mit einer IC_{50} Wert-Spannbreite von 2,27 μ M bis 16,76 μ M. *Z*-Coumaroyl-Lupeol vermag ebenfalls 11 Proteinkinasen zu hemmen, jedoch sind dies in einigen Fällen nicht dieselben wie bei *E*-Coumaroyl-Lupeol. Die Kinase, die von beiden Coumaroyl-Lupeolderivaten mit einem IC_{50} Wert von 2,27 μ M bzw. von 2,44 μ M gehemmt wird ist der epidermal growth factor receptor. In der unten dargestellten Tabelle sind alle Werte aufgelistet. Jedes nicht ausgefüllte Feld stellt einen absolvierten Test ohne messbare Bioaktivität dar.

Tab. 3.3.2.: Bioaktivität von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol auf humane tumorrelevante Proteinkinasen: Oberer Zahlenwert: IC_{50} Konzentration in g/L; Unterer Zahlenwert: IC_{50} Konzentration in μ M

	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK	IGF-1-R
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	1,30E-06		4,10E-06		9,60E-06
IC_{50} Wert in μ M	2,27		7,16		16,76
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	1,40E-06	6,80E-06	8,10E-06		
IC_{50} Wert in μ M	2,44	11,87	14,14		
	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3	AKT1	ARK5
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	3,80E-06	5,40E-06	6,50E-06		
IC_{50} Wert in μ M	6,63	9,43	11,35		
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	4,80E-06	6,10E-06			
IC_{50} Wert in μ M	8,38	10,65			

	Aurora-A	Aurora-B	PAK4	PDK1	CDK2/CycA
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol					4,30E-06
IC ₅₀ Wert in μ M					7,51
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol					8,00E-06
IC ₅₀ Wert in μ M					13,97
	CDK4/CycD1	CK2-alpha1	FLT3	INS-R	MET
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	4,90E-06		5,30E-06		
IC ₅₀ Wert in μ M	8,55		9,25		
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	8,30E-06		8,80E-06		
IC ₅₀ Wert in μ M	14,49		15,36		
	PDGFR-beta	PLK1	SAK	TIE2	COT
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol				2,60E-06	6,40E-06
IC ₅₀ Wert in μ M				4,54	11,17
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol				2,80E-06	8,80E-06
IC ₅₀ Wert in μ M				4,89	15,36
	B-RAF-VE				
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol					
IC ₅₀ Wert in μ M					
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	8,10E-06				
IC ₅₀ Wert in μ M	14,14				

3.3.3. Tumorzellinhibitionsassay an murinen L5178Y

Lymphomazellen

Anhand einer Zellkultur von murinen Lymphomazellen wurde der Effekt von β -Sitosterol auf intakte Zellen getestet (Tab. 3.3.3.). Beide coumaroylierten Lupeolderivate entfalten bei der eingesetzten Konzentration von 17,5 μ M keinerlei zytotoxische Aktivität auf diese Zelllinie.

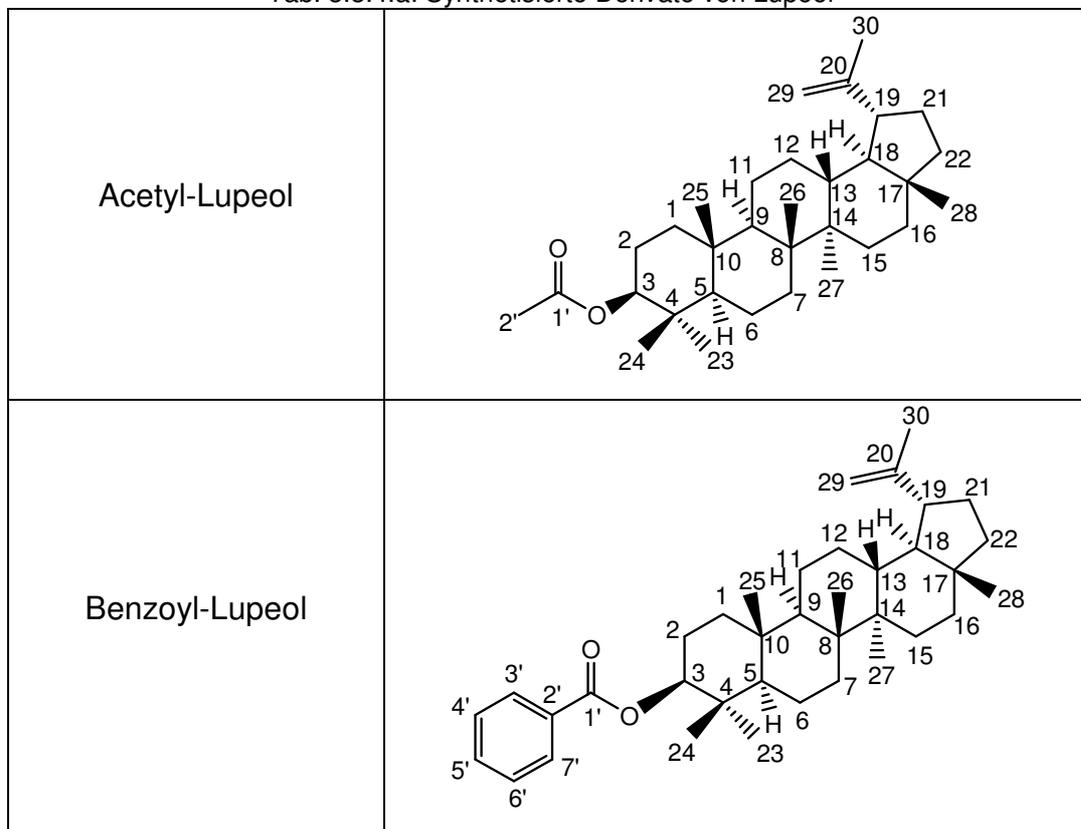
Tab. 3.3.3.: Inhibition von β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan auf murine Lymphomazellen (L5178Y)

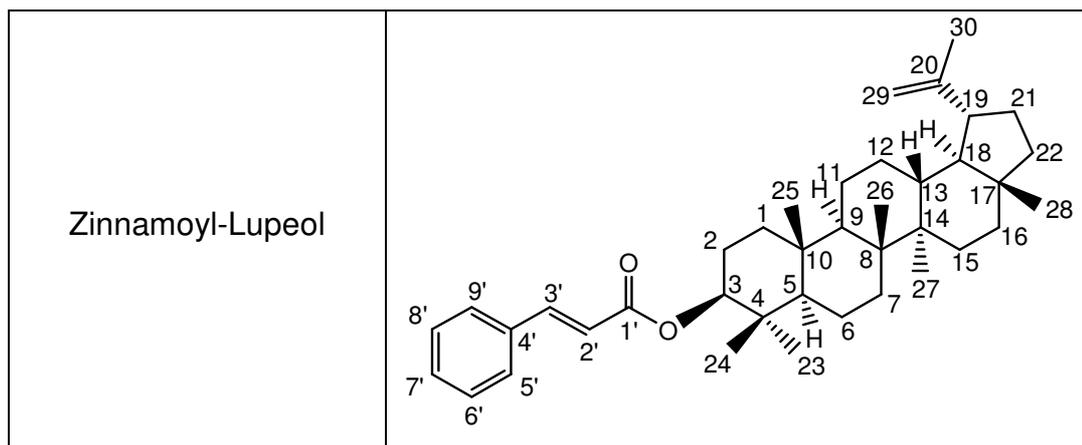
Name	MG	L5178Y Wachstum Kontrolle = 100%	Inhibierung in %	10 μ g/ml = x μ M
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	572,7	105,0	-	17,5
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	572,7	102,0	-	17,5

3.3.4. Semisynthetische Lupeol-Derivate

Für den ICAM-1 Expressionsunterdrückungsbioassay (Kapitel 3.5.) wurden für die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung anhand kommerziell erworbenen Lupeols verschiedene Derivatisierungen durchgeführt (Tab. 3.3.4.a). Es wurde eine Acetylierung, eine Benzoylierung und eine Zinnamoylierung durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.). Da Acetyl-Lupeol im Vergleich zu Benzoyl- und Zinnamoyl-Lupeol nicht umkristallisiert wurde, zeigen sich in dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum kleinere Verunreinigungen. Die NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. dargestellt.

Tab. 3.3.4.a: Synthetisierte Derivate von Lupeol





In den folgenden NMR Tabellen sind die ^1H NMR Daten der verschiedenen Lupeolester dargestellt.

An Position 2' von Acetyl-Lupeol (Tab. 3.3.4.b) ist die Methylgruppe des Acetylrestes bei einer chemischen Verschiebung von 2,04 ppm zu erkennen.

Tab. 3.3.4.b: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Acetyl-Lupeol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Acetyl-Lupeol CDCl_3 500 MHz	
	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 1	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 2
3	4,46 (1H m)	
19	2,36 (1H m)	
23	0,93 (3H s)	
24	0,78 (3H s)	
25	0,85 (3H s)	
26	1,02 (3H s)	
27	0,87 (3H s)	
28	0,83 (3H s)	
29	4,65 (1H brs)	4,68 (1H d $J=2,2$ Hz)
30	1,68 (3H s)	
2'	2,04 (3H s)	

An den chemischen Verschiebungen der Protonen 3' bis 7' von Benzoyl-Lupeol (Tab. 3.3.4.c) ist erkennbar, dass es sich um ein

aromatisches AA'BB'C System handelt, was typisch für die angeesterte Benzoesäure ist.

Tab. 3.3.4.c: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Benzoyl-Lupeol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Benzoyl-Lupeol CDCl_3 500 MHz	
	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 1	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 2
3	4,72 (1H m)	
19	2,39 (1H ddd $J=6,0(5,6)$; 8,05(8,1); 12,3 Hz)	
23	1,00 (3H s)	
24	0,79 (3H s)	
25	0,92 (3H s)	
26	1,05 (3H s)	
27	0,96 (3H s)	
28	0,91 (3H s)	
29	4,57 (1H brs)	4,69 (1H d $J=2,5$ Hz)
30	1,69 (3H s)	
3'7'	8,03 (2H d $J=1,25$ Hz)	
4'6'	7,44 (2H t $J=7,9(7,5)$)	
5'	7,54 (1H m)	

An den Positionen 2' und 3' von Zinnamoyl-Lupeol (Tab. 3.3.4.d) ist die *E*-konfigurierte Doppelbindung des Zimtsäurerestes zu erkennen. Der aromatische Teil ist typisch für ein AA'BB'C System.

Tab. 3.3.4.d: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Zinnamoyl-Lupeol

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	Zinnamoyl-Lupeol CDCl_3 500 MHz	
	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 1	$\delta\text{H(m, JHz)}$ Proton 2
3	4,62 (1H m)	
19	2,38 (1H ddd $J=5,55(5,7)$; 8,3(8,20); 13,9 Hz)	
23	0,92 (3H s)	
24	0,88 (3H s)	
25	0,89 (3H s)	

26	1,04 (3H s)	
27	0,95 (3H s)	
28	0,79 (3H s)	
29	4,57 (1H brs)	4,69 (1H d $J=1,9$ Hz)
30	1,69 (3H s)	
2'	6,44 (1H d $J= 15,7$)	
3'	7,66 (1H d $J= 15,7$)	
5', 9'	7,53 (dd $J=3,8(1,9);$ 6,6)	
6'7'8'	7,38 (3H m)	

3.4. *E*-Coumaroyl-Taraxerol und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol

Um das Vorkommen der coumaroylierten Triterpenderivate in den Blättern der Gattung *Rhizophora* und deren Gehalt zu bestimmen, sollte ursprünglich im März 2008 erneut frisches Blattmaterial von *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan gesammelt werden. Jedoch waren Pflanzen dieser Art zu diesem Zeitpunkt nicht mehr auffindbar und so wurden Blätter der nächstverwandten Schwesterart *Rhizophora stylosa* (Rhizophoraceae) gesammelt. Aus etwa 20 g Frischgewicht konnten statt *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol isoliert werden (Abb. 3.4.a; Tab. 3.4.a). Um die Lokalisation der Triterpene in den Blättern zu bestimmen, wurde einerseits ein komplettes Blatt extrahiert und andererseits zuerst die wachshaltige Kutikulaschicht mit organischen Lösungsmitteln abgelöst und danach das restliche, von der Kutikula befreite Blatt zerkleinert und extrahiert. Die *p*-Coumarsäureester konnten sehr leicht mittels DC identifiziert werden, da sie auf der einen Seite aufgrund ihres *p*-Coumarsäurebestandteiles eine gute UV-Absorption bei 254 nm besitzen und auf der anderen Seite aufgrund ihres Triterpengrundgerüstes gut mit Anisaldehyd Sprühreagenz angefärbt werden können (rot).

Taraxerol ist ein pentazyklisches Triterpen, welches unter anderen im Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) vorzufinden ist [DNP]. Daneben ist es auch in vielen Arten der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae) oder der Heidekrautgewächse (Ericaceae) vorzufinden [DNP].

Das Verhältnis zwischen Taraxerol und Coumaroyl-Taraxerol hinsichtlich des Vorkommens im Pflanzenreich verhält sich ähnlich wie bei Lupeol und Coumaroyl-Lupeol: Die coumaroylierte Form des Triterpens ist wesentlich seltener. Neben der Art *Rhizophora apiculata*, in der Coumaroyl-Taraxerol schon beschrieben wurde [Kokpol *et al.* 1990], sind *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol aus der Pflanzenart *Bruguiera cylindrica* bekannt [DNP]. Bemerkenswert hierbei ist, dass die Gattung *Rhizophora*, sowie die Gattung *Bruguiera* zur Familie der Rhizophoraceae gehören.

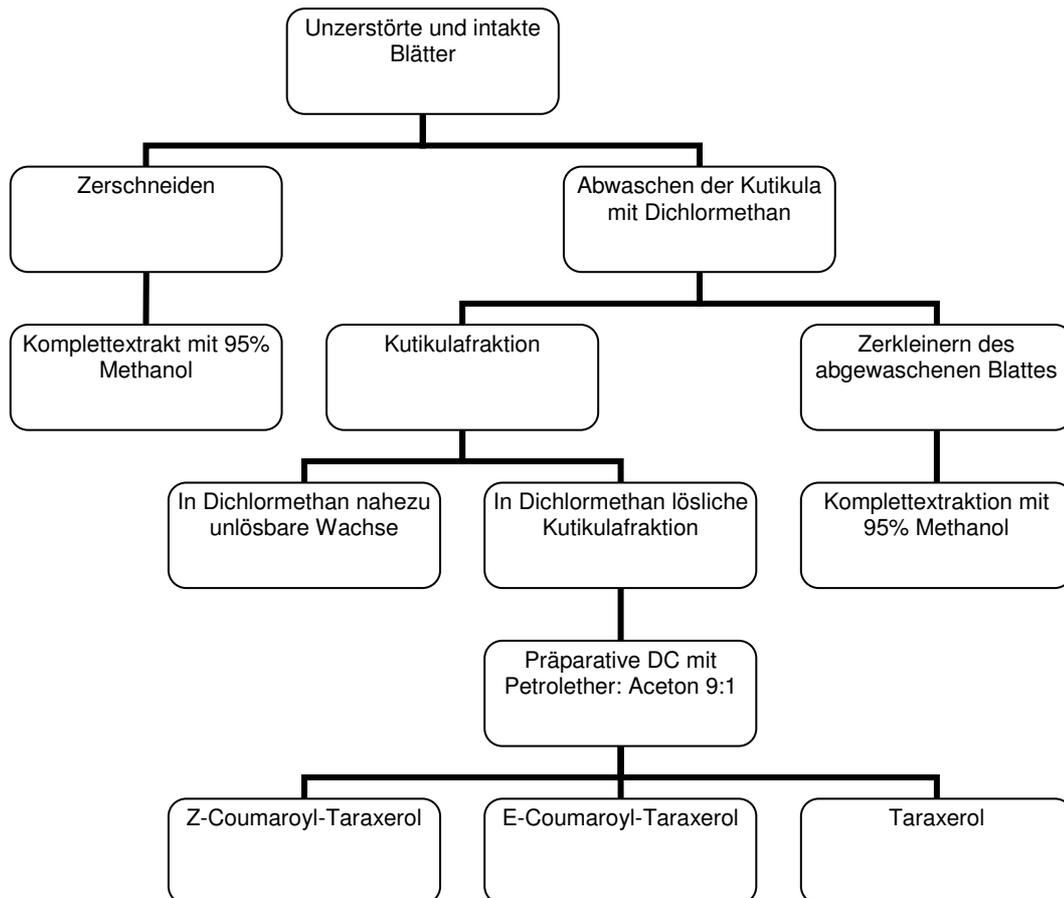


Abb. 3.4.a: Isolierungsschema von *E*-Coumaroyl-Taraxerol, *Z*-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol aus den Blättern von *Rhizophora stylosa* (der der Quantifizierung basierenden Gewichtsangaben und Verhältnisse sind in Kapitel 7.2.2. angegeben)

Es entstanden folgende Fraktionen

Totalextrakt	Das komplette Blatt inklusive Kutikula zerkleinert und extrahiert
Kutikula	Von der Oberfläche mittels organischer Lösungsmittel abgewaschener Kutikulaanteil
Nicht lösliches Wachs der Kutikula	Der Bestandteil der abgelösten Kutikula, der sich auf der organischen Phase oben als Wachsschicht abgesetzt hat
Rest	Das von der Kutikula befreite Blatt, welchen zerkleinert und komplett extrahiert wurde

Zunächst wurde eine vergleichende Dünnschichtchromatographie mit allen Fraktionen durchgeführt (Abb. 3.4.b). Als Fließmittelsystem wurde Petrolether und Aceton im Verhältnis 9:1 verwendet.

E-Coumaroyl-Taraxerol, *Z*-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol

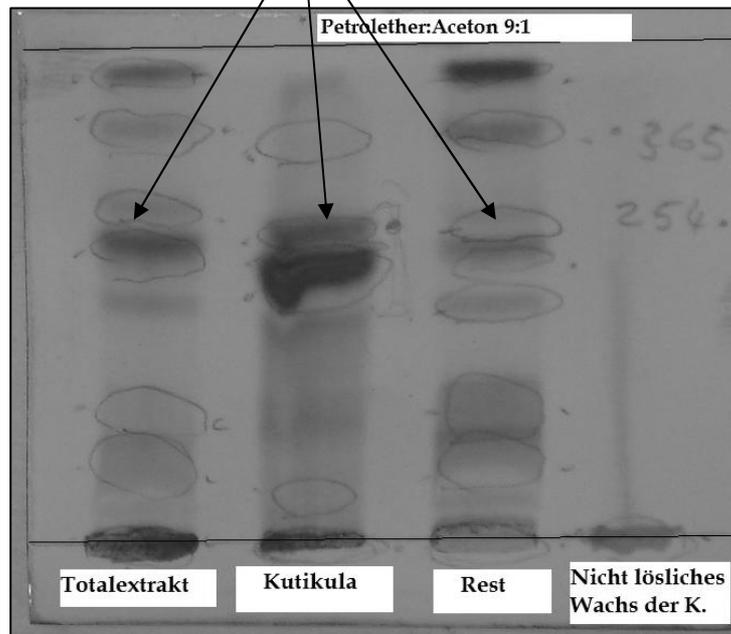
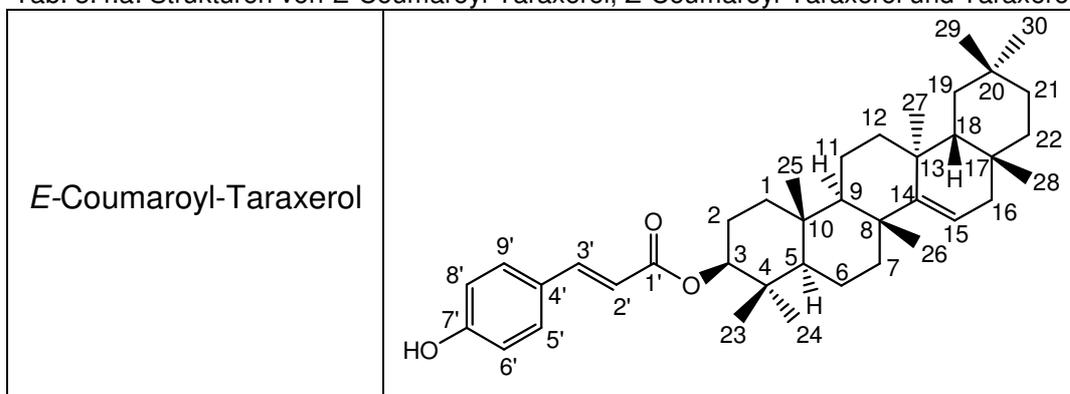
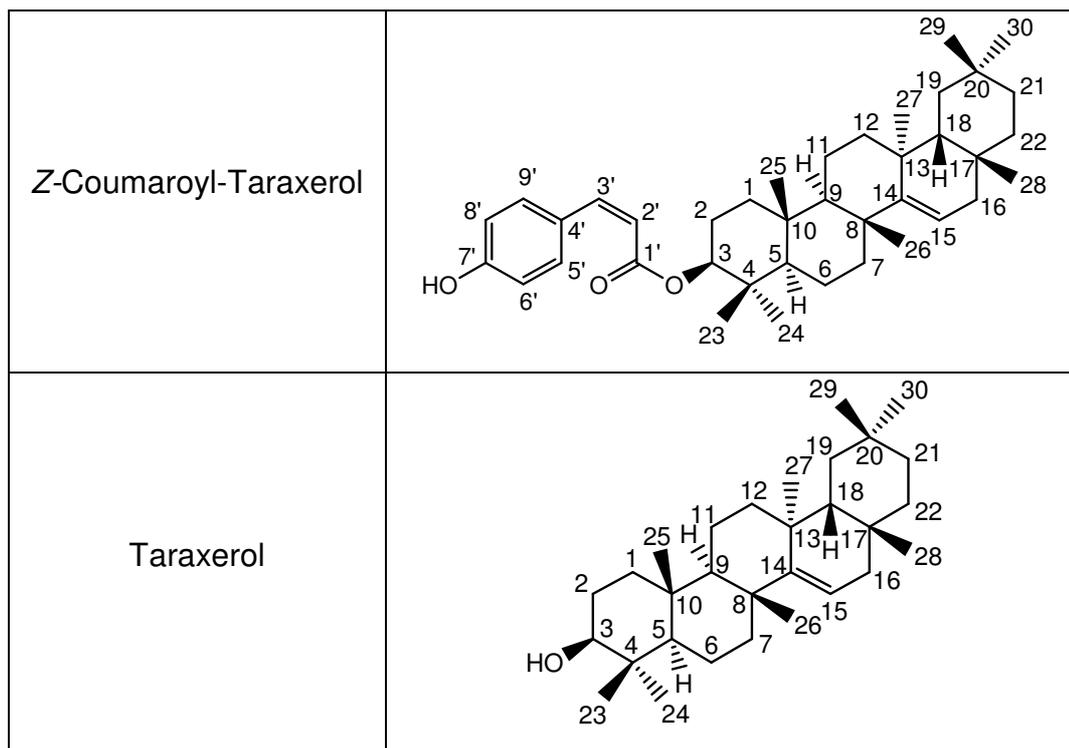


Abb. 3.4.b: Dünnschichtchromatographie der verschiedenen Blattkompartimente von *Rhizophora stylosa*

Anhand dieser Dünnschichtchromatographie (Abb. 3.4.a) ist zu erkennen, dass der überwiegende Teil der coumaroylierten Taraxerolderivate in der Kutikulaschicht lokalisiert ist.

Tab. 3.4.a: Strukturen von *E*-Coumaroyl-Taraxerol, *Z*-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol





Im Folgenden sind die ^1H NMR Daten von Taraxerol, *E*-Coumaroyl-Taraxerol und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol dargestellt (Tab. 3.4.b). Anhand des Protons an Position 15 konnte bewiesen werden, dass es sich um Taraxerol und nicht um β -Amyrin handelt, welches ein Isomer von Taraxerol ist, bei dem eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 12 und 13 zu finden ist und die Methylgruppe 27 an Position 14 lokalisiert ist. Das Doppelbindungsproton hätte im Fall von β -Amyrin aber eine chemische Verschiebung von nur 5,18 ppm [Kajikawa *et al.* 2005].

Tab. 3.4.b: Charakteristische ^1H NMR-Daten von *E*-Coumaroyl-Taraxerol, *Z*-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol im Vergleich zu Literaturwerten

Kohlenstoff Position Nr.	<i>Z</i> -Coumaroyl-Taraxerol [Kokpol <i>et al.</i> 1990] in CDCl_3	Taraxerol in CDCl_3 500 MHz	<i>E</i> -Coumaroyl-Taraxerol in CDCl_3 500 MHz	<i>Z</i> -Coumaroyl-Taraxerol in CDCl_3 500 MHz
	$\delta\text{H(m, JHz)}$	$\delta\text{H(m, JHz)}$	$\delta\text{H(m, JHz)}$	$\delta\text{H(m, JHz)}$
3	4,52 1H t ($J=5,88$)	3,2 1H m	4,52 1H m	4,52 1H m
15	5,50 1H dd ($J=2,5, 7,0$)	5,51 1H m	5,51 1H m	5,51 1H m
23	0,95 6H s	0,96 3H s	0,96 3H s	0,96 3H s
24		0,98 3H s	0,98 3H s	0,98 3H s
25	0,84 3H s	0,84 3H s	0,84 3H s	0,84 3H s
26	1,09 3H s	1,09 3H s	1,09 3H s	1,09 3H s

27	0,93 3H s	0,93 3H s	0,93 3H s	0,93 3H s
28	0,87 3H s	0,87 3H s	0,87 3H s	0,87 3H s
29	0,91 6H s	0,91 6H s	0,91 6H s	0,91 6H s
30				
2'	6,75 1H d ($J=8,5$)	-	6,31 1H d($J=15$)	6,83 1H d ($J=8,7$)
3'	7,61 1H d ($J=8,5$)	-	7,61 1H d($J=15$)	7,66 1H d ($J=8,7$)
5'9'	5,82 2H d ($J=11,6$)	-	6,88 2H d($J=5$)	5,82 2H d ($J=5$)
6'8'	6,83 2H d ($J=11,6$)	-	7,45 2H d($J=5$)	6,83 2H d ($J=5$)

Um die Position der Doppelbindung im Taraxerolgrundgerüst weiter zu bestätigen, wurde ein 1D-TOCSY Spektrum aufgenommen. Bei diesem TOCSY Spektrum handelt es sich um ein eindimensionales COSY Spektrum, bei dem mit der Frequenz eines bestimmten Protons eingewirkt wird, woraufhin die korrelierenden Protonen eines Spinsystems erscheinen.

Im folgenden TOCSY Spektrum (Abb. 3.4.c) wird mit der Frequenz des Protons Nummer 15 eingewirkt, woraufhin 2 Signale im aliphatischen Bereich zu sehen sind, die zu den Protonen an Position 16 gehören. Die Methylgruppe an Position 28 wird ebenfalls geringfügig durch eine Korrelation durch den Raum angeregt. Aber schon anhand der Integration, die bei der Methylgruppe dreifach höher sein müsste, als bei einem der Protonen an Position 16, ist zu sehen, dass dies nur eine sehr schwache Korrelation ist. Wenn es sich anstatt eines Taraxerolderivates um β -Amyrin handeln würde, dann wären insgesamt 3 Protonen angeregt worden. Bei β -Amyrin ist die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen an Position 12 und 13 wodurch sich das Proton der Doppelbindung an Position 12 befinden würde. Dies würde ein Spinsystem mit den Protonen an Position 11 und dem Proton an Position 9 bilden. Dieses sich an Position 9 befindende Proton wäre bei einer TOCSY Anregung von β -Amyrin sichtbar gewesen. Da zum einen dies nicht der Fall ist und zum anderen die chemische Verschiebung des Protons an der Doppelbindung unterschiedlich zu den Literaturwerten von β -Amyrin ist, kann eindeutig festgehalten werden, dass es sich bei dem Triterpenanteil um Taraxerol handelt (Abb. 3.4.d).

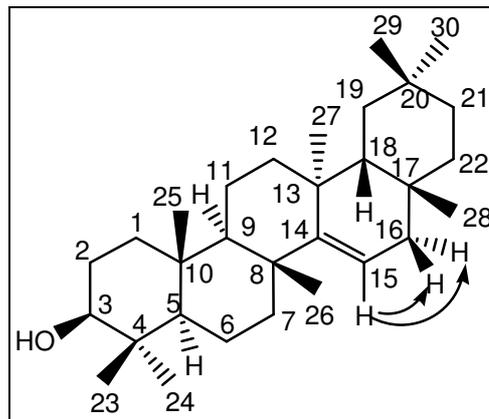
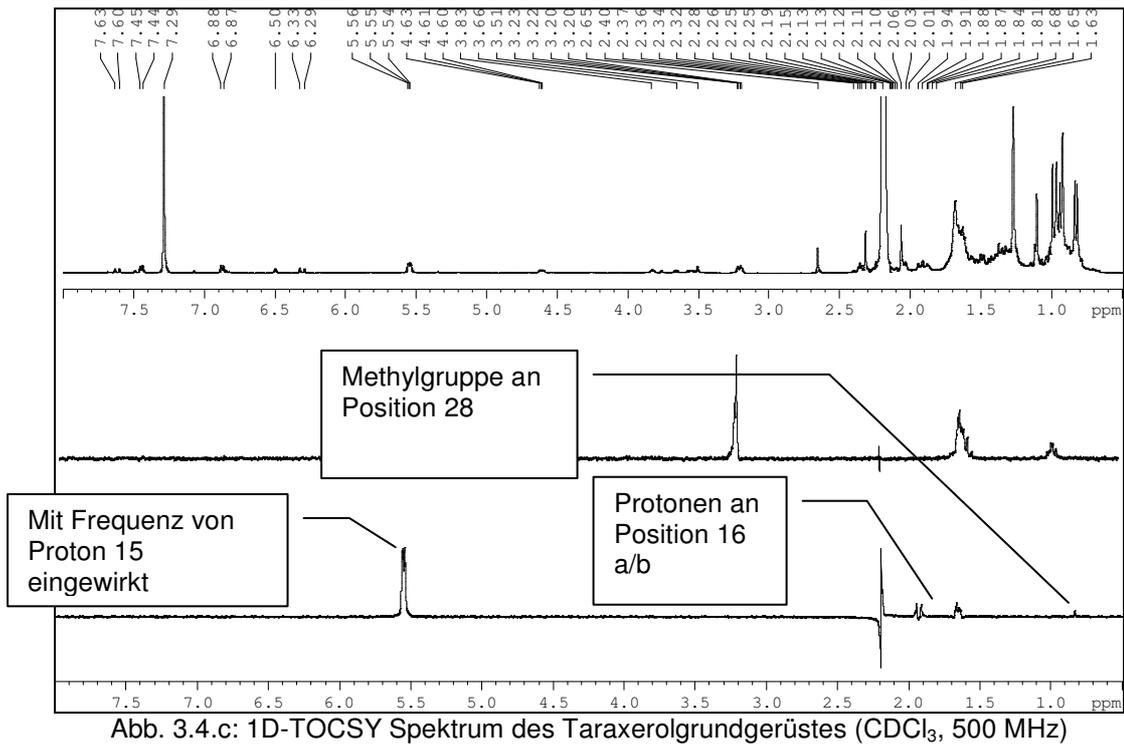
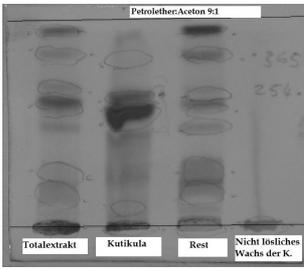
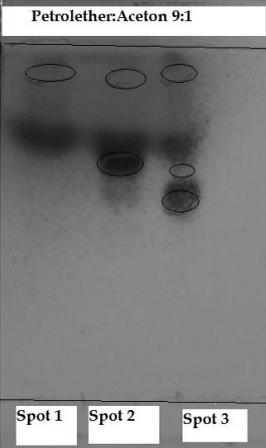


Abb. 3.4.d: TOCSY Korrelationen des Taraxerolgrundgerüsts

3.4.1. Semiquantitative Gehaltserfassung

Im nächsten Schritt sollte eine semiquantitative Analyse vorgenommen werden, um einen Eindruck von dem Anteil der Taraxerolderivate bezogen auf das Frischgewicht berechnen zu können (Abb. 3.4.1.). Dazu wurden die verschiedenen Taraxerolderivate mittels präoperativer Dünnschichtchromatographie (Tab. 3.4.1.) voneinander getrennt und ihre Identität mittels NMR bestätigt.

Tab. 3.4.1.: Präperative Dünnschichtchromatographie von Taraxerolderivaten

DC Vergleich der einzelnen Blattbestandteile	Präperative DC vor dem Ausschneiden unter UV-Licht	Durch präperative DC erhaltene Fraktionen
		

Bezogen auf das Frischgewicht sind in der Kutikula insgesamt ca. 7 % aller extrahierbaren Substanzen lokalisiert, davon sind aber etwa 24% nicht weiter lösliche wachsartige Substanzen. Von den löslichen Bestandteilen der Kutikula sind etwa 76% Fettsäuren, welche nicht näher bestimmt wurden. Dass es sich um Fettsäuren handelt, konnte mittels NMR festgestellt werden. Die restlichen 25% des löslichen Kutikulaanteiles bestehen zu 50% aus unverestertem Taraxerol und jeweils etwa 25% aus *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol (Abb. 3.4.1.).

Die Qualifizierung und Quantifizierung der Taraxerolderivate geschah anhand von Integrationswerten und Kopplungskonstanten der NMR Spektren (Methodik siehe Kapitel 2.7.10.).

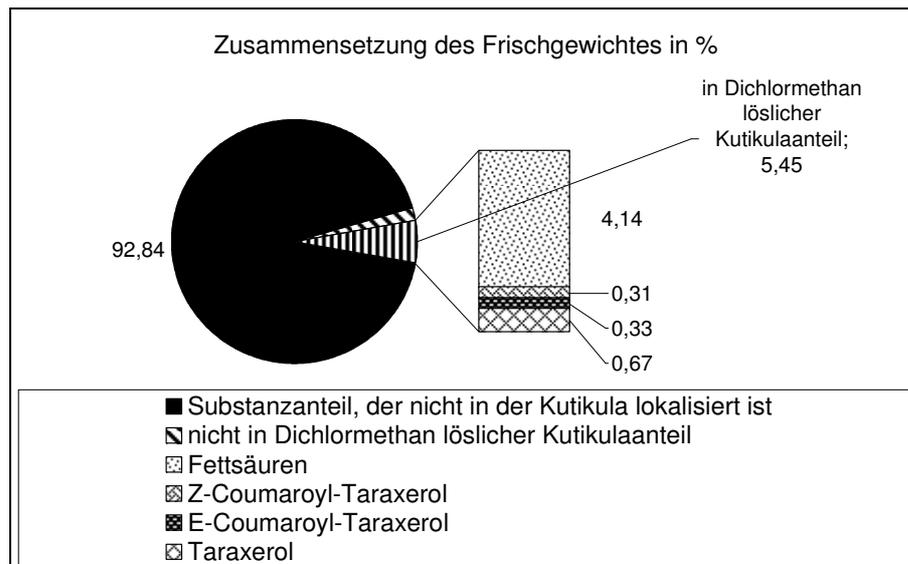


Abb. 3.4.1.: Grafische Darstellung der Quantifizierung der Taraxerolderivate in *Rhizophora stylosa*

3.5. UV-Assay mit Triterpenderivaten und Sterolderivaten hinsichtlich reduzierter ICAM-1 Expression

Die folgenden Studien zur ICAM-1 Expressionsunterdrückung wurden in Kooperation mit dem IUF (Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Eine Zellkultur humaner Hautzellen der Vorhäute von etwa 10-jährigen Jungen werden kultiviert und 24 h lang mit UVA1 Strahlung belastet. Nach der Bestrahlung wird die Transkription der mRNA des ICAM-1 Proteins mittels PCR, welche spezifisch auf die mRNA der ICAM-1 Gentranskriptes ist, untersucht. ICAM-1 ist auch unter der Bezeichnung CD54 bekannt, welches ein zellmembrangebundenes Rezeptorprotein ist, an das sich zytotoxische T-Zellen anheften können und neben Nekrosen auch andere Entzündungsreaktionen auslösen können. Der Mechanismus für die Überexpression von ICAM-1 ist noch weitgehend unbekannt, jedoch scheinen membrangebundene Ceramide ein Auslöser für eine Signalkaskade zu sein, die in einer Transkriptionsfaktoraktivierung endet. Wahrscheinlich ist hierfür der Transkriptionsfaktor AP-2-alpha verantwortlich.

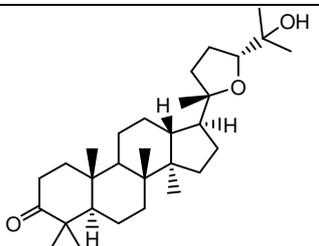
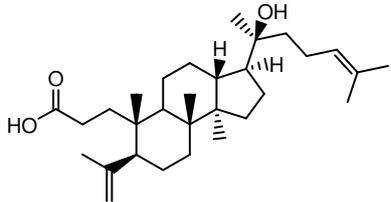
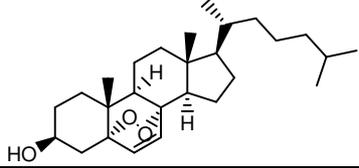
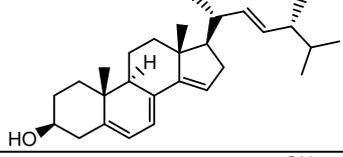
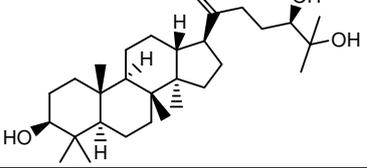
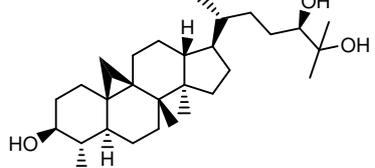
Bei diesem Assay wird versucht, Substanzen zu finden, die die Transkription von ICAM-1 unterdrücken können. Ob die Substanzen im Bereich der Zellmembran oder im Bereich der Signaltransduktionskaskade wirken, kann im Rahmen dieser Experimente nicht geklärt werden.

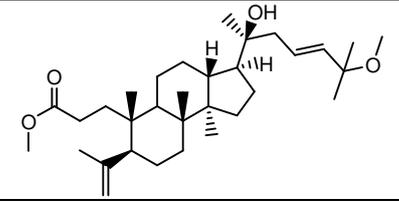
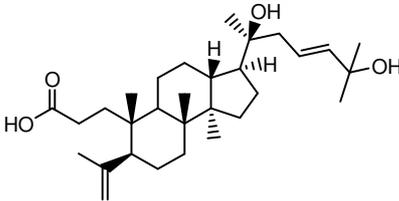
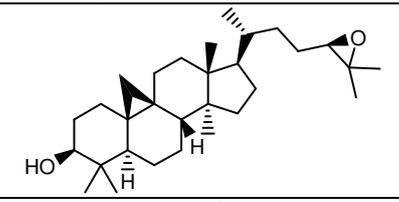
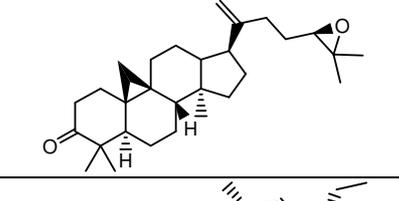
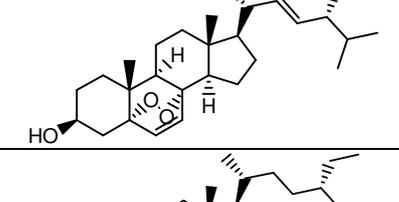
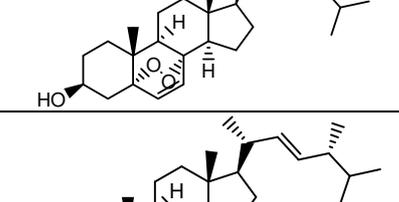
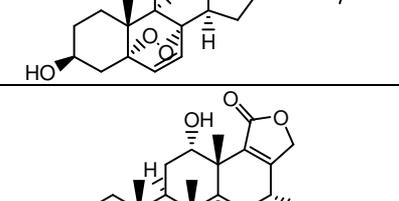
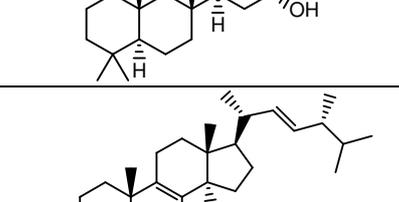
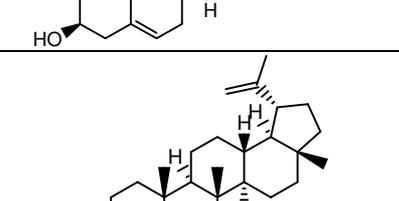
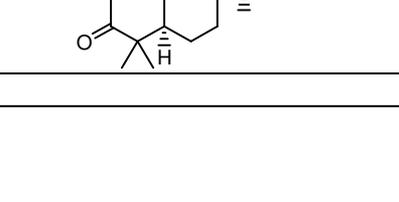
Zunächst wird ein Zytotoxizitätstest anhand eines MTT Assays durchgeführt (30 μ M Substanz). Für diesen Ansatz wurden die Substanzen in 2%igem Ethanol gelöst. Die in diesem Assay nicht als zytotoxisch bestimmten Substanzen werden für den ICAM-1 Assay verwendet. Bei diesem Assay gibt es eine Kontrollgruppe an Zellen, die nicht bestrahlt wird und eine weitere Kontrollgruppe, die ohne Behandlung bestrahlt wird. Somit kann jeweils das Minimum und das Maximum der ICAM-1 Transkription festgestellt werden. Um die inhibitorische Aktivität der verschiedenen Substanzen zu testen, werden diese mit den Zellen über Nacht inkubiert (30 μ M Substanz) und die Substanz anschließend von den Zellen abgewaschen, damit nur die an der Zellmembran angelagerten oder in die Zelle eingedrungenen Substanzen ihre Wirkung entfalten können. Danach werden

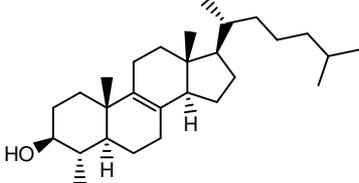
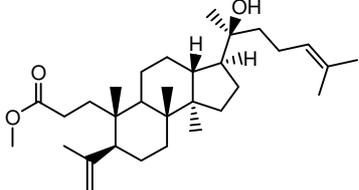
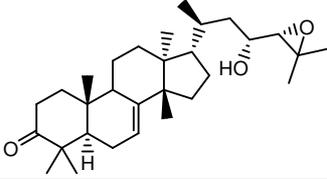
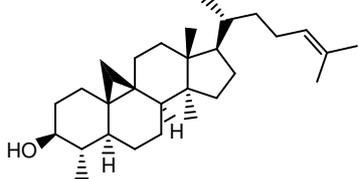
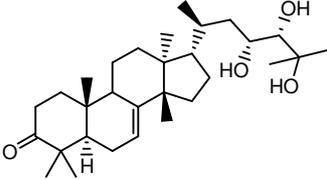
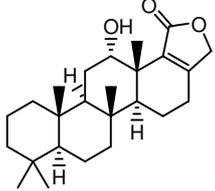
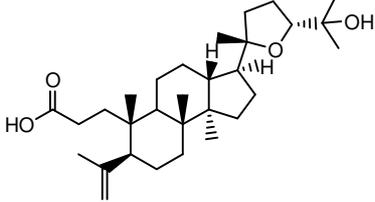
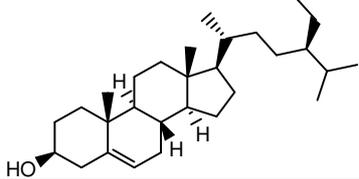
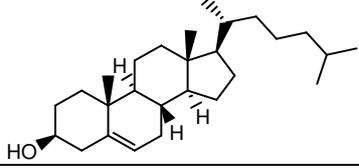
alle Zellen gleichmäßig mit UVA1 24 Stunden lang bestrahlt und die mRNA des ICAM-1 Genes mittels PCR festgestellt und quantifiziert.

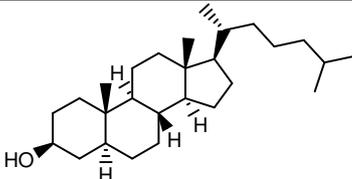
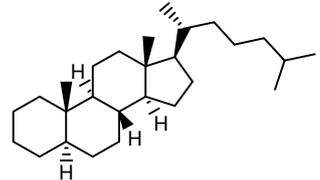
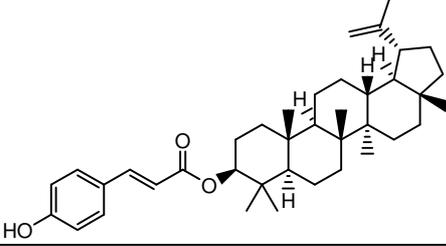
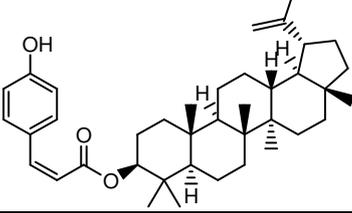
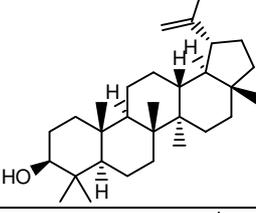
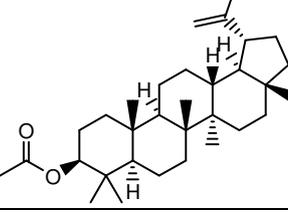
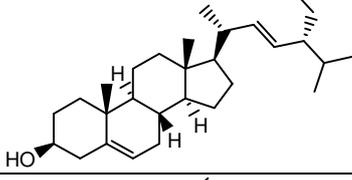
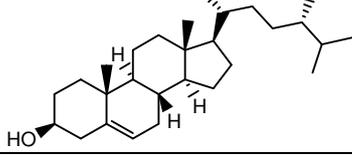
In der folgenden Tabelle sind alle Substanzen aufgeführt (Quellen der Substanzen siehe Kapitel 7.1.) die in den Test eingeflossen sind (Tab. 3.5.a, Abb. 3.5.a, Abb.3.5.b). Einige dieser Substanzen sind erst in späteren Testreihen eingeflossen, da sie erst nach den ersten Versuchen aufgrund der Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen entweder synthetisiert oder kommerziell erworben wurden.

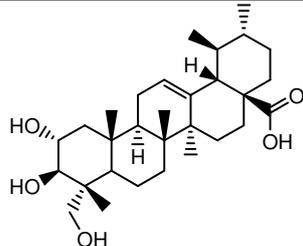
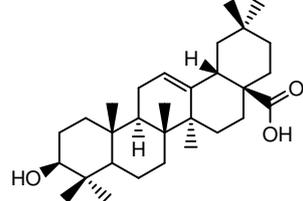
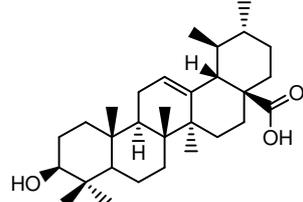
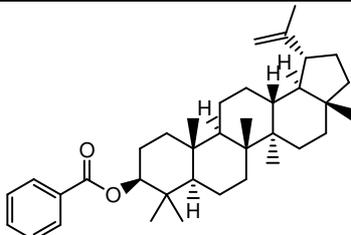
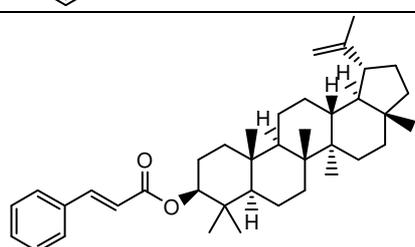
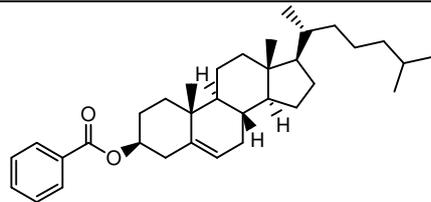
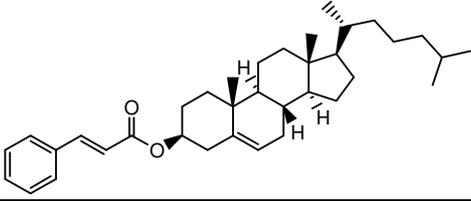
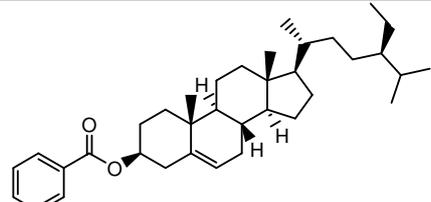
Tab. 3.5.a: Triterpene und Steroide, die in den UV-Assay eingeflossen sind

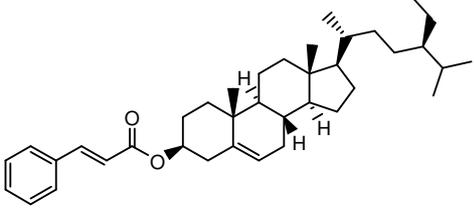
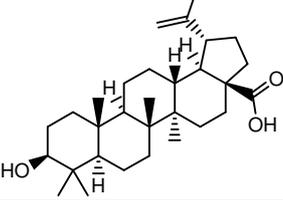
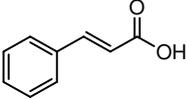
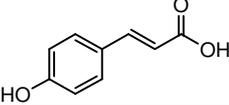
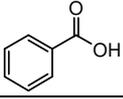
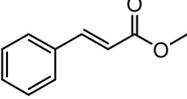
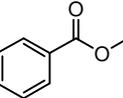
Code	Struktur	Name	MG
PB1		Cabraleol	458
PB2		Dammarenolsäure	458
PB3		7-Hydroxycholesterol-peroxide	416
PB4		14-Dehydroergosterol	398
PB5		24,25-Dihydroxy-5α-dammar-20-en-3on	458
PB6		4α,14-Dimethyl-9,19-cyclocholestan-3β,24α,25-triol	446

PB7		(23 <i>E</i>)-(20 <i>S</i>)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure	444
PB8		(20 <i>S</i> ,23 <i>E</i>)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure	474
PB9		24,25-Epoxycycloartenol	442
PB10		24,25-Epoxy-dammar-20-en-3-on	440
PB11		5 α ,8 α -epidioxy-24-ethylcholesta-6,22-dien-3 β -ol	442
PB12		5 α ,8 α -epidioxy-24-ethylcholesta-5-en-3 β -ol	444
PB13		Ergosterol-Peroxid	428
PB14		16-Hydroxyscalarolide	402
PB15		Lichesterol	396
PB16		Lupeon	424

PB17		4α-Methyl-5α-Cholesta-8-en-3β-ol	400
PB18		Methyl-dammarenolol	472
PB19		Niloticin	456
PB20		29-Norcycloartenol	412
PB21		Piscidinol A	474
PB22		Scalaroside	386
PB23		Shorasäure (24R) bzw. Eicheriansäure (24S)	474
PB24		β-Sitosterol	414
PB25		Cholesterol	386

PB26		5α-Cholestan-3β-ol	388
PB27		5α-Cholestan	372
PB28		<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	5742
PB29		<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	572
PB30		Lupeol	426
PB31		Acetyl-Lupeol	468
PB32		Stigmasterol	412
PB33		Campesterol	400

PB34		Asiatische Säure	488
PB35		Oleanolsäure	456
PB36		Ursolsäure	456
PB37		Benzoyl-Lupeol	530
PB38		Zinnamoyl-Lupeol	556
PB39		Benzoyl-Cholesterol	490
PB40		Zinnamoyl-Cholesterol	516
PB41		Benzoyl- β -Sitosterol	518

PB42		Zinnamoyl- β -Sitosterol	544
PB43		Betulinsäure	456
PB44		Zimtsäure	148
PB45		<i>p</i> -Coumarsäure	164
PB46		Benzoessäure	122
PB47		Zimtsäuremethylester	162
PB48		Benzoessäuremethylester	136

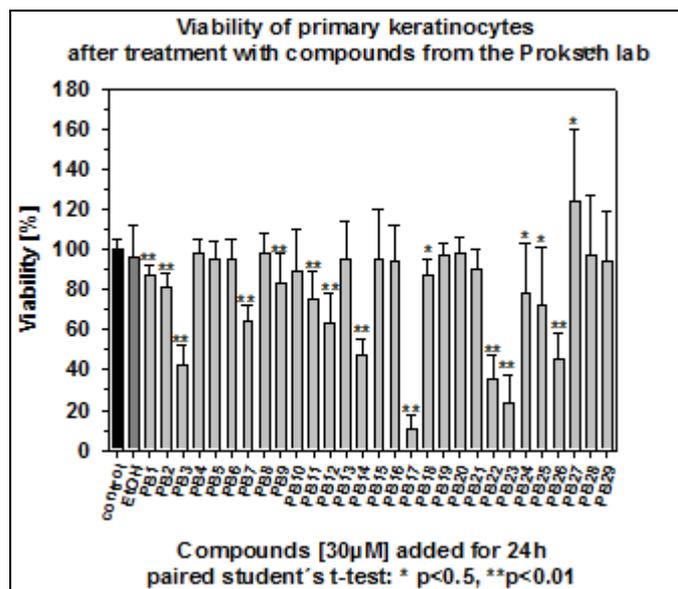


Abb. 3.5.a: Zytotoxizitätsuntersuchung mittels MTT der Substanzen PB1 bis PB29

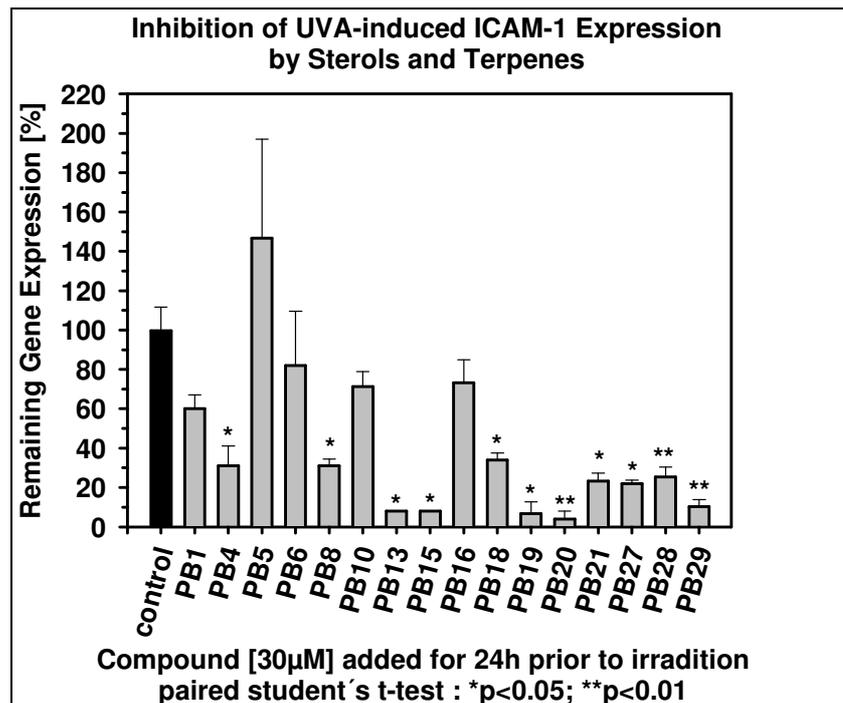


Abb. 3.5.b: Inhibierung der ICAM-1 Transkription durch verschiedenen Triterpene und Sterole

Bei der Transkriptionsinhibierung von ICAM-1 fallen besonders die Substanzen PB4 (14-Dehydroergosterol), PB8 ((20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure), PB13 (Ergosterol-Peroxid), PB15 (Lichesterol), PB18 (Methyldammarenolat), PB19 (Niloticin), PB20 (29-Norcycloartenol), PB21 (Piscidinol A), PB27 (5 α -Cholestan), PB29 (*E*-Coumaroyl-Lupeol) und PB28 (*Z*-Coumaroyl-Lupeol) auf (Abb. 3.5.b; Tab. 3.5.b). Aus diesen Substanzen lässt sich sehr schwer eine Struktur-Wirkungs-Beziehung herleiten, da alle Strukturen zu wenige strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen.

Tab. 3.5.b: Die exakten Daten der ICAM-1 Transkriptionsinhibierung

Stimulus	%uale Induktion der ICAM-1 Transkription	Stimulus	%uale Induktion der ICAM-1 Transkription
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
UVA	80	UVA	80
UVA	100	UVA	100
UVA	113	UVA	113
PB1/UVA	67	PB1/UVA	67
PB1/UVA	53	PB1/UVA	53
PB1/UVA	60	PB1/UVA	60
PB4/UVA	40	PB4/UVA	40

PB4/UVA	20		PB4/UVA	20
PB4/UVA	33		PB4/UVA	33
PB5/UVA	200		PB5/UVA	200
PB5/UVA	100		PB5/UVA	100
PB5/UVA	140		PB5/UVA	140
PB6/UVA	73		PB6/UVA	73
PB6/UVA	60		PB6/UVA	60
PB6/UVA	113		PB6/UVA	113
PB8/UVA	33		PB8/UVA	33
PB8/UVA	33		PB8/UVA	33
PB8/UVA	27		PB8/UVA	27
PB10/UVA	80		PB10/UVA	80
PB10/UVA	67		PB10/UVA	67
PB10/UVA	67		PB10/UVA	67
UVA	96		UVA	96
UVA	100		UVA	100
UVA	119		UVA	119
PB13/UVA	8		PB13/UVA	8
PB13/UVA	8		PB13/UVA	8
PB13/UVA	8		PB13/UVA	8
PB15/UVA	8		PB15/UVA	8
PB15/UVA	8		PB15/UVA	8
PB15/UVA	8		PB15/UVA	8
PB16/UVA	85		PB16/UVA	85
PB16/UVA	73		PB16/UVA	73
PB16/UVA	62		PB16/UVA	62
PB18/UVA	38		PB18/UVA	38
PB18/UVA	35		PB18/UVA	35
PB18/UVA	31		PB18/UVA	31
PB19/UVA	8		PB19/UVA	8
PB19/UVA	12		PB19/UVA	12
PB19/UVA	0		PB19/UVA	0
PB20/UVA	0		PB20/UVA	0
PB20/UVA	4		PB20/UVA	4
PB20/UVA	8		PB20/UVA	8
UVA	86		UVA	86
UVA	100		UVA	100
UVA	103		UVA	103
PB21/UVA	28		PB21/UVA	28
PB21/UVA	21		PB21/UVA	21
PB21/UVA	21		PB21/UVA	21
PB27/UVA	21		PB27/UVA	21
PB27/UVA	24		PB27/UVA	24
PB27/UVA	21		PB27/UVA	21
PB28/UVA	21		PB28/UVA	21
PB28/UVA	24		PB28/UVA	24
PB28/UVA	31		PB28/UVA	31
PB29/UVA	10		PB29/UVA	10
PB29/UVA	7		PB29/UVA	7
PB29/UVA	14		PB29/UVA	14

Da bei diesem ersten ICAM-1 Expressionsassay die beiden Lupeolderivate *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol als besonders aktiv ermittelt

wurden, wurde anhand verschiedener Lupeol- und Sterolderivate versucht, eine Struktur-Wirkungs-Beziehung abzuleiten.

Substanzen aus der Lupeolfamilie: Lupeol, Betulinsäure, Lupeon, Acetyl-Lupeol, Benzoyl-Lupeol, Zinnamoyl-Lupeol, *E*-Coumaroyl-Lupeol und *Z*-Coumaroyl-Lupeol.

Substanzen aus der Sterolfamilie: β -Sitosterol, Benzoyl- β -Sitosterol, Zinnamoyl- β -Sitosterol, Cholesterol, Benzoyl-Cholesterol und Zinnamoyl-Cholesterol.

Aromatische Substanzen, die als Esterbestandteil vorliegen: Zimtsäure, *p*-Coumarsäure und Benzoessäure.

Lipophile aromatische Substanzanaloge, um die Polarität zu reduzieren und die Membrangängigkeit zu erhöhen: Zimtsäuremethylester und Benzoessäuremethylester.

Extrakte: Mangrove Extrakt nhex (*n*-Hexan Extrakt der Blätter von *Rhizophora apiculata*, aus dem *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol isoliert wurden), Evening Primrose Oil PG Naturpharma (Nachtkerzenöl von PG Naturpharma), Evening Primrose Oil Fagron (Nachtkerzenöl von Fagron)

Weiter wurden Extrakte von *Tylophora indica* (Apocynaceae) (Mangrove extract T), *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae) (Mangrove extract R) und *Aglaia duppereana* (Meliaceae) (Mangrove extract A) getestet.

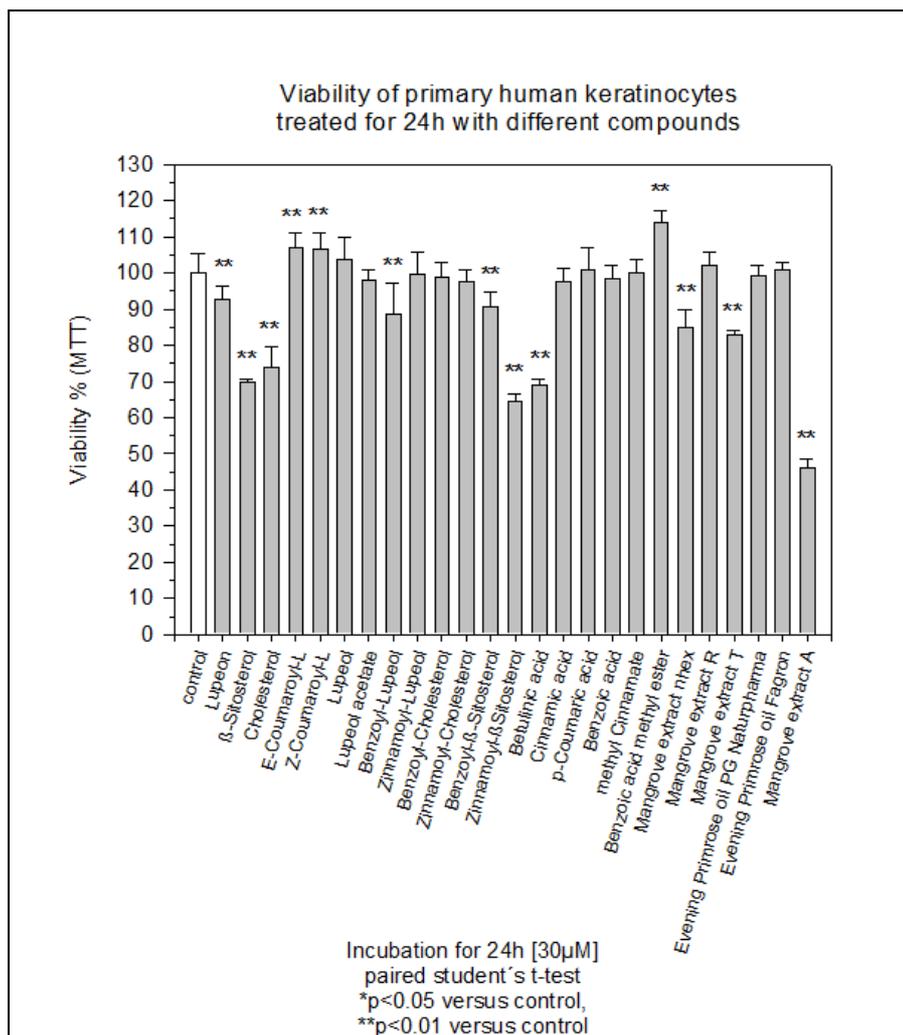


Abb. 3.5.c Zytotoxizitätstest mit Cholesterol, Lupeol und β -Sitosterolderivate sowie einigen verschiedenen Extrakten

Durch diesen Zytotoxizitätstest (Abb. 3.5.c, Tab. 3.5.c) konnte gezeigt werden, dass alle β -Sitosterolderivate im Konzentrationsbereich von 30 μ M im etwa gleichen Maß zytotoxisch sind. Cholesterol ist in höheren Konzentrationen ebenfalls zytotoxisch, aber bei der Modifikation mit einem Benzoyl- oder Zinnamoylrest an der Position 3 des Moleküls wird die Toxizität aufgehoben. Alle anderen Substanzen besitzen nur eine extrem schwache oder gar keine Toxizität. Die Zytotoxizität des *n*-Hexan Extraktes der Blätter von *Rhizophora apiculata* ist ebenfalls als gering einzuschätzen. Die Nachtkerzenölextrakte sind ebenfalls nicht toxisch, ebenso wie der Extrakt von *Ryania speciosa*. Der Extrakt von *Tylophora indica* ist nur leicht toxisch, aber der Extrakt von *Aglaia duppereana* reduziert die Viabilität der Zellkultur um 50%.

Tab. 3.5.c: Die exakten Daten des Zytotoxizitätsassays mit Cholesterol, Lupeol und β -Sitosterolderivate sowie einigen verschiedenen Extrakten

Substanz	Überlebens- rate	Standard- abweichung	Signifikanz
Kontrollgruppe	100.00	5.50	-
Lupeon	92.85	3.70	0.008
β -Sitosterol	70.00	0.80	0.000
Cholesterol	73.80	5.66	0.000
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	107.10	3.93	0.000
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	106.70	4.38	0.003
Lupeol	103.60	6.30	0.097
Acetyl-Lupeole	97.90	2.84	0.703
Benzoyl-Lupeol	88.47	8.60	0.004
Zinnamoyl-Lupeol	99.49	6.41	0.694
Benzoyl-Cholesterol	98.99	3.88	0.874
Zinnamoyl-Cholesterol	97.70	3.12	0.666
Benzoyl- β -Sitosterol	90.70	3.95	0.003
Zinnamoyl- β -Sitosterol	64.67	1.87	0.000
Betulinsäure	69.05	1.60	0.000
Zimtsäure	97.50	3.96	0.65
<i>p</i> -Coumarsäure	101.00	5.83	0.335
Benzoessäure	98.20	3.96	0.885
Zimtsäuremethylester	100.20	3.39	0.398
Benzoessäure-methylester	114.00	3.18	0.000
n-hex von <i>Rhizophora apiculata</i>	84.90	4.87	0.004
Extrakt von <i>Ryania speciosa</i>	102.00	3.90	0.525
Extrakt von <i>Tylophora indica</i>	82.80	1.34	0.001
Extrakt von <i>Aglaia duppereana</i>	46.30	2.33	0.000
Nachtkerzenöl von PG Naturpharma	99.20	2.81	0.804
Nachtkerzenöl Fagron	101.00	1.81	0.661

Aufgrund von diversen Problemen bei der Durchführung der ICAM-1 Inhibitionsmessung im IUF (Institut für Umweltmedizinische Forschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), konnten bis zum Abschluss dieser Arbeit keine Aktivitätsstudien hinsichtlich der UVA1 induzierten ICAM-1 Expressionsunterdrückung für die in Tab. 3.5.c aufgelisteten Substanzen durchgeführt werden.

3.6. Weitere Testreihen mit Triterpenen

3.6.1. NF κ B Inhibition durch Lupeol und Ursolsäure

Aus der Literatur ist bekannt [Saleem *et al.* 2004], dass Lupeol die TPA (12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate) induzierte NF κ B Antwort zu unterdrücken vermag. Pro Maus wurden hierbei entweder 1 oder 2 mg Lupeol appliziert, wodurch die TPA induzierbaren Ödeme der Haut verkleinert werden konnten. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Lupeol die Expression von NF κ B unterdrücken konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Lupeol auch die TNF α (tumor necrosis factor Untereinheit α) induzierte NF κ B Aktivierung unterdrücken kann (Abb. 3.6.1.a). Der Test wurde indirekt mit einem Reporterassay durchgeführt. Es wurde untersucht, ob NF κ B die Transkription eines Reportergenese induzieren kann. Hierfür wurde die SEAP (secreted form of human alkaline phosphatase) als Reporterprodukt eingesetzt. Da dieses Enzym von den Zellen der Zellkultur sekretiert wird, konnte anhand der Phosphataseaktivität im umgebenden Medium festgestellt werden, ob aktiviertes NF κ B im Zellkern vorliegt.

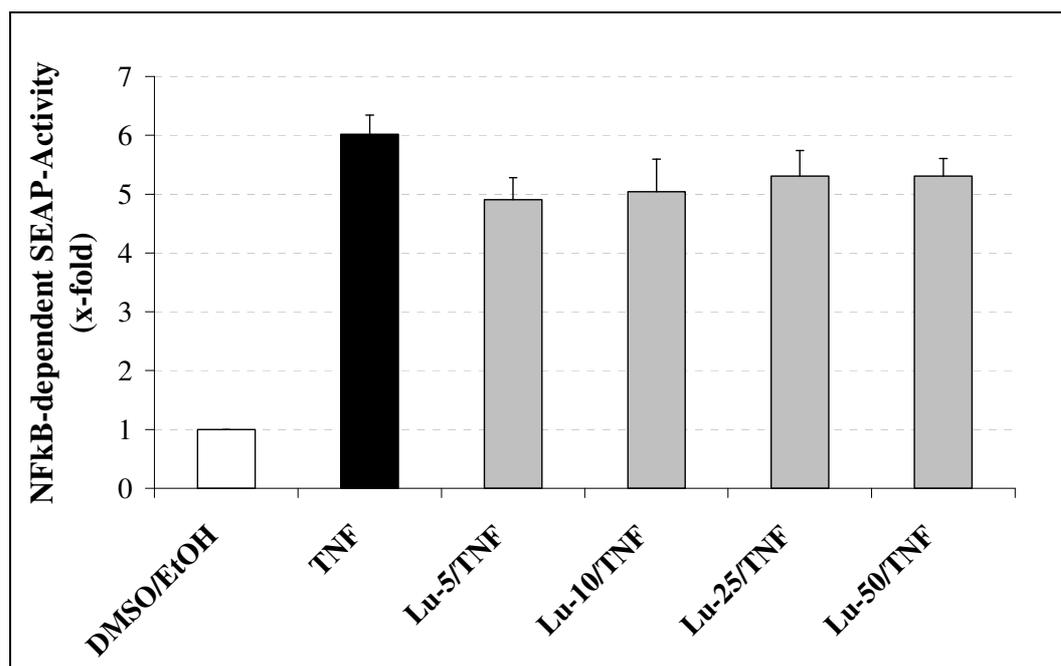


Abb. 3.6.1.a: NF κ B Inhibitionsassay mit Lupeol (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M und 50 μ M) an TNF α stimulierten Zellen

Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet, in das die in Ethanol gelöste Substanz eingebracht wurde. Dieses Lösungsmittelgemisch war zudem die Negativkontrolle. Die Positivkontrolle enthielt $\text{TNF}\alpha$. Für diese Versuche wurde der Zellkultur parallel zur $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation entweder 5 μM , 10 μM , 25 μM oder 50 μM Lupeol beigelegt. Jedoch war selbst bei einer Konzentration von 50 μM keine Reduktion der $\text{NF}\kappa\text{B}$ Antwort zu verzeichnen.

Da aus der Literatur bekannt ist [Shishodia *et al.* 2003], dass Ursolsäure eine antientzündliche Wirkung besitzt, wurde derselbe Test mit Ursolsäure durchgeführt, um die Testmethode zu verifizieren.

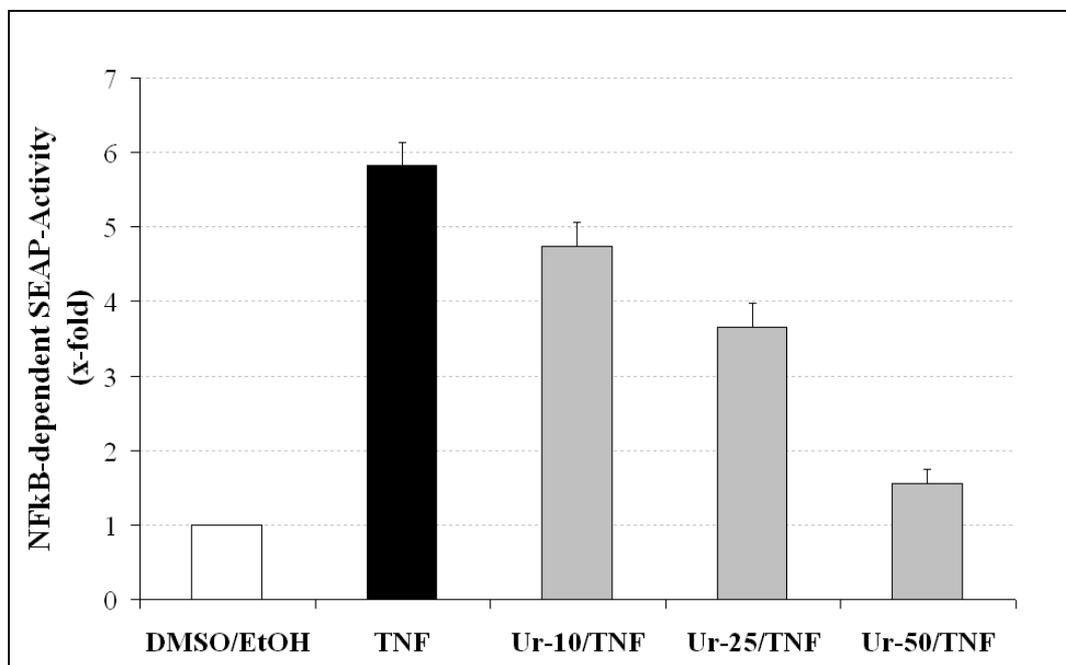


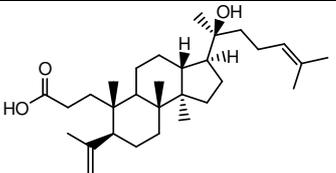
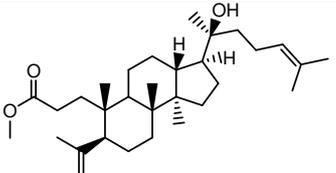
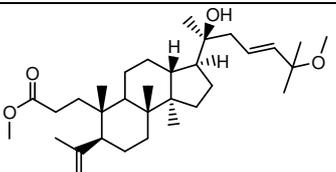
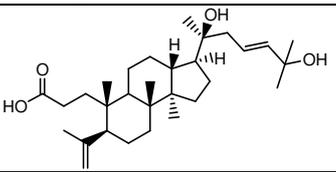
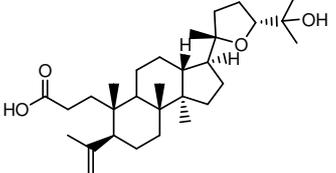
Abb. 3.6.1.b: $\text{NF}\kappa\text{B}$ Inhibitionsassay mit Ursolsäure (10 μM , 25 μM , 50 μM) an $\text{TNF}\alpha$ stimulierten Zellen

Die obige Abbildung (Abb. 3.6.1.b) zeigt eine Negativkontrolle mit DMSO/EtOH als Lösungsmittelsystem, eine $\text{TNF}\alpha$ induzierte Überexpression von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und verschiedene Applikationen mit Ursolsäure. Hierfür wurden Ursolsäure in den Konzentrationen von 10 μM , 25 μM und 50 μM eingesetzt, um die $\text{TNF}\alpha$ induzierte $\text{NF}\kappa\text{B}$ Überexpression zu hemmen.

3.6.2. Zytotoxische Triterpene – Dammarenolsäure und ihre Derivate

Aufgrund der durch die Literatur bekannten antiviralen Bioaktivität [Poehland *et al.* 1987] wurde untersucht, ob Dammarenolsäure und einige ihrer strukturell eng verwandten Derivate auch eine zytotoxische Aktivität auf verschiedene humane Krebszelllinien besitzen. Es wurden folgende Dammarenolsäurederivate auf ihre Zytotoxizität hin getestet (Tab. 3.6.2.a):

Tab. 3.6.2.a: Auf Zytotoxizität hin untersuchte Dammarenolsäurederivate

PB2		Dammarenolsäure
PB18		Methyldammarenolat
PB7		(23E)-(20S)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure
PB8		(20S,23E)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure
PB23		Shoreasäure (24R) bzw. Eicheriansäure (24S)

Die zytotoxischen Untersuchungen wurden an folgenden Zelllinien durchgeführt:

HepG2	humane Leberkarzinomzellen
Huh7	humane Leberkarzinomzellen
MCF7	humane Brustkrebszelllinien
HCT116	humane Darmkrebszellen

Tab. 3.6.2.b: IC₅₀ Werte (in μM) der zytotoxischen Wirkungen von Dammarenolsäurederivaten auf verschiedene humane Krebszelllinien

	HepG2	Huh7	MCF7	HCT116
PB2 (Dammarenolsäure)	16	13	13	8
PB18 (Methyldammarenolat)	> 80	>80	>80	39
PB7 ((23E)-(20S)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure)	> 80	60	30	13
PB8 ((20S,23E)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure)	30	>80	>80	70
PB23 (Shoreasäure (24R) bzw. Eicheriansäure (24S))	> 80	38	48	22

Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Testreihen aufgeführt. Von jeder Zelllinie wurden 4 unterschiedliche Ansätze durchgeführt (n=4) (Abb. 3.6.2.a; Abb. 3.6.2.b; Abb. 3.6.2.c; Abb. 3.6.2.d)

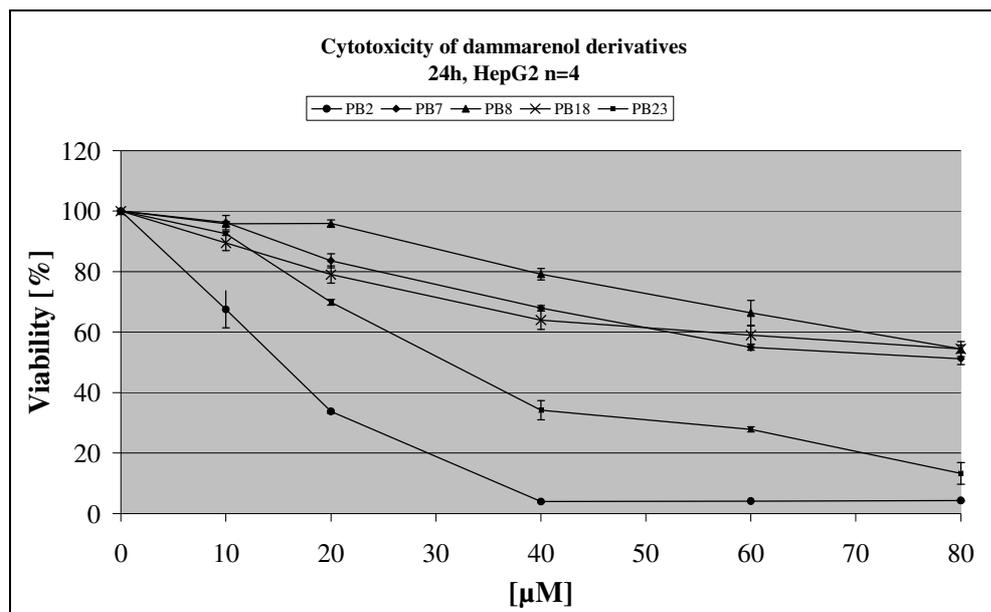


Abb. 3.6.2.a: Zytotoxizität der Dammarenolsäurederivate auf die humane Leberkarzinomzelllinie HepG2

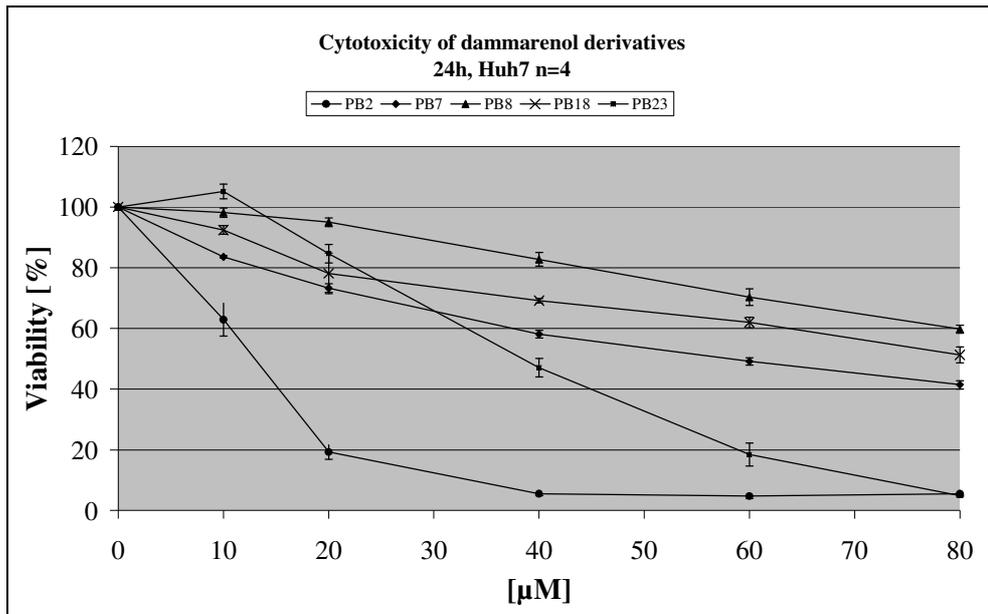


Abb.3.6.2.b: Zytotoxizität der Dammarenolsäurederivate auf die humane Leberkarzinomzelllinie Huh7

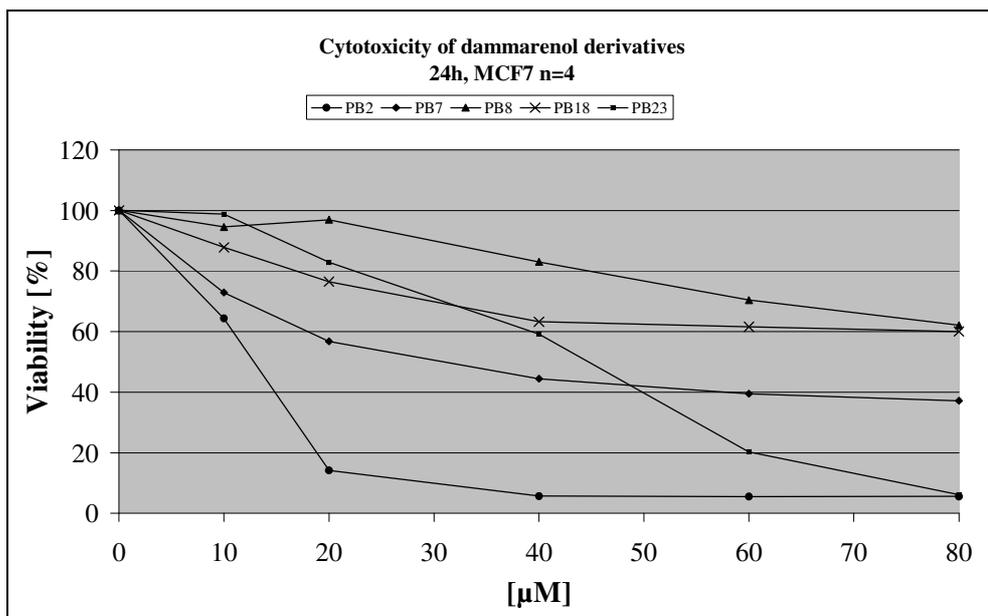


Abb.3.6.2.c: Zytotoxizität der Dammarenolsäurederivate auf die humane Brustkrebszelllinie MCF7

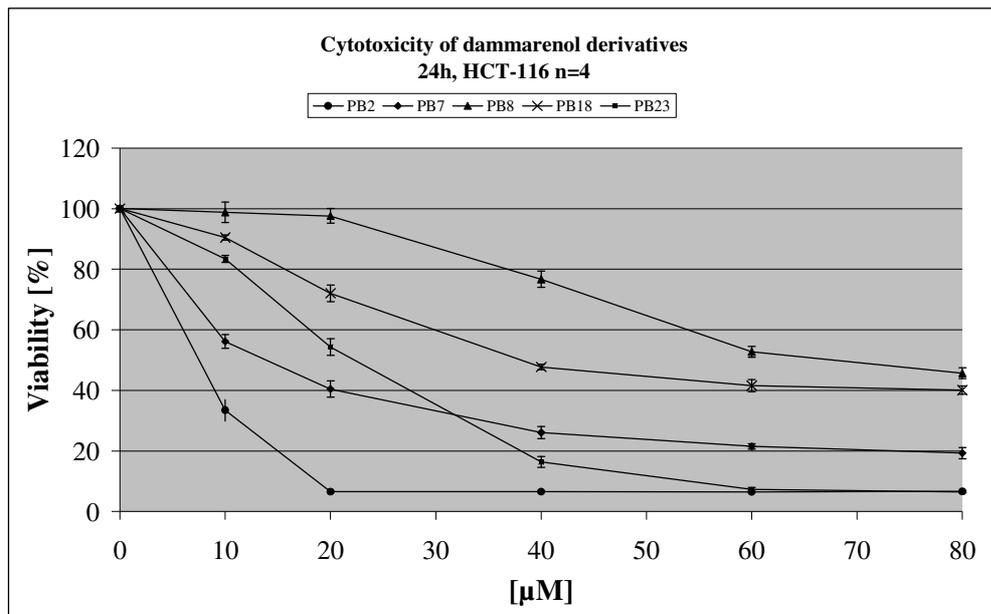


Abb.3.6.2.d: Zytotoxizität der Dammarenolsäurederivate auf die humane Darmkrebszelllinie HCT116

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich (Tab. 3.6.2.b; Abb. 3.6.2.a; Tab. 3.6.2.c; Tab. 3.6.2.d; Tab. 3.6.2.e; Tab. 3.6.2.f), dass Dammarenolsäure auf alle Zelllinien am stärksten zytotoxisch wirkt. Dammarenolsäure hat eine Carboxylfunktion an Position 2 und eine Hydroxygruppe an Position 20. Zwischen Position 24 und 25 besteht eine Doppelbindung und die komplette Seitenkette ist lipophil.

Bei Methyl-dammarenolat ist die Säurefunktion an Position 2 methyliert. Die Bioaktivität sinkt drastisch, nur noch bei humanen Darmkrebszellen ist eine schwache Bioaktivität zu verzeichnen.

Bei der Substanz (20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure befindet sich im Vergleich zur Dammarenolsäure an Position 25 eine Hydroxygruppe. Die Doppelbindung liegt zwischen Position 23 und 24. Auch hier ist ein drastischer Abfall der Bioaktivität zu verzeichnen. Bei den Zelllinien Huh7 und MCF7 ist der IC₅₀ Wert größer als 80 µM

(23*E*)-(20*S*)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure besitzt einen Methylester und eine Methoxygruppe an Position

25. Ansonsten ist die Substanz identisch mit (20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure. Die Bioaktivität unterscheidet sich von der von (20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure jedoch eklatant.

Shoreasäure (24*R*) bzw. Eicheriansäure (24*S*) unterscheiden sich von allen anderen Dammarenolsäurederivaten durch ihren zusätzlichen Ring, der durch die Seitenkette gebildet wird. Die Bioaktivität dieser Substanz ist moderat, aber aufgrund dieser starken strukturellen Abweichung ist es schwer eine Struktur-Wirkungs-Korrelation im Vergleich zu den anderen Dammarenolsäurederivaten abzuleiten.

3.7. Weitere insektizide Naturstoffe

Um die Wirkung der insektiziden Naturstoffe aus Mangroven in einen bioaktiven Kontext einordnen zu können, wurden aus weiteren Pflanzen Naturstoffe mit bekannter insektizider Bioaktivität isoliert. Die insektizide Wirkung der Naturstoffe aus Arten der Gattung *Ryania* und der Gattung *Aglaia* ist hinreichend beschrieben [Jefferies *et al.* 1992; Jefferies *et al.* 1996; Jefferies *et al.* 1996; González-Coloma *et al.* 1999; Schneider *et al.* 2000; Nugroho *et al.* 1999]. Diese Stoffe wurden als Positivkontrolle isoliert, um ihre insektizide Aktivität auf die im Institut gehaltene Kultur von *Spodoptera littoralis* zu testen.

3.7.1. Didehydroaglaiastatin aus den Blüten von *Aglaia duppereana*

Aus den Blüten der in Südostasien verbreiteten Pflanzenart *Aglaia duppereana* (Meliaceae) wurde das Rocaglamidderivat Didehydroaglaiastatin isoliert (Tab. 3.7.2.b; Abb. 3.7.2.a). Da die Konzentration dieser Alkaloide im Rohextrakt extrem gering ist, können diese Substanzen nur durch BAGI isoliert werden. Nachdem der mit 90% Methanol hergestellte Rohextrakt gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt wurde, wurden die in der Methanolphase befindlichen Substanzen mittels VLC grob aufgetrennt. In diesen Fraktionen konnte Didehydroaglaiastatin mittels DAD-HPLC detektiert werden. Drei ähnlich erscheinende Fraktionen wurden vereint und über eine Sephadexsäule weiter aufgereinigt. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte über die präparative HPLC. Die Isolierung von Didehydroaglaiastatin wurde wie bereits in der Literatur beschrieben vorgenommen [Nugroho 1997]. Das NMR-Spektrum ist in Kapitel 7.4. dargestellt.

Tab. 3.7.2.a: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Didehydroaglaiastatin

Proton an Kohlenstoffatom Nr.	[Ohse <i>et al.</i> 1996] CDCl_3 500 MHz		Didehydroaglaiastatin $\text{MeOH-}d_4$ 500 MHz	
	$\delta\text{H(m, JHz)}$		$\delta\text{H(m, JHz)}$	
3	4,6 (1H s)		4,46 (1H s)	
5	6,28 (1H d $J=2,0$)		6,31 (1H d $J=1,2$)	
7	6,08 (1H d $J=2,0$)		6,15 (1H d $J=1,5$)	
6-OCH ₃	3,83 (3H s)		3,82 (3H s)	
8-OCH ₃	3,83 (3H s)		3,83 (3H s)	
2'6'	7,13 (2H d $J=9,0$)		7,06 (2H d $J=8,8$)	
3'5'	6,58 (2H d $J=9,0$)		6,54 (2H d $J=8,8$)	
4'-OCH ₃	3,66 (3H s)		3,65 (3H s)	
3''5''	7,03 (3H m)		7,03 (3H m)	
2''6''	6,89 (2H m)		6,89 (2H m)	
3'''	3,48 (1H m)	3,62 (1H m)	4,14 (1H m)	4,11 (1H m)
4'''	1,94-2,06 (1H m)		2,38 (1H m)	2,31 (1H m)

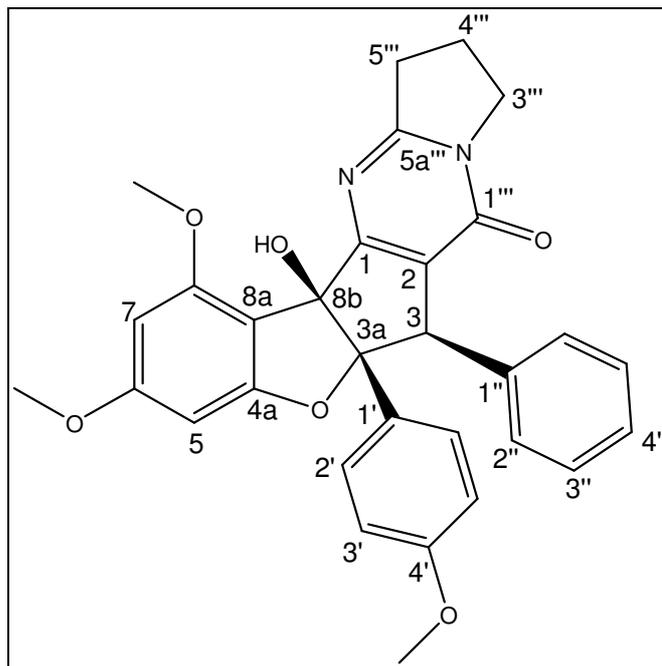
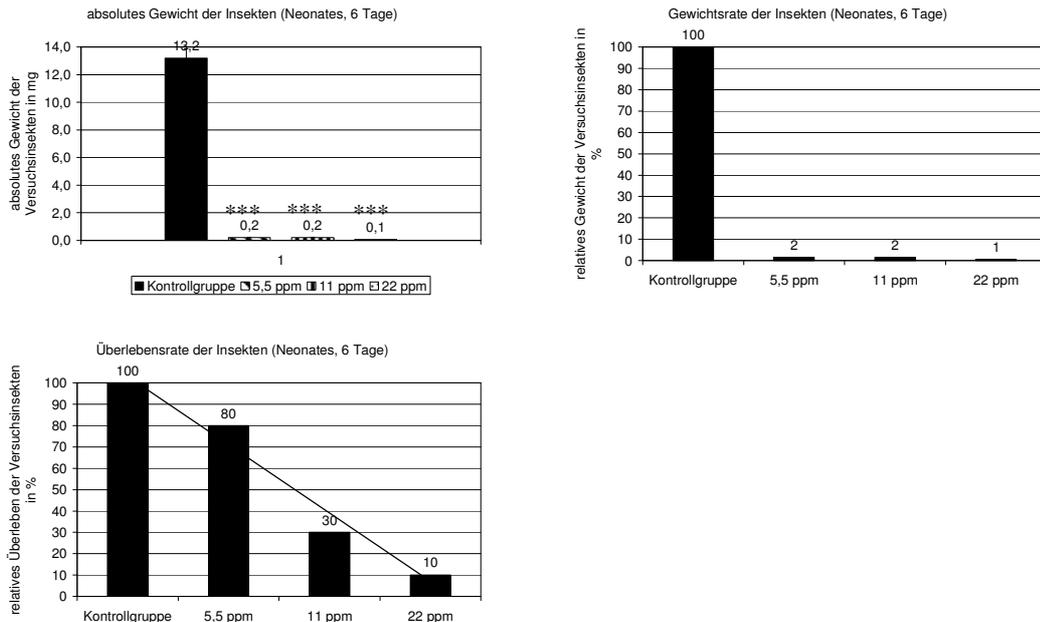


Abb. 3.7.2.a: Didehydroaglaiastatin

Insektenbioassayergebnisse

In diesen Insektenexperimenten (Abb. 3.7.2.b) konnte gezeigt werden, dass die Gewichtsreduktion schon im Konzentrationsbereich von 5,5 ppm bei $p > 98\%$ liegt. Somit liegt der IC_{50} Wert weit unter 5,5 ppm. Bei der Überlebensrate wurde eine LC_{50} Konzentration von etwa 9 ppm festgestellt.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.7.2.b: Die insektizide Wirkung von Didehydroaglaistatin

3.7.2. Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin aus Zweigen von *Ryania speciosa*

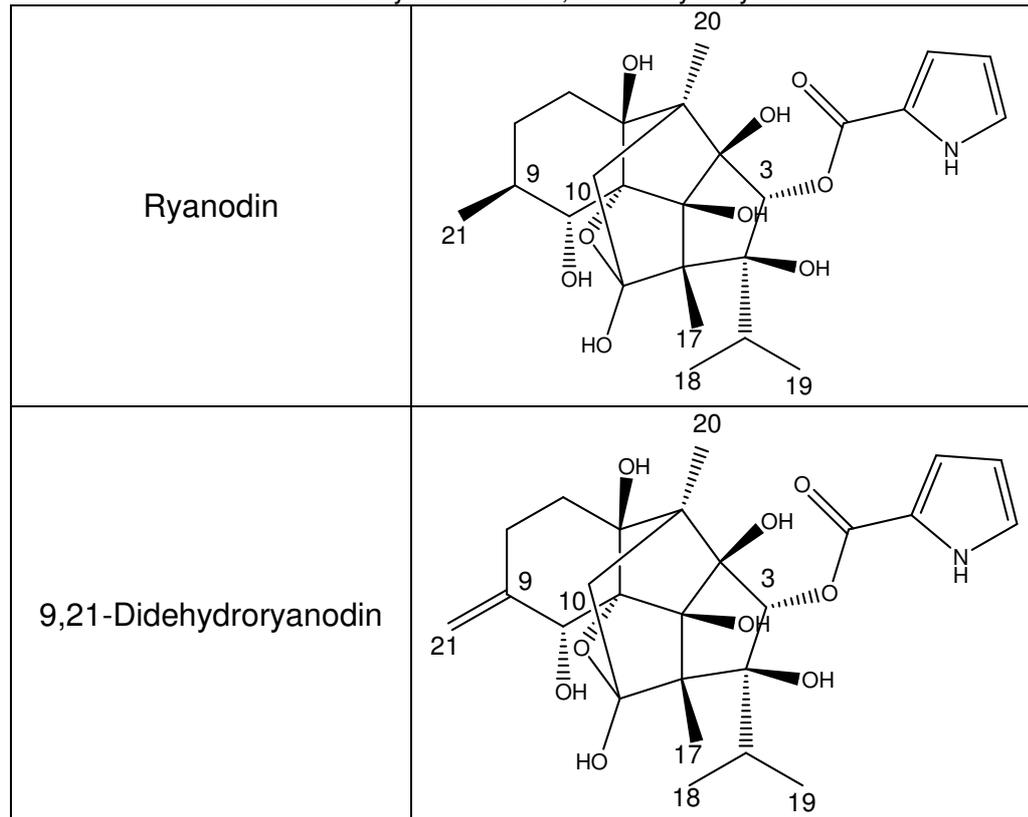
Aus den Zweigen der in Süd- und Mittelamerika sowie auf den karibischen Inseln beheimateten Pflanzenart *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae) wurden zwei verschiedene Ryanodinderivate (Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin) isoliert (Tab. 3.7.3.a; Tab. 3.7.3.b). Die pulverisierte Droge (insgesamt 500 g) wurde im trockenen Zustand in eine Soxhlehülse gefüllt, mit Seesand und Watte bedeckt und mit Dichlormethan in der Soxhletapparatur extrahiert. Es wurden drei Soxhletapparaturen mit jeweils 500 mL Volumen betrieben. Ein Destillationsdurchgang dauerte etwa 30 Minuten, insgesamt wurden die Apparaturen etwa 24 Stunden lang

betrieben. Nach der Vereinigung und Evaporation aller Dichlormethanphasen wurde der Rückstand in Ethylacetat rückgelöst und mittels präoperativer HPLC aufgetrennt. Die Isolierung der Ryanodinderivate wurde wie bereits in der Literatur beschrieben durchgeführt [Jefferies *et al.* 1992]. Die NMR-Spektren sind in Kapitel 7.4. dargestellt.

Tab. 3.7.3.a: Charakteristische ^1H NMR-Daten von Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin

	[Waterhouse <i>et al.</i> 1984] MeOH- d_4 300 MHz		gemessene Werte MeOH- d_4 500 MHz	
	9,21-Dehydro- ryanodin	Ryanodin	9,21- Dehydro- ryanodine	Ryanodin
Proton an Kohlenstoffatom Nr.	$\delta\text{H}(\text{m}, J$ nicht angegeben)	$\delta\text{H}(\text{m}, J$ nicht angegeben)	$\delta\text{H}(\text{m}, J\text{Hz})$	$\delta\text{H}(\text{m}, J\text{Hz})$
3	5,63 (1H, s)	5,64 (1H, s)	5,65 (1H, s)	5,63 (1H, s)
10	5,48 (1H, s)	3,80 (1H, d)	5,48 (1H, s)	3,77 (1H, d)
17	1,40 (3H, s)	1,40 (3H, s)	1,38 (3H, s)	1,38 (3H, s)
18	0,75 (3H, d)	0,76 (3H, d)	0,75 (3H, d; $J=6,3$ Hz)	0,75 (3H, d; $J=6,3$ Hz)
19	1,10 (3H, d)	1,12 (3H, d)	1,10 (3H, d; $J=6,95$ Hz)	1,11 (3H, d; $J=6,95$ Hz)
20	0,90 (3H, s)	0,90 (3H, s)	0,91 (3H, s)	0,90 (3H, s)
21 (Methylgruppe)	-	1,01 (3H, d)	-	1,01 (3H, d; $J=6,3$ Hz)
21 (Methylengruppe)	4,74 (1H, d); 5,04 (1H, d)	-	4,74 (1H, s); 5,04 (1H, d; $J=1,8$ Hz)	-

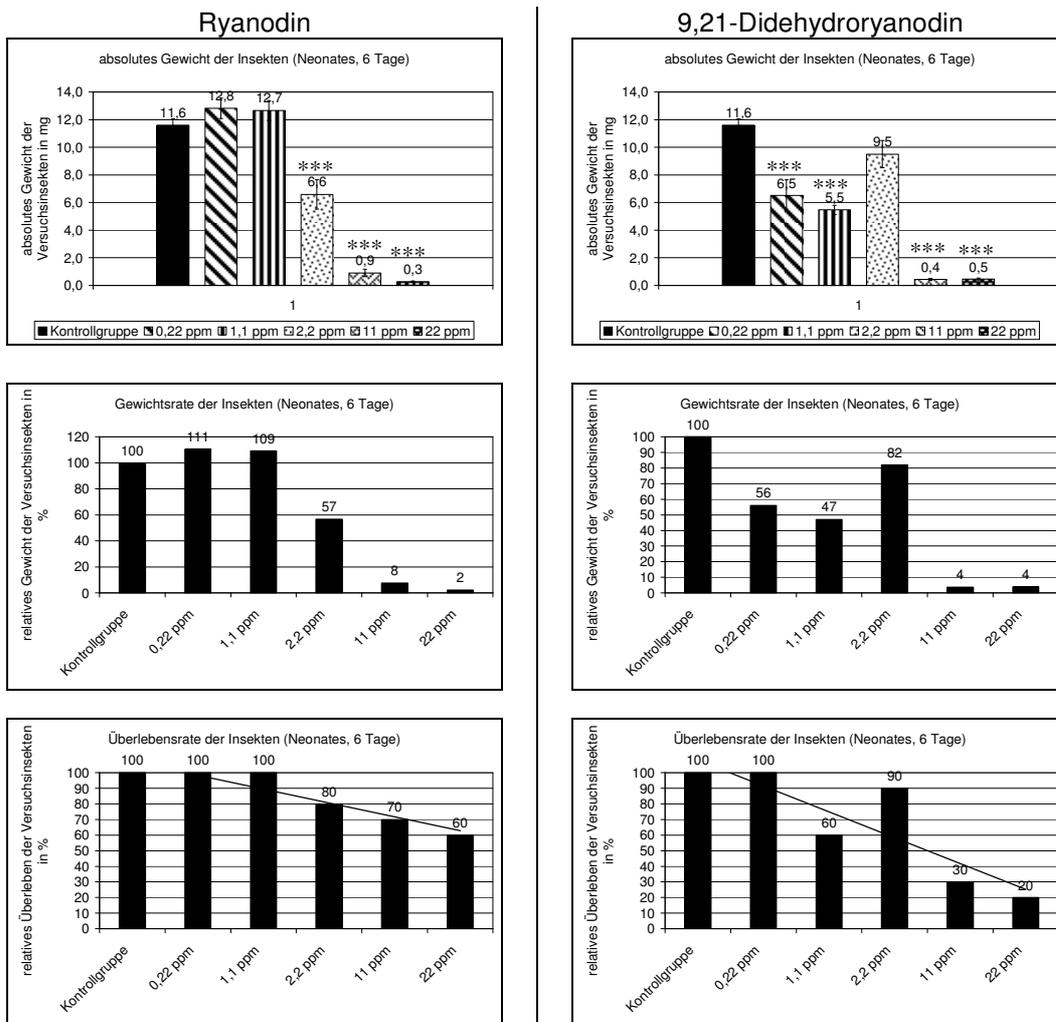
Tab. 3.7.3.b: Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin



Insektenbioassayergebnisse

Im Rahmen der Insektiziditätstests von Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin konnte festgestellt werden, dass 9,21-Didehydroryanodin eine stärkere insektizide Wirkung entfaltet als Ryanodin (Abb. 3.7.3). Bei der Gewichtsreduktion stellt sich bei 9,21-Didehydroryanodin im Konzentrationsbereich von 0,22 ppm schon ein Effekt ein, wobei bei Ryanodin der erste gewichtsreduzierende Effekt erst bei der zehnfachen Dosis zu erkennen ist. Der IC_{50} Wert von 9,21-Didehydroryanodin liegt demnach bei etwa 0,5 ppm, der IC_{50} Wert von Ryanodin bei ungefähr 2,5 ppm. Auch der letale Effekt stellt sich bei 9,21-Didehydroryanodin bei einer geringeren Konzentration ein als im Fall von Ryanodin. Der LC_{50} Wert von 9,21-Didehydroryanodin liegt bei etwa 2,2 ppm, bei Ryanodin liegt der LC_{50} Wert oberhalb von 22 ppm, da bei dieser Konzentration mehr als 50% der Insekten überlebten. Im Fall von 9,21-Didehydroryanodin weicht der Wert bei der Konzentration von 2,2 ppm stark von den anderen Werten ab, die jedoch eine Datenreihe ergeben, aus der eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit

abzuleiten ist. Dieser Fehler beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass in diesem Versuchsansatz die Substanz nicht komplett homogen im Futterstück verteilt wurde. Nichtsdestotrotz kann aufgrund der diese Konzentration umrahmenden Versuchsergebnissen eine Interpretation hinsichtlich einer Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit erstellt werden.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:
 * >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.7.3: Die Bioassayergebnisse von Ryanodine und 9,21-Didehydroryanodine anhand der Insektenkultur von *Spodoptera littoralis* im Vergleich

3.8. Weitere Naturstoffe aus Mangroven

3.8.1. *Heritiera littoralis*

3.8.1.1. Tilirosid aus den Blättern von *Heritiera littoralis*

Aus den Blättern der Mangrovenart *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) wurde das seltene Flavonoidglykosid Tilirosid isoliert (Abb. 3.8.1.1.a; Abb. 3.8.1.1.b). Das Vorkommen dieser Substanz in den Blättern dieser Mangrovenart wurde bereits beschrieben [Tian *et al.* 2004]. Tilirosid (6''-*O*-*trans-p*-Coumaroyl-Astragalin) ist bekannt aus vielen Lindenarten, dem Wolfsmichgewächs *Croton setigerus* (früher *Eremocarpus setigerus*) oder aus der Erdbeere *Fragaria ananassa* [DNP].

Aus den Blättern dieser Mangrovenart wurde ein Rohextrakt hergestellt, der von Prof. Dr. Wenhan Lin von der Universität Peking zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Rohextrakt wurde in 90%igem Methanol wieder gelöst und gefiltert. Von der Methanolphase wurden die lipophilen Bestandteile durch Ausschüttelung gegen *n*-Hexan abgetrennt. Die restliche Methanolphase wurde eingedampft und in einer Mischung von Ethylacetat und Wasser unter Einwirkung von Ultraschall wieder gelöst. Mehrmals wurde die Ethylacetatphase gegen Wasser und die Wasserphase gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden eingedampft und mittels einer Silicasäule aufgetrennt. Als Lösungsmittelsystem wurde eine Mischung aus Ethylacetat und Methanol im Verhältnis 98:2 gewählt. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatografisch (mit demselben Lösungsmittelsystem) untersucht, die tilirosidhaltigen Fraktionen vereint und mittels einer Sephadexsäule weiter aufgetrennt. Als Fließmittel der Sephadexsäule wurde 100%iges Methanol verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden ein weiteres Mal mittels DC untersucht und die tilirosidhaltigen Fraktionen vereint. Durch präparative HPLC wurde die Substanz ein letztes Mal aufgereinigt (Abb. 3.8.1.1.b). Das NMR Spektrum ist im Kapitel 7.4. dargestellt.

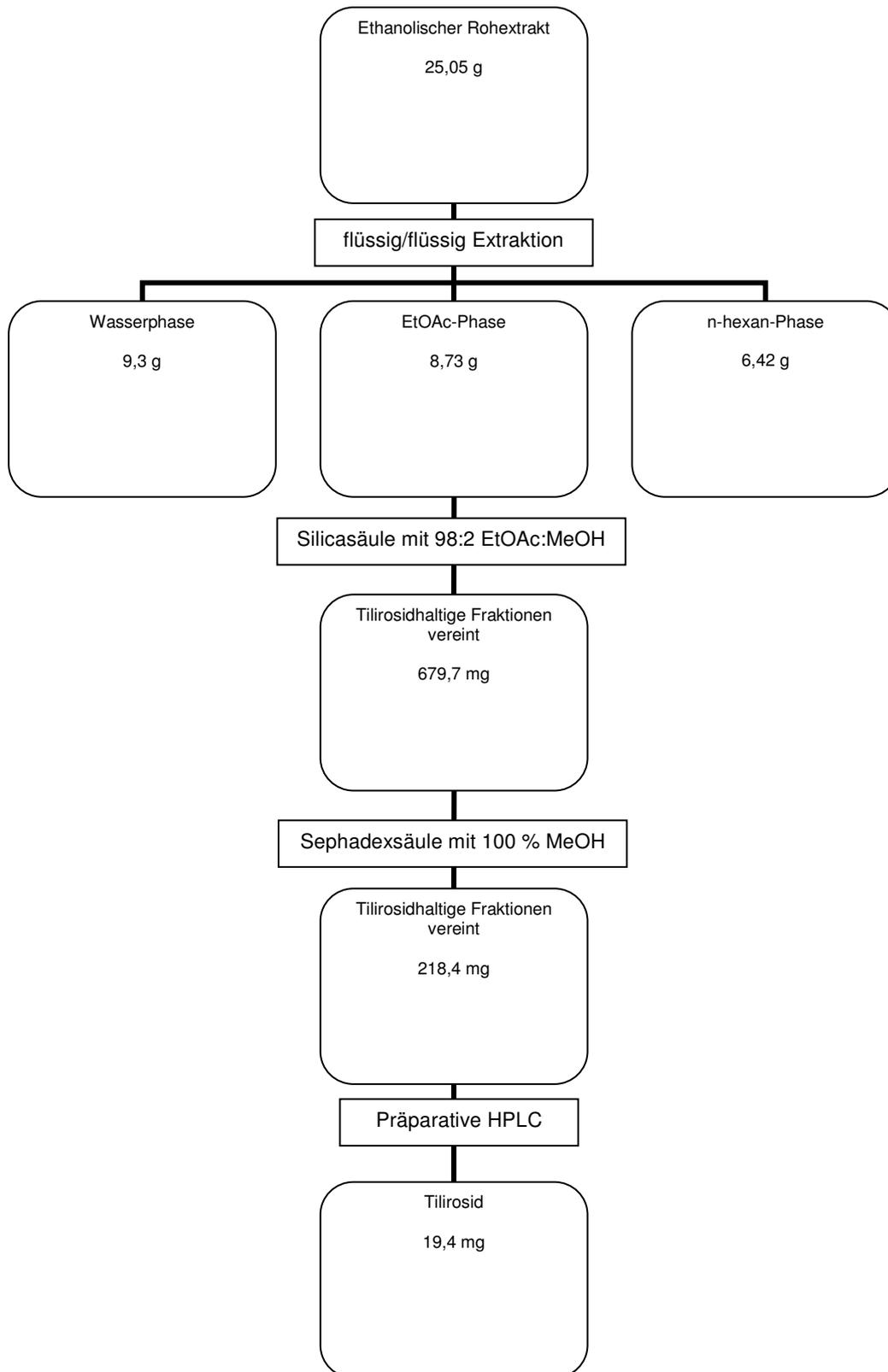


Abb. 3.8.1.1.a: Isolierungsschema von Tilirosid aus den Blättern von *Heritiera littoralis*

Tab. 3.8.1.1.a: ^1H NMR-Daten von Tilirosid

Proton an Kohlenstoff Nr.	[Jung <i>et al.</i> 1998] DMSO- d_6 400 MHz	Tilirosid DMSO- d_6 500 MHz
	δH (m, J/Hz)	δH (m, J/Hz)
6	6,10 (1H d $J=2,0$ Hz)	6,13 (1H d $J=1,9$ Hz)
8	6,34 (1H d $J=2,0$ Hz)	6,37 (1H d $J=1,9$ Hz)
2', 6'	7,93 (2H d $J=8,9$ Hz)	7,97 (2H d $J=8,8$ Hz)
3', 5'	6,81 (2H d $J=8,9$ Hz)	6,84 (2H d $J=8,5$ Hz)
1''	5,4 (1H d $J=7,3$ Hz)	5,43 (1H d $J=7,1$ Hz)
6''a	3,98 (1H dd $J=12; 6,3$ Hz)	4,01 (1H dd $J=11,8, 6,65(6,3)$ Hz)
6''b	4,22 (1H brd $J=12$ Hz)	4,26 (1H d $J=10,4$ Hz)
2''', 6'''	7,31 (2H d $J=8,6$ Hz)	7,31 (2H d $J=8,5$ Hz)
3''', 5'''	6,74 (2H d $J=8,6$ Hz)	6,77 (2H d $J=8,5$ Hz)
7'''	7,28 (1H d $J=15,8$ Hz)	7,31 (1H d $J=10,7$ Hz)
8'''	6,06 (1H d $J=15,8$ Hz)	6,09 (1H d $J=10,7$ Hz)
5-OH	12,56 (1H s)	12,56 (1H s)

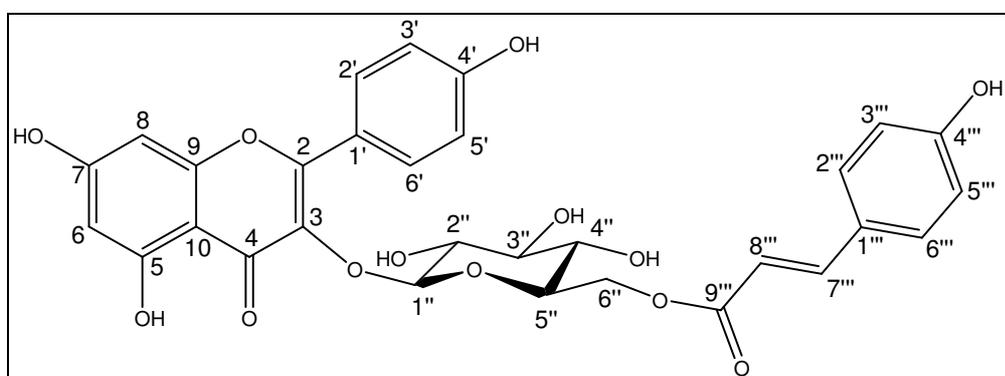
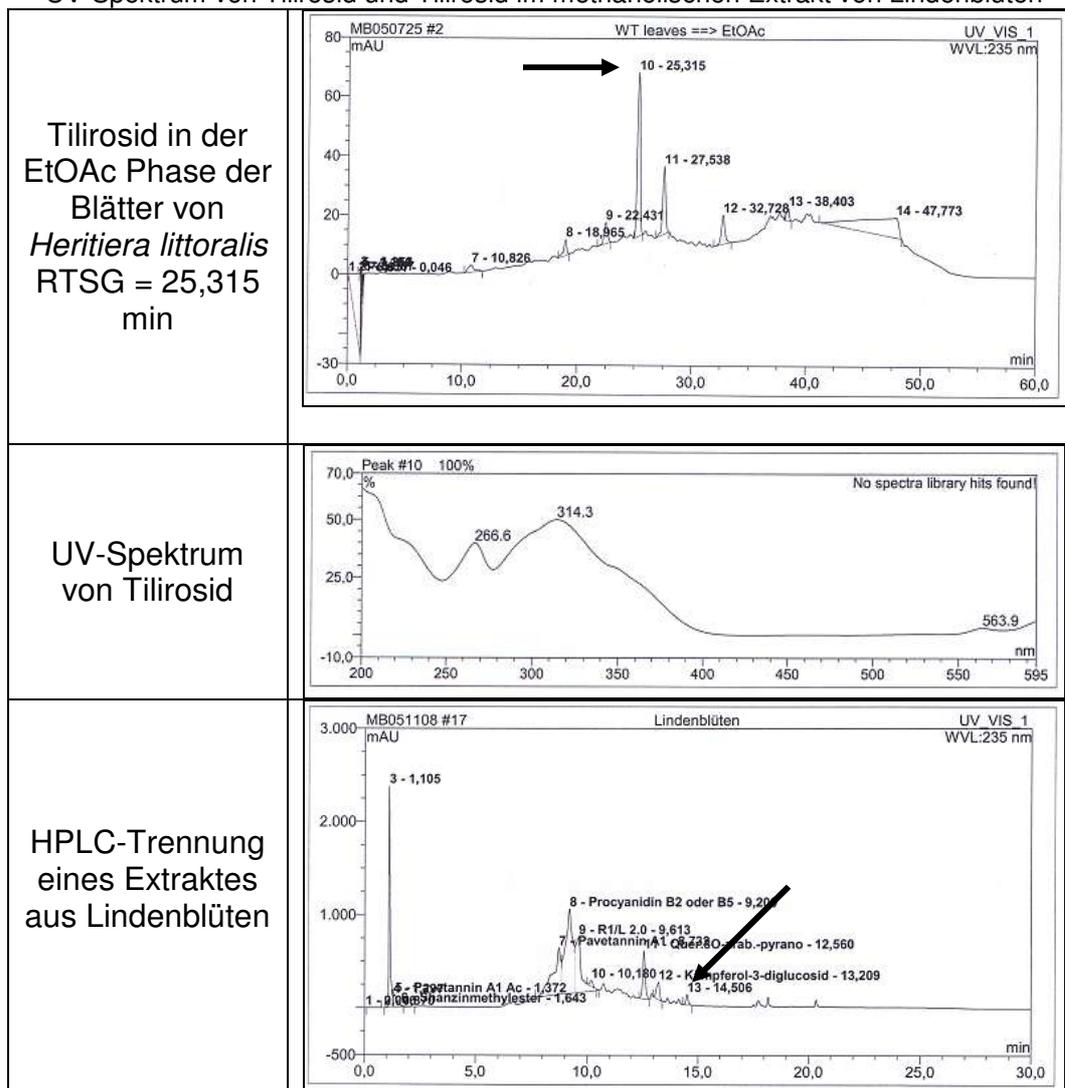


Abb. 3.8.1.1.b: Tilirosid

In den folgenden Abbildungen ist das Chromatogramm der Ethylacetatphase der Blätter von *Heritiera littoralis* und das UV-Spektrum von Tilirosid dargestellt (Tab. 3.8.1.1.b). Bei diesem Spektrum ist zu erkennen, dass das klassische Spektrum eines Flavonoidderivates im Wellenlängenbereich um etwa 310 nm von einem UV-Spektrum einer *p*-Coumarsäure überdeckt wird. Diese UV-Absorptionsaddition ist typisch für diese Substanz. Der Name Tilirosid leitet sich von den Lindengewächsen (Tilioidea) ab, aus deren Blüten Tilirosid erstmals isoliert wurde. Deshalb wurde aus 1 g Lindenblüten ein methanolischer Extrakt hergestellt. In dem abgebildeten Chromatogramm (Tab. 3.8.1.1.b) des methanolischen Lindenblütenextraktes ist der Tilirosidpeak markiert (Pfeil). Durch diesen Vergleich konnte aus DAD-HPLC Basis festgestellt werden, dass das Vorkommen von Tilirosid in dem EtOAc Extrakt der Blättern der Mangrovenart *Heritiera littoralis* wesentlich dominanter gegenüber anderen

Substanzen ist als in Lindenblüten. Für großtechnische Isolierung würden sich deshalb die Blätter der Mangrovenart *Heritiera littoralis* eher eignen als Lindenblüten, da weniger störende Substanzen abgereinigt werden müssen. Tilirosid wird als stark antioxidativer (DPPH Test IC_{50} Wert bei 6 μ M) und antientzündlicher (ED_{50} Wert bei 35,6 mg/kg (Ratten)) Naturstoff beschrieben [Sala *et al.* 2002].

Tab. 3.8.1.1.c: Das Chromatogramm der EtOAc Phase der Blätter von *Heritiera littoralis*, das UV-Spektrum von Tilirosid und Tilirosid im methanolischen Extrakt von Lindenblüten



Im negativen Modus des LC-MS Spektrums (Abb. 3.8.1.1.c) von Tilirosid kann eine eindeutige Fragmentierung erkannt werden. Zuerst wird der an den Zuckerteil veresterte *p*-Coumarsäureanteil abgespalten, anschließend der Glukoseanteil, sodass als letztes Fragment das Flavonoidaglykon Kämpferol zu erkennen ist.

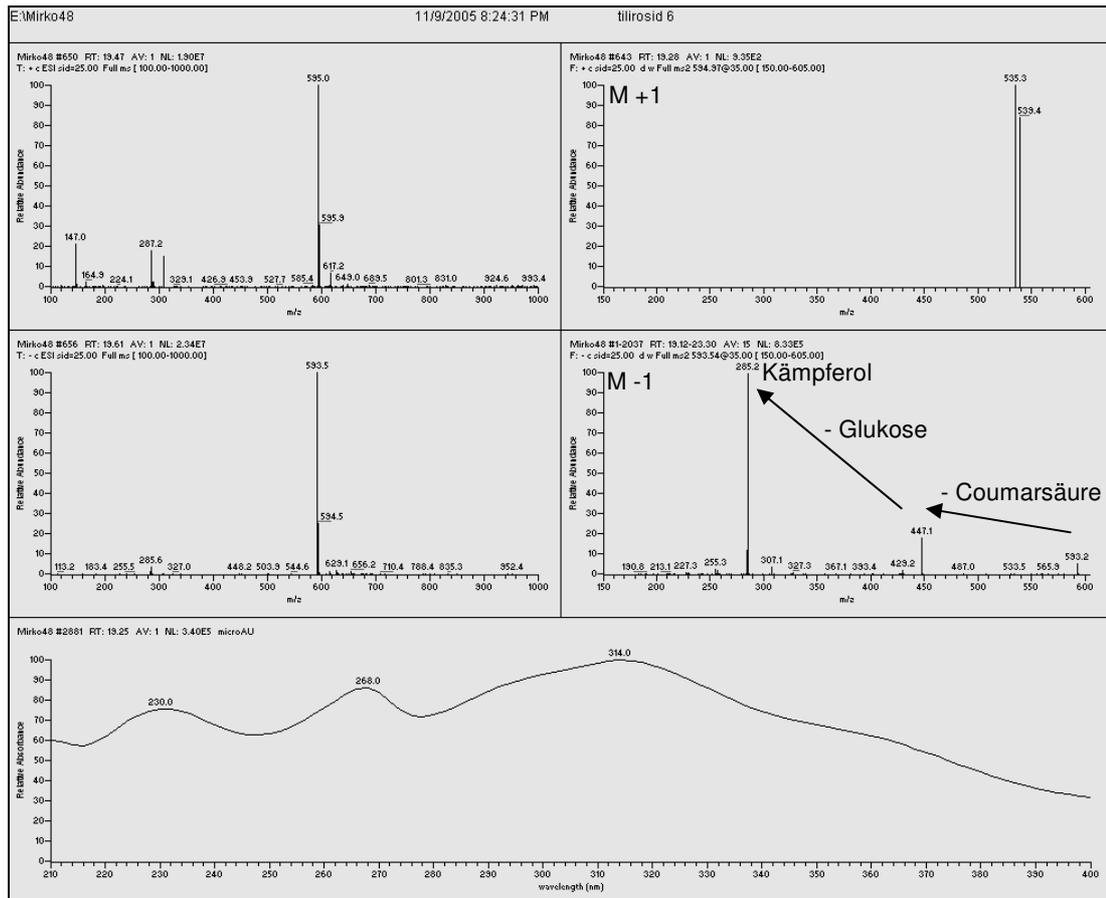


Abb. 3.8.1.1.c: LC-MS Spektrum und UV-Spektrum (unten) von Tilirosid (MG 594 g/mol)

3.8.1.2. Heritol, Heritonin und Vallapin aus den Zweigen von *Heritiera littoralis*

Aus den Zweigen der Mangrovenart *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) wurden 3 seltene Sesquiterpenlaktonderivate vom Cadinantyp isoliert (Abb. 3.8.1.2.a). Hierbei handelt es sich um Vallapin, Heritonin und Heritol (Tab. 3.8.1.2.d). Der Rohextrakt wurde von Prof. Dr. Wenhan Lin von der Universität Peking zur Verfügung gestellt. Der Rohextrakt wurde in 90%igem Methanol gelöst und gefiltert. Die lipophilen Bestandteile wurden durch Ausschütteln gegen *n*-Hexan von der 90%igen Methanolphase abgetrennt. Aus der *n*-Hexan-Phase konnte nach einer weiteren Auftrennung durch eine Silicasäule (Lösungsmittelsystem Ethylacetat und *n*-Hexan im Verhältnis 1 zu 1) mittels präparativer HPLC das Sesquiterpenlakton Vallapin isoliert. Die restliche 90%ige Methanolphase wurde eingedampft und in einem Gemisch aus Wasser und Ethylacetat unter Ultraschalleinfluss wieder gelöst. Die

Ethylacetatphase wurde mehrmals gegen Wasser und die Wasserphase mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden eingedampft und mittels einer Silicasäule mit dem Lösungsmittelgemisch von Ethylacetat und *n*-Hexan im Verhältnis 8:2 aufgetrennt. Da die beiden Sesquiterpenlaktone Heritol und Heritonin nicht weiter durch Silicagel von einander getrennt werden konnten, wurde das Gemisch aus diesen beiden Substanzen mittels einer Sephadexsäule getrennt. Die NMR Spektren sind im Kapitel 7.4. dargestellt.

Die Namen Heritol und Heritonin leiten sich von der Stammpflanze *Heritiera littoralis* ab, aus der diese Substanzen bereits isoliert wurden und deren Strukturen mittels Röntgenkristallographie absolut bestimmt wurden [Miles *et al.* 1989].

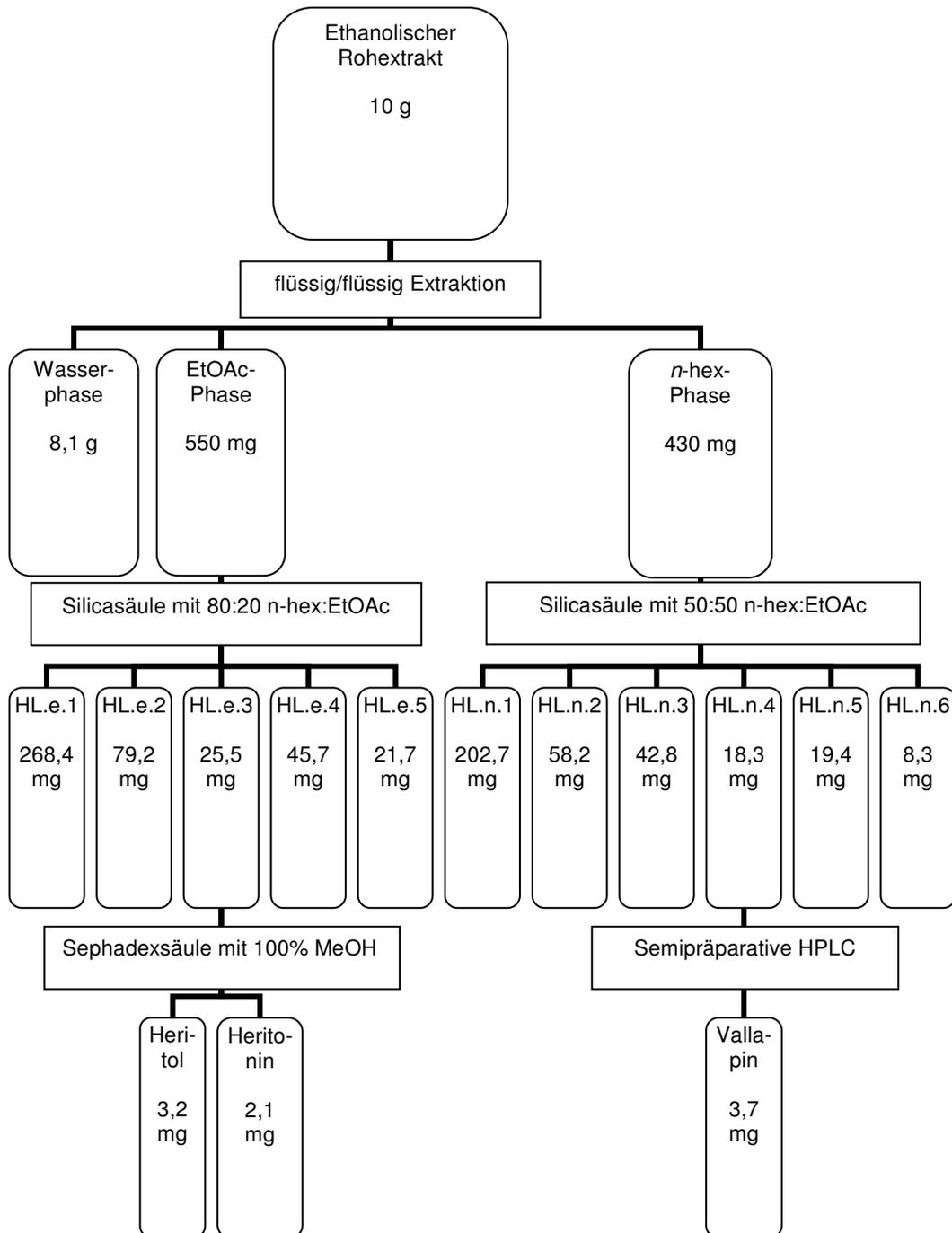


Abb. 3.8.1.2.a: Isolierungsschema von Vallapin, Heritol und Heritonin aus Zweigen von *Heritiera littoralis*

Für die Strukturaufklärung waren ^1H NMR Daten in der Literatur nur rudimentär beschrieben, weil die Strukturaufklärung in diesen Literaturstellen primär anhand von Röntgenstrukturkristallografie durchgeführt wurde: Vallapin (Tab. 3.8.1.2.a) [Miles *et al.* 1991], Heritonin (Tab. 3.8.1.2.b) [Miles *et al.* 1989] und Heritol (Tab. 3.8.1.2.c) [Miles *et al.* 1987].

Tab. 3.8.1.2.a: ¹H-NMR-Daten von Vallapin

	[Miles <i>et al.</i> 1991] CDCl ₃ 200 MHz	Vallapin CDCl ₃ 500 MHz
Proton an Kohlenstoff Nr.	δ H(m, J/Hz)	δ H(m, J/Hz)
1	7,48 (1H s)	7,44 (1H s)
4	6,74 (1H s)	6,85 (1H s)
8	5,22 (1H s)	4,90 (1H m)
9	4,42 (1H s)	3,91 (1H m)
10	3,06 (1H m)	3,13 (1H m)
13	2,20 (3H s)	2,17 (3H s)
14	2,31 (3H s)	2,24 (3H s)
15	3,95 (3H s)	3,88 (3H s)
16	1,45 (3H d(J=10 Hz))	1,45 (3H d(J=7Hz))

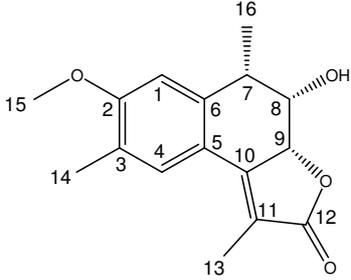
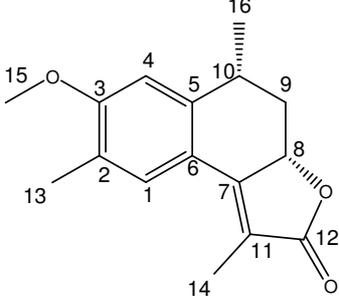
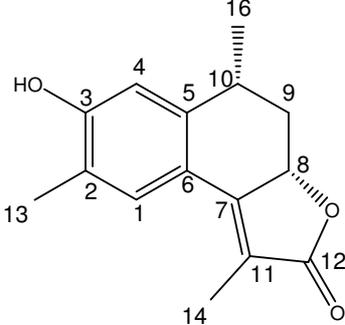
Tab. 3.8.1.2.b: ¹H-NMR-Daten von Heritonin

	[Miles <i>et al.</i> 1989] CDCl ₃ 200 MHz	Heritonin MeOH- <i>d</i> ₄ 500 MHz
Proton an Kohlenstoff Nr.	δ H(m, J/Hz)	δ H(m, J/Hz)
1	6,84 (1H s)	6,96 (1H s)
4	7,41 (1H s)	7,41 (1H s)
8	4,89 (1H dd(J=3 Hz))	4,82 (1H dd(J=10;1,5 Hz))
9	2,63 (1H m)	2,80 (1H m)
10	3,10 (1H m)	3,16 (1H m)
13	2,13 (3H s)	2,13 (3H s)
14	2,25 (3H s)	2,45 (3H s)
15	3,90 (3H s) (O-Me)	3,81 (3H s) (O-Me)
16	1,46 (3H d(J=7 Hz))	1,38 (3H d(J=7,5 Hz))

Tab. 3.8.1.2.c: ¹H-NMR-Daten von Heritol

	[Miles <i>et al.</i> 1989] CDCl ₃ 200 MHz	Heritol DMSO- <i>d</i> ₆ 500 MHz
Proton an Kohlenstoff Nr.	δ H(m, J/Hz)	δ H(m, J/Hz)
1	6,85 (1H s)	6,89 (1H s)
4	7,42 (1H s)	7,42 (1H s)
8	4,90 (1H dd (J nicht angegeben))	5,03 (1H dd (J=12,5; 3,5 Hz))
9	2,62 (1H m)	DMSO-Peak
10	3,10 (1H m)	3,05 (1H m)
13	2,18 (3H s)	1,99 (3H s)
14	2,30 (3H s)	2,15 (3H s)
16	1,42 (3H d (J nicht angegeben))	1,30 (3H d (J=7,5 Hz))

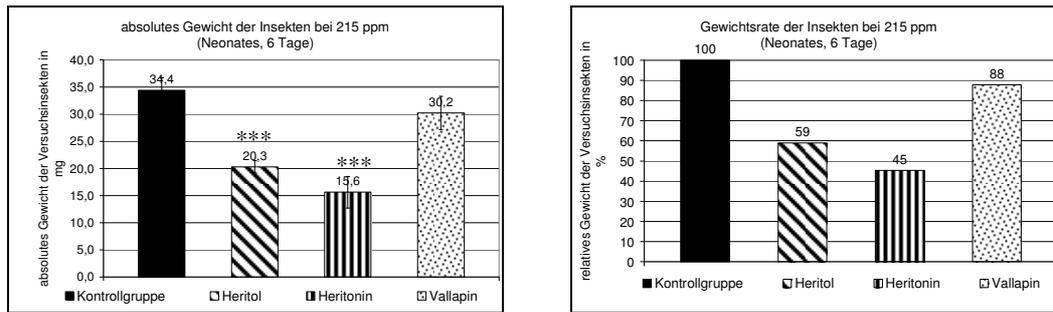
Tab. 3.8.1.2.d: Strukturen von Vallapin, Heritonin und Heritol

Vallapin	
Heritonin	
Heritol	

Insektenbioassayergebnisse

Heritol, Heritonin und Vallapin weisen eine ausgeprägte Ichthyotoxizität auf [Miles *et al.* 1987] und von Rotenon ist neben der ausgeprägten insektiziden Aktivität auch eine starke ichthyotoxische Wirkung berichtet [Teixeira *et al.* 1984]. Dies wurde als Anhaltspunkt genommen, um Heritol, Heritonin und Vallapin auf ihre insektizide Aktivität zu untersuchen.

Bei einer gewählten Konzentration von 215 ppm lassen sich die Wirkungsunterschiede der drei Derivate am deutlichsten aufzeigen. Die zu $p > 99\%$ statistisch signifikante gewichtsreduzierende Wirkung von Heritol und Heritonin liegt jeweils bei etwa 50%. Die leichte gewichtsreduzierende Wirkung von Vallapin ist hingegen weniger als 95% statistisch signifikant (Abb. 3.8.1.2.). Dieser Unterschied kann eventuell auf die zusätzliche Hydroxygruppe des Vallapins an der Position 9 zurückzuführen sein.



Signifikanz mittels T-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe:

* >95%ige Signifikanz; ** >98%ige Signifikanz, *** >99%ige Signifikanz (n=10)

Abb. 3.8.1.2: Die Bioassayergebnisse von Heritol, Heritonin und Vallapin anhand der Insektenkultur von *Spodoptera littoralis* im Vergleich

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Insektenbioassays

4.1.1. Ellagsäure

Ellagsäure ist im Pflanzenreich ein weit verbreiteter sekundärer Naturstoff und stellt ein Depsid aus zwei Gallussäuremolekülen dar. Gallussäure wird über Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolbrenztraubensäure über den Zwischenmetaboliten Shikimisäure synthetisiert (Abb. 4.1.1.a). Für die verschiedenen methylierten Ellagsäurederivate fließen vermutlich methylierte Gallussäurederivate in die Biosynthese ein. Die nachträgliche Methylierung der Ellagsäure ist enzymatisch ebenfalls möglich, jedoch aufgrund der stark deprotonierten Hydroxygruppen eher unwahrscheinlich.

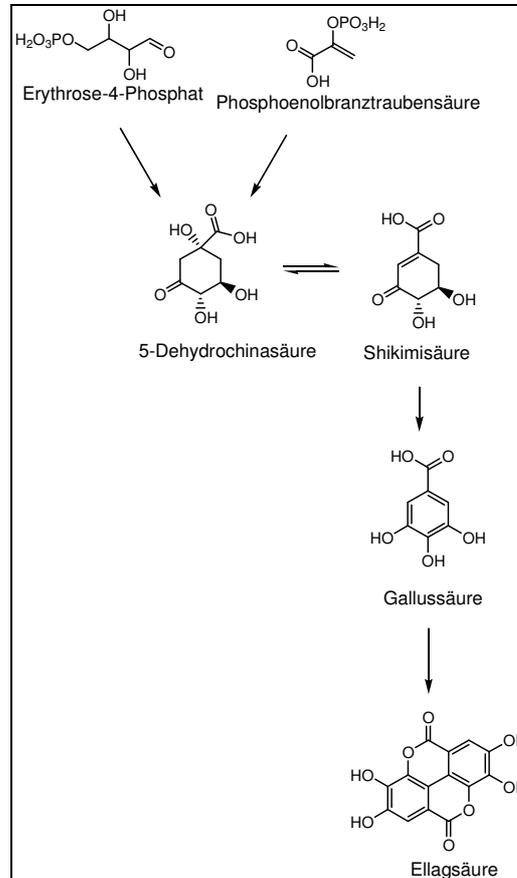


Abb. 4.1.1.a: Biosynthese von Ellagsäure in Pflanzen [Dewick und Haslam 1969]

Durch Totalsynthese von Ellagsäure können auch methylierte Derivate synthetisiert werden [Alam und Tsuboi 2007]. Hierbei ist die C-C Bindung zwischen den Aromaten die größte Herausforderung. Diese C-C Verknüpfung kann mittels am Aromaten eingebrachter Halogene erzielt werden. Die Laktone formieren sich daraufhin spontan.

Im Fall von Ellagsäure konnte in einem Konzentrationsbereich von 100 ppm schon eine stark fraßhemmende Aktivität registriert werden. Sobald die Insekten der Schadinsektenart *Spodoptera littoralis* keine Wahl zwischen einem Futterstück mit und ohne Substanz haben, liegt der IC₉₀ Wert der Gewichtsreduktion für Ellagsäure bei 200 ppm.

Die durch HPLC-Quantifizierung ermittelte Konzentration von Ellagsäure in der Rinde von *Sonneratia alba* beträgt fast 1000 ppm. Somit ist festzuhalten, dass die Konzentration von Ellagsäure in der Rinde dieser Mangrovenart weitaus höher ist, als die in Laborversuchen ermittelte benötigte Konzentration, um einen gewichtsreduzierenden bzw. einen repellenten Effekt zu bewirken.

Im Fall der in Laborversuchen ermittelten Gewichtsreduktionen bei einer Konzentration von etwa 200 ppm ist zusätzlich erkennbar, dass 3-Methyl-O-Ellagsäure den schwächsten Effekt hat (nicht statistisch signifikant), 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure einen mittelstarken Effekt (IC₅₀ bei 200 ppm) und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure einen starken Effekt aufweist (IC₈₀ bei 200 ppm), der nahezu identisch mit dem von unmethylierter Ellagsäure (IC₉₀ bei 200 ppm) ist.

3-Methyl-O-Ellagsäure hat die geringste Konzentration in der Rinde von *Sonneratia alba* (ca. 120 ppm), aber 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure (ca. 1200 ppm) und ist somit höher konzentriert als Ellagsäure (ca. 1000 ppm). Die Konzentration an 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure (1800 ppm) in der Rinde von *Sonneratia alba* übersteigt die Konzentration von Ellagsäure um den Faktor 1,8.

Die beiden aktivsten Komponenten (Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure) sind in der Rinde von *Sonneratia alba* in einer Gesamtkonzentration von 2800 ppm (ca. 0,28 %) enthalten.

Die Ursache für die unterschiedlich starken Wirkungen der Ellagsäurederivate auf Insekten kann derzeit noch nicht abschließend geklärt werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass Ellagsäure, sowie die Derivate 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure und 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure in der Rinde von *Sonneratia alba* um ein vielfaches (Ellagsäure: um das 5-fache; 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure: um das 6-fach; 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure: um das 9-fache) höher konzentriert sind, als die benötigten Konzentrationen, um in Laborversuchen einen gewichtsreduzierenden Effekt von mindestens 50% zu bewirken.

Weiter zeigte sich durch die Untersuchung des Kernholzes, dass alle vier Ellagsäurederivate hauptsächlich in der Rinde wiederzufinden sind. Die Rinde ist bei auf Holz spezialisierten Insektenarten das erste Kompartiment, welches Fraßinsekten oral aufnehmen. Durch die Einlagerung der Substanzen in diesen Teil der Zweige können Insekten vermutlich schon bei den ersten Fraßreaktionen zurückgedrängt werden.

Die Frage, ob diese Substanzen spezifisch oder unspezifisch wirken, kann nicht endgültig geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass Ellagsäure eine adstringierende Wirkung besitzt und es ist durchaus vorstellbar, dass durch die Adstringtion der Proteine im Mund-, Rachen- und Darmbereich der Insekten die Nahrungsaufnahme bzw. Nährstoffaufnahme reduziert wird, wodurch sich wiederum das Gewicht reduziert. Durch die Wahlversuche konnte gezeigt werden, dass Insekten in der Lage sind, ellagsäurereiche Nahrung zu bemerken, was darauf hindeutet, dass die sensorische Erkennung dieser Substanz schon im Mund- und Rachenraum der Insekten stattfindet.

4.1.2. β -Sitosterol

Ausgehend von den aus Mevalonat biosynthetisierten Isopreneinheiten werden über die linearen Zwischenmetaboliten Squalen und 2,3-Epoxysqualen in Pflanzen β -Sitosterol und andere Steroide wie Campesterol oder Stigmasterol biosynthetisiert (Abb. 4.1.2.a). Das Verhältnis zwischen β -Sitosterol und Campesterol hat Einfluss auf die Samenreife von *Arabidopsis* Arten [Schaeffer *et al.* 2001]

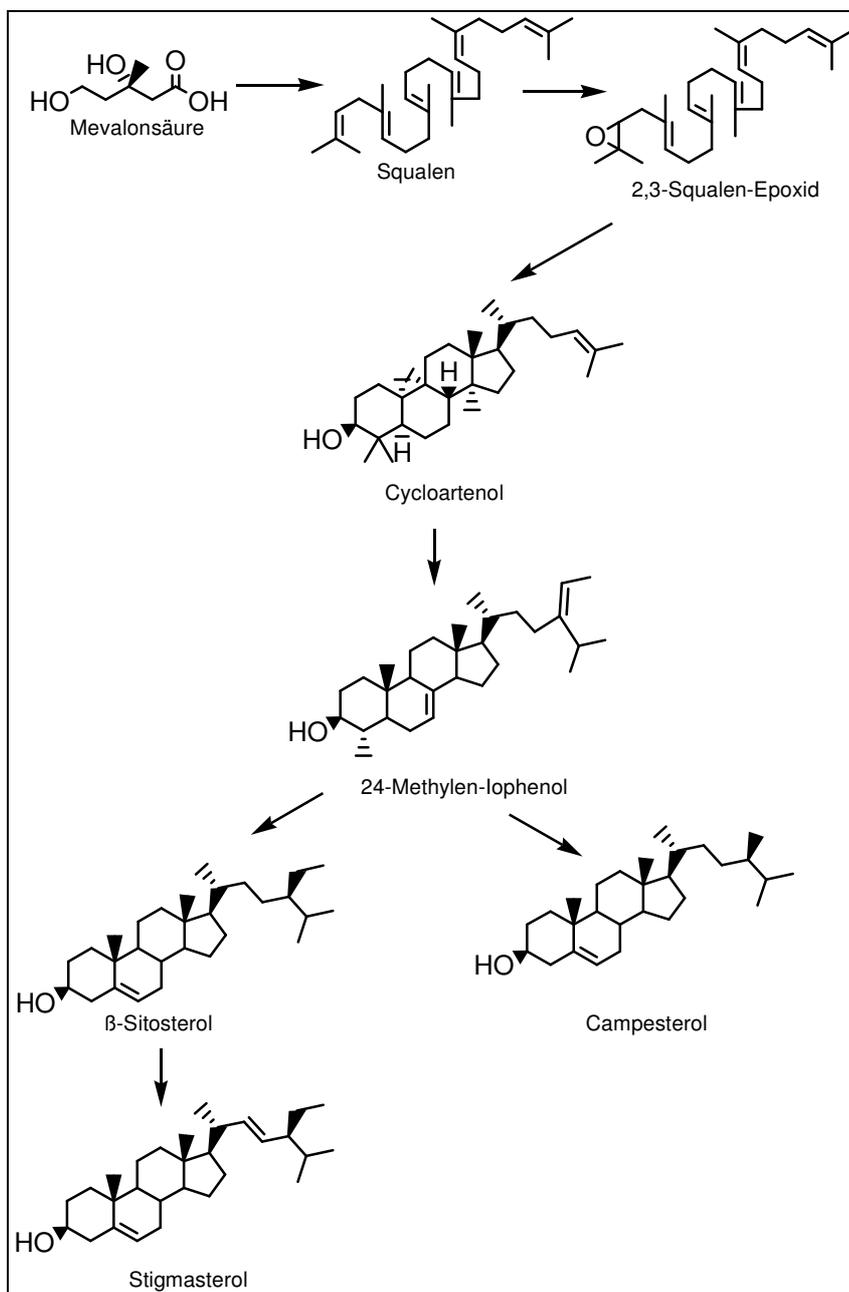


Abb. 4.1.2.a: Biosynthese von β -Sitosterol in Pflanzen [vereinfacht nach Schaeffer *et al.* 2001]

Die bioaktive Wirkung von β -Sitosterol auf *Spodoptera littoralis* ist bei einer Konzentration von 300 ppm nicht letal insektizid. Es konnte dennoch durch die Versuchsreihen gezeigt werden, dass Insekten, die ausschließlich mit 300 ppm β -Sitosterol-haltigem Futter gefüttert werden, eine signifikant reduzierte Gewichtszunahme zeigen sowie eine statistisch signifikant verlängerte Entwicklungszeit besitzen. Die Gewichte der Puppen und der adulten Falter sind ebenfalls reduziert. Ein weiterer Effekt, der sich erst weit nach Beendigung der Futteraufnahme einstellt, ist die um etwa 50% reduzierte Eiablage der behandelten Insekten. Der wohl wichtigste Effekt betrifft erst die nächste Generation, denn im Fall der während des Larvenstadiums mit 300 ppm β -Sitosterol gefütterten Insekten zeigte sich, dass fast alle abgelegten Eier steril sind, denn im Vergleich zur Kontrollgruppe sind nur etwa 0,3% neue Insekten in der nächsten Generation geschlüpft.

Zur Kontrolle sollte von der Mangrovenart *Lumnitzera littorea* (Combretaceae) im März 2008 erneut Blattmaterial gesammelt werden, um den natürlichen Gehalt an β -Sitosterol zu bestimmen. Aufgrund von umweltbedingten Veränderung im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan konnten zu diesem Zeitpunkt nur Blätter der Schwesterart *Lumnitzera racemosa* (Combretaceae) gesammelt werden. Durch semiquantitative Dünnschichtchromatographie und eines kommerziell erworbenen β -Sitosterol Standards konnte durch DC Vergleich und Rückberechnung eine Konzentration von etwa 430 ppm im frischen Blattmaterial ermittelt werden. An der quantitativen DC ist ebenfalls zu erkennen, dass die Substanzzusammensetzung in der Kutikula gleich der im inneren Blattgewebe ist.

Durch die Quantifizierung von β -Sitosterol im frischen Blattmaterial (etwa 430 ppm) konnte gezeigt werden, dass die für die entwicklungsmodifizierende Bioaktivität auf *Spodoptera littoralis* benötigte Konzentration in dieser Mangrovenart um 45% überschritten wird.

Die Frage hinsichtlich der Wirkweise von β -Sitosterol kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Ein möglicher Angriffspunkt könnte die Hormonbiosynthese von Insekten sein. Nachstehend ist die

Insektensteroidhormonbiosynthese in vereinfachter Weise dargestellt (Abb. 4.1.2.b). Aber auch andere Mechanismen, wie der Einfluss auf die Membranfluidität könnten eine Rolle für die Wirkung spielen.

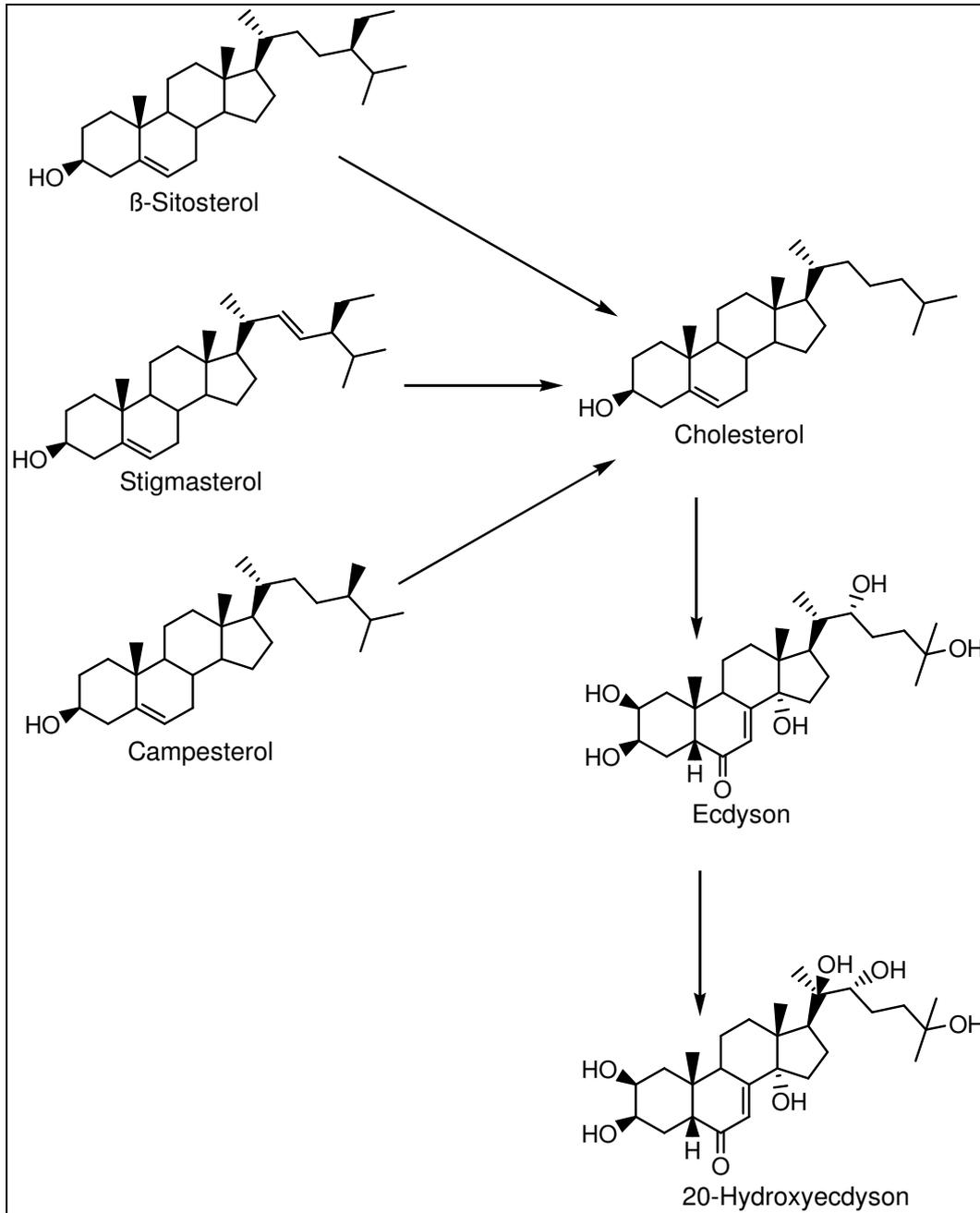


Abb. 4.1.2.b: Hormonbiosynthese in Insekten [vereinfacht nach Ikekawa 1983]

Über einen Einfluss auf die Hormonbiosynthese könnte die dauerhaft erhöhte Aufnahme an β -Sitosterol deshalb zu einem erhöhten 20-Hydroxyecdysonspiegel führen. Für diese Annahme spricht auch, dass die Applikation von Cholesterol denselben starken gewichtsreduzierenden Effekt

auf *Spodoptera littoralis* hat wie β -Sitosterol. Diese Vermutungen können jedoch nur sehr schwer überprüft werden, da die Konzentration an 20-Hydroxyecdysen im Insektenkörper sehr gering ist. Quantitative Bestimmungen sind daher außerordentlich schwierig.

Unter den Phytosterolen nimmt β -Sitosterol im Pflanzenreich eine dominierende Stellung hinsichtlich des Vorkommens ein. Aufgrund der vorangegangenen Biotests kann spekuliert werden, dass die Verbreitung dieser Substanz im Pflanzenreich nicht zufällig sein muss, sondern ihre evolutionärbedingte Ursache unter anderem in der entwicklungsmodifizierenden Bioaktivität auf Fraßinsekten zu finden ist.

Wie im Falle der schon eingangs beschriebenen Ellagsäurederivate hemmt dieser sekundäre Pflanzenstoff in geringen Konzentrationen die Entwicklung von Insekten, ohne einen letalen Effekt zu bewirken. Diese Art des Schutzes vor Insektenfraß hat durchaus seine ökologische Rechtfertigung, denn die als Larve oder Raupen gedeihenden Insekten sollen nicht restlos vernichtet werden, da sie als adulte Tiere unter Umständen wichtig für die Bestäubung der Pflanzen sind.

In zwei anderen Fällen konnte für β -Sitosterol bereits eine Bioaktivität nachgewiesen werden, die sich auf die Reproduktivität auswirkt. Eine langfristige Behandlung mit β -Sitosterol in geringer Dosis oder eine kurzfristige Behandlung mit β -Sitosterol in einer hohen Dosis reduziert bei Albinoratten die Spermakonzentration und die Hodengewichte. Nach Absetzung der Behandlung konnten die Hodengewichte jedoch innerhalb von 30 Tagen wieder regeneriert werden [Malini und Vanithakumari 1991]. In einem anderen Fall konnte gezeigt werden, dass äußerst geringe Konzentrationen an β -Sitosterol (1, 10 und 100 ng/L) ausreichen, um eine Degeneration der Eiklardrüse der zwitterigen Schnecke *Lymnaea stagnalis* auszulösen [Czech *et al.* 2001].

Neben dem Eingriff in die Hormonbiosynthese könnte β -Sitosterol noch über einen anderen Wirkmechanismus eine fertilitätsreduzierende Wirkung auf Insekten besitzen.

Einige Indizen sprechen für denselben Wirkmechanismus, über den auch Gossypol wirkt. In folgender Tabelle sind die vergleichenden Bioaktivitäten mit Literaturangaben aufgelistet (Tab. 4.1.2.).

Tab. 4.1.2.: Bioaktivitätsvergleich von Gossypol und β -Sitosterol

	Gossypol	β -Sitosterol
Bioaktivität gegen Prostatakrebszellen	Zhang <i>et al.</i> 2007	Bennani <i>et al.</i> 2006
Männliche Sterilität	Matlin <i>et al.</i> 1985	Malini und Vanithakumari 1991
Sterilität bei Insekten, wenn die Larven mit der Substanz gefüttert werden	Coutinho 2002	Die vorliegende Arbeit
Auslöser für Apoptose	Kline <i>et al.</i> 2008	Park <i>et al.</i> 2007
Entzündungs-hemmend	Fitzpatrick <i>et al.</i> 1990	Villaseñor <i>et al.</i> 2002
Mitochondriale Wirkung und damit Auslösung von Apoptose und antientzündlicher Wirkung	Oliver <i>et al.</i> 2005	Choi <i>et al.</i> 2003

Des Weiteren ist bekannt, dass eine mitochondriale Störung eine männliche Sterilität bewirkt [Folgerø *et al.* 1993]. Aus den in der obigen Tabelle dargestellten Parallelen zu Gossypol und aus der mitochondrialen Cytochrom *c* Freisetzung durch β -Sitosterol, die auf eine mitochondriale Toxizität hindeutet, kann angenommen werden, dass β -Sitosterol evtl. auch über diesen Mechanismus die Sterilität bei Insekten induziert. Diese unspezifische, wahrscheinlich über Membraninteraktionen in den Mitochondrien ausgelöste Toxizität könnte auch erklären, weshalb wie in dieser Arbeit gezeigt, auch andere Sterole wie Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol oder 5α -Cholestan dieselbe Bioaktivität bei Insekten auslösen können wie β -Sitosterol.

Durch das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) wird der Cholesteroltransport in den Mitochondrien gewährleistet und kann die Membrandynamik der Mitochondrien durch Steroleinlagerungen nachhaltig verändern [Petrescu *et al.* 2001; Haç-Wydro *et al.* 2007]. Dieses Protein kann jedoch nicht zwischen Cholesterol und β -Sitosterol unterscheiden [Kallen *et al.* 1998], wodurch bei erhöhter Bioverfügbarkeit von β -Sitosterol die Sterolzusammensetzung der Mitochondrienmembranen nachhaltig verändert oder gestört werden kann. Auch die Expression von StAR kann nachhaltig durch β -Sitosterol reduziert werden [Sharpe *et al.* 2007], was ebenfalls wiederum Einfluß auf die Sterolzusammensetzung der Mitochondrienmembran hat.

Durch eine Störung der Mitochondrien und somit eine Störung der zellulären Energieversorgung könnte auch das Phänomen der Gewichtsreduktion durch die Aufnahme von β -Sitosterol bei Insekten erklärt werden. Aufgrund der verminderten ATP Biosynthese könnte die Proliferation der Gewebszellen retardiert sein.

4.1.3. *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol und *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol

Im Fall von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol ist ein deutlicher Unterschied bei der insektenspezifischen Bioaktivität auf *Spodoptera littoralis* zu erkennen. *Z*-Coumaroyl-Lupeol reduziert das Gewicht der Schadinsekten in einer Konzentration von 108 ppm, jedoch nicht statistisch signifikant. *E*-Coumaroyl-Lupeol hingegen reduziert das Gewicht der Insekten bei einer Konzentration von 108 ppm um 50%. Dieser IC₅₀ Wert ist zu $p > 99\%$ signifikant.

Um die native Konzentration und die gewebsspezifische Verteilung dieser coumaroylierten Triterpene zu untersuchen, sollten im März 2008 im Mangrovengarten von Haikou auf der südchinesischen Insel Hainan weitere Blattproben der Mangrovenart *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) gesammelt werden. Aufgrund umweltbedingter Veränderungen konnte leider im Bereich des Mangrovengartens keine weitere Art dieser Mangrove gefunden werden, und so wurde auf Blätter der Schwesterart *Rhizophora stylosa* (Rhizophoraceae) zurückgegriffen.

Bei der Aufarbeitung des Blattmaterials wurde die Kutikula mittels Chloroform abgelöst und anschließend die Substanzen aus dem restlichen Blatt isoliert. Mittels DC konnte gezeigt werden, dass die Triterpene in der Kutikula akkumulieren. Nachdem die Kutikulafraktion weiter aufgetrennt wurde und die triterpenoiden Strukturen mittels NMR Spektroskopie bestimmt wurden, zeigte sich, dass in *Rhizophora stylosa* *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol gebildet werden, wohingegen in *Rhizophora apiculata* *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol vorliegen. Im Vergleich dazu konnte in *Rhizophora stylosa* kein einziges Lupeolderivat nachgewiesen werden, jedoch neben *E*- und *Z*-Coumaroyl-Taraxerol das unveresterte Triterpen Taraxerol. Durch eine quantitative Bestimmung konnte gezeigt werden, dass die unveresterte Form von Taraxerol und die beiden Ester zusammen im Verhältnis 1:1 zueinander in der Kutikula von *Rhizophora stylosa* vorliegen. Die Kutikula macht einen Gewichtsanteil von etwa 7% des gesamten Blattes aus. Erwähnenswert bei diesen Ergebnissen ist, dass alle Taraxerolderivate zusammen etwa 25% des Gesamtgewichtes dieser Wachsschicht ausmachen. Aufgrund dieser

Untersuchungsergebnisse ist es durchaus vorstellbar, dass auch die Lupeolderivate der Schwesterart *Rhizophora apiculata* in der Kutikula akkumuliert werden. Die Frage, warum sich in der einen Art Taraxerolderivate befinden und in der anderen Art Lupeolderivate, lässt sich unter Umständen über den Weg der Biosynthese dieser beiden Substanzen erklären. Es konnte gezeigt werden [Basyuni *et al.* 2007], dass in *Rhizophora stylosa* mehrere Triterpensynthesen expremiert werden, die sowohl Lupeol, als auch Taraxerol synthetisieren können. Die einseitige Spezifizierung des Enzyms auf entweder den einen oder den anderen Metaboliten konnte in dieser Veröffentlichung jedoch nicht belegt werden. Ergebnisse einer weiteren Veröffentlichung [Kushiro *et al.* 2000] zeigten, dass nur eine minimale Mutation in einer Triterpensynthese in Form eines Aminosäureaustausches ausreichen würde, um verschiedene Triterpene zu synthetisieren (Abb. 4.1.3.). Somit ist durchaus vorstellbar, dass sich das Auftreten der beiden unterschiedlichen Triterpengrundgerüste durch einen genetisch geringfügigen Unterschied dieser beiden Schwesterarten erklären lässt.

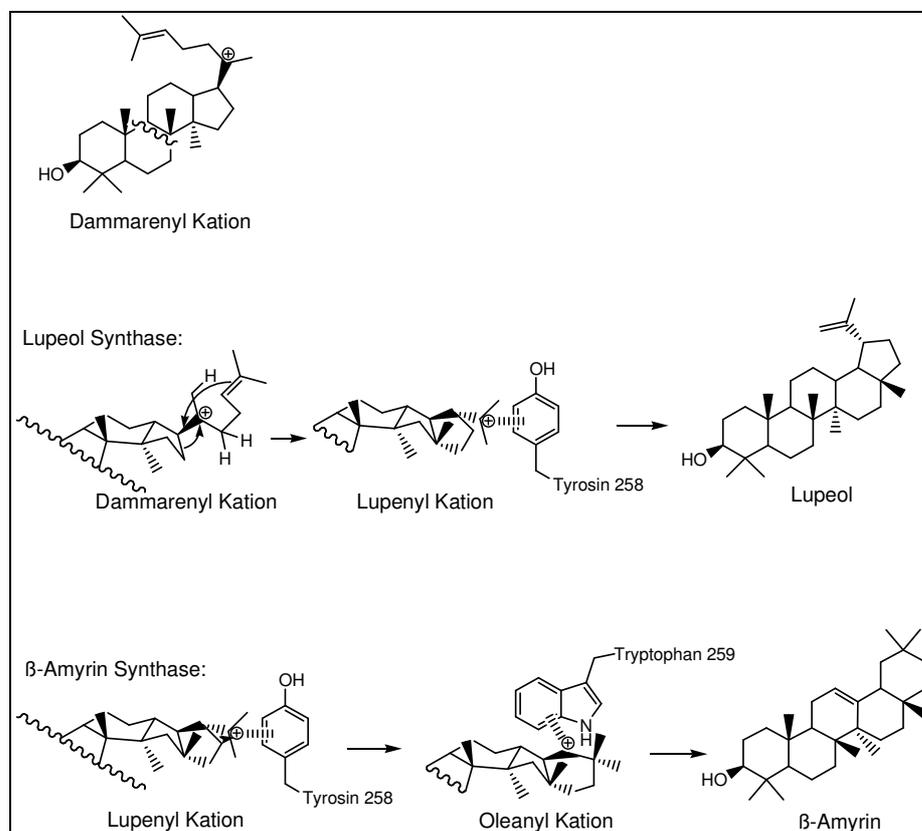


Abb. 4.1.3.a: Durch eine Punktmutation hervorgerufene Änderung in der Triterpenbiosynthese [vereinfacht nach Kushiro *et al.* 2000]

Nur ein bekanntes Enzym würde in Frage kommen, welches Lupeol und Taraxerol zugleich synthetisieren könnte. Es handelt sich hierbei um eine mit PEN2 abgekürzte Baruolsynthase, die der Lupeolsynthase sehr ähnlich zu sein scheint [Lodeiro *et al.* 2007]. Somit kann die Mutation möglicherweise auf ein Enzym eingeschränkt werden, die dafür verantwortlich ist, dass in der einen Art Lupeolderivate und in der anderen Art Taraxerolderivat synthetisiert werden. Durch eine kleine Mutation dieses Enzyms könnte sich die Biosynthese auf entweder das eine oder das andere Produkt beschränken. Wenn es sich hierbei um eine zufällige Punktmutation handelt, könnte die Tatsache erklären werden, warum aus einem Individuum der Art *Rhizophora apiculata* bereits Taraxerolderivate isoliert werden konnten [Kokpol *et al.* 1990], wohingegen während dieser Arbeit aus einem Individuum der Art *Rhizophora apiculata* nur Lupeolderivate isoliert werden konnten.

Die Veresterung mit *p*-Coumarsäure wird aller Voraussicht nach enzymatisch durchgeführt. Es sind Coumaroyltransferasen bekannt, die *p*-Coumarsäure unter Verwendung des Zwischenmetaboliten *p*-Coumaroyl-S-Coenzym-A an eine freie Hydroxygruppe verestern [Kaffarnik *et al.* 2005]. Für den Fall von Triterpenen wurde jedoch noch kein solches Enzym beschrieben. In diesem Zusammenhang ist interessant zu erwähnen, dass nur im Falle von Taraxerol das nicht veresterte Triterpen zu detektieren ist, was vermuten lässt, dass die Veresterung durch dasselbe Enzym geschieht, dieses aber anscheinend spezifischer auf Lupeol reagiert als auf Taraxerol und somit Taraxerol teilweise als nicht umgesetztes Ausgangsprodukt zurückbleibt bzw. in die Kutikula abgegeben wird.

Die sehr unpolaren Substanzen werden im Zellinneren des Blattgewebes synthetisiert und diffundieren höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer Lipophilie sehr leicht durch die Zellmembran aus den Zellen heraus und akkumulieren sich auf der Blattaußenseite bzw. in der Kutikula [Guhling *et al.* 2005].

In einer Studie [Williams 1999] konnte gezeigt werden, dass Taraxerolderivate in Kombination mit Coumaroyl-Lupeol eine starke insektizide Wirkung gegen das adulte Stadium des Schadinsektes *Cylas*

formicarius entfalten. Die insektizide Wirkung von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol konnte in Experimenten an der Insektenkultur von *Spodoptera littoralis* bestätigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Toxizität dieser Substanzen nicht nur auf eine Insektenart beschränken lässt. Diese Bioaktivität könnte auch die Frage beantworten, warum diese Substanzen in der Kutikula, also auf der äußersten Schicht des Blattes eingelagert werden. Bei Befall des Blattes durch herbivore Insekten wird die Kutikula das erste Kompartiment sein, welches die Schadinsekten in größeren Mengen oral aufnehmen. Durch die ausgesprochen hohe Lipophilie dieser Substanzen werden diese wohl sehr schnell vom Gewebe der Insekten aufgenommen und können intrazellulär ihre Wirkung entfalten. Durch die hier gewonnene Datenlage, dass diese Triterpene auf der Oberfläche des Blattgewebes akkumuliert werden, kann wiederum der auf evolutionären Selektionsvorteil basierende Schluss gezogen werden, dass diese Sekundärstoffe der Pflanzenart einen gewissen Schutz gegen Fraßinsekten bieten könnten.

Eine weitere mögliche Funktion wäre der Schutz vor der hohen tropischen UV-Belastung. Die *p*-Coumarsäure, die mit dem Triterpen verestert ist, hat einen spektralen Absorptionsbereich von etwa 270 nm bis 330 nm. UVB Licht liegt im Wellenlängenbereich von etwa 280 nm bis 320 nm. Durch die Veresterung mit dem lipophilen Triterpenteil kann somit die *p*-Coumarsäure in die äußere Wachsschicht eingebettet und die schädliche UVB Strahlung abfangen werden, bevor sie das Blattgewebe erreichen kann. Zudem ist bekannt, dass Pflanzen UVB Licht-abhängig die Biosyntheserate von *p*-Coumarsäure regulieren können [Rozema *et al.* 2001].

4.1.4. Heritol, Heritonin und Vallapin

Von denen aus *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) isolierten Sesquiterpenlaktone ist bekannt, dass sie eine starke ichthyotoxische Bioaktivität im einstelligen ppm-Bereich besitzen [Miles *et al.* 1987, 1989, 1991]. Aufgrund dieser Bioaktivität werden Extrakte von *Heritiera littoralis* in der traditionellen Fischerei auf den Philippinen eingesetzt [Miles *et al.* 1998]. Rotenon, ist ein starkes natürliches Insektizid [Cabizza *et al.* 2004] und zudem ebenfalls im einstelligen ppm-Bereich ichthyotoxisch [Teixeira *et al.* 1984].

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Heritol, Heritonin und Vallapin auch insektizide Aktivitäten besitzen. Heritol und Heritonin besitzen eine gewichtsreduzierende Wirkung mit einem IC₅₀ Wert von etwa 200 ppm. Die gewichtsreduzierenden Bioaktivitäten von Heritol und Heritonin sind im Vergleich zur Kontrollgruppe zu $p > 99\%$ statistisch signifikant. Die leichte gewichtsreduzierende Bioaktivität von Vallapin hingegen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Der Ursache der abgeschwächten Bioaktivität von Vallapin könnte in der zusätzlichen Hydroxygruppe an Position 9 zu finden sein. Der Grund für die stärkere Bioaktivität von Heritonin im Vergleich zu Heritol basiert wahrscheinlich auf der methylierten aromatischen Hydroxygruppe.

Obwohl Rotenon und Heritolderivate nach Literaturangaben ichthyotoxische Wirkungen besitzen, sind die insektiziden Bioaktivitäten dieser drei Sesquiterpenlaktone nicht mit der von Rotenon vergleichbar. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die ichthyotoxischen bzw. insektiziden Bioaktivitäten von Rotenon und den Heritolderivaten verschiedenen Mechanismen unterworfen sind.

Die Sesquiterpenlaktone Heritol, Heritonin und Vallapin sind biogenetisch zu den Cadinan Sesquiterpenen zu zählen [Hänsel und Sticher, 8. Auflage]. *Heritiera littoralis* ist ein Vertreter der Familie der Sterculiaceae, welche phylogenetisch als Untergruppe der Malvaceae einzuordnen ist

[<http://plants.usda.gov/>]. Aus den Malvaceae sind bereits einige Sesquiterpene vom Cardinantyp bekannt [Stipanovic *et al.* 2006]. Auch Gossypol, welches ein Dimeres Cardinan Sesquiterpen ist, ist Bestandteil der Baumwollpflanze, die ebenfalls ein Vertreter der Malvaceae ist. In Abb. 4.1.4. ist die Biosynthese von Cadinan dargestellt [Hänsel und Sticher, 8. Auflage], sowie die davon abgeleiteten Strukturen Heritol, (8*R*)-(-)-3-Hydroxy- α -calacorene [Stipanovic *et al.* 2006], Artemisinin [Hänsel und Sticher, 8. Auflage] und Gossypol [Hänsel und Sticher, 8. Auflage]. Um die Isopreneinheiten in den Naturstoffen hervorzuheben, wurde auf die explizite Darstellung der Stereozentren verzichtet.

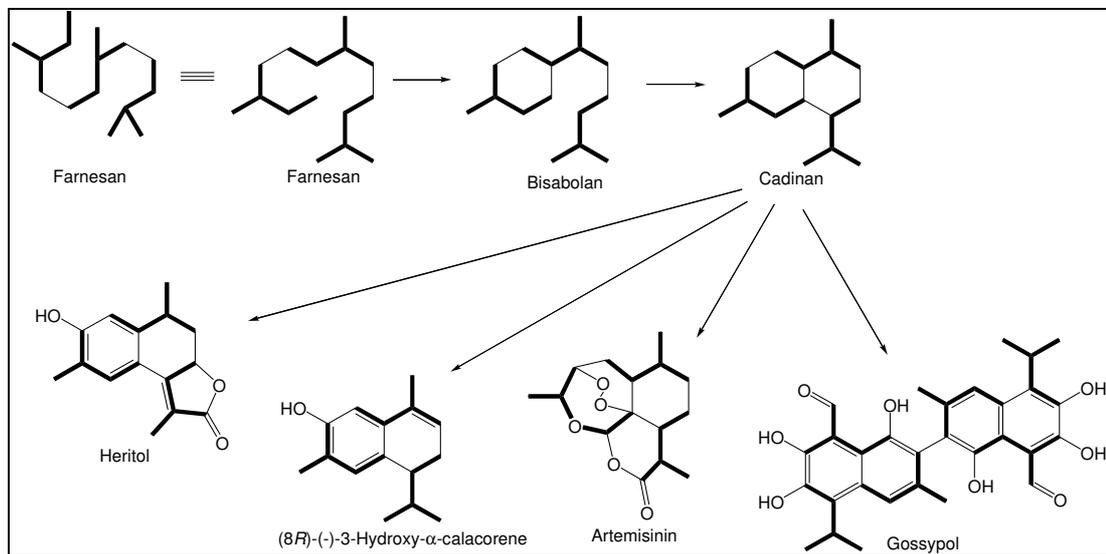


Abb 4.1.4.: Die Biosynthese der Cadinanesesquiterpene Heritol, (8*R*)-(-)-3-Hydroxy- α -calacorene, Artemisinin und Gossypol [grafische Zusammenfassung nach [Hänsel und Sticher, 8. Auflage] und [Stipanovic *et al.* 2006]]

4.1.5. Didehydroaglaiastatin

Der Name Aglaiastatin leitet sich von der Fähigkeit ab, die Proteinbiosynthese zu blockieren [Ohse *et al.* 1996]. Dieses Rocaglamidderivat wurde im Rahmen dieser Arbeit aus den Blüten von *Aglaiia duppereana* (Meliaceae) isoliert. Von vielen Rocaglamidderivaten ist die insektizide Wirkung schon hinreichend bekannt [Schneider *et al.* 2000]. Dieses Rocaglamidderivat erfüllte den Zweck eines Positivstandards für die insektizide Wirkung von Naturstoffen. In den hierbei durchgeführten

Experimenten konnte gezeigt werden, dass der IC_{50} Wert der Gewichtszunahme weit unterhalb von 5,5 ppm liegen muss, die LC_{50} Konzentration bei etwa 9 ppm. Problematisch bei dieser Versuchsdurchführung ist die geringe Konzentration der Substanzen, die bei der Präparation des Insektenfutters gleichmäßig verteilt werden muss.

Das Rocaglamidgrundgerüst findet seinen biosynthetischen Ursprung in einem methoxylierten Flavonoid, an das ein Cinnamoylamid ankondensiert wird [Nugroho *et al.* 1999].

4.1.6. Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin

Ryanodin ist ein Diterpenester aus dem Diterpenalkohol Ryanodol und der 1H-Pyrrol-2-Carbonsäure (Minalin). Ryanodol wird folgendermaßen aus 4 Isopreneinheiten synthetisiert (Abb. 4.1.7.a).

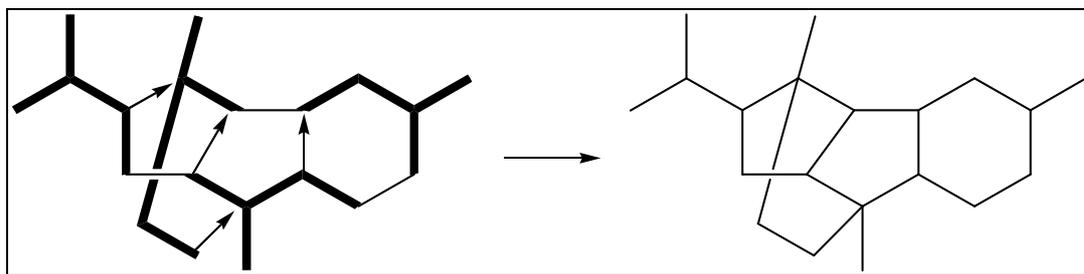


Abb. 4.1.7.a: Biosynthese des Ryanodin Grundgerüsts [nach Hänsel und Sticher (8. Auflage)]

Eine Totalsynthese von Ryanodol in 49 Teilschritten ist bereits beschrieben [Bélanger *et al.* 1979]. Jedoch wird die Frage nach der Wirtschaftlichkeit in dieser Arbeit nicht beantwortet.

Die insektizide Wirkung von Ryanodinderivaten ist wie im Fall von Rocaglamidderivaten ebenfalls hinreichend bekannt [Jefferies *et al.* 1992; Jefferies *et al.* 1996; Jefferies *et al.* 1996; González-Coloma *et al.* 1999]. Dennoch scheint der großflächige Einsatz von Ryanodinderivaten als Insektizide nicht praktikabel zu sein, denn diese Naturstoffe binden an

humane muskuläre Ryanodinrezeptoren und lösen dadurch toxische Reaktionen aus [Achenbach *et al.* 1995].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Naturstoffe Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin isoliert werden. Die gewichtsreduzierende IC_{50} Konzentration liegt bei Ryanodin bei etwa 2,5 ppm, bei 9,21-Didehydroryanodin bei etwa 0,5 ppm. Die LC_{50} Konzentration von 9,21-Didehydroryanodin liegt bei etwa 2,2 ppm, die LC_{50} Konzentration von Ryanodin oberhalb von 22 ppm, denn selbst bei dieser Konzentration haben mehr als die Hälfte der Versuchsinsekten überlebt. Durch die Methylengruppe zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 21 ändert sich die dreidimensionale Struktur des Diterpentails (Abb. 4.1.7.b; Abb. 4.1.7.c). Diese Strukturveränderungen (Markierungen in Abb. 4.1.7.b und Abb.4.1.7.c) könnten der Grund für die Toxizitätszunahme von 9,21-Didehydroryanodin im Vergleich zu Ryanodin sein. Da auch in Insekten die Ryanodinrezeptoren die Targets dieser Substanz sind, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Methylengruppe die Bindungaffinität zum Ryanodinrezeptor erhöht wird.

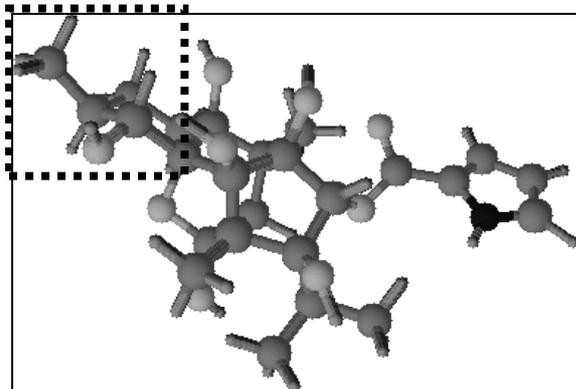


Abb. 4.1.7.b: Dreidimensionale Struktur von Ryanodin mit der Methylgruppe an Position 21

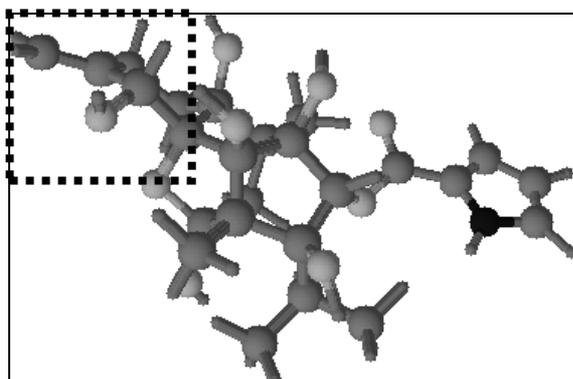


Abb. 4.1.7.c: Dreidimensionale Struktur von 9,21-Didehydroryanodin mit der Methylengruppe zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 21

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Ausbildung einer exocyclischen Methylengruppe zwischen den Kohlenstoffen 9 und 21 eine letale Wirkungsverstärkung um mindestens den Faktor 10 bewirkt.

Insgesamt ist festzuhalten, dass alle Naturstoffe aus Mangroven, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden, nicht in einem ähnlichen Konzentrationsbereich insektizid sind, wie die schon sehr gut charakterisierten Rocaglamid- und Ryanodinderivate. Dennoch sind die Bioaktivitäten auf die Schadinsektenart *Spodoptera littoralis* hochdivers. Die Bioaktivität von Ellagsäure ist stark gewichtsreduzierend und repellativ. Die hierfür benötigten Konzentrationen sind weitaus geringer als die in der Mangrovenart *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae) vorkommenden natürlichen Konzentrationen. Ebenso verhält es sich mit den methylierten Derivaten von Ellagsäure aus *Sonneratia alba*. Im Fall von β -Sitosterol konnte neben dem gewichtsreduzierenden Effekt auf Larven, Puppen und adulten Faltern eine reduzierte Eiablage, sowie eine fast komplette Sterilität festgestellt werden und zwar in einer geringeren Konzentration als β -Sitosterol in der Mangrovenart *Lumnitzera racemosa* (Combretaceae) natürlich vorkommt. Im Fall von Heritol, Heritonin und Vallapin konnte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung hinsichtlich der gewichtsreduzierenden Aktivität aufgezeigt werden.

4.2. Generelle Chemisch-Ökologische Betrachtung

Diese nun erhaltenen Ergebnisse können in einen größeren Kontext hinsichtlich ihrer ökologischen Bedeutung auf molekularem Niveau diskutiert werden. Durch Laborexperimente und die Quantifizierungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass die auf die Insektenentwicklung inhibitorisch wirkenden Substanzen in ausreichenden Mengen in Pflanzen enthalten sind, um diese Wirkung auch *in planta* zu entfalten.

Eine andere ökologische Betrachtungsweise geht dahingehend, dass diese in den Blättern vorkommenden Substanzen als Allelopathika ihre ökologische Bedeutung finden. Vom Walnussbaum *Juglans regia* (Juglandaceae) ist bekannt, dass er die Substanz Juglon (ein Naphthochinonderivat) in das Erdreich abgibt, welche allelopathisch und somit wachstumshemmend auf andere Pflanzen wirkt [Römpp Lexikon Naturstoffe].

Da Mangrovenbäume im salzwasserhaltigem Schlamm gedeihen, bilden sie zur Sauerstoffversorgung ihres Wurzelsystems sogenannte Pneumatophoren aus (Abb. 4.2.a). Diese vielen kleinen schnorchelartigen vertikalen Wurzelverlängerungen, die unterhalb des Blätterdaches der Mangrove durch den Schlamm an die Oberfläche ragen, haben die Aufgabe das Wurzelsystem mit ausreichend Sauerstoff aus der Luft zu versorgen. In der folgenden Abbildung sind solche Pneumatophorenanordnungen dargestellt (Abb. 4.2.a). Diese Art der Wurzelmorphologie ist für die Pflanze lebensnotwendig, da sie sonst die Zellatmung und somit das Überleben des Wurzelsystems nicht gewährleisten kann, denn die direkte Sauerstoffaufnahme der Wurzeln, wie sie bei normalen Landpflanzen von statten geht, ist aufgrund des ständig nassen Schlammes nicht oder nur bedingt möglich.



Abb. 4.2.a: Die Pneumatophoren der Mangrovenart *Rhizophora apiculata* (aufgenommen von Mirko Bayer, April 2006)

In einem Mangrovenwald ist es ebenso üblich, dass keine Blätter unterhalb des Blätterdachs der Bäume liegen. Für den sofortigen Abtransport der herab gefallenen Blätter sind die sich ausschließlich von Blättern ernährenden Mangrovenkrabben verantwortlich. In einer Untersuchung aus dem Jahr 2002 wurde das Verhalten der Mangrovenkrabbe hinsichtlich des Abtransportes der Blätter genauestens studiert [Ólafsson *et al.* 2002]. Auch während der Forschungstätigkeiten im Mangrovengarten auf der Insel Hainan konnten Krabben beobachtet werden, wie sie mit Blättern in ihren Nisthöhlen zwischen den Pneumatophoren unterhalb des Blätterdaches der einzelnen Mangroven verschwanden. Durch den durch Krabben produzierten Humus wird das von Pflanzen oberirdisch produzierte pflanzliche Gewebe wieder dem Erdreich, nahe der eigenen Wurzeln zur Verfügung gestellt.

Im Falle von *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora stylosa* und *Lumnitzera littorea* könnte der Blatteintrag in den Boden unterhalb der Mangrove noch einige andere Bedeutungen haben.

Die durch Blatteintrag in den Boden eingebrachten Phytosterole könnten den Wurzeln der in den Gezeitenzonen gedeihenden Mangrovenpflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber Meersalz vermitteln [Oku *et al.* 2003]. Diese Schutzwirkung beruht auf der Einlagerung der Sterole in die Membranen und somit der Modulation der Membranpermeabilität, wodurch die Zellen resistenter gegenüber Stressfaktoren werden [Oku *et al.* 2003].

Für Lupeolderivate, Taraxerolderivate und β -Sitosterol konnte nachgewiesen werden [Kpoviessi *et al.* 2006; Macías-Rubalcava *et al.* 2007], dass sie abhängig von der Pflanzenart entweder eine Wachstums- bzw. Keimungsförderung oder eine Wachstums- bzw. Keimungshemmung entfalten können. So haben zum Beispiel Lupeol und Taraxerol eine entwicklungsfördernde Wirkung auf Tomaten, jedoch auch eine entwicklungshemmende Wirkung auf Amaranth und bestimmte Grasarten [Macías-Rubalcava *et al.* 2007]. Lupeol und β -Sitosterol entfalten eine entwicklungshemmende Wirkung gegenüber der Bohnenart *Vigna unguiculata* (Fabaceae) [Kpoviessi *et al.* 2006]. In allen Fällen konnte diese Wirkung schon in micromolaren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die Vermutung, dass das oberirdisch ausgebildete Blattwerk verschiedene allelopathische Substanzen in den Boden unterhalb des Mangroven einbringen kann, wird durch die Tatsache bestätigt, dass die Mangrovenart *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) in ihren Blättern ein Indolderivat synthetisiert, welches wachstumshemmende Eigenschaften auf Pflanzen besitzt [Saha *et al.* 1978; Bandaranayake 2002]. Einen Pflanzenwachstumshemmer in den Blättern zu produzieren bietet nur dann einen evolutionären Vorteil, wenn die Blätter wie zum Beispiel durch Mangrovenkrabben aktiv in das Erdreich eingebracht werden. Die Substanz Rhizophorin und das pflanzliche Hormon Indol-3-Essigsäure besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit (Abb. 4.2.b), wodurch eventuelle vitalitätsreduzierende kompetitive Hemmungen begünstigt sein könnten.

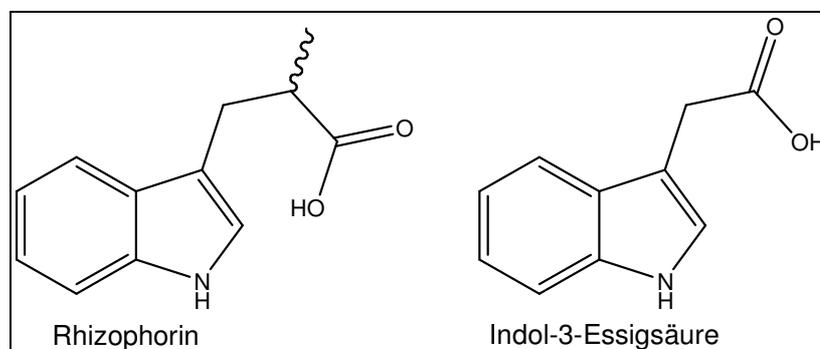


Abb. 4.3.b: Die Strukturen von Rhizophorin und Indol-3-Essigsäure im Vergleich

Neben der Wiederverwertung der Nährstoffe hat der Blatteintrag in den Boden offensichtlich auch die Funktion, Stoffe in den Boden einzubringen, die andere Pflanzen an deren Ausbreitung hindern. Dadurch könnten die Mangrovenpflanzen ihre lebensnotwendigen Pneumatophoren vor Überwucherung durch andere Pflanzen schützen. Die während dieser Arbeit in den Mangrovenblättern festgestellten Konzentrationen dieser Substanzen überstiegen die für diese allelopathische Aktivität berichteten notwendigen Konzentrationen an Taraxerol, Lupeol und β -Sitosterol. Hinzu kommt eine Anreicherung der Substanzen im Erdreich durch ständig neuen Blatteintrag. Auch die selektive Entfaltung der Bioaktivität, die entweder eine Hemmung oder eine Förderung auf die Pflanzenentwicklung hervorruft, weist darauf hin, dass manche Pflanzen Mechanismen besitzen, für andere Pflanzen herbizid wirkende Substanzen zur Wachstumsbeschleunigung zu nutzen.

Die mögliche Kombination aus herbizider und insektizider Bioaktivität macht Substanzen für die industrielle Anwendung in der Landwirtschaft sehr interessant. Auf die Blätter aufgesprüht, könnten diese Substanzen ihre insektizide Wirkung entfalten. Sobald sie ins das Erdreich gelangen schützen sie die ausgewählten Pflanzen vor Überwucherung durch andere Pflanzen und unterstützen das Wachstum der Kulturpflanzen zudem.

4.3. Kinasen- und Zellkulturinhibitionsassays

4.3.1. Ellagsäure

Von Ellagsäure ist bekannt, dass sie eine aus Mais isolierte Proteinkinase in einem sehr geringen Konzentrationsbereich hemmen kann [Cozza *et al.* 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ellagsäure, ihre methylierten Derivate und synthetische Teilstrukturen an 24 verschiedenen tumorrelevanten humanen Proteinkinasen auf ihr inhibitorisches Potential hin getestet. Es ist durch Computermodelle *in silico* bestätigt worden, dass Ellagsäure eine hohe Affinität zu der ATP Bindungsdomäne von Proteinen besitzt und dadurch eine kompetitive Hemmung auslösen kann [Cozza *et al.* 2006].

Aus den vorliegenden Daten ist ersichtlich, dass Ellagsäure alle Kinasen in unterschiedlicher Stärke hemmt.

Mit einem IC_{50} Wert von 250 nM wird der membrangebundene Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1-R) am stärksten gehemmt. Dieser membrangebundene Rezeptor trägt Signale mittels des second messenger Moleküls cAMP in das Zellinnere weiter. Der IGF-1 ist ein Protein mit 70 Aminosäuren, welches eine strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin besitzt. Dieser IGF-1 Rezeptor spielt eine wichtige Rolle auch für die Entwicklung und Proliferation von Milchdrüsengewebe. Die Signaltransduktionsaktivität des IGF-1-R wird in Zusammenhang mit der Prostatakrebsentstehung gebracht [Wu *et al.* 2006]. Eine Störung dieses Rezeptors ist unter anderem eine mögliche Ursache für die Entwicklung von Brustkrebs und Lungenkrebs und ist somit schon ein etabliertes Ziel für verschiedene Tumorthérapien [Warshamana-Greene *et al.* 2005; Jones *et al.* 2004].

Die SAK (Snk/Plk AKIN Kinase) ist auch unter dem Namen PLK4 (Polo-like-kinase-4) bekannt. Sie wird nach dem IGF-1-R am zweitstärksten mit einem IC_{50} Wert von 260 nM durch Ellagsäure gehemmt. Sie gehört zu der Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und wurde erst vor einigen Jahren

charakterisiert. Ihre wichtige Rolle zeigt sich in der Centriolenorganisation während der Mitose [Leung *et al.* 2002; Habedanck *et al.* 2005; Swallow *et al.* 2005].

Dennoch werden auch alle anderen untersuchten Kinasen gehemmt. Die mittlere Hemmung besitzt einen IC_{50} Wert von 2,31 μ M. Interessant zu erwähnen ist, dass die schwächste Hemmung bei der humanen Casein Kinase 2 (CK2) festzustellen war, denn in der Literatur wurde gezeigt, dass die CK2 aus Mais mit einem IC_{50} Wert von 40 nM gehemmt wird [Cozza *et al.* 2006]. Somit konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die an humanen Kinasen durchgeführten *in vitro* Testreihen das Ziel haben dürfen über die Anwendbarkeit einer Substanz zu spekulieren.

Das Phänomen der breiten Hemmung aller Proteinkinasen liegt an den hochkonservierten ATP Bindungsdomänen. Sobald Ellagsäure einfach methyliert vorliegt, nimmt die Aktivität drastisch ab und nicht mehr alle Proteinkinasen können gehemmt werden. Sobald Ellagsäure zweifach, dreifach oder vierfach methyliert wird, ist die komplette Aktivität verschwunden. Die synthetischen Biphenole weisen allesamt bis auf 2,3-Dihydroxy-Biphenyl keine Aktivität mehr auf. 2,3-Dihydroxy-Biphenyl hat mit Ellagsäure gemeinsam, dass sich in diesem Molekül zwei orthoständige Hydroxygruppen an einem Aromaten befinden. Dieses strukturelle Merkmal fehlt allen anderen Biphenolen.

Ellagsäure ist ein relativ unspezifischer Inhibitor. In der Forschung wird die Entwicklung von starken und hochspezifischen Inhibitoren gezielt vorangetrieben. Ein Beispiel hierfür ist die Substanz ZSTK474 (Abb. 4.3.1.a), die einen Benzo[d]imidazol-Ring besitzt [Yaguchi *et al.* 2006].

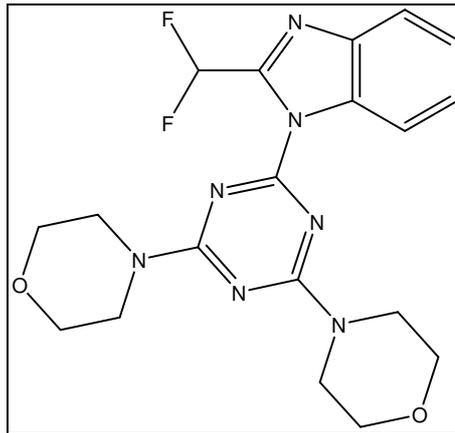
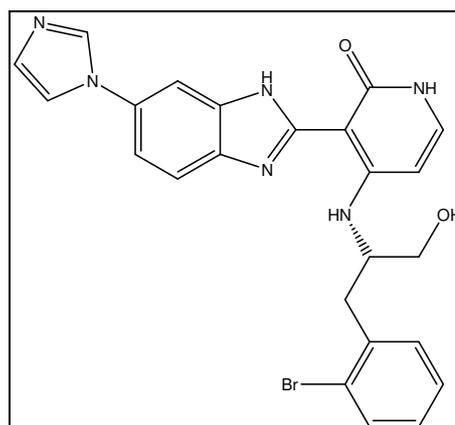


Abb. 4.3.1.a: Die ATP kompetitive Substanz ZSTK474

Andere Benzo[*d*]imidazol-Derivate wurden auch schon als Inhibitoren des IGF-1-R identifiziert. Viele verschiedene Derivate wurden auf ihre Bioaktivität hin untersucht. Das stärkste inhibitorische Potential entfaltet das 2-Bromoderivat von 3-(1H-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pyridin-2(1H)-on (Abb. 4.3.1.b) mit einem IC_{50} Wert von 290 nM [Velaparathi *et al.* 2007] (IC_{50} Wert von Ellagsäure bei 250 nM). Allgemein sind Benzo[*d*]imidazole aufgrund der Ähnlichkeit zum Purinderivat Adenosin gute ATP kompetitive Kinasenhemmer (Abb. 4.3.1.c) [Meggio *et al.* 1990]. Die restlichen strukturellen Elemente solch einer synthetischen Substanz sind verantwortlich für eine Interaktion mit proteinspezifischen Strukturen, um eine hochselektive Bindungsspezifität hervorzurufen.

Abb. 4.3.1.b: Die ATP kompetitive Substanz 2-Bromo-3-(1H-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pyridin-2(1H)-on

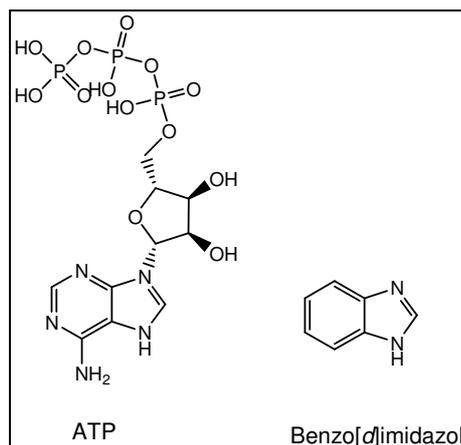


Abb. 4.3.1.c: ATP und Benzo[d]imidazole im Vergleich

Um die Aktivitäten der Ellagsäurederivate nicht nur auf Targetniveau, sondern auch auf zellulärem Niveau zu untersuchen, wurden ihre Bioaktivitäten anhand muriner Lymphomazellen (L5178Y) und verschiedenen humanen Krebszelllinien untersucht. Die Ergebnisse dieser Testreihen an murinen Lymphomazellen unterstreichen den Effekt, dass Ellagsäure am stärksten wirkt, wo hingegen bei jeder zusätzlichen Methylierung die Aktivität drastisch abnimmt. Dennoch ist der inhibitorische Effekt von Ellagsäure nicht vergleichbar mit den Konzentrationsbereichen, in denen Ellagsäure Proteinkinasen zu hemmen vermag. Ein Grund hierfür kann die Polarität von Ellagsäure sein, denn erst in einem pH Wert Bereich unterhalb von 5,6 liegt sie als komplett protoniertes Molekül vor (Abb. 4.3.1.d) [Hasegawa *et al.* 2003]. In dem physiologischen pH Wert Bereich (etwa 7,5), bei dem die Testreihen an murinen Lymphomazellen durchgeführt wurden, ist Ellagsäure mindestens einfach, wenn nicht zweifach deprotoniert [Hasegawa *et al.* 2003]. Durch diese zusätzliche Polarität wird Ellagsäure vermindert durch die Zellmembran diffundieren können und die Targets intrazellulär nur schwer bis gar nicht erreichen.

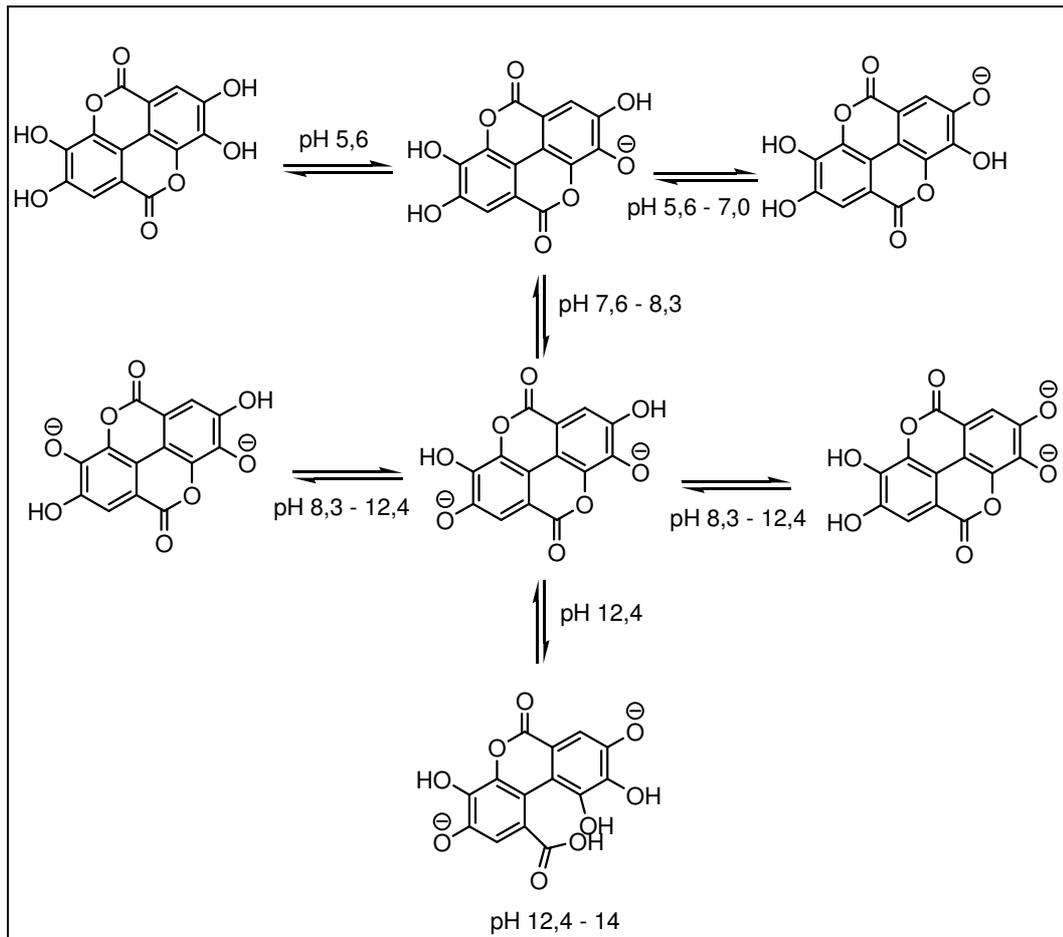


Abb. 4.3.1.d: Die Deprotonierungsstufen von Ellagsäure bei unterschiedlichen pH-Werten [verändert nach Hasegawa *et al.* 2003]

Eine weitere Ursache für die reduzierten Aktivitäten bei den murinen Lymphomazellen könnten unterschiedliche Targets sein. Auf der einen Seite wurden die *in vitro* Testreihen an humanen Proteinkinasen durchgeführt und auf der anderen Seite wurden für die *in vivo* Testreihen Zellen aus Mäusen verwendet. Entweder hemmt Ellagsäure die gleichen Proteine, aber aufgrund des Speziesunterschiedes in einer abgeschwächten Form oder Ellagsäure hemmt in dieser murinen Zelllinie keine für die Proliferation essentiellen Proteine.

Ellagsäure wurde ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen auf humane Krebszelllinien appliziert. Hierzu zählt eine humane Leberkarzinomzelllinie (HepG2), eine humane Darmkrebszelllinie (HCT116) und eine humane Brustkrebszelllinie (MCF7). Die Zelllinien HepG2 und HCT116 erfahren selbst bei der höchsten gewählten Konzentration von 100

μM keine statistisch signifikante Hemmung der Viabilität. Jedoch ist bei der Zelllinie MCF7 eine lineare Korrelation zwischen Konzentration und Wirkung ersichtlich. Wiederum ist die Hemmung dieser Krebszelllinien nicht vergleichbar mit den vorangegangenen *in vitro* Assays, bei denen IC_{50} Werte im nanomolaren Bereich gemessen wurden.

In den *in vitro* Assays hat der IGF-1-R die stärkste direkte Hemmung erfahren. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass dieser Rezeptor in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 überexprimiert ist [Skog *et al.* 2004]. Somit könnte die inhibitorische Wirkung auf den IGF-1-R ein Grund für die Bioaktivität auf die Brustkrebszelllinien sein. Die wesentlich abgeschwächte Wirkung im Vergleich zu den *in vitro* Studien kann wiederum durch die hohe Polarität der Ellagsäure erklärt werden, wodurch die Resorption dieser Substanz durch die unpolare Zellmembran der Krebszellen weitestgehend unterbunden wird.

Das mit Ellagsäure strukturverwandte Polyketid Alternariol (Abb. 4.3.1.e) ist ebenfalls ein guter Hemmstoff für verschiedene Proteinkinasen [Aly *et al.* 2008].

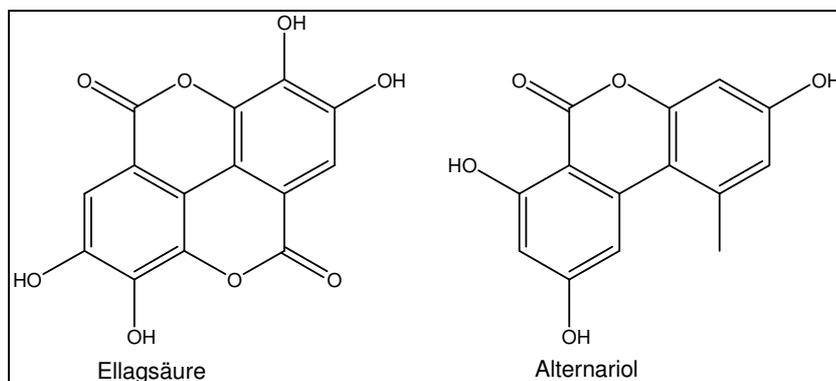


Abb. 4.3.1.e: Die Strukturen von Ellagsäure und Alternariol im Vergleich

Jedoch ist die hemmende Wirkung von Alternariol im Vergleich zu Ellagsäure um eine Zehnerpotenz schwächer. Die Ursachen dafür könnten zum einen in dem Fehlen eines kompletten Laktonringes bei Alternariol im Vergleich zur Ellagsäure und zum anderen im Fehlen des zweiten o-di-Hydroxysystems zu finden sein. Die Konsequenz aus dem fehlenden Laktonring ist neben der veränderten Molekülgröße auch die Polarität, da die

Hydroxygruppe an dem methylierten Phenolring keinen phenylogenen Carbonsäurecharakter mehr besitzt. Des Weiteren unterscheidet sich Alternatiol von Ellagsäure im Hydroxylierungsmuster. Bei Ellagsäure sind die Hydroxygruppen orthoständig, bei Alternariol die des einen Aromaten metaständig und am anderen Aromaten ist metaständig zu der einen Hydroxygruppe nur eine Methylgruppe zu finden.

Ellagsäure kann schon heute in der Therapie von Prostatakrebs als wirkungsverstärkende Komponente für Vinorelbin und Estramustin eingesetzt werden (180 mg pro Tag) [Falsaperla *et al.* 2005]. In geringen Dosen wird die polare Ellagsäure wahrscheinlich nicht genügend stark resorbiert. Beim medizinischen Einsatz von Ellagsäure muss bedacht werden, dass diese Substanz nach den hier gewonnenen Erkenntnissen als relativ unspezifischer Breitbandhemmer einzustufen ist. Die Breitbandhemmung basiert auf der Fähigkeit von Ellagsäure mit der ATP-Bindungsdomäne zu interagieren, die bei jeder Proteinkinase vorhanden ist. Ellagsäure stellt eine interessante Substanz dar, wenn eine gezielte Breitbandwirkung erwünscht ist. Als spezifischer Inhibitor für einzelne Proteinkinasen ist diese Substanz jedoch nicht anwendbar. Jedoch haben die Experimente mit 3-Methyl-O-Ellagsäure gezeigt, dass eine Modifikation einer Hydroxygruppe von Ellagsäure die Inhibitionsstärke zwar reduziert, aber auch die Selektivität auf bestimmte Kinasen erhöht. Von diesem Ansatz kann ausgegangen werden, um verschiedene zytotoxische Derivate von Ellagsäure zu synthetisieren.

Die unterschiedlichen Bioaktivitäten der Biphenole auf die murine Lymphomazelllinie stehen im drastischen Gegensatz zu den Ergebnissen an den isolierten Proteinkinasen. Dies kann ebenfalls mit den unterschiedlichen Targets erklärt werden. Denn innerhalb der Zellen sind noch weitaus mehr Targetproteine vorhanden als die 24 hier untersuchten humanen Proteinkinasen.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Ellagsäure starke antiplasmodiale Aktivitäten gegen verschiedene Parasitenarten zeigt [Verotta *et al.* 2001]. Dieser Befund stellt ebenfalls einen interessanten Ansatz für Therapiemöglichkeiten dar.

Ellagsäure ist ein Bestandteil vieler Genuss- und Nahrungsmittel. Sie ist aufgrund der Reifung in Eichenfässern in Mengen von bis zu 30 mg/L in verschiedenen Whisky- und Brandysorten nachweisbar [Goldberg *et al.* 1999; Koga *et al.* 2007] und trägt zu dem typischen Geschmack dieser Spirituosen bei.

In der Rinde von Granatäpfeln konnte Ellagsäure in einer Konzentration von etwa 100 mg/g ermittelt werden [Zhou *et al.* 2008]. Der Granatapfelsaft zeigt zudem verschiedene Bioaktivitäten, unter anderem die Hemmung der Cyclooxygenase, einer Proteinkinase und des Transkriptionsfaktors NF κ B [Adams *et al.* 2006]. Auch in Erdbeeren konnte Ellagsäure als bioaktive Komponente mit antioxidativen und antiproliferativen Eigenschaften identifiziert werden [Zhang *et al.* 2008].

4.3.2. β -Sitosterol

Das Phytosterol β -Sitosterol wurde ebenfalls auf eine kinasenhemmende Wirkung hin untersucht. Von den in diesem Test untersuchten 24 Proteinkinasen vermochte β -Sitosterol 3 Proteinkinasen mit einem IC₅₀ Wert von 8,68 μ M, 18,81 μ M bzw. 22,91 μ M zu hemmen. 21 Proteinkinasen wurden jedoch nicht gehemmt. In einem Versuch zur Zytotoxizität auf Keratinozyten konnte zudem festgestellt werden, dass β -Sitosterol im Bereich von 30 μ M eine zytotoxische Wirkung entfaltet. Bei dieser Konzentration wurden 30% der Zellen abgetötet. Eine zytotoxische Wirkung in diesem Konzentrationsbereich wurde auch auf humane Krebszelllinien festgestellt [Moon *et al.* 2008]. Weiter ist bekannt, dass β -Sitosterol eine fertilitätsreduzierende Wirkung auf Mäuse hat, die aber reversibel ist [Malini *et al.* 1991].

In den Testreihen mit β -Sitosterol, Cholesterol, 5 α -Cholestan-3 β -ol und 5 α -Cholestan konnte nur eine schwache bis fast unbedeutende negative Wirkung auf die Überlebensrate der murinen Zelllinie L5178Y festgestellt werden. Dass β -Sitosterol in dieser Testreihe unwirksam war, aber auf

humane Keratinozyten toxisch ist, liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Ursprungsspezies der Zellen. Die Testergebnisse an isolierten humanen Proteinkinasen lassen sich somit nur bedingt auf andere Spezies oder bestimmte Zelllinien übertragen, denn es ist durchaus möglich, dass in diesen Zelllinien diese Proteintargets entweder nicht vorliegen, deren Hemmung keinen letalen Effekt induziert oder dass sie eine andere Struktur haben, mit der diese Substanzen nicht auf inhibitorische Weise wechselwirken können.

4.3.3. *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol

Die beiden Isomere *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit, verschiedene humane tumorrelevante Proteinkinasen zu hemmen, untersucht. Jedes der beiden Isomere vermag 11 der insgesamt 24 humanen Proteinkinasen dieser Testreihe zu hemmen. *E*-Coumaroyl-Lupeol entfaltet hierbei eine IC_{50} Spannbreite von 2,27 μ M bis 16,76 μ M, *Z*-Coumaroyl-Lupeol von 2,44 μ M bis zu 15,25 μ M. Die Kinase, die von beiden Triterpenderivaten mit einem IC_{50} Wert von 2,27 μ M (*E*-Coumaroyl-Lupeol) bzw. 2,44 μ M (*Z*-Coumaroyl-Lupeol) gehemmt wird, ist der EGF-R (epidermal growth factor receptor), der eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Lungenkrebs spielt [Paez *et al.* 2004]. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass die Konformation an der Doppelbindung der veresterten *p*-Coumarsäure praktisch keinen Einfluss auf die Wirkung hat.

Im Fall der Proteine EPHB4 und B-RAF-VE hemmt ausschließlich *Z*-Coumaroyl-Lupeol mit einem IC_{50} Wert von 11,87 μ M bzw. 14,14 μ M, im Fall des IGF-1-R und VEGF-R3 hemmt nur *E*-Coumaroyl-Lupeol mit den IC_{50} Werten von 16,76 μ M bzw. 11,35 μ M.

EPHB4 ist eine Rezeptor Tyrosin Kinase und es ist bekannt, dass in Tumorzellen dieser Rezeptor überexprimiert wird. Es sind schon verschiedene Inhibitoren dieser Kinase bekannt [Bardelle *et al.* 2008].

Der B-RAF-VE ist eine Proteinkinase einer Signalkaskade die die Apoptose inhibiert und teilweise bei malignen Melanomen krankhaft

verändert ist. Eine krankhafte Veränderung dieser Proteinkinase bewirkt zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.

Die Signaltransduktionsaktivität des IGF-1-R wird in Zusammenhang mit der Prostatakrebsentstehung gebracht [Wu *et al.* 2006]. Eine Störung dieses Rezeptors ist ebenso eine mögliche Ursache für die Entwicklung von Brust- und Lungenkrebs und ist somit schon ein etabliertes Ziel für verschiedene Tumorthérapien [Warshamana-Greene *et al.* 2005; Jones *et al.* 2004].

Der VEGF-R3 gehört zu den vascular endothelial growth Faktoren und spielt eine essentielle Rolle in der Angiogenese des Tumorgewebes [Labrecque *et al.* 2005]. Ein prominenter Hemmer des VEGFs ist der Arzneistoff Thalidomid [Melchert und List 2007].

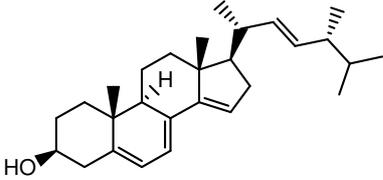
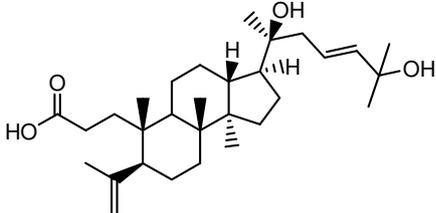
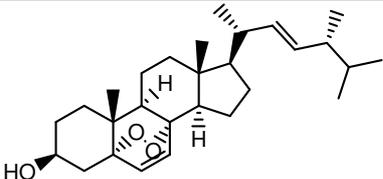
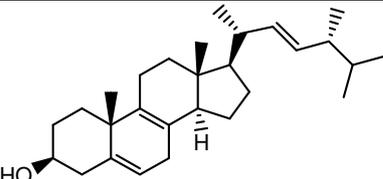
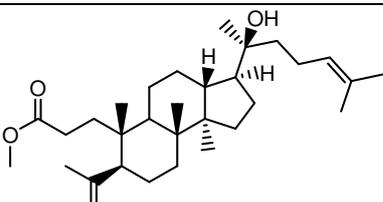
Somit konnte gezeigt werden, dass die *E*- oder *Z*-Konformation des *p*-Coumarsäurerestes von Coumaroyl-Lupeol in einigen Fällen eine essentielle Rolle für die inhibitorische Bioaktivität von bestimmten Proteinkinasen spielt.

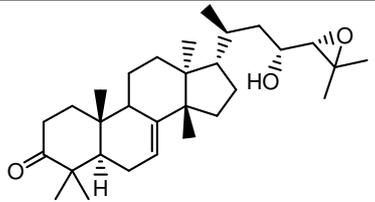
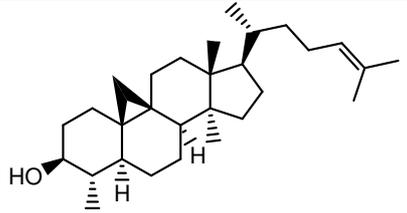
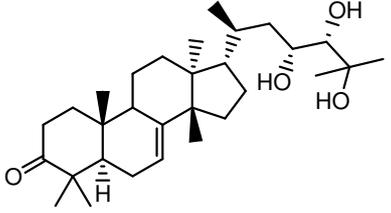
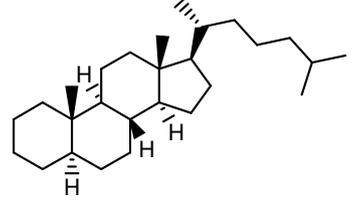
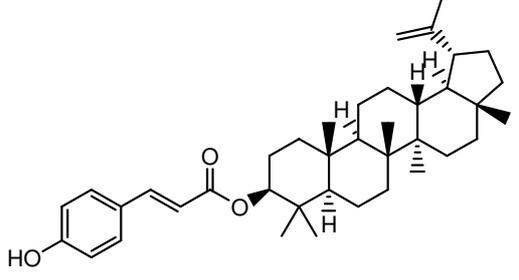
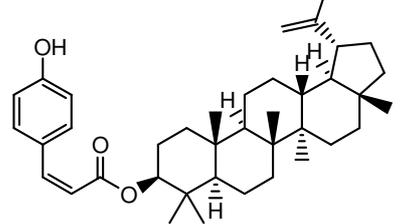
Bei der Testung dieser Substanzen an murinen Lymphomazellen konnte im Konzentrationsbereich von 17,5 μ M jedoch keine inhibitorische Aktivität festgestellt werden. Der Grund für diese Abweichung zu den Testreihen an den humanen Proteinkinasen kann nur mit unterschiedlichen Targets erklärt werden, die entweder humanspezifisch sein müssen oder die in dieser murinen Zelllinie nicht ausschlaggebend für das Überleben sind. Aufgrund der Lipophilie dieser Substanzen ist davon auszugehen, dass *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol durch die Zellmembran in die Zelle eindringen wird. Vielleicht ist die Lipophile auch zu hoch, um aus der Zellmembran in das Zellinnere weiter überzugehen und die Substanzen werden in der Zellmembran akkumuliert, wodurch sie das entsprechende Target nicht erreichen können.

4.4. Inhibierung der UVA1-induzierten ICAM-1 Expression

Bei der Untersuchung auf die inhibitorische Wirkung der UVA1-induzierten ICAM-1 Überexpression wurden strukturell hochdiverse Triterpene eingesetzt. Die signifikantesten Aktivitäten hinsichtlich der Expressionsunterdrückung des ICAM-1 Genes nach UVA1 Bestrahlung zeigten die folgenden Substanzen (Tab. 4.4.).

Tab. 4.4.: Die Triterpene, die am stärksten die ICAM-1 Transkription hemmen konnten

Name der Substanz	Struktur der Substanz	Reduktion der ICAM-1 Transkriptions-induktion
14-Dehydroergosterol		70%
(20 <i>S</i> ,23 <i>E</i>)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure		70%
Ergosterol-Peroxid		90%
Lichesterol		90%
Methyldammarenolat		70%

Niloticin		92%
29-Norcycloartenol		96%
Piscidinol A		80%
5 α -Cholestan		80%
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol		80%
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol		90%

In allen Fällen ist eine solche Bioaktivität noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Aufgrund der Strukturdiversitäten kann jedoch keine Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Zudem ist der Zusammenhang zwischen der UVA1-Bestrahlung und der ICAM-1 Expression zwar rudimentär bekannt, jedoch wird sie über eine sehr

komplexe Signalkaskade reguliert, wodurch sich viele verschiedene Angriffspunkte anbieten.

Aufgrund der Aktivitäten von *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol wurden verschiedene Derivate von Lupeol, β -Sitosterol und Cholesterol auf ihre Bioaktivität hin untersucht. Durch Probleme bei der Anzucht der Keratinozytenzellkulturen konnten für ein Teil der Substanzen bis zum Abschluss dieser Arbeit nur die Zytotoxizitätsdaten erhoben werden

Auffällig hierbei ist, dass β -Sitosterol bei der Konzentration von 30 μ M die Viabilität der Zellen um 30% reduziert. Die Derivate Benzoyl- β -Sitosterol und Zinnamoyl- β -Sitosterol besitzen in etwa die gleiche Zytotoxizität.

Bei Cholesterol hingegen, welches ebenfalls bei 30 μ M einen viabilitätreduzierenden Effekt von etwa 30% hat, wird der zytotoxische Effekt bei einer Veresterung mit Benzoesäure oder Zimtsäure eliminiert.

Erneut konnte festgestellt werden, dass weder *E*- noch *Z*-Coumaroyl-Lupeol einen zytotoxischen Effekt auf Keratinozyten haben. Bis auf einen nur gering ausgeprägten zytotoxischen Effekt von Lupeol und Benzoyl-Lupeol zeigen die anderen Lupeolderivate Zinnamoyl-Lupeol, Acetyl-Lupeol und reines Lupeol keinerlei Zytotoxizität.

Die zytotoxische Wirkung von Betulinsäure wurde schon hinreichend anhand verschiedener Proteintargets untersucht [Grunewald *et al.* 2005; Chintharlapalli *et al.* 2007] und stellt deswegen keinen überraschenden Befund dar, sondern diente nur als Positivkontrolle.

Weil *E*- und *Z*-Coumaroyl-Lupeol im *n*-Hexan Extrakt der Blätter von *Rhizophora apiculata* vorkommen, wurde dieser Extrakt auch getestet und es konnte gezeigt werden, dass er nur schwach zytotoxisch ist.

Daneben flossen auch die veresterten Teilstrukturen in ihrer Reinform ein. Dazu zählen Zimtsäure, *p*-Coumarsäure und Benzoessäure, die alle keine zytotoxische Wirkung bei einer Konzentration von 30 µM entfalten.

Weiter wurden die Methylester von Benzoessäure und Zimtsäure getestet, um einen Vergleich zu den polaren Carbonsäuren Benzoessäure und Zimtsäure zu erhalten, die weniger stark lipophil sind und deswegen wahrscheinlich in geringeren Mengen die Zellmembran passieren können.

Aus einer Literaturstelle ist bekannt, dass Nachtkerzenöl bis zu 32% Lupeol enthält [Ntsourankoua und Artaud 1997]. Aus diesem Grund flossen zwei verschiedene Nachtkerzenölpräparate in die Testreihen ein. Weder das Produkt von PG Naturpharma noch das Produkt von Fagron zeigten zytotoxische Aktivitäten.

Zudem wurden Extrakte von *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae), *Tylophora indica* (Apocynaceae) und *Aglaia duppereana* (Meliaceae) getestet. Hierbei ist auffallend, dass der Extrakt aus *Ryania speciosa* keine zytotoxische Aktivität hat, der Extrakt aus *Tylophora indica* nur eine leichte Toxizität und der Extrakt aus *Aglaia duppereana* eine relativ hohe Toxizität.

4.4.2. Möglicher Wirkmechnismus der ICAM-1 Expressionsunterdrückung

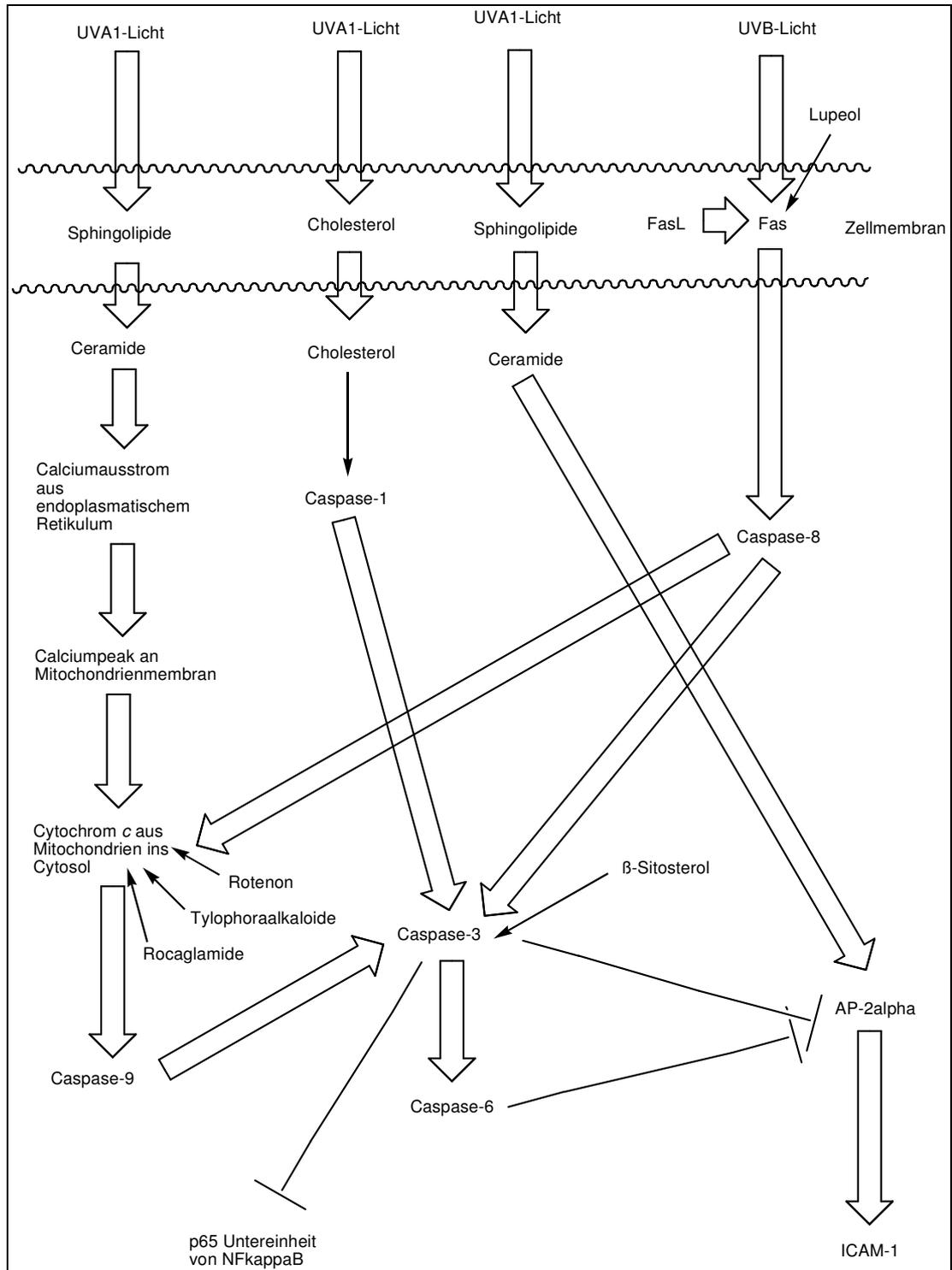


Abb. 4.4.2: Möglicher Wirkmechanismus der ICAM-1 Expressionsunterdrückung

Durch UVA1 Strahlung werden ausgehend von denen in der Zellmembran gebundenen Sphingolipiden Ceramide herausgelöst, die in das Cytoplasma übergehen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der UVA1 Licht abhängigen Ceramidentstehung und der Induktion des Transkriptionsfaktors AP-2 nachgewiesen werden [Grether-Beck *et al.* 2003]. Durch den Transkriptionsfaktor AP-2 wird die Transkription des ICAM-1 Genes induziert [Grether-Beck *et al.* 2005]. Daneben wird durch Ceramide ebenfalls der Calciumeinstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma stimuliert [Darios *et al.* 2003]. Durch einen erhöhten Calciumspiegel wird aus Mitochondrien Cytochrom *c* in das Cytoplasma abgegeben [Hajnoczky *et al.* 2000]. Für Ceramide konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie die Ausschleusung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Cytoplasma bewirken [Ghafourifar *et al.* 1999; Grether-Beck *et al.* 2003]. Cytoplasmatisches Cytochrom *c* leitet die Aktivierung der Caspase-9 (Caspase = Cysteiny-Aspartate Specific Protease) ein, von der aus weitere apoptotische Proteine reguliert werden können [Skulachev 1998]. Caspase-9 aktiviert Caspase-3 [Gashegu *et al.* 2006], Caspase-3 wiederum Caspase-6 [Wen *et al.* 1997]. Caspase-3 kann neben der p65 Untereinheit von NF κ B auch andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und AP-2 abbauen [Kang *et al.* 2001; Woenckhaus *et al.* 2003; Oh und Lim 2007], Caspase-6 degradiert sehr selektiv nur den Transkriptionsfaktor AP-2 [Nyormoi *et al.* 2001]. Somit kann über diesen Caspase Weg der für die ICAM-1 Transkription verantwortliche Transkriptionsfaktor AP-2 degeneriert werden. Hierdurch wird unter anderem die ICAM-1 Transkription gestoppt und es lässt sich erklären, weshalb nach UVA1 Licht Stimulation zunächst die Transkription von ICAM-1 induziert wird, aber durch den langsamen Deaktivierungsweg über die Caspasen die Transkription nach etwa 16 Stunden wieder herunterreguliert wird [Grether-Beck *et al.* 2003]. Da bei einer Bestrahlung mit UVA1 Licht auch Cholesterol aus der Zellmembran herausgelöst wird [Grether-Beck *et al.* 2008], kann Cholesterol über die Interaktion mit Caspase-1 [Schroeder und Hilbi 2007] ebenfalls zu einer Aktivierung der Caspase-3 führen [Tewari *et al.* 1995].

Neben dem passiven Zelltod durch Mitochondrienruption kann auch ein aktiver Zelltod ausgelöst werden. Hierzu bindet FasL (Fas Ligand) an drei Fas Rezeptoren. Durch das Zusammenführen von drei Fas Proteinen bildet sich intrazellulär durch die Trimerisierung die FADD (Fas Associated Death Domain). Diese Domäne kann durch Aktivierung der Caspase-8 wiederum die Apoptosesignalkaskade auslösen [Abbas und Lichtman 2005]. Die aktivierte Caspase-8 kann einerseits die Caspase-3 direkt aktivieren [Abbas und Lichtmann 2005], andererseits aber auch über die Prozessierung verschiedener Mediatoren (Bid und Bax) die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien hervorrufen, wodurch die Caspase-3 über die dadurch aktivierte Caspase-9 stimuliert wird [Luo *et al.* 1998; Kudla *et al.* 2000; Ge *et al.* 2002; Roucou *et al.* 2002; Werner *et al.* 2002]. Der Fas Rezeptor kann auch unabhängig von seinem Liganden FasL durch UVB Licht aktiviert werden [Aragane *et al.* 1998]. Weiter ist bekannt, dass durch die Bestrahlung von UVB Licht die Expression von ICAM-1 unterdrückt werden kann [Krutmann und Trefzer 1992].

Die Beobachtung, dass Naturstoffe auf der einen Seite entzündungshemmende Wirkungen besitzen die auf der Inhibition verschiedener Transkriptionsfaktoren beruhen, aber auch eine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen entfalten, könnte auf deren Interaktionen mit der Caspase-Kaskade beruhen.

Durch Rotenon wird verstärkt Cytochrom *c* in das Cytosol freigesetzt und die Caspase-9 aktiviert [Li *et al.* 2005]. Des Weiteren sind Rotenonderivate als entzündungshemmende Substanzen [da Silva und Parente 2002] und als Tumorchemmstoffe bekannt [Blaskó *et al.* 1989].

Von Rocaglamiden sind ebenfalls anti-entzündliche Aktivitäten beschrieben [Baumann *et al.* 2002; Proksch *et al.* 2005]. Ebenfalls ist die apoptotische Bioaktivität von Rocaglamiden bekannt [Zhu *et al.* 2007]. Das Rocaglamidderivat Silvestrol induziert wie Rotenon eine Freisetzung von Cytochrom *c* in das Cytosol [Kim *et al.* 2007].

Alkaloide von *Tylophora indica* setzen Cytochrom *c* in das Cytosol frei [Ganguly und Khar 2002] und aktivieren dadurch die Caspase-3. Tylophoraalkaloide sind ebenfalls gute Wirkstoffe gegen verschiedene Krebszelllinien [Gao *et al.* 2004] und zeigen deutliche entzündungshemmende Wirkung über eine Hemmung des AP-1 Transkriptionsfaktors [Yang *et al.* 2006].

Aristolochiasäure zeigt dasselbe Wirkmuster. Durch Aristolochiasäure werden Mitochondrienmembranen permeabel gemacht und Cytochrom *c* wird in das Cytosol freigesetzt [Qi *et al.* 2007]. Durch Aristolochiasäure steigt die Caspaseaktivität in der Zelle an [Balachandran *et al.* 2005] und die Apoptose wird eingeleitet [Takeyama *et al.* 2002]. Neben der starken insektiziden Wirkung von Aristolochiasäure [Nascimento *et al.* 2003] besitzt Aristolochiasäure auch entzündungshemmende Eigenschaften [Moreno 1993].

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu bemerken, dass Rotenon, Rocaglamide, Aristolochiasäure und Tylophoraalkaloide alle sehr stark wirkende Insektizide sind und dass bewährte Targets von Insektiziden den Cytochrom *c* Metabolismus in der Atmungskette treffen [Lümmen 1998]. Auch proteinogene Insektizide können in Krebszellen Apoptose über die Aktivierung der Caspase-3 auslösen [Dowling *et al.* 2004].

Im Rahmen des ICAM-1 Assays wurden verschiedene Triterpene und Sterole auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Gentranskription von ICAM-1 zu mindern. Auffallend gute Bioaktivitäten zeigten hierbei Derivate von Lupeol, β -Sitosterol und Cholesterol. Cholesterol wirkt wahrscheinlich über die Aktivierung der Caspase-1 [Schroeder und Hilbi 2007] wie im oben vorgestellten Modell negativ regulierend auf ICAM-1 (Abb. 4.4.2). Lupeol wirkt antiproliferativ über eine Stimulation des Caspase-6 Signalweges [Saleem *et al.* 2005] und hemmt NF κ B [Saleem *et al.* 2004]. Für β -Sitosterol konnte eine Stimulierung der Caspase-3 [Park *et al.* 2007] und eine generelle apoptotische Wirkung [Moon *et al.* 2008] nachgewiesen werden.

Es ist schwer zu prognostizieren, an welchen Positionen des Regulationsweges die hier untersuchten Triterpene bzw. Sterole wirken,

denn die in der Literatur untersuchten erhöhten Caspase Aktivitäten sind nur Indikatoren dafür, dass die Interaktion mit der Kaskade oberhalb dieser Position stattfinden muss. Ein Beispiel ist Lupeol, dem nachgewiesen werden konnte, dass es die Caspase-6 induziert [Saleem *et al.* 2005], weil der Fas-abhängige Signalweg ohne den natürlichen Liganden FasL stimuliert wird. Eine Möglichkeit wäre z.B., dass ein in der Zellmembran eingelagertes Triterpen drei Fas-Proteine agglutinieren kann, wodurch sich intrazellulär die FADD (Fas Associated Feath Domain) ausbildet, durch die die apoptotische Signalkaskade aktiviert wird.

Alle anderen Angriffspunkte wie die Calciumfreisetzung oder die Freisetzung von Cytochrom *c* in das Cytoplasma sind ebenfalls denkbar. Unspezifische Interaktionen mit Membranen sind auch möglich, denn durch die Membrandestabilisierung kann Calcium aus den Endoplasmatischen Retikulum oder Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt werden.

Die Auslösung der Signalkaskade durch unspezifische Wechselwirkungen mit den Membranen der Mitochondrien bzw. des Endoplasmatischen Reticulums könnten eine Erklärung für die ähnlichen oder gleichen Bioaktivitäten der strukturell hochdiversen, jedoch ähnlich unpolaren Triterpenderivate liefern, denen im Rahmen dieser Arbeit eine Expressionsunterdrückung von ICAM-1 nachgewiesen werden konnten.

Einige dieser Strukturen wurden bereits in der Literatur als Interaktionspartner mit verschiedenen Ebenen dieser Signalkaskade beschrieben. Darunter zählt die Asiatische Säure, die die Freisetzung von Cytochrom *c* bewirkt [Hsu *et al.* 2005], die Betulinsäure, die an einer anderen Stelle die Caspasen-Kaskade aktiviert [Fulda *et al.* 1997], die Ursolsäure, die die Aktivierung der Caspase-3 induziert [Manu und Kuttan 2008] oder ein Oleanolsäurederivat, welches ebenfalls die Caspase-3 Aktivierung auslöst [Reyes *et al.* 2006].

Weiter ist interessant zu erwähnen, dass Derivate von Cholesterol, β -Sitosterol und Lupeol Bioaktivitäten auf Insekten zeigen. Zwar nicht

vergleichbar mit den Bioaktivitäten von Rocaglamiden, aber dennoch sind stringente Parallelen zu erkennen.

Durch die Applikation von verschiedenen Vitamin D Derivaten konnte bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen der induzierten Apoptose und der negativen Regulation der ICAM-1 Expression gezeigt werden [Martinesi *et al.* 2008]. Dieser Befund unterstützt die hier vorgestellte mögliche Regulierung der ICAM-1 Expression durch verschiedene Triterpene und Sterole.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass der UVA1 induzierte ICAM-1 Assay somit ein sehr guter Reporter- und Screeningassay für antientzündlich und apoptotisch wirkende Substanzen ist.

4.5. NF κ B Assay

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription und somit die Expression vieler verschiedener entzündungsrelevanter Proteine steuert. Zu diesen Proteinen zählen Enzyme wie Cyclooxygenasen oder Lipoxygenasen oder auch Signalproteine wie Interleukine. Durch die Hemmung von NF κ B können entzündliche Reaktionen verhindert werden. Das prominenteste Beispiel für einen solchen Naturstoff ist Helanin aus *Arnica montana* (Asteraceae) [Hänsel und Sticher, 8. Auflage].

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Lupeol eine NF κ B inhibierende Wirkung entfaltet, wenn die Zellen mit Phorbolestern stimuliert werden [Saleem *et al.* 2004]. Phorbole sind Diterpene, die Kontaktallergien auslösen können. Es gibt vier verschiedene Grundtypen: Den Lathyrantyp, den Daphnantyp, den Tigliantyp und den Ingenantyp (Abb. 4.5.). TPA (12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate) ist vom Tigliantyp, der aufgrund seiner Doppelbindungen kovalente Bindungen zu Proteinen ausbilden kann, die dadurch ihre natürliche Konformationen ändern und somit ein nicht physiologisches, körperfremdes Antigen bilden.

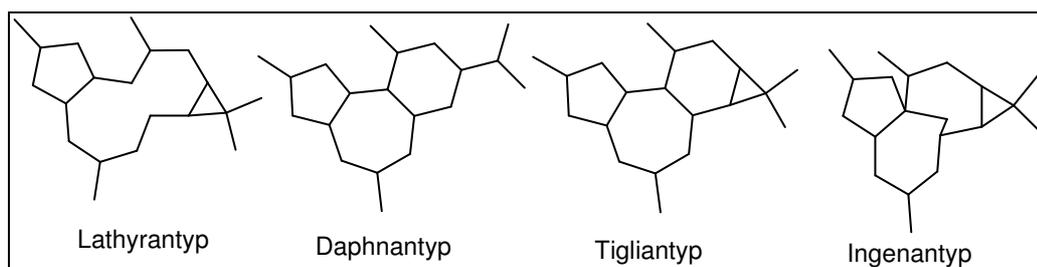


Abb. 4.5.: Die vier verschiedenen Phorbolgrundgerüste [Römpp Lexikon Naturstoffe]

Diesen entzündungsinduzierenden Mechanismus kann Lupeol unterdrücken, indem die Expression von NF κ B gehemmt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Lupeol auch die TNF α (tumor necrosis factor Untereinheit α) – induzierte NF κ B Überexpression gehemmt werden kann. TNF α bindet an einen Rezeptor

(TNF-R), dieser wiederum aktiviert über eine intrazelluläre Signalkaskade verschiedene Transkriptionsfaktoren. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist NF κ B. Um diese Versuchsdurchführung zu verifizieren, wurde gleichzeitig eine Positivkontrolle mit Ursolsäure durchgeführt [Shishodia *et al.* 2003]. Bei der Versuchsdurchführung mit Ursolsäure zeigte sich eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Korrelation. Bei Zugabe von 50 μ M Ursolsäure wurde praktisch die komplette NF κ B abhängige Produktion der SEAP (secreted form of human alkaline phosphatase) gehemmt.

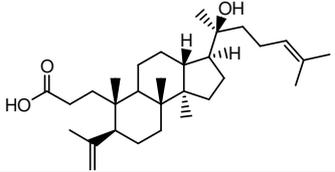
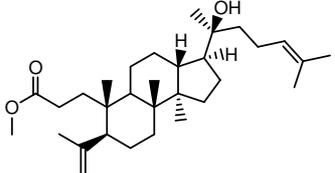
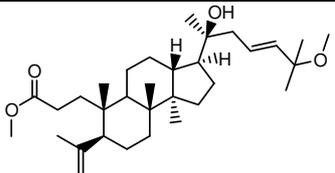
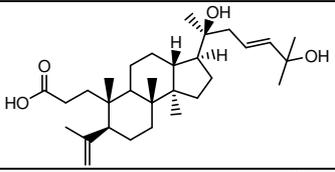
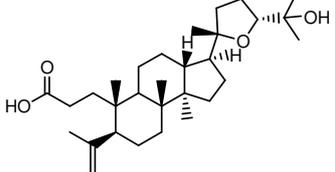
Lupeol hingegen zeigte selbst in höheren Dosen keine signifikante Abweichung zur nur mit TNF α behandelten Kontrolle.

Daher konnte gezeigt werden, dass Lupeol zwar die TPA induzierte Überexpression von NF κ B zu hemmen vermag, jedoch nicht die TNF α induzierte NF κ B Aktivität. Offenbar wird die TPA induzierte NF κ B Induktion über einen anderen Mechanismus reguliert als die TNF α induzierte Wirkung. Außerdem konnte somit gezeigt werden, dass Lupeol nicht direkt NF κ B hemmt, sondern die TPA-abhängige Signalkaskade, die in einer NF κ B Regulation mündet.

4.6. Zytotoxischer Assay mit Dammarenolsäurederivaten

Alle hier getesteten Dammarenolsäurederivate wurden aus Pflanzen der Gattung *Aglaia* isoliert [Eck 2004].

Tab. 4.6.: Auf Zytotoxizität hin untersuchte Dammarenolsäurederivate

PB2		Dammarenolsäure
PB18		Methyldammarenolat
PB7		(23E)-(20S)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure
PB8		(20S,23E)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure
PB23		Shoreasäure (24R) bzw. Eicheriansäure (24S)

Die Spaltung des A-Rings dieses Triterpens läuft wahrscheinlich über die Zwischenstufe einer Ketofunktion an Position 3, die zu einem Laktoring übergeht, welcher wiederum mittels Wasserverbrauch gespalten wird [Rosenthal *et al.* 1965]. Nach Spaltung des Rings wird wahrscheinlich die Hydroxygruppe an Position 4 unter Wasserabspaltung eliminiert und es entsteht eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 23 oder 4 und 24.

Aufgrund der durch die Literatur bekannten antiviralen Bioaktivität [Poehland *et al.* 1987] wurde untersucht, ob Dammarenolsäure und einige

ihrer Derivate auch eine zytotoxische Aktivität auf verschiedene humane Krebszelllinien haben. Für diesen MTT Assay wurden zwei humane Leberkarzinomzelllinien (HepG2 und Huh7), sowie eine humane Brustkrebszelllinie (MCF7) und eine humane Darmkrebszelllinie (HCT116) verwendet.

Der IC_{50} Wert für Dammarenolsäure liegt bei allen vier Krebszelllinien zwischen 8 μ M und 16 μ M.

Methyldammarenolat zeigt nur noch bei HCT116 einen IC_{50} Wert von etwa 40 μ M. Auf die anderen drei Krebszelllinien zeigt Methyldammarenolat ebenfalls eine zytotoxische Wirkung, diese war aber oberhalb von 80 μ M.

(20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure hatte auf HCT116 einen IC_{50} Wert bei 70 μ M und auf HepG2 einen IC_{50} Wert von 30 μ M. Bei den beiden anderen Krebszelllinien (Huh7 und MCF7) wurde ein IC_{50} Wert oberhalb von 80 μ M festgestellt.

(23*E*)-(20*S*)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure hingegen zeigte eine Hemmung auf HepG7 mit einem IC_{50} Wert oberhalb von 80 μ M, aber einen etwas niedrigeren IC_{50} Wert auf Huh7 (60 μ M), MCF7 (30 μ M) und HCT116 (13 μ M).

Shoreasäure (24*R*) bzw. Eicheriansäure (24*S*) zeigt nur auf die Zelllinien Huh7, MCF7 und HCT116 einen niedrigeren IC_{50} Wert als 80 μ M. Bei Huh7 38 μ M, bei MCF7 48 μ M und bei HCT116 22 μ M.

Dammarenolsäure zeigte bei allen Krebszelllinien die stärkste zytotoxische Bioaktivität. Wenn die Säurefunktion an Position 2 methyliert ist, ist nur noch eine mittelstarke Aktivität auf HCT116 zu registrieren. Somit kann festgehalten werden, dass die Säurefunktion eine essentielle Rolle für die Zytotoxizität dieser Triterpene spielt.

(20*S*,23*E*)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure ist an der Säurefunktion und an der Hydroxygruppe an Position 25 im Gegensatz zu (23*E*)-(20*S*)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure nicht methyliert und es zeigen sich komplett unterschiedliche Bioaktivitäten auf die vier verschiedenen Zelllinien. Für die Bioaktivität auf die Zelllinie HepG6 ist die Säurefunktion an

Position 2 essentiell. Für die Aktivität auf die Zelllinie HCT116 ist eine lipophile Funktion and Position 24/25 für eine stärkere Wirkung wichtig.

Shoreasäure bzw. Eicheriansäure besitzen zwar an Position 2 eine Säurefunktion, jedoch ist bei diesen Substanzen ein Ringschluss in den Seitenketten vorhanden, der wiederum mit einer hydrophilen Hydroxygruppe besetzt ist. Wegen diesen strukturellen Konstellationen besitzen diese Substanzen keine mit Dammarenolsäure vergleichbare Aktivität auf die Zelllinie HepG6.

Somit kann festgehalten werden, dass für die zytotoxische Aktivität eine Säurefunktion an Position 2 und eine lineare hydrophobe Seitenkette essentiell ist.

5. Biogenetischer Zusammenhang der isolierten Substanzen

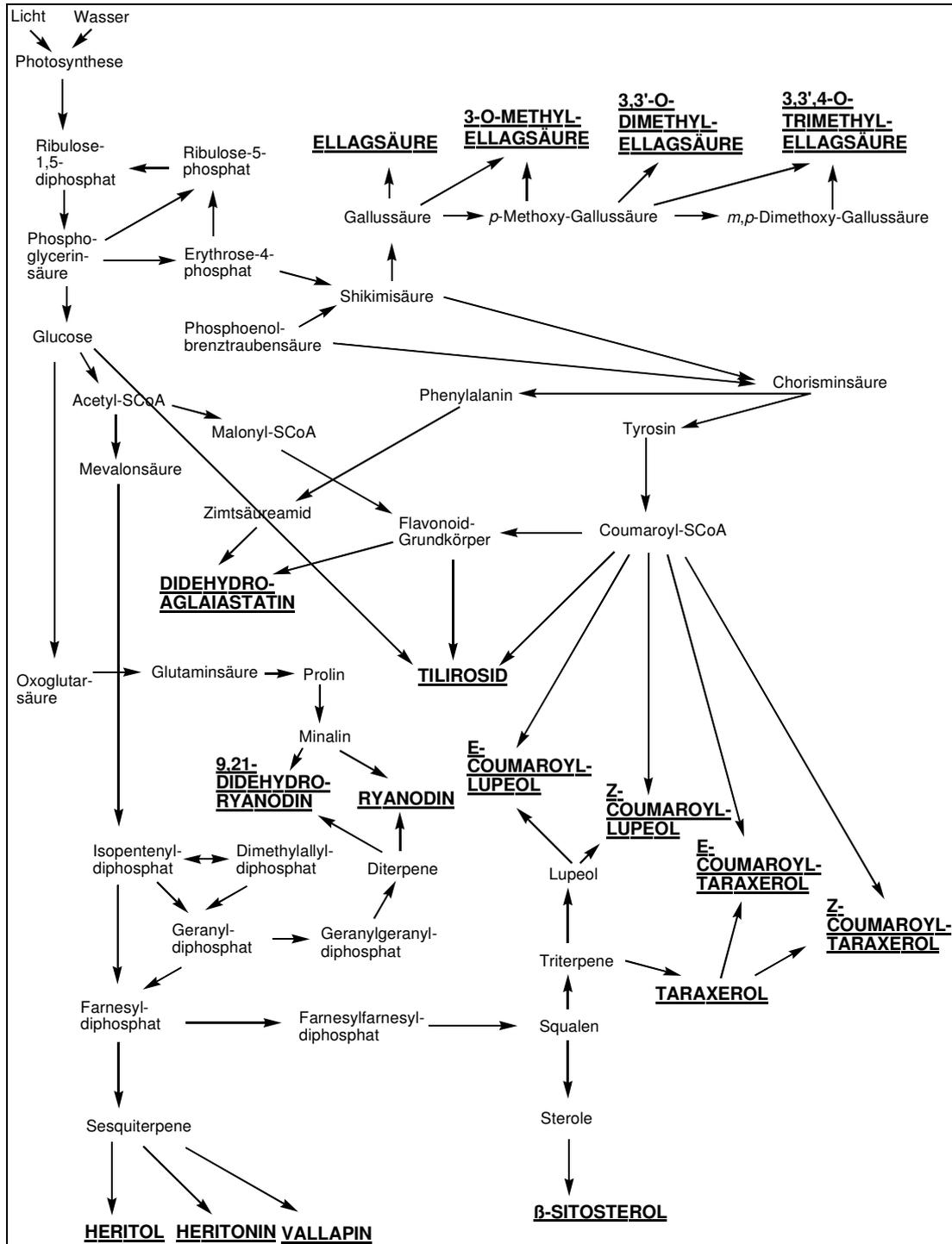
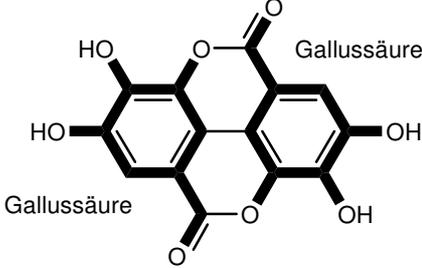
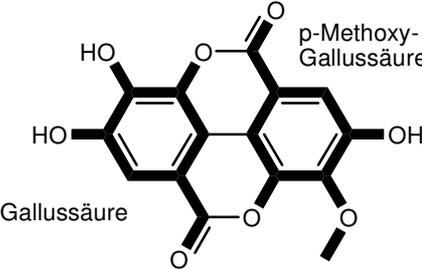
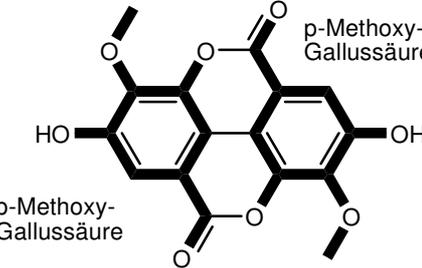
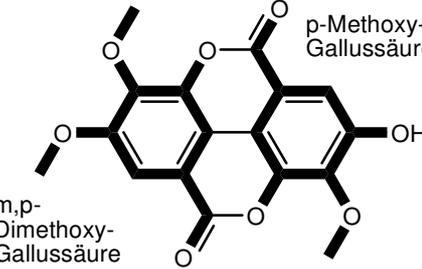


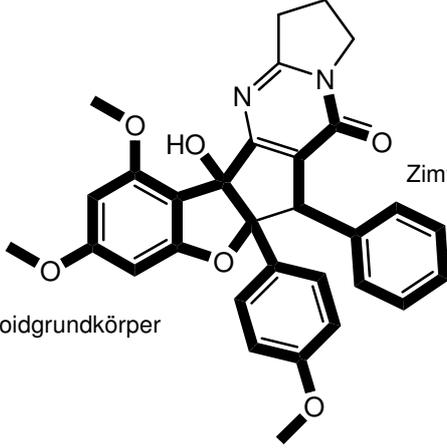
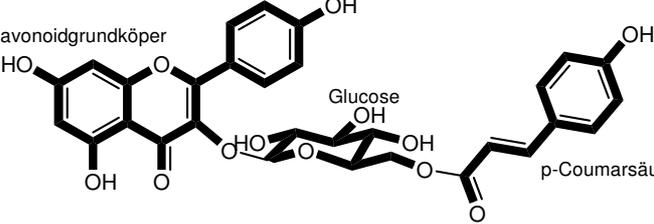
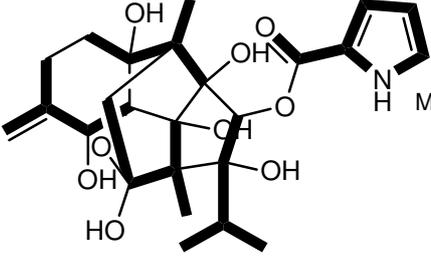
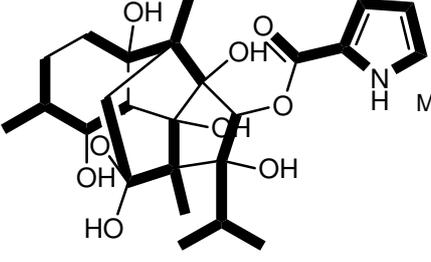
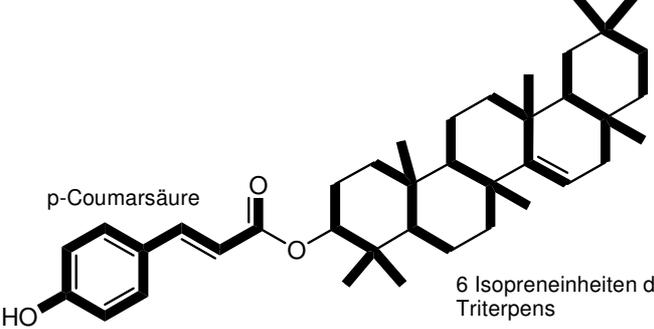
Abb. 5: Biogenetischer Zusammenhang aller isolierten Substanzen

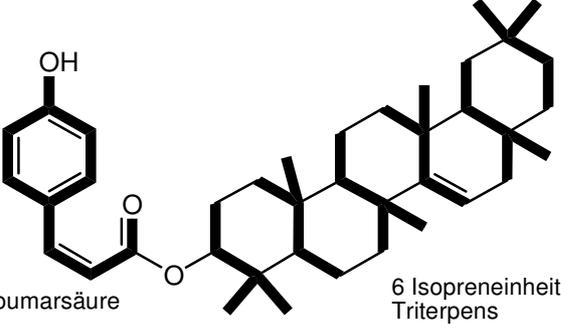
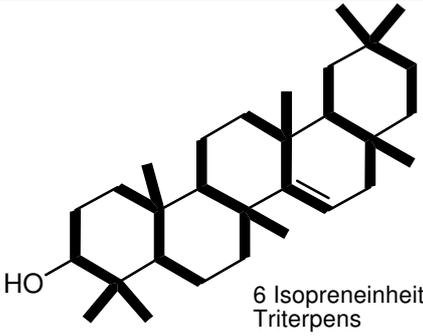
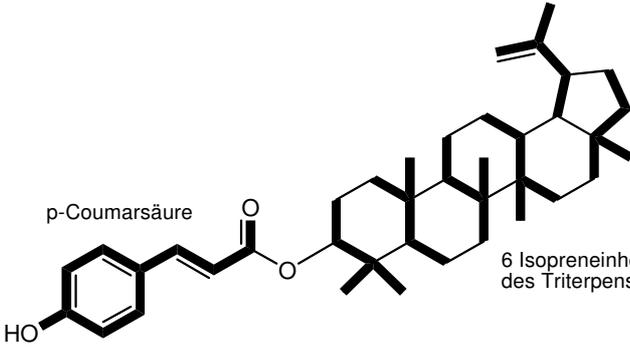
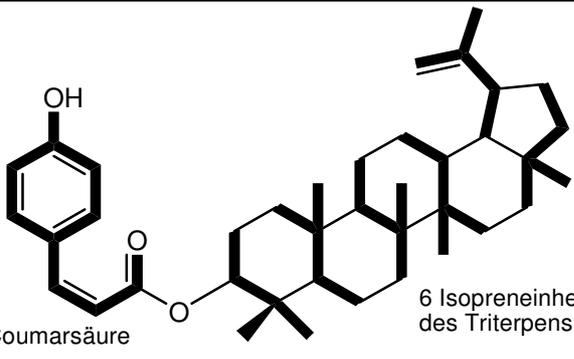
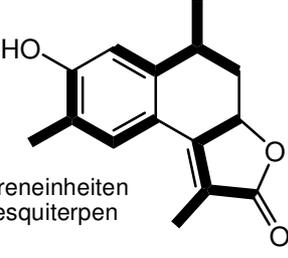
In Abb. 5 ist der biogenetische Zusammenhang der während dieser Arbeit aus verschiedenen Pflanzen isolierten Naturstoffe dargestellt. In Tab. 5 sind die einzelnen, teilweise aufgrund fehlender Literaturinformation

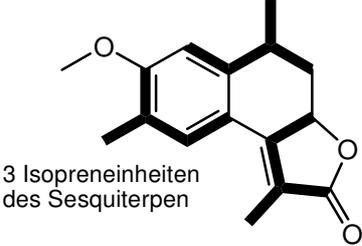
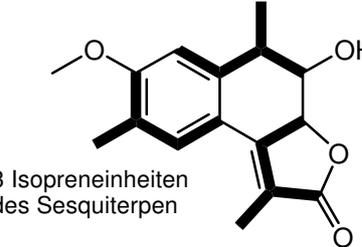
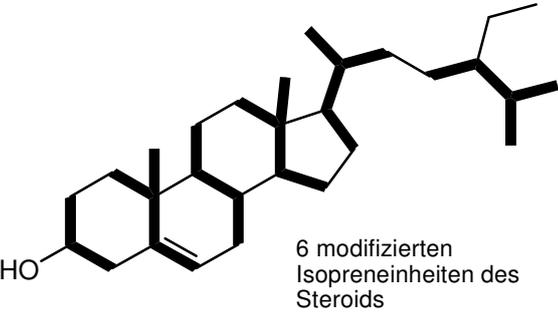
vermuteten biogenetischen Bausteine der verschiedenen Substanzen hervorgehoben. Aus Gründen der verbesserten Darstellung der Teilstrukturen wurde auf die explizite Hervorhebung der Stereozentren verzichtet.

Tab. 5: Biogenetische Bausteine der einzelnen Naturstoffe

Ellagsäure	 <p>Gallussäure</p> <p>Gallussäure</p>
3-Methyl-O-Ellagsäure	 <p>p-Methoxy-Gallussäure</p> <p>Gallussäure</p>
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	 <p>p-Methoxy-Gallussäure</p> <p>p-Methoxy-Gallussäure</p>
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	 <p>p-Methoxy-Gallussäure</p> <p>m,p-Dimethoxy-Gallussäure</p>

<p>Didehydroaglaiastatin</p>	 <p>Zimtsäureamid</p> <p>Flavonoidgrundkörper</p>
<p>Tiliosid</p>	 <p>Flavonoidgrundkörper</p> <p>Glucose</p> <p>p-Coumarsäure</p>
<p>9,21-Didehydroryanodin</p>	 <p>Minalin</p> <p>4 Isopreneinheiten des Diterpens</p>
<p>Ryanodin</p>	 <p>Minalin</p> <p>4 Isopreneinheiten des Diterpens</p>
<p>E-Coumaroyl-Taraxerol</p>	 <p>p-Coumarsäure</p> <p>6 Isopreneinheiten des Triterpens</p>

Z-Coumaroyl-Taraxerol	 <p>The structure shows a p-coumaric acid moiety (a benzene ring with a hydroxyl group at the para position and a propenoic acid side chain) esterified to the C-3 position of a triterpene skeleton. The triterpene is composed of six isoprene units. The side chain of the coumaric acid is in the Z configuration.</p> <p>p-Coumarsäure</p> <p>6 Isopreneinheiten des Triterpens</p>
Taraxerol	 <p>The structure shows a triterpene skeleton composed of six isoprene units. It features a hydroxyl group at the C-3 position and a double bond at the C-14 position.</p> <p>HO</p> <p>6 Isopreneinheiten des Triterpens</p>
E-Coumaroyl-Lupeol	 <p>The structure shows a lupeol triterpene skeleton (six isoprene units) esterified to the C-3 position with a p-coumaric acid moiety. The side chain of the coumaric acid is in the E configuration.</p> <p>p-Coumarsäure</p> <p>HO</p> <p>6 Isopreneinheiten des Triterpens</p>
Z-Coumaroyl-Lupeol	 <p>The structure shows a lupeol triterpene skeleton (six isoprene units) esterified to the C-3 position with a p-coumaric acid moiety. The side chain of the coumaric acid is in the Z configuration.</p> <p>p-Coumarsäure</p> <p>HO</p> <p>6 Isopreneinheiten des Triterpens</p>
Heritol	 <p>The structure shows a sesquiterpene skeleton composed of three isoprene units. It features a hydroxyl group and a lactone ring.</p> <p>HO</p> <p>3 Isopreneinheiten des Sesquiterpen</p>

Heritonin	 <p>3 Isopreneinheiten des Sesquiterpen</p>
Vallapin	 <p>3 Isopreneinheiten des Sesquiterpen</p>
β -Sitosterol	 <p>6 modifizierten Isopreneinheiten des Steroids</p>

6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH; Cellular and Molecular Immunology. *Saunders ISBN 0-7216-0008-5*. 2005; **5. Auflage**: 227-231

Achenbach H, Hübner H, Vierling W, Brandt W, Reiter M; Spiganthine, the cardioactive principle of *Spigelia Anthelmia*. *J. Nat. Prod.* 1995; **58**: 1092-1096

Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D; Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006; **54**: 980-985

Alam A, Tsuboi S; Total synthesis of 3,3',4-Tri-O-Methylellagic acid from gallic acid. *Tetrahedron.* 2007; **63**: 10454-10465

Alvarez ME; Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology.* 2000; **44**: 429-442

Aly AH, Edrada-Ebel RA, Dewi Indiani I, Wray V, Müller WEG, Totzke F, Zirrgiebel U, Schächtele C, Kubbutat MHG, Lin WH, Proksch P, Ebel R; Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte *Alternaria* sp. And Their Subsequent Detection in Its Host Plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* 2008; **71**: 972-980

Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T; Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. *The Journal of Cell Biology.* 1998; **140**: 171-182

Aratanechemuge Y, Hibasami H, Sanpin K, Katsuzaki H, Kunio I, Komiya T; Induction of apoptosis by Lupeol isolated from mokumen

(*Gossampinus mala barica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncology Reports*. 2004; **11**: 289-292

Balachandran P; Wei F, Lin RC, Khan IA, Pasco DS; Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: Toxicity in cultured renal epithelial cells. *Kidney International*. 2005; **67**: 1797-1805

Bandaranayake WM; Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*. 1998; **2**: 133-148

Bandaranayake WM; Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*. 2002; **10**: 421-452

Bardelle C, Cross D, Davenport S, Kettle JG, Ko EJ, Leach AG, Mortlock A, Read J, Roberts NJ, Robins P, Williams EJ; Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: Structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines. *Bioorganic & Medicinal Letters*. 2008; **18**: 2776-2780

Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, Kinjo K, Baba S, Takara K; Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe, Rhizophoraceae. *FEBS Journal*. 2007; **274**: 4028-5042

Baumann B, Bohnenstengel F, Siegmund D, Wajant H, Weber C, Herr I, Debatin KM, Proksch P, Wirth T; Rocaglamides are potent inhibitors of NFκB activation in T-cells. *J. Biol. Chem*. 2002; **277**: 44791-44800

Becker HGO, Berger W, Domschke G, Ganghänel E, Faust J, Fischer M, Gentz F, Gewalt K, Gluch R, Mayer R, Müller K, Pavel D, Schmidt H, Schollberg K, Schwetlick K, Seiler E, Zeppenfeld G; Organikum – Organisch-chemisches Grundpraktikum. *Johann Ambrosius Barth ISBN 3-335-00343-8*. 1993; **19. Auflage**: 423-424

-
- Bélanger A, Berney DJF, Borschberg HJ, Brousseau R, Doutheau A, Durand R, Katayama H, Lapalme R, Leturc DM, Liao CC, MacLachlan FN, Maffrand JP, Marazza F, Martino R, Moreau C, Saint-Laurent L, Saintonge R, Soucy P, Ruest L, Deslongchamps P; Total synthesis of ryanodol. *Can. J. Chem.* 1979; **57**: 3348-3354
- Bennani H, Drissi A, Giton F, Kheuang L, Fiet J, Adlouni A; Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and Prevention.* 2007; **31**: 64-69
- Blaskó G, Shieh HL, Pezzuto JM, Cordell GA; ¹³C-NMR spectral assignment and evaluation of the cytotoxic potential of rotenone. *J. Nat. Prod.* 1989; **52**: 1363-1366
- Bringmann G, Holenz J, Wiesen B, Nugroho BW, Proksch P; Dioncophylline A as a Growth-Retarding Agent against the Herbivorous Insect *Spodoptera littoralis*: Structure-Activity Relationships. *J. Nat. Prod.* 1997; **60**: 342-347
- Cabizza M, Angioni A, Melis M, Cabras M, Tuberoso CV, Cabras P; Rotenone and Rotenoids in Cubè Resins, Formulations, and Residues on Olives. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **52**: 288-293
- Calzada F, Alanís AD; Additional Antiprotozoal Flavonol Glycosides of the Aerial Parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research.* 2007; **21**: 78-80
- Casanova H, Ortiz C, Peláez C, Vallejo A, Moreno ME, Acevedo M; Insecticide Formulations Based on Nicotine Oleate Stabilized by Sodium Caseinate. *J. Agric. Food Chem.* 2002; **50**: 6389-6394
- Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S; Betulinic Acid inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein
-

Transkription Factors. *Cancer Res.* 2007; **67**: 2816-2823

Coria C, Almiron W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M, Palacios S; Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Biotechnology.* 2008; **99**: 3066-3070

Coutinho EM; Gossypol: a contraceptive for men. *Contraception.* 2002; **65**: 259-263

Cozza G, Bonvini P, Zorzi E, Poletto G, Pagano MA, Sarno S, Donella-Deana A, Zagotto G, Rosolen A, Pinna LA, Meggio F, Moro S; Identification of Ellagic acid as Potent Inhibitor of Protein Kinase CK2: A Successful Example of a Virtual Screening Application. *J. Med. Chem.* 2006; **49**: 2363-2366

Czech P, Weber K, Dietrich DR; Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat. Toxicol.* 2001; **53**: 103-114

Darios F, Lambeng N, Troadec JD, Michel PP, Ruberg M; Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *Journal of Neurochemistry.* 2003; **84**: 643-654

Da Silva BP, Parente JP; Antiinflammatory Activity of Rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. *Phytother. Res.* 2002; **16**: 87-88

Dewick PM, Haslam E; Phenol Biosynthesis in Higher Plants. *Biochem J.* 1969; **113**: 537-542

DNP – Dictionary of Natural Products – DVD Version 17:1

Donadio AC, Remedi MM, Frede S, Bonacci GR, Chiabrando GA, Pistoresi-

-
- Palencia MC; Decreased expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) is associated with tumor cell spreading *in vivo*. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2002; **19**: 437-444
- Dowling AJ, Daborn PJ, Waterfield NR, Wang P, Streuli CH, French-Constant RH; The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 2004; **6**: 345-353
- Duong NT; Isolation and Structure Elucidation of Insecticidal Secondary Metabolites from *Aglaia* species collected in Vietnam; Dissertation. 2005; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Eck G; Triterpene aus Arten der Gattung *Aglaia* (Meliaceae); Dissertation. 2004; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Elliott M, Janes NF, Jeffs KA, Needham PH, Sawicki RM; New pyrethrin-like esters with high insecticidal activity. *Nature*. 1965; **207**: 938-940
- Falsaperla M, Morgia G, Tartarone A, Ardito R, Romano G; Support Ellagic Acid Therapy in Patients with Hormone Refractory Prostate Cancer (HRPC) on Standard Chemotherapy Using Vinorelbine and Estramustine Phosphate. *European Urology*. 2005; **47**: 449-455
- Fitzpatrick LR, Bostwick JS, Renzetti M, Pendleton RG, Decktor DL; Antiinflammatory effects of various drugs on acetic acid induced colitis in the rat. *Agents Actions*. 1990; **30**: 393-402
- Folgerø T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T, Øian P; Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human Reproduction*. 1993; **8**: 1863-1868
- Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nuñez G,
-

- Krammer PH, Peter ME, Debatin KM; Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res.* 1997; **57**: 4956-4964
- Ganguly T, Khar A; Induction of Apoptosis in human erythroleukemic cell line K562 by Tylophora alkaloids involves release of cytochrome c and activation of caspase-3. *Phytomedicine.* 2002; **9**: 288-295
- Gao W, Lam W, Zhong S, Kaczmarek C, Baker DC, Cheng YC; Novel Mode of Action of Tylophorine Analogs as Antitumor Compounds. *Cancer Res.* 2004; **64**: 678-688
- Gashegu J, Vanmuylder N, Philippon C, Choa-Duterre M, Rooze M, Louryan S; Correlation of HSP110 expression with caspase-3 and -9 during apoptosis induced *in vivo* embryonic exposition to retinoic acid or irradiation in early mouse craniofacial development. *Orthod. Craniofacial. Res.* 2006; **9**: 84-92
- Ge X, Fu YM, Li YQ, Meadows GG; Activation of caspase and cleavage of Bid are required for tyrosine and phenylalanine deficiency-induced apoptosis of human A375 melanoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2002; **403**: 50-58
- Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, Richter C; Ceramide Induces Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; **274**: 6080-6084
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ; Phenolic Constituents, Furans, and Total Antioxidant Status of Distilled Spirits. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**: 3978-3985
- González-Coloma A, Gutiérrez C, Hübner H, Achenbach H, Terrero D,
-

-
- Frage BM; Selective Insect Antifeedant and Toxic Action of Ryanoid Diterpenes. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**: 4419-4424
- Greca MD, Monaco P, Previtiera L; Stigmasterols from *Thypha Latifolia*. *J. Nat. Prod.* 1990; **53**: 1430-1435
- Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Krutmann J; Mitochondrial Cytochrome c Release Mediates Ceramide-induced Activator Protein 2 Activation and Gene Expression in Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; **278**: 47498-47507
- Grether-Beck S, Timmer A, Felsner I, Brenden H, Brammertz D, Krutmann J; Ultraviolet A-Induced Signaling Involves a Ceramide-Mediated Autocrine Loop Leading to Ceramide *De Novo* Synthesis. *J Invest Dermatol.* 2005; **125**: 545-553
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A; Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertility and Sterility.* 2005; **83**: 1106-1112
- Guhling O, Hobl B, Yeats T, Jetter R; Cloning and characterization of a glycol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem on hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2006; **448**: 60-72
- Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Nigg EA; The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature Cell Biology.* 2005; **7**: 1140-1148
- Hąc-Wydro K, Wydro P, Jagoda A, Kapusta J; The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2007; **150**: 22-34
- Hajnóczky G, Csordás G, Madesh M, Pacher P; Control of apoptosis by IP₃ and ryanodine receptor driven calcium signal. *Cell Calcium.* 2000;
-

28: 349-363

Hänzel, Sticher; Pharmakognosie – Phytopharmazie; 8. Auflage; ISBN 3-54-034256-7

Harborne AR, Mumby PJ, Micheli F, Perry CT, Dahlgren CP, Holmes KE, Brumbaugh DR; The Functional Value of Caribbean Coral Reef, Seagrass and Mangrove Habitats to Ecosystem Processes. *Advances in Marine Biology*. 2006; **50**: 57-189

Hasegawa M, Terauchi M, Kikuchi Y, Nakao A, Okubo J, Yoshinaga T, Hiratsuka H, Kobayashi M, Hoshi T; Deprotonation Processes of Ellagic Acid in Solution and Solid States. *Monatshefte für Chemie*. 2003; **134**: 811-821

Hosny MM, Topper CP, Moawad GM, El-Saadany GB; Economic damage threshold of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in Egypt. *Crop Protection*. 1986; **5**: 100-104

Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, Lin CC; Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. *JPET*. 2005; **313**: 333-344

<http://plants.usda.gov/> - United States Department of Agriculture – Natural Resources Conservation Service

Ikekawa N; VI. Sterol metabolism in insects and biosynthesis of ecdysone in the silkworm. *Experientia*. 1983; **39**: 466-472

IUF aktuell 01/2002: Berichtszeitraum 01.01.02-31.03.02

Jefferies PR, Blumenkopf TA, Gengo PJ, Cole LC, Casida JE ; Ryanodine Action at Calcium Release Channels. 1. Importance of Hydroxyl Substituents. *J. Med. Chem*. 1996; **39**: 2331-2338

-
- Jefferies PR, Gengo PJ, Watson MJ, Casida JE; Ryanodine Action at Calcium Release Channels. 2. Relation to Substituents of the Cyclohexane Ring. *J. Med. Chem.* 1996; **39**: 2339-2346
- Jefferies PR, Lam WW, Toia RF, Casida JE; Ryania Insecticide: Structural Assignments of Four Natural 8 α -Hydroxy-10-epiryranoids. *J. Agric. Food Chem.* 1992; **40**: 509-512
- Jefferies PR, Toia RF, Brannigan B, Pessah I, Casida JE; Ryania Insecticide: Analysis and Biological Activity of 10 Natural Ryanoids. *J. Agric. Food Chem.* 1992; **40**: 142-146
- Jones HE, Goddard L, Gee JMW, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, Knowlden JM, Williams S, Wakeling AE, Nicholson RI; Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer.* 2004; **11**: 793-824
- Jung KY, Oh SR, Park SH, Lee IS, Ahn KS, Lee JJ, Lee HK; Anti-complement Activity of Tiliroside from the Flower Buds of *Magnolia fargesii*. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; **21**: 1077-1078
- Kaffarnik F, Heller W, Hertkorn N, Sandermann Jr H; Flavonol 3-O-glycoside hydroxycinnamoyltransferases from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *FEBS Journal.* 2005; **272**: 1415-1424
- Kajikawa M, Yamato KT, Fukuzawa H, Sakai Y, Uchida H, Ohyama K; Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L.. *Phytochemistry.* 2005; **66**: 1759-1766
- Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF; Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Is A Sterol Transfer
-

Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; **273**: 26285-26288

Kandoth PK, Ranf S, Pancholi SS, Jayanty S, Walla MD, Miller W, Howe GA, Lincoln DE, Stratmann JW; Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *PNAS*. 2007; **104**: 12205-12210

Kang KH, Lee KH, Kim MY, Chai KH; Caspase-3-mediated Cleavage of the NF- κ B Subunit p65 and the NH₂ Terminus Potentiates Naphthoquinone Analog-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; **276**: 24638-24644

Kim S, Hwang BY, Su BN, Chai H, Mi Q, Kinghorn AD, Wild R, Swanson SM; Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaia foveolata*, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. *Anticancer Res*. 2007; **27**: 2175-2183

Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Lust JA, Greipp PR, Kumar S; R-(-)-gossypol (AT-101) activates programmed cell death in multiple myeloma cells. *Experimental Hematology*. 2008; **36**: 568-576

Koga K, Taguchi A, Koshimizu S, Suwa Y, Yamada Y, Shirasaka N, Yoshizumi H; Reactive Oxygen Scavenging Activity of Matured Whiskey and Its Active Phenols. *Journal of Food Science*. 2007; **72**: 212-217

Kokpol U, Chavasiri W, Chittawong V, Miles DH; Taraxeryl cis-p-hydroxycinnamate, a novel taraxeryl from *Rhizophora apiculata*. *J. Nat. Prod*. 1990; **53**: 953-955

Kpoviessi DSS, Gdaguidi FA, Gbenou JD, Accrombessi GC, Haddad M,

-
- Moudachirou M, Quetin-Leclercq J; Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and cylindrical isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders. *Electronic Journal of Natural Substances*. 2006; **1**: 12-19
- Krutmann J, Trefzer U; Modulation of the expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human keratinocytes by ultraviolet (UV) radiation. *Springer Semin Immunopathol*. 1992; **13**: 333-344
- Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A, Antonsson B; The Destabilization of Lipid Membranes Induced by the C-terminal Fragment of Caspase 8-cleaved Bid Is Inhibited by the N-terminal Fragment. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; **275**: 22713-22718
- Kushiro T, Shibuya M, Masuda K, Ebizuka Y; Mutational Studies on Triterpene Synthases: Engineering Lupeol Synthase into β -Amyrin Synthase. *J. Am. Soc.* 2000; **122**: 6816-6824
- Labrecque L, Lamy S, Chapus A, Mihoubi S, Durocher Y, Cass B, Bojanowski MW, Gingras D, Béliveau R. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis*. 2005; **26**: 821-826
- Leiter U, Garbe C; Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. **624**: 89-103
- Ley SV, Denholm AA, Wood A; The Chemistry of Azadirachtin. *Natural Products Reports*. 1993; **10**: 109-158
- Li J, Spletter ML, Johnson DA, Wright LS, Svendsen CN, Johnson JA; Rotenone-induced caspase 9/3-independent and -dependent cell death in undifferentiated and differentiated human neural stem cells. *Journal of Neurochemistry*. 2005; **92**: 462-476
-

- Li XC, Elsohly HN, Hufford CD, Clark AM; NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 1999; **37**: 856-859
- Lodeiro S, Xiong Q, Wilson WK, Kolesnikova MD, Onak CS, Matsuda SPT; An Oxidosqualene Cyclase Makes Numerous Products by Diverse Mechanisms: A Challenge to Prevailing Concepts of Triterpene Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; **129**: 11213-11222
- Lodovici M, Raimondi M, Guglielmi F, Gemignani S, Dolara P; Protection against ultraviolet-B-induced oxidative DNA damage in rabbit corneal-derived cells (SIRC) by 4-coumaric acid. *Toxicology* 2003; **184**: 141-147
- Lou X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X; Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell.* 1998; **94**: 481-490
- Lozán JL, Kausch H; Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Pareys Studentexte 74, 2. Auflage, ISBN: 3-8263-3159-1
- Lümmen P; Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1998; **1364**: 287-296
- Marcías FA, Molinillo JMG, Varela RM, Galindo JCG; Review Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Manag. Sci.* 2007; **63**: 327-348
- Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Jiménez-Estrada M, Cruz-Ortega R, Anaya AL; Pentacyclic Triterpenes with Selective Bioactivity from *Sebastiania adenophora* Leaves, Euphorbiaceae. *J. Chem. Ecol.* 2007; **33**: 147-156
- Malini T, Vanithakumari G; Antifertility effects of beta-sitosterol in male
-

-
- albino rats. *J Ethnopharmacol.* 1991; **35**: 149-153
- Manu KA, Kuttan G; Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- κ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *International Immunopharmacology.* 2008; **8**: 974-981
- Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Badnoli S, Bonanomi AG, Stio M; Vitamin D Derivates Induce Apoptosis and Downregulate ICAM-1 Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008; **14**: 597-604
- Matlin SA, Zhou R, Bialy G, Blye RP, Naqvi RH, Lindberg MC; (-)-Gossypol: an active male antifertility agent. *Contraception.* 1985; **31**: 141-149
- Meggio F, Shugar D, Pinna LA; Ribofuranosyl-benzimidazole derivates as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* 1990; **187**: 89-94
- Melchert M, List A; The thalidomide saga. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; **39**: 1489-1499
- Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL; Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental Neurobiology.* 2006; **197**: 275-283
- Miles DH, Chittawong V, Lho DS, Payne AM, de la Cruz AA, Gomez ED, Weeks JA, Atwood JL; Toxicants from mangrove plants, VII. Vallapin and Vallapianin, novel sesquiterpene lactones from the mangrove plant *Heritiera littoralis*. *J. Nat. Prod.* 1991; **54**: 286-289
- Miles DH, Kokpol U, Chittawong V, Santi TP, Kwanjai T, Nguyen C; Mangrove Forests – The Importance of Conservation as a Bioresource for Ecosystem Diversity and Utilization as a Source of
-

Chemical Constituents With Potential Medicinal and Agricultural Value. *Pure Appl. Chem.* **1998**; 70: 2113-2122

Miles DH, Lho DS, de la Cruz AA, Gomez ED, Weeks JA, Atwood JL; Toxicants from Mangrove Plants. 3. Heritol, a Novel Ichthyotoxin from the Mangrove Plant *Heritiera littoralis*. *J. Org. Chem.* 1987; **52**: 2930-2932

Miles DH, Ly AM, Chittawong V, de la Cruz AA, Gomez ED; Toxicants from mangrove plants, VI. Heritonin a new piscicide from the mangrove plant *Heritiera littoralis*. *J. Nat. Prod.* 1989; **52**: 896-898

Millar NS, Denholm I; Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci.* 2007; **7**: 53-66

Moon DO, Kim MO, Choi YH, Kim GY; β -Sitosterol induces G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt yllindrica pathways. *Cancer Letters.* 2008; **264**: 181-191

Moreno JJ; Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and *in vivo* models of inflammation. *Immunopharmacology.* 1993; **26**: 1-9

Mosmann T; Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983; **65**: 55-63

Nascimento IR, Murata AT, Bortoli SA, Lopes LMX; Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. *Pest Manag. Sci.* 2003; **60**: 413-416

Ntsourankoua H, Artaud J; Determination and identification of triterpenic alcohols in borage, blackcurrant and evening primrose oils. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.* 1997; **4**: 147-151

-
- Nugroho BW, Edrada RA, Wray V, Witte L, Bringmann G, Gehling M, Proksch P; An insecticidal Rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry*. 1999; **51**: 367-376
- Nugroho BW; Isolierung und Strukturaufklärung insektizider Naturstoffe aus tropischen Pflanzen der Familie Zingiberaceae und *Aglaia*-Arten (Familie Meliaceae); Dissertation. 1997; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Nyormoi O, Wang Z, Doan D, Ruiz M, McConkey D, Bar-Eli M; Transcription Factor AP-2 α is Preferentially Cleaved by Caspase 6 and Degraded by Proteasome during Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Molecular And Cellular Biology*. 2001; **21**: 4856-4867
- Oh PS, Lim KT; HeLa cells treated with phytolectin [150 kDa] were killed by activation of caspase 3 via inhibitory activities of NF- κ B and AP-1. *Journal of Biomedical Science*. 2007; **14**: 223-232
- Ohse T, Ohba S, Yamamoto T, Koyano T, Umezawa K; Cyclopentabenzofuran Lignan Protein Synthesis Inhibitor from *Aglaia odorata*. *J. Nat. Prod.* 1996; **59**: 650-652
- Oku H, Baba S, Koga H, Takara K, Iwasaki H; Lipid composition of mangrove and its relevance to salt tolerance. *J. Plant Res.* 2003; **116**: 37-45
- Ólafsson E, Buchmayer S, Skov MW; The East African Decapod Crab *Neosarmatium meinerti* (de Man) Sweeps Mangrove Floors Clean of Leaf Litter. *Ambio*. 2002; **31**: 569-573
- Oliver CL, Miranda MB, Shangary S, Land S, Wang S, Johnson DE; (-)-Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl-2- and
-

- Bcl-X_L-mediated apoptosis resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005; **4**: 23-31
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC; EGF-R mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; **304**: 1497-1500
- Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I; In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; **79**: 165-168
- Park C, Moon DO, Rhu CH, Choi BT, Lee WH, Kim GY, Choi YH; β -Sitosterol induces Anti-Proliferation and Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through Activation of Caspase-3 and Induction of Bax/Bcl-2 Ratio. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; **30**: 1317-1323
- Petrescu AD, Gallegos AM, Okamura Y, Strauss JF, Schroeder F; Steroidogenic Acute Regulatory Protein Binds Cholesterol and Modulates Mitochondrial Membrane Sterol Domain Dynamics. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; **276**: 36970-36982
- Poehland BL, Carté BK, Francis TA, Hyland LJ, Allaudeen HS, Troupe N; In vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids. *J. Nat. Prod.* 1981; **50**: 706-713
- Proksch P, Giaisi M, Treiber MK, Palfi K, Merling A, Spring H, Krammer PH, Li-Weber M; Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *J. Immunol.* 2005; **174**: 7075-7084
- Qi X, Cai Y, Gong L, Liu L, Chen F, Xiao Y, Wu X, Li Y, Xue X, Ren J; Role of mitochondrial permeability transition in human renal tubular epithelial cell death induced by aristolochic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; **222**: 105-110
-

-
- Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD; Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *The Plant Journal*. 2004; **39**: 477-486
- Reyes FJ, Centelles JJ, Lupiáñez JA, Cascante M; (2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Letters*. 2006; **580**: 6302-6310
- Rogers EF, Koniuszy FR, Shavel J Jr., Folkers K; Plant Insecticides. I. Ryanodine, A New Alkaloid from *Ryania Speciosa* Vahl.. *J. Am. Chem. Soc.* 1948; **70**: 3086-3088
- Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC; Evidence-based surgical hypothesis – ICAM-1 expression determinates malignant potential of cancer. *Surgery*. 2007; **141**: 705-707
- Römpp Lexikon Naturstoffe; *Thieme*. ISBN: 3-13-749901-1. 1997
- Rosenthal D, Niedermeyer AO, Fried J; Baeyer-Villiger Oxidation of 4-Methylated 3-Keto Steroids and the Facile Pyrolysis of 4,4-Dimethyl 3,4-Seco Lactones. *J. Org. Chem.* 1965; **30**: 510-515
- Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC; Bax oligomerisation in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem. J.* 2002; **368**: 915-921
- Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC; Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 1990; **82**: 1247-1259
- Rozema J, Broekman RA, Blokker P, Meijkamp BB, de Bakker N, van de Staaij J, van Beem A, Ariese F, Kars SM; UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. *Journal*
-

of Phytochemistry and Photobiology B: Biology. 2001; **62**: 108-117

Saha PK, Ganguly T, Ganguly SN, Sircar SM; Rhizophorine, a new indole acid plant growth inhibitor from *Rhizophora mucronata*. *The Plant Biochemical Journal*. 1978; **5**: 65-68

Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Cérda-Nicolás M, Ríos JL; Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*. 2003; **461**: 53-61

Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H; Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*. 2004; **23**: 5203-5214

Saleem M, Kweon MH, Yun JM, Adhami VM, Khan N, Syed DN, Mukhtar H; A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in Xenograft Model. *Cancer Res*. 2005; **65**: 11203-11213

Satdive RK, Fulzele DP, Eapen S; Enhanced production of γ -lindral by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of Biotechnology*. 2007; **128**: 281-289

Schaeffer A, Bronner R, Benveniste P, Schaller H; The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *The Plant Journal*. 2001; **25**: 605-615

Schneider C, Bohnenstengel FI, Nugroho BW, Wray V, Witte L, Hung PD, Kiet LC, Proksch P; Insecticidal γ -lindral derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). *Phytochemistry*. 2000; **54**: 731-736

-
- Schroeder GN, Hilbi H; Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*. *Cellular Microbiology*. 2007; **9**: 265-278
- Sharpe RL, Woodhouse A, Moon TW, Trudeau VL, MacLatchy DL; β -Sitosterol and 17 β -estradiol alter gonadal steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression in goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*. 2007; **151**: 34-41
- Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ; Oncogenic B-RAF^{V600E} inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of BAD and BIM. *J. Biol. Chem*. 2008; **283**: 22128-22135
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB; Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor-kB Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Res*. 2003; **63**: 4375-4383
- Shitan N, Yazaki K; Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2007; **8**: 244-253
- Siegmund B, Leitner E, Pfannhauser W; Determination of the Nicotine Content of Various Edible Nightshades (Solanaceae) and Their Products and Estimation of the Associated Dietary Nicotine Intake. *J. Agric. Food Chem*. 1999; **47**: 3113-3120
- Sies H, Stahl W; Carotenoids and UV Protection. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2004; **3**: 749-752
- Skog S, He Q, Khoshnoud R, Fornander T, Rutqvist LE; Genes Related to Growth Regulation, DNA Repair and Apoptosis in an Oestrogen
-

Receptor-Negative (MDA-231) versus an Oestrogen Receptor-Positive (MCF-7) Breast Tumor Cell Line. *Tumor Biology*. 2004; **25**: 41-47

Skulachev VP; Cytochrome *c* in the apoptotic antioxidant cascades. *FEBS Letters*. 1998; **423**: 275-280

Sligh JE, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL; Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intracellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1993; **90**: 8529-8533

Srivastava SN, Przybylska M; The Crystal Structure of Ryanodol *p*-Bromobenzyl Ether. *Acta Cryst*. 1970; **26**: 707-715

Stipanovic RD, Puckhaber LS, Reibenspies JH, Williams HJ; The absolute configuration of (-)-3-hydroxy- α -calacorene. *Phytochemistry*. 2006; **67**: 1304-1308

Sutko JL, Airley JA, Welch W, Ruest L; The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds. *Pharmacol. Rev*. 1997; **49**: 53-98

Swallow CJ, Ko MA, Siddiqui NU, Hudson JW, Dennis JW; SAK/Plk4 and mitotic fidelity. *Oncogene*. 2005; **24**: 306-312

Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, Tanaka T; Role of the Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome *c* Release in Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis. *Experimentall Cell Research*. 2002; **274**: 16-24

Teixeira JRM, Lapa AJ, Souccar C, Valle JR; Timbós: Ichthyotoxic plants used by brasilian Indians. *J. Ethnopharmacology*. 1984; **10**: 311-318

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Zhi, Beidler DR,

-
- Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM; Yama/CPP32 β , a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitible Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell*. 1995; **81**: 801-809
- Tian Y, Wu J, Zhang S ; Flavonoids from the leaves of *Heritiera littoralis* D.. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 2004; **13**: 214-216
- Van de Stolpe A, van der Saag PT; Intracellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 1996; **74**: 13-33
- Verlaparthi U, Wittman M, Liu P, Stoffan K, Zimmermann K, Sang X, Carboni J, Li A, Attar R, Gottardis M, Greer A, Chang CYY, Jacobsen BL, Sack JS, Sun Y, Langley DR, Balasubramanian B, Vyas D; Discovery and initial SAR of 3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pyridin-2(1*H*)-ones as inhibitors of insulin-like growth factor 1-receptor (IGF-1R). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 2317-2321
- Verotta L, Dell'Agli M, Giolito A, Guerrini M, Cabalion P, Bosisio E; *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Extracts of *Tristanopsis* Species and Identification of the Active Constituents: Ellagic Acid and 3,4,5-Trimethoxyphenyl-(6'-*O*-galloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside. *J. Nat. Prod.* 2001; **64**: 603-607
- Villaseñor IM, Angelada J, Canlas AP, Echegoyen D; Bioactivity Studies on β -Sitosterol and its Glucoside. *Phytotherapy Research*. 2002; **16**: 417-421
- Warchamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E, García-Echeverría C, Hofmann F, Krystal GF; The Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Kinase Inhibitor, NVP-ADW742, Sensitizes Small Cell Lung Cancer Cell Lines to the Effect of Chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2005; **11**: 1563-1571
-

- Waterhouse AL, Holden I, Casida JE; 9,21-Didehydroryanodine: a New Principle Toxic Constituent of the Botanical Insecticide Ryania. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1984; 1265-1266
- Weishaupt C, Munoz KN, Buzney E, Kupper TS, Fuhlbrigge RC; T-Cell distribution and Adhesion Receptor Expression in Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2007; **13**: 2549-2556
- Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD; Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Caspases during Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; **272**: 26056-26061
- Werner AB, de Vries E, Tait SWG, Bontjer I, Borst J; TRAIL Receptor and CD95 Signal to Mitochondria via FADD, Caspase-8/10, Bid, and BAX but Differentially Regulate Events Downstream from Truncated Bid. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002; **277**: 40760-40767
- Williams LAD; *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) Triterpenoids with Insecticidal Activity. *Naturwissenschaften.* 1999; **86**: 450-452
- WO/2006/099930: Patent: Extraction Method for producing plant extracts, especially *Waltheria paniculata* extracts containing tiliroside
<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2006099930&DISPLAY=CLAIMS>
- Woenckhaus C, Giebel J, Failing K, Fenic I, Dittberner T, Poetsch M; Expression of AP-2 α , c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression?. *Journal of Pathology.* 2003; **201**: 278-287
- Wong YY, HO CL, Nguyen PH, Teo SS, Harikrishna JA, Rahim RA, Wong MCVL; Isolation of salinity tolerant genes from the mangrove plant, *Bruguiera cylindrica* by using suppression subtractive hybridization
-

-
- (SSH) and bacterial functional screening. *Aquatic Botany* 2007; **86**: 117-122
- Wu JD, Haugk K, Woodke L, Nelson P, Coleman I, Plymate SR; Interaction of IGF Signaling and the Androgen Receptor in Prostate Cancer Progression. *J. Cell. Biochem.* 2006; **99**: 392-401
- Yang CW, Chen WL, Wu PL, Tseng HY, Lee SJ; Anti-Inflammatory Mechanisms of Phenanthroindolizidine Alkaloids. *Molecular Pharmacology.* 2006; **69**: 749-758
- Yaguchi SI, Fukui Y, Koshimizu I, Yoshimi H, Matsuno T, Gouda H, Hirono S, Yamazaki K, Yamori T; Antitumor Activity of ZSTK474, a New Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor. *J. Nat. Canc. Inst.* 2006; **98**: 545-556
- Zhang M, Liu H, Tian Z, Griffith BN, Li QQ; Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways. *Life Sciences.* 2007; **80**: 767-774
- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D; Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *J. Agric. Food Chem.* 2008; **56**: 670-675
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R; Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2005; **23**: 283-333
- Zhou B, Zhenhua W, Xiaojun L, Zhang J, Xianming H; Analysis of Ellagic Acid in Pomegranate Rinds by Capillary Electrophoresis and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* 2008; **19**: 86-89
-

Zhu J, Zeng X, Yanma, Liu T, Qian K, Han Y, Xue S, Tucker B, Schultz G, Coats J, Rowley W, Zhang A; Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2006; **22**: 515-522

Zhu JY, Lavrik IN, Mahlknecht U, Giarsi M, Proksch P, Krammer PH, Li-Weber M; The traditional Chinese herbal compound rocaglamide preferentially induces apoptosis in leukemia cells by modulation of mitogen-activated protein kinase activities. *Int. J. Cancer.* 2007; **121**: 1839-1846

7. Anhang

7.1. Substanztabellen

In der folgenden Tabelle (Tab. 7.1.a) sind die aus verschiedenen Pflanzen isolierten bioaktiven Substanzen aufgelistet. In der Tabelle sind die Stammpflanzen, das Organ, die ökologische Einordnung, der Substanztyp und der Verwendungszweck hinsichtlich der untersuchten Bioaktivität aufgelistet.

Tab. 7.1.a: Die aus verschiedenen Pflanzen isolierten bioaktiven Substanzen

Name der Substanz	Isoliert aus	Organ	Ökologische Einordnung der Pflanzen	Substanz-Typ	Bioaktivität festgestellt bei	
<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol	<i>Rhizophora apiculata</i>	Blätter	Mangroven	Triterpen-ester	ICAM-1 Inhibition, Insekten	
<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol					ICAM-1 Inhibition Insekten	
<i>Z</i> -Coumaroyl-Taraxerol	<i>Rhizophora stylosa</i>	Blätter			Triterpen	
<i>E</i> -Coumaroyl-Taraxerol						
Taraxerol						
β -Sitosterol	<i>Lumnitzera littorea</i>	Blätter		Steroid	ICAM-1 Inhibition Insekten	
Ellagsäure	<i>Sonneratia alba</i>	Zweige		Diphenol-dilakton	Kinasen, Insekten	
3-Methyl-O-Ellagsäure				Diphenol-dilakton-methyl-ether	Kinasen, Insekten	
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure					Kinasen, Insekten	
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure					Kinasen, Insekten	
Tilirosid	<i>Heritiera littoralis</i>	Blätter	Flavonoid-glycosid			
Heritol		Zweige	Sesqui-terpen-lakton			
Heritonin						
Vallapin						
Didehydroaglaiastatin	<i>Aglaia duppereana</i>	Blüten	Nicht-Mangroven	Alkaloid	Insekten	
Ryanodin	<i>Ryania speciosa</i>	Zweige			Insekten	
9,21-Didehydroryanodin					Insekten	

Weiter wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Triterpene und Sterole semisynthetisch hergestellt. Diese sind mit Art der Derivatisierungsreaktion und dem Verwendungszweck in folgender Tabelle dargestellt (Tab.7.1.b).

Tab. 7.1.b: Semisynthetisch hergestellte Triterpene und Sterole

Name der Substanz	Art der Reaktion	Substanztyp	Bioaktivität untersucht bei
Benzoyl-Lupeol	Benzoylierung	Triterpenester	ICAM-1 Inhibition
Benzoyl- β -Sitosterol		Steroidester	ICAM-1 Inhibition
Benzoyl-Cholesterol		Steroidester	ICAM-1 Inhibition
Zinnamoyl-Lupeol	Zinnamoylierung	Triterpenester	ICAM-1 Inhibition
Zinnamoyl- β -Sitosterol		Steroidester	ICAM-1 Inhibition
Zinnamoyl-Cholesterol		Steroidester	ICAM-1 Inhibition
Acetyl-Lupeol	Acetylierung	Triterpenester	ICAM-1 Inhibition

Weitere Substanzen wurden kommerziell erworben, um sie ebenfalls in verschiedene Bioassays einfließen zu lassen (Tab.7.1.c).

Tab. 7.1.c: Verschiedene für Bioassays kommerziell erworbene Substanzen

Name der Substanz	Bezugsquelle	Verwendungszweck
β -Sitosterol	Fluka	Synthese, ICAM-1 Inhibition, Insekten
2,2'-Dihydroxy-Biphenyl	Fluka	Kinasen, Insekten
2,3-Dihydroxy-Biphenyl	Fluka	Kinasen, Insekten
2-Phenyl-Phenol	Fluka	Kinasen, Insekten
4,4'-Dihydroxy-Biphenyl	Fluka	Kinasen, Insekten
4-Phenyl-Phenol	Fluka	Kinasen, Insekten
5 α -Cholestan	Fluka	ICAM-1 Inhibition
5 α -Cholestan-3 β -ol	Fluka	ICAM-1 Inhibition
Asiatische Säure	Aldrich	ICAM-1 Inhibition
Benzoessäure	Fluka	ICAM-1 Inhibition
Benzoessäuremethylester	Fluka	ICAM-1 Inhibition
Betulinsäure	Aldrich	ICAM-1 Inhibition
Biphenyl-2-Carbonsäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Biphenyl-4,4'-Dicarbonsäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Biphenyl-4-Carbonsäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Campesterol	Sigma	ICAM-1 Inhibition

Cholesterol	Fluka	Synthese, ICAM-1 Inhibition, Insekten
Diphensäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Ellagsäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Lupeol	Sigma	Synthese, ICAM-1 Inhibition, NFκB-Inhibition
Oleanolsäure	Sigma	ICAM-1 Inhibition
<i>p</i> -Coumarsäure	Fluka	ICAM-1 Inhibition
Stigmasterol	Sigma	ICAM-1 Inhibition
Tetramethyl-ellagsäure	Prof. Dr. Wenhan Lin	Kinasen
Ursolsäure	Fluka	ICAM-1 Inhibition NFκB-Inhibition
Zimtsäure	Fluka	Kinasen, Insekten
Zimtsäuremethylester	Fluka	ICAM-1 Inhibition

Da in der institutseigenen Substanzbibliothek weitere Triterpen- und Steroidderivate vorhanden waren, flossen diese ebenfalls in verschiedene Bioassay ein (Tab. 7.1.d).

Tab. 7.1.d: verschiedene Substanzen aus der institutseigenen Substanzbibliothek, die in verschiedene Bioassays eingeflossen sind

Name der Substanz	Herkunft	Verwendungszweck
Cabraleol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Dammarenolsäure	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition, Zytotoxizität
7-Hydroxycholesterol-peroxide	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
14-Dehydroergosterol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
24,25-Dihydroxy-5 α -dammar-20-en-3on	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
4 α ,14-Dimethyl-9,19-cyclocholestan-3 β ,24 α ,25-triol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
(23E)-(20S)-20,25-dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-3-carbonsäure	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition, Zytotoxizität
(20S,23E)-20,25-Dihydroxy-3,4-secodammara-4(28)-23-dien-carbonsäure	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition, Zytotoxizität
24,25-Epoxy-cycloartenol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
24,25-Epoxy-dammar-20-en-3-on	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
5 α ,8 α -epidioxy-24-ethylcholesta-6,22-dien-3 β -ol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
5 α ,8 α -epidioxy-24-ethylcholesta-5-en-3 β -ol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Ergosterol-Peroxid	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
16-Hydroxyscalarolide	Institutseigene	ICAM-1 Inhibition

	Substanzbibliothek	
Lichesterol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Lupeon	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
4 α -Methyl-5 α -Cholesta-8-en-3 β -ol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Methylammarenolat	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition, Zytotoxizität
Niloticin	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
29-Norcycloartenol	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Piscidinol A	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Scalaroside	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition
Shoreasäure (24R) bzw. Eicheriansäure (24S)	Institutseigene Substanzbibliothek	ICAM-1 Inhibition, Zytotoxizität

7.2. Rohdaten der Quantifizierungen

7.2.1. Quantifizierung von Ellagsäurederivaten in Zweigen von *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae)

Tab. 7.2.1.a: Quantitative Analyse der Ellagsäurederivate in Zweigen von *Sonneratia alba* (1)

Frischgewicht = Trockengewicht			
Rinde			
Biomaterial in g		Extrakt in g	in %
1,231		0,1101	8,94%
Holz			
Biomaterial in g		Extrakt in g	in %
3,6854		0,0093	0,25%
Standard:	Ellagsäure		
Konzentration in mg/ml	Fläche	Einspritzvolumen in μ l	
0,1	12463773	20	
auf 10 μ l Einspritzvolumen berechnet:			→ 6231886,5 Pro 0,1 mg
Faktorberechnung wegen Abweichungen des Molekulargewichtes			Faktor
Ellagsäure	302	g/mol	1,00
3-Methyl-O-Ellagsäure	316	g/mol	0,96
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	330	g/mol	0,92
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	344	g/mol	0,88

Formeln zur Berechnung:

mg absolut (faktorbereinigt):

$(\text{Gemessene Fläche bei 2 mg Extrakt pro ml}) * (0,1 \text{ mg}) / (\text{gemessene Fläche bei } 0,1 \text{ mg Ellagsäure bei Einspritzvolumen von } 10\mu\text{l}) * (\text{derivatspezifischer Faktor})$

Prozentualer Anteil im Extrakt:

$(\text{mg absolut im Extrakt (faktorbereinigt)}) / 2 * 100$

Prozentualer Anteil im Biomaterial:

$(\text{prozentualer Anteil im Extrakt}) * (\text{prozentualer Anteil des Extraktes im Biomaterial})$

Tab. 7.2.1.b: Quantitative Analyse der Ellagsäurederivate in Zweigen von *Sonneratia alba* (2)

Rinde				
Konzentration des Extraktes in mg/ml		Einspritzvolumen in μl		
2		10		
	Fläche in 2mg Extrakt/ml	mg absolut (faktorbereinigt)	in % im Extrakt	in % im Biomaterial
Ellagsäure	1366825	0,0219	1,097%	0,09808%
3-Methyl-O-Ellagsäure	209450	0,0032	0,161%	0,01436%
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	1847221	0,0271	1,356%	0,12131%
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	2890226	0,0407	2,036%	0,18208%
Holz				
Konzentration des Extraktes in mg/ml		Einspritzvolumen in μl		
2		10		
	Fläche in 2mg/ml	absolut mg (faktorbereinigt)	in % im Extrakt	in % im Biomaterial
Ellagsäure	594201	0,0095	0,477%	0,00120%
3-Methyl-O-Ellagsäure	214096	0,0033	0,164%	0,00041%
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	2320882	0,0341	1,704%	0,00430%
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	1336536	0,0188	0,941%	0,00238%

Folgendes Substanzverhältnis zwischen Rinde und Kernholz konnte ermittelt werden:

	Rinde		Holz
Ellagsäure	81,5	zu	1
3-Methyl-O-Ellagsäure	34,7	zu	1
3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	28,2	zu	1
3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure	76,6	zu	1

7.2.2. Quantifizierung von Taraxerolderivaten in den Blättern von *Rhizophora stylosa* (Rhizophoraceae)

Tab. 7.2.2.: Berechnung der Quantifizierung von Taraxerolderivaten in *Rhizophora stylosa*

Rückberechnung für Quantifizierung von <i>Rhizophora stylosa</i>			
Spot 1	6,7	mg	54,92%
Spot 2	2,3	mg	18,85%
Spot 3	3,2	mg	26,23%
	12,2	mg	

Zusammensetzung nach Auswertung des ¹ HNMR Spektrums						
Spot 1	Fettsäure(n)	100%				
Spot 2	Fettsäure(n)	70,00 %	Z-Coumaroyl-Taraxerol	30,00 %		
Spot 3	Fettsäure(n)	30,00 %	E-Coumaroyl-Taraxerol	23,33 %	Taraxerol	46,67 %
Fettsäure(n)	9,27	mg	75,98%			
Z-Coumaroyl-Taraxerol	0,69	mg	5,66%			
E-Coumaroyl-Taraxerol	0,75	mg	6,12%			
Taraxerol	1,49	mg	12,24%			
	12,20	mg				

folgende Angaben wurden gemessen:					
			in %		
Frischgewicht (FG)	9,9892	g	100,00 %		
Trockengewicht (TG)	2,4199	g	24,23%		
Kutikula (K)	0,7148	g	7,16%		

Substanzen + Fette der Kutikula (S+F)	0,5440	g	5,45%		
	S+F	K	TG	FG	in ppm (FG)
Fettsäure(n)	75,98%	57,83%	17,08%	4,14%	413,80
Z-Coumaroyl- Taraxerol	5,66%	4,30%	1,27%	0,31%	30,80
E-Coumaroyl- Taraxerol	6,12%	4,66%	1,38%	0,33%	33,33
Taraxerol	12,24%	9,32%	2,75%	0,67%	66,66
Taraxerol- derivate gesamt	24,02%	18,28%	5,40%	1,31%	130,79

7.3. Tabellarische Auflistungen der Insektenbioassayergebnisse

Im Folgenden werden die erhobenen Insektenassaydaten dargestellt, auf denen basierend die Statistiken im Ergebnisteil erstellt wurden. Die Gewichte sind jeweils in mg angegeben.

Tab. 7.3.a: Repellenter Effekt von Ellagsäure in einem Wahl-Versuch

Tab. 7.3.b: Langzeit-Versuch mit Ellagsäure mit einer Konzentration von 20 ppm

Tab. 7.3.c: Verschiedene Versuchsansätze mit verschiedenen Ellagsäurekonzentrationen

Tab. 7.3.d: Insekten Biotest Ergebnisse mit verschiedenen Ellagsäurederivaten

Tab. 7.3.e: β -Sitosterol Langzeitversuch: Gewichte der Kontrollgruppe (Raupen)

Tab. 7.3.f: β -Sitosterol Langzeitversuch: Gewichte der mit 300 ppm β -Sitosterol gefütterten Insekten (Raupen)

Tab. 7.3.g: β -Sitosterol Langzeitversuch: Berechnung der Standardabweichungen

Tab. 7.3.h: β -Sitosterol Langzeitversuch: Auftreten, Messung und statistische Bewertung der Puppen und der Puppengewichte

- Tab. 7.3.i: β -Sitosterol Langzeitversuch: Durchschnittliche Entwicklungsdauer vom Schlüpfen bis zur Verpuppung, vom Schlüpfen bis zum Falter und statistische Bewertung der Ergebnisse
- Tab. 7.3.j: β -Sitosterol Langzeitversuch: Frischgewichte der toten Falter und statistische Bewertung dieser Ergebnisse
- Tab. 7.3.k: β -Sitosterol Langzeitversuch: Zeit und Menge der Eiablage in mg sowie der Anzahl der geschlüpften Neonates
- Tab. 7.3.l: Bioaktivitätsvergleich zwischen β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan
- Tab. 7.3.m: Bioaktivitätsvergleich zwischen *Z*- und *E*-Coumaroyl-Lupeol
- Tab. 7.3.n: Bioassaydaten von Didehydroaglaiastatin bei verschiedenen Konzentrationen
- Tab. 7.3.o: Bioassaydaten von Ryanodin bei verschiedenen Konzentrationen
- Tab. 7.3.p: Bioassaydaten von 9,21-Didehydroryanodin bei verschiedenen Konzentrationen
- Tab. 7.3.q: Bioassaydaten von Heritol, Heritonin und Vallapin bei einer Konzentration von 215 ppm

Tab. 7.3.a: Repellenter Effekt von Ellagsäure in einem Wahl-Versuch

		ursprüngliches Gewicht eines Futterstückes:		754,55
		Verum	Placebo	Verhältnis zwischen den verzehrten Gewichten (Verum/Placebo)
20 ppm	restliches Gewicht	683,61	677,66	1,08
	verzehrtes Gewicht	70,94	76,89	
40 ppm	restliches Gewicht	635,67	728,22	0,22
	verzehrtes Gewicht	118,88	26,33	
60 ppm	restliches Gewicht	705,15	658,24	1,95
	verzehrtes Gewicht	49,4	96,31	
80 ppm	restliches Gewicht	705,72	659,72	1,94
	verzehrtes Gewicht	48,83	94,83	
100 ppm	restliches Gewicht	721,08	668,31	2,58
	verzehrtes Gewicht	33,47	86,24	

Tab. 7.3.b: Langzeit-Versuch mit Ellagsäure mit einer Konzentration von 20 ppm

30 Neonates als Kontrollgruppe		
30 Neonates mit 20 ppm Ellagsäure		
	Kontrollgruppe	20 ppm Ellagsäure
Überlebende	22	20
Gesamtgewicht in mg	15,07	8,62
Durchschnittsgewicht in mg	0,68	0,43
Überlebensrate	100	91
Gewichtsrate	100	63

Tab. 7.3.c: Verschiedene Versuchsansätze mit verschiedenen Ellagsäurekonzentrationen

	Kontrollgruppe	108 ppm	215 ppm	323 ppm
1	26,1	5	2,1	1,2
2	21,5	8,3	1,6	1,4
3	10,2	10,2	1,94	1,41
4	12,9	5,3	2,6	1,2
5	20,8	9	1,9	1,9
6	5,2	8,2	1,5	
7	23	9,3	2,9	
8	28,6	6,1	1,3	
9	19,8	5,5	0,6	
10	16	2,75	1,5	
Anzahl der Überlebenden	10	10	10	5
Durchschnittsgewicht	18,4	7,0	1,8	1,4
Standardabweichung	7,30	2,37	0,66	0,29
Standardabweichung des Mittelwertes	2,31	0,75	0,21	0,13
Gewichtsrate	100,00	37,83	9,74	7,72
Überlebensrate	100,00	100,00	100,00	50,00
T-Test zur Kontrolle		4,72	7,17	7,36
T-Test Signifikanz				
>99%	2,878	+++	+++	+++
>98%	2,552	+++	+++	+++
>95%	2,101	+++	+++	+++

Tab. 7.3.d: Insekten Biotest Ergebnisse mit verschiedenen Ellagsäurederivaten

	Kontrollgruppe	Ellagsäure	3-Methyl-O-Ellagsäure	3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure	3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure
	29,5				
	15,7				
	18,2				
	20,3				

Tab. 7.3.f: β -Sitosterol Langzeitversuch: Gewichte der mit 300 ppm β -Sitosterol gefütterten Insekten (Raupen)

300 ppm β -Sitosterol	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16	Tag 17	Tag 18	Tag 19	Tag 20	Tag 21
1	1,5	1,3	5	9,6	19,4	47,9	61,9	160,1	271,1	316,5						
2	4,2	1,6	10,8	15,4	46,1	48,3	175,8	274,7	325,9	727,5	707,2	601,5	513,6			
3	7,6	3,7	12,2	42,5	49,3	133,5	299,8	344,5	677,8	1307,2	1118,2	1115,9	557,1	525,7		
4	8,7	8,6	27,6	63,2	103	265,4	342,9	469,8	898,2	1330,5	1408,3	1257,2	567,3	625,2		
5	8,8	10,7	28,3	63,7	115,8	274,3	351,8	517,5	1032,4	1392,4	1553,8	1526,6	1139,8	522,1	595,2	
6	9,5	12,2	31	66,6	129,8	286,5	362,7	549,7	1062,6	1438,7	1691,3	1657,8	1195,2	549,1	496,5	
7	10,5	12,6	31	67,3	138,5	292,9	362,8	557,7	1099,5	1474,9	1695,7	1749,7	1246,8	1525	534,7	
8	10,9	13,2	32,4	68,4	146,2	296,6	395,2	560,4	1106,8	1496,2	1729	1751,1	1353,6	551,5	1001,5	
9	14,6	14,5	46,9	68,9	216,1	357,5	496,6	1038,3	1572,8	1770,9	1802,7	1812,6	1458,5	1103,2	578,2	494,1
10	17	30,8	69,7	168,6	399,7	365	1035,9	1564,3	1977,2	1910,1	1855,3	2001,5	1726,8	504	522,4	462
Mittelwert	9	11	29	63	136	237	389	604	1002	1316	1507	1497	1084	738	621	478
Stabw	4,5	8,5	18,8	43,2	108,9	117,5	257,2	410,4	517,4	469,5	375,9	435	438,5	374,6	189,7	22,7
SEM	1,4	2,7	5,9	13,7	34,4	37,2	81,3	129,8	163,6	148,5	125,3	145	146,2	124,9	63,2	7,6
% Gew.	49,1	40,9	37,1	51,2	43,4	57,4	56,8	48,6	61,2	71,7	96,2	201,1	186,4	126,4	-	-

Tab. 7.3.g: β -Sitosterol Langzeitversuch: Berechnung der Standardabweichungen

	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16	Tag 17	Tag 18	Tag 19
Signifikanz T-Test	5,31	3,78	6,94	3,15	4,39	4,48	2,96	4,58	3,72	3,28	0,27	4,5	3,6	1,26
mit p >99% signifikant	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
2,878														
mit p >98% signifikant	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
2,552														
mit p >95% signifikant	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
2,101														

Tab. 7.3.h: β -Sitosterol Langzeitversuch: Auftreten, Messung und statistische Bewertung der Puppen und der Puppengewichte

Kontrollgruppe	Tag 18	Tag 19	Tag 20
1	505,6	534,8	505,0
2	557,1	515,1	638,6
3		584,5	
4		542,5	
5		613,3	
6		542,2	
7			
8			
9			
10			
Anzahl der Puppen	2,0	6,0	2,0
Mittelwert	531,4	555,4	571,8
Stabw	36,4	36,3	94,5

SEM	11,5	11,5	29,9		
% Gew.	100,0	100,0	100,0		
300 ppm β -Sitosterol	Tag 18	Tag 19	Tag 20	Tag 21	Tag 22
1		539,8	504,8	590,6	460,5
2			467,1	494,2	480,4
3				507,5	
4				516,7	
5					
6					
7					
8					
9					
10					
Anzahl der Puppen					
Mittelwert		539,8	486,0	527,3	470,5
Stabw			26,7	43,2	14,1
SEM			8,9	14,4	4,7
% Gew.		97,2	85,5	-	-
T-Test zur Kontrolle	2,45962099				
mit p >99% signifikant	---				
2,878					
mit p >98% signifikant	---				
2,552					
mit p >95% signifikant	+++				
2,101					

Tab. 7.3.i: β -Sitosterol Langzeitversuch: Durchschnittliche Entwicklungsdauer vom Schlüpfen bis zur Verpuppung, vom Schlüpfen bis zum Falter und statistische Bewertung der Ergebnisse

Durchschnittliche Entwicklungszeit bis zur Verpuppung in Tagen		
	Kontrollgruppe	300 ppm β -Sitosterol
	18,0	19,0
	18,0	20,0
	19,0	20,0
	19,0	21,0
	19,0	21,0
	19,0	21,0
	19,0	21,0
	19,0	22,0
	20,0	22,0
	20,0	
Mittelwert	19,0	20,8
Stabw	0,7	1,0
SEM	0,2	0,3
Durchschnittliche Entwicklungszeit zum Falter in Tagen		
	Kontrollgruppe	300 ppm β -Sitosterol
	27,0	27,0
	27,0	29,0
	27,0	29,0
	27,0	29,0

	28,0	29,0	
	28,0	29,0	
	28,0	30,0	
	29,0	31,0	
	29,0	31,0	
	30,0		
Mittelwert	28,0	29,3	
Stabw	1,1	1,2	
SEM	0,3	0,4	
Entwicklungszeit (in Tagen)		bis Puppe	bis Falter
T-Test zur Kontrolle		4,77	2,60
mit p >99% signifikant		+++	---
2,878			
mit p >98% signifikant		+++	+++
2,552			
mit p >95% signifikant		+++	+++
2,101			

Tab. 7.3.j: β -Sitosterol Langzeitversuch: Frischgewichte der toten Falter und statistische Bewertung dieser Ergebnisse

Frischgewichte der toten Falter		
	Kontrollgruppe	300 ppm β -Sitosterol
	186,2	75,1
	133,5	130,9
	203,6	114,8
	145,5	93,7
	163,3	115,8
	274	146,8
	189,1	128,5
	185,3	170,3
	174,7	140,4
	177,9	
Mittelwert	183,31	124,03
Stabw	38,15	28,42
SEM	12,06	8,99
%Gew	100,00	67,66
%Überlebende	100,00	70,00
T-Test zur Kontrolle		3,94
T-Test Signifikanz		
>99%	2,878	+++
>98%	2,552	+++
>95%	2,101	+++

Tab. 7.3.k: β -Sitosterol Langzeitversuch: Zeit und Menge der Eiablage in mg sowie der Anzahl der geschlüpften Neonates

Eiablage								Vergleich
Kontrollgruppe	Tag 30	Tag 31	Tag 32	Tag 33	Tag 34	Tag 35	Tag 36	
mg Eier	42,75	57,61	139,63	128,4	62,27	16,98	49,07	

Neonates	26	260	390	300				
wann geschlüpft	Tag 35	Tag 34	Tag 35	Tag 36				
akkumuliert mg Eier		100,36	239,99	368,39	430,66	447,64	496,71	100%
akkumuliert Neonates	26	286	676	976	976	976	976	100%
300 ppm β -Sitosterol	Tag 30	Tag 31	Tag 32	Tag 33	Tag 34	Tag 35	Tag 36	
mg Eier			28,87	9,58	45,48	53,92	77,38	
Neonates					1	2		
wann geschlüpft					Tag 36	Tag 36		
akkumuliert mg Eier			28,87	38,45	83,93	137,85	215,23	43,3%
akkumuliert Neonates					1	3	3	0,31%

Tab. 7.3.l: Bioaktivitätsvergleich zwischen β -Sitosterol, Cholesterol, 5α -Cholestan- 3β -ol und 5α -Cholestan

	Kontrollgruppe	β -Sitosterol	Cholesterol	5α -Cholestan- 3β -ol	5α -Cholestan
	18,6	7,6	5,3	18,1	3,7
	19,5	4,6	11,5	6	1,5
	18,4	12,6	13,8	13,4	8,8
	14	12,3	11,5	8,9	2,1
	12,3	12	3,1	8,4	2,2
	14	5,9	14,8	10,4	5,4
	16,3	8,9	12,8	7,1	5,9
	14,8	15	17,6		5,5
	14,2	10,2	12,2		1,3
	13,8	12,9			
Mittelwert	15,6	10,2	11,4	10,3	4,0
Stabw	2,46	3,37	4,53	4,18	2,53
SEM	0,78	1,06	1,43	1,32	0,80
%Gew	100	65	73	66	26
T-Test zur Kontrolle		4,09	2,57	3,43	10,34
T-Test Signifikanz					
>99%	2,878	+++	---	+++	+++
>98%	2,552	+++	+++	+++	+++
>95%	2,101	+++	+++	+++	+++

Tab. 7.3.m: Bioaktivitätsvergleich zwischen *Z*- und *E*-Coumaroyl-Lupeol

	Kontrollgruppe	<i>Z</i> -Coumaroyl-Lupeol	<i>E</i> -Coumaroyl-Lupeol
	11,55	8,6	5,8

	8,7	5,72	4
	8,7	6,5	4,3
	10,3	9,4	2,84
	12,6	8,7	5,7
	8,6	2,5	4,5
	6,7	4,3	
	5		
	7,2		
Mittelwert	8,8	6,5	4,5
Stabw	2,39	2,55	1,11
SEM	0,76	0,81	0,35
%Gew	100	74	51
T-Test zur Kontrolle		2,07	5,15
T-Test Signifikanz			
>99%	2,878	---	+++
>98%	2,552	---	+++
>95%	2,101	---	+++

Tab. 7.3.n: Bioassaydaten von Didehydroaglaistatin bei verschiedenen Konzentrationen

	Kontrollgruppe	5,5 ppm	11 ppm	22 ppm
	13,90	0,19	0,13	0,06
	12,70	0,21	0,23	
	12,50	0,11	0,24	
	16,40	0,25		
	14,60	0,30		
	10,40	0,22		
	10,60	0,17		
	10,80	0,19		
	15,20			
	14,80			
Mittelwert	13,19	0,21	0,20	0,06
Stabw	2,12	0,06	0,06	
SEM	0,67	0,02	0,02	
%Gew	100,00	1,55	1,52	0,55
%Überlebende	100,00	80,00	30,00	10,00
T-Test zur Kontrolle		19,39	19,39	19,61
T-Test Signifikanz				
>99%	2,878	+++	+++	+++
>98%	2,552	+++	+++	+++
>95%	2,101	+++	+++	+++

Tab. 7.3.o: Bioassaydaten von Ryanodin bei verschiedenen Konzentrationen

	Kontrollgruppe	0,22 ppm	1,1 ppm	2,2 ppm	11 ppm	22 ppm
	12,30	12,60	12,60	6,00	2,50	0,40

	10,60	10,10	10,30	10,60	1,10	0,40
	11,20	11,20	11,30	8,30	0,40	0,30
	12,40	10,80	10,60	10,50	1,30	0,10
	12,90	15,30	15,30	7,20	0,50	0,20
	8,80	12,70	12,10	1,70	0,20	0,20
	10,90	17,50	17,50	2,00	0,30	
	12,00	12,10	12,10	6,40		
	10,70	14,70	13,60			
	14,20	11,30	11,30			
Mittelwert	11,60	12,83	12,67	6,59	0,90	0,27
Stabw	1,49	2,32	2,25	3,38	0,82	0,12
SEM	0,47	0,73	0,71	1,07	0,26	0,04
%Gew	100,00	110,60	109,22	56,79	7,76	2,30
%Überlebende	100,00	100,00	100,00	80,00	70,00	60,00
T-Test zur Kontrolle		1,41	1,25	4,29	19,88	23,94
T-Test Signifikanz						
>99%	2,878	---	---	+++	+++	+++
>98%	2,552	---	---	+++	+++	+++
>95%	2,101	---	---	+++	+++	+++

Tab. 7.3.p: Bioassaydaten von 9,21-Didehydroryanodin bei verschiedenen Konzentrationen

	Kontroll- gruppe	0,22 ppm	1,1 ppm	2,2 ppm	11 ppm	22 ppm
	12,30	13,70	6,40	8,00	0,60	0,50
	10,60	10,50	4,60	13,40	0,20	0,40
	11,20	8,50	5,30	4,80	0,50	
	12,40	5,60	5,00	9,80		
	12,90	5,90	7,10	10,30		
	8,80	7,60	4,40	14,40		
	10,90	5,00		10,50		
	12,00	3,10		6,60		
	10,70	2,60		7,70		
	14,20	2,50				
Mittelwert	11,60	6,50	5,47	9,50	0,43	0,45
Stabw	1,49	3,64	1,07	3,10	0,21	0,07
SEM	0,47	1,15	0,34	0,98	0,07	0,02
%Gew	100,00	56,03	47,13	81,90	3,74	3,88
%Überlebende	100,00	100,00	60,00	90,00	30,00	20,00
T-Test zur Kontrolle		4,10	10,58	1,93	23,44	23,60
T-Test Signifikanz						
>99%	2,878	+++	+++	---	+++	+++
>98%	2,552	+++	+++	---	+++	+++
>95%	2,101	+++	+++	---	+++	+++

Tab. 7.3.q: Bioassaydaten von Heritol, Heritonin und Vallapin bei einer Konzentration von 215 ppm

	Kontroll- gruppe	215 ppm Heritol	215 ppm Heritonin	215 ppm Vallapin
	33,00	19,50	10,70	15,20
	38,20	20,60	9,10	32,20
	38,20	21,00	16,60	31,20
	25,00	29,00	4,90	28,40
	37,10	22,50	41,30	30,50
	25,10	20,00	14,30	50,70
	51,30	14,30	14,50	39,40
	30,80	17,90	14,60	16,00
	31,00	18,20	14,10	28,60
	34,70	20,10	15,90	30,10
Mittelwert	34,44	20,31	15,60	30,23
Stabw	7,62	3,77	9,71	10,23
SEM	2,41	1,19	3,07	3,24
%Gew	100,00	58,97	45,30	87,78
%Überlebende	100,00	100,00	100,00	80,00
T-Test zur Kontrolle		5,25	4,83	1,04
T-Test Signifikanz				
>99%	2,878	+++	+++	---
>98%	2,552	+++	+++	---
>95%	2,101	+++	+++	---

Tab. 7.3.r: Bioassaydaten für den ersten Testscreen (verschiedene Mangrovenarten und Organe) mit mathanolischen Extrakten bei 2200 ppm

	Anzahl der Raupen	mg gesamt	mg pro Raupe	Überlebensrate	Gewichtsrate
Kontrolle	18,50	93,66	5,06	100,00	100,00
<i>Avicennia marina</i> Blätter	16,00	14,44	0,90	86,49	17,83
<i>Rhizophora apiculata</i> Blätter	16,00	15,87	0,99	86,49	19,59
<i>Lumnitzera littorea</i> Blätter	19,00	20,60	1,09	102,70	21,48
<i>Lumnitzera littorea</i> Zweige	19,00	20,77	1,09	102,70	21,59
<i>Sonneratia ovata</i> Blätter	18,00	22,11	1,23	97,30	24,26
<i>Sonneratia alba</i> Zweige	16,00	20,23	1,26	86,49	24,97
<i>Rhizophora mucronata</i> Zweige	18,00	23,12	1,28	97,30	25,37
<i>Rhizophora mucronata</i> Blätter	17,00	25,24	1,48	91,89	29,33
<i>Laguncularia racemosa</i> Zweige	18,00	28,45	1,58	97,30	31,22
<i>Barringtonia racemosa</i> Blätter	17,00	28,23	1,66	91,89	32,80
<i>Sonneratia alba</i> Blätter	17,00	28,95	1,70	91,89	33,64
<i>Sonneratia ovata</i> Zweige	14,00	26,47	1,89	75,68	37,35
<i>Lumnitzera racemosa</i> Blätter	17,00	32,70	1,92	91,89	37,99
<i>Laguncularia racemosa</i> Blätter	18,00	43,99	2,44	97,30	48,27
<i>Kandelia candel</i> Blätter	19,00	47,35	2,49	102,70	49,22
<i>Lumnitzera racemosa</i> Zweige	18,00	50,39	2,80	97,30	55,30
<i>Xylocarpus granatum</i> Blätter	20,00	74,15	3,71	108,11	73,23
<i>Bruguiera sexangula</i> Blätter	20,00	80,49	4,02	108,11	79,49
<i>Pluchea indica</i> Zweige	16,00	65,79	4,11	86,49	81,22

<i>Sonneratia caseolaris</i> Blätter	17,00	77,96	4,59	91,89	90,58
<i>Bruguiera sexangula</i> Zweige	18,00	83,86	4,66	97,30	92,02
<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> Blätter	19,00	93,68	4,93	102,70	97,39
<i>Pluchea indica</i> Blätter	18,00	93,30	5,18	97,30	102,38
<i>Rhizophora apiculata</i> Zweige	17,00	88,68	5,22	91,89	103,04
<i>Xylocarpus granatum</i> Zweige	18,00	97,12	5,40	97,30	106,57
<i>Kandelia candel</i> Zweige	17,00	92,31	5,43	91,89	107,25
<i>Avicennia marina</i> Zweige	19,00	103,49	5,45	102,70	107,59

7.4. NMR Spektren

7.4.1. NMR Spektren der Ellagsäurederivate

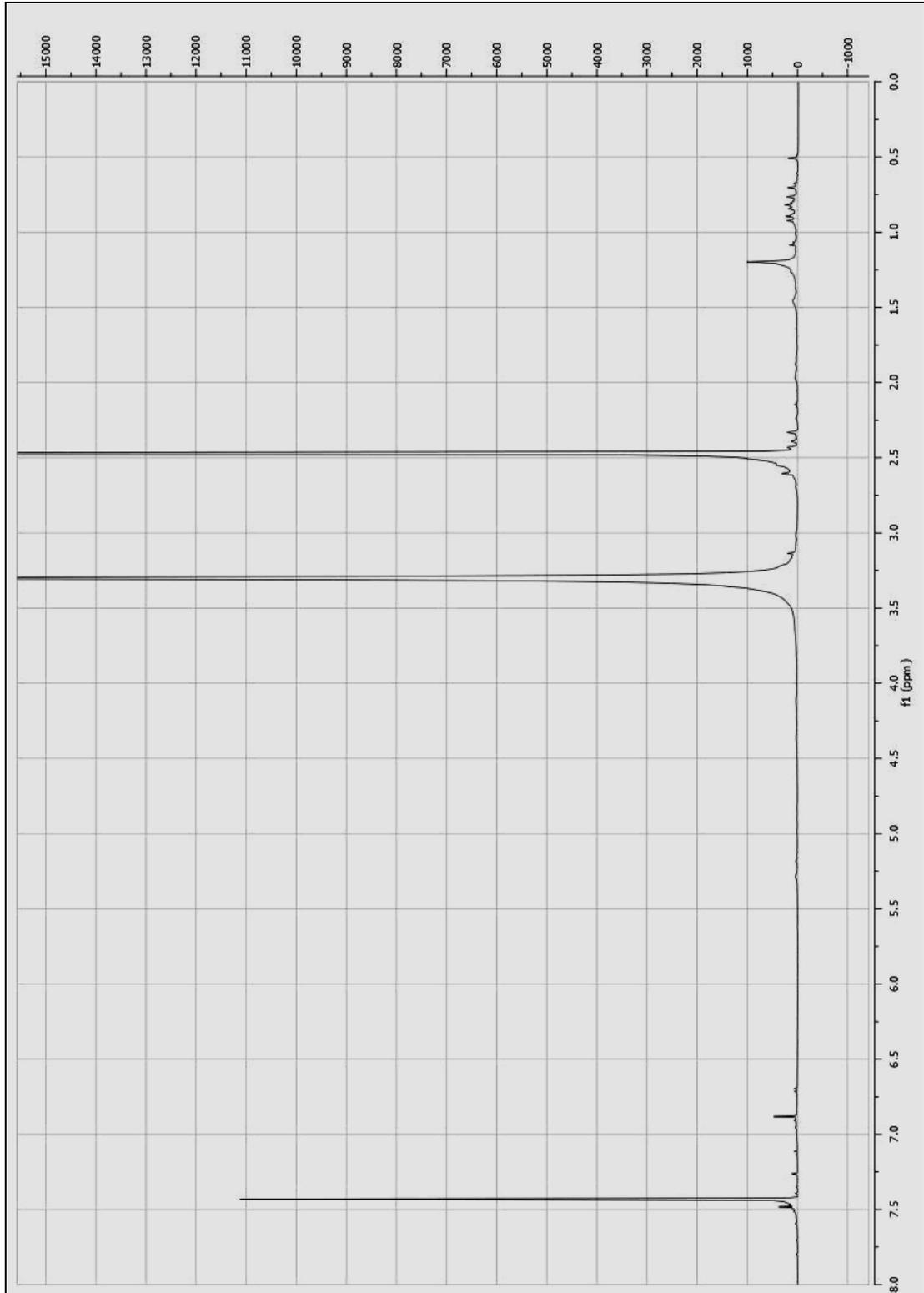


Abb. 7.4.1.a: ^1H NMR Spektrum von Ellagsäure in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.1.1.a)

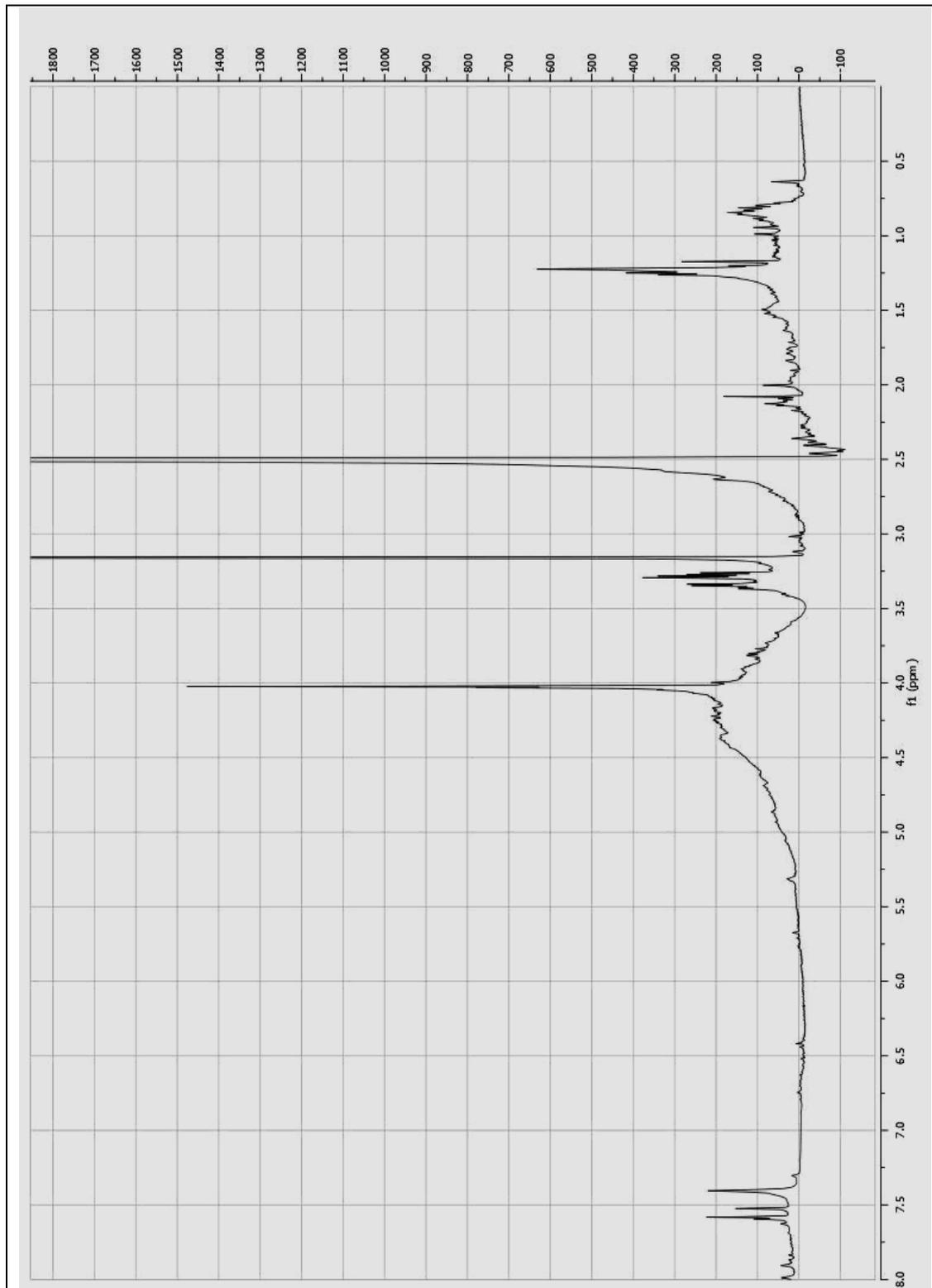


Abb. 7.4.1.b: ^1H NMR Spektrum von 3-Methyl-O-Ellagsäure in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.1.1.a)

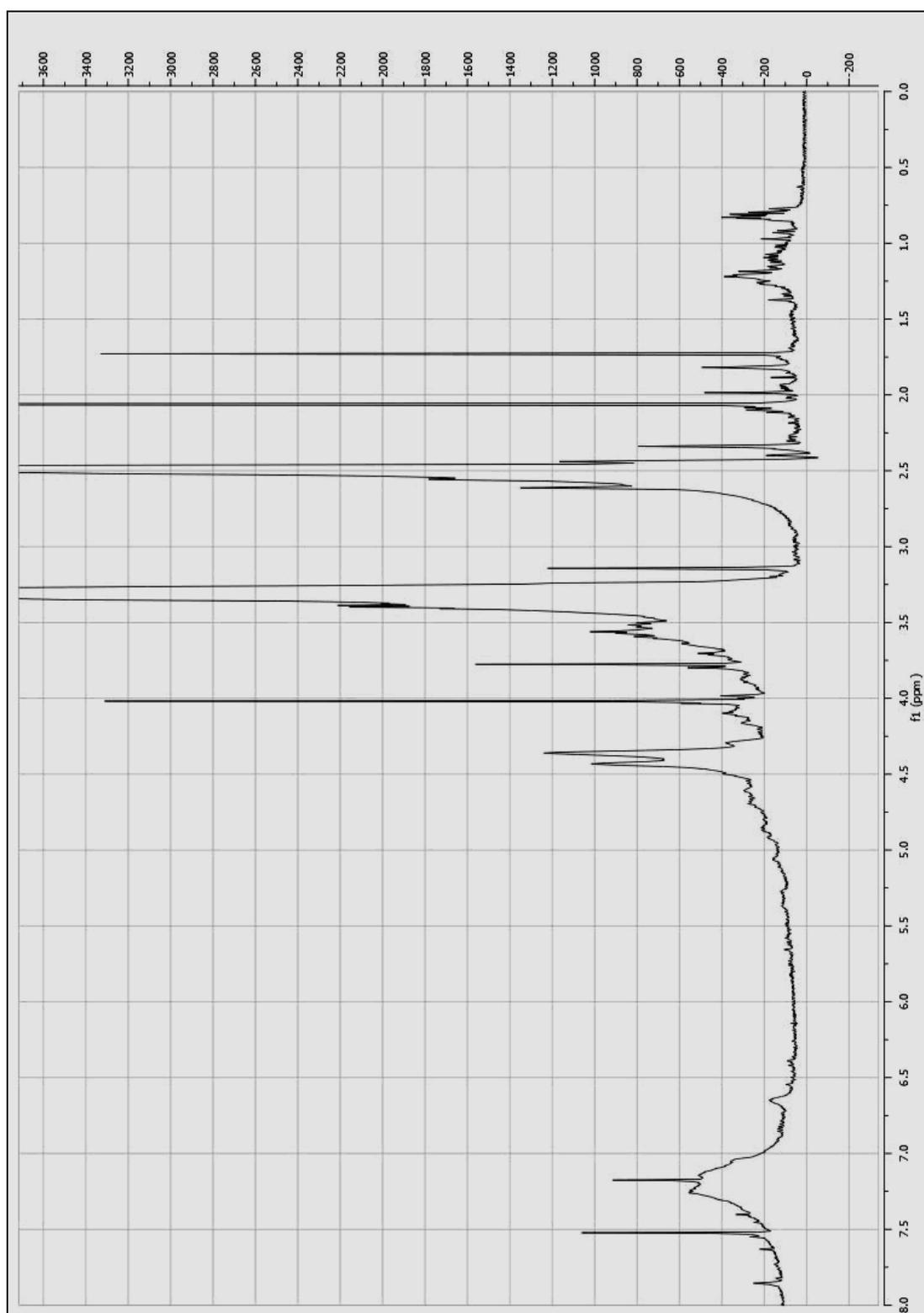


Abb. 7.4.1.c: ^1H NMR Spektrum von 3,3'-Di-O-Methyl-Ellagsäure in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.1.1.a)

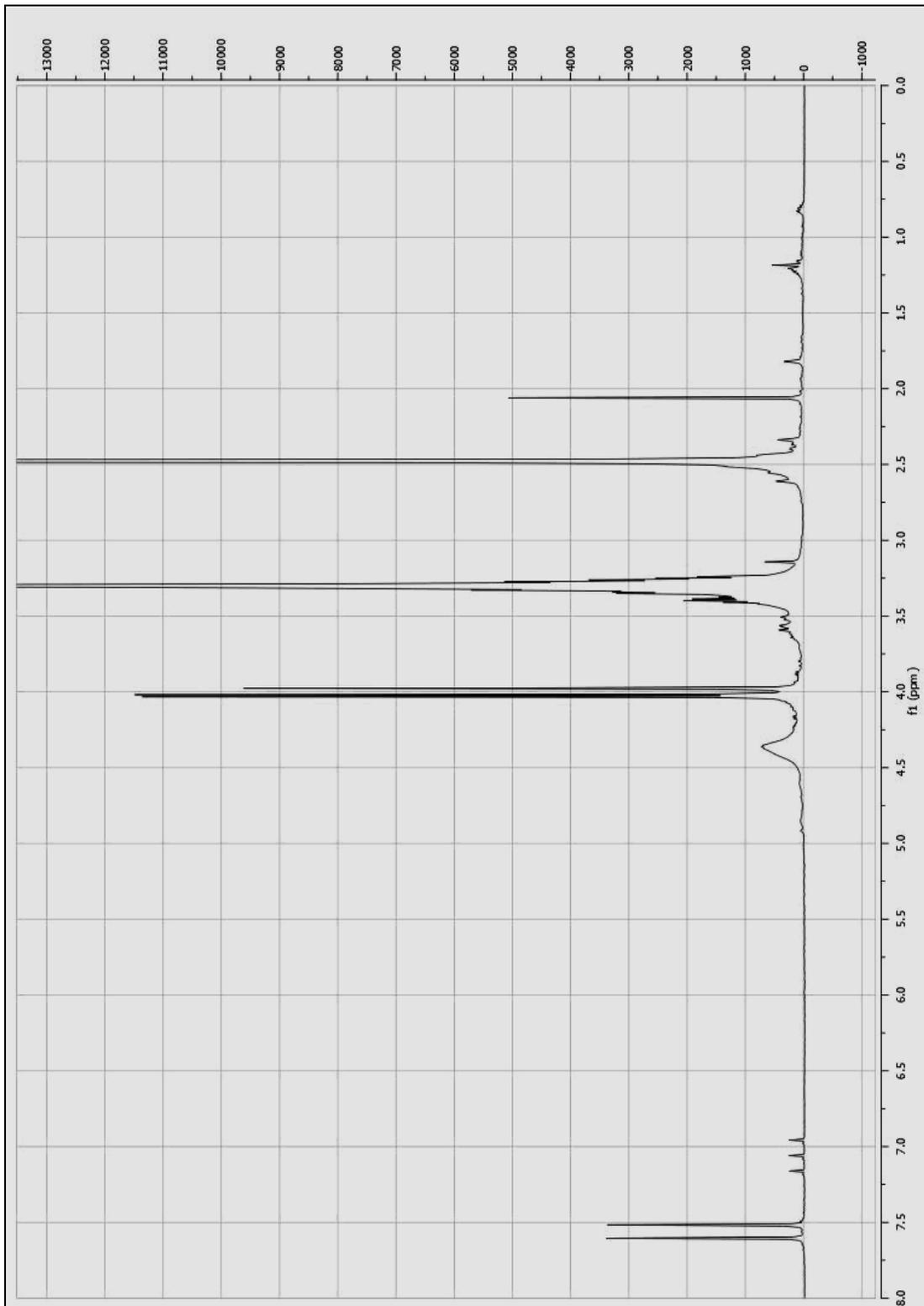


Abb. 7.4.1.d: ^1H NMR Spektrum von 3,3',4-Tri-O-Methyl-Ellagsäure in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.1.1.a)

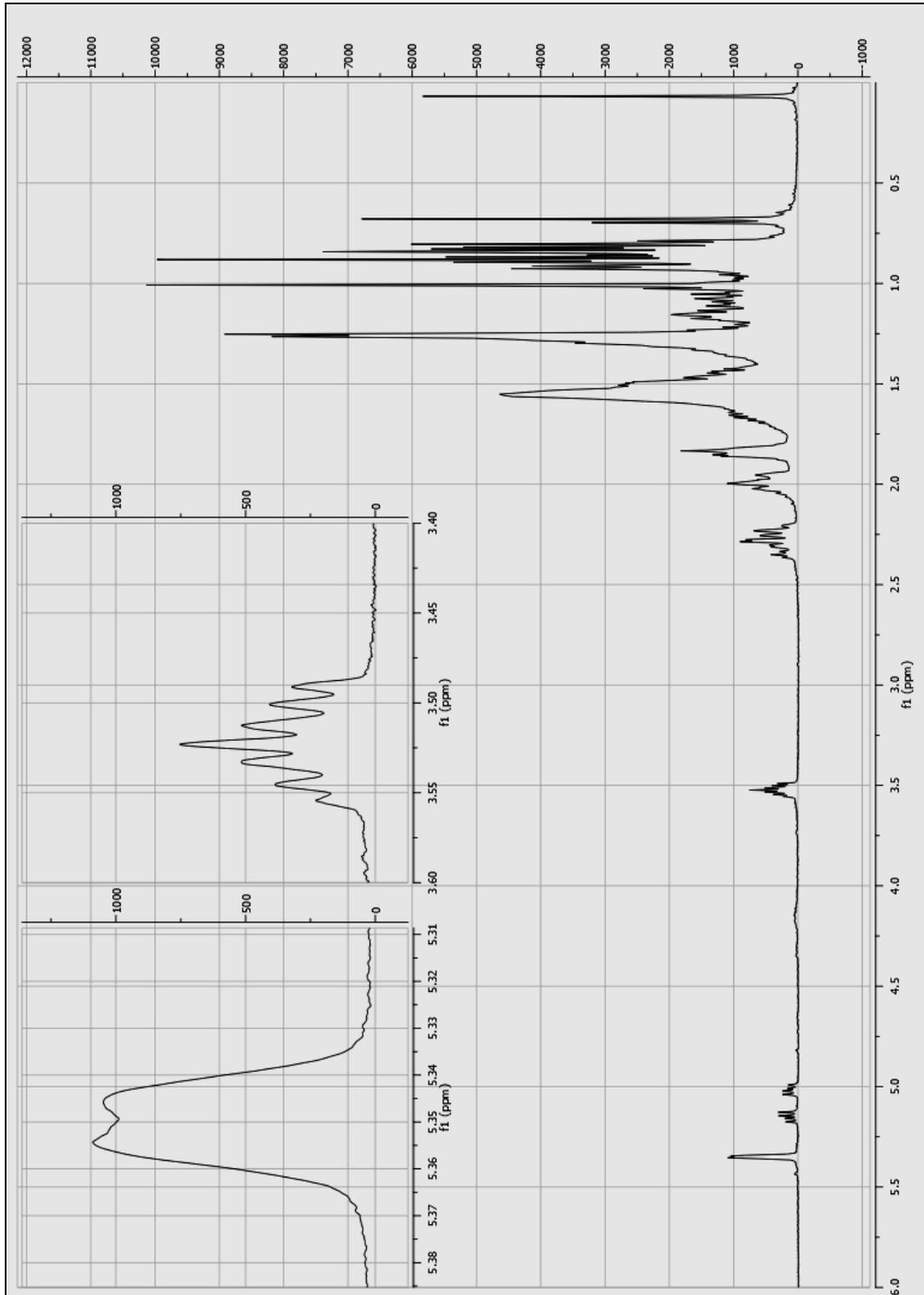
7.4.2. NMR Spektrum von β -Sitosterol

Abb. 7.4.2.: ^1H NMR Spektrum von β -Sitosterol in $\text{DMSO-}d_6$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.2.1.a)

7.4.3. NMR Spektren von *Z*-Coumaroyl-Lupeol, *E*-Coumaroyl-Lupeol, *Z*-Coumaroyl-Taraxerol und *E*-Coumaroyl-Taraxerol

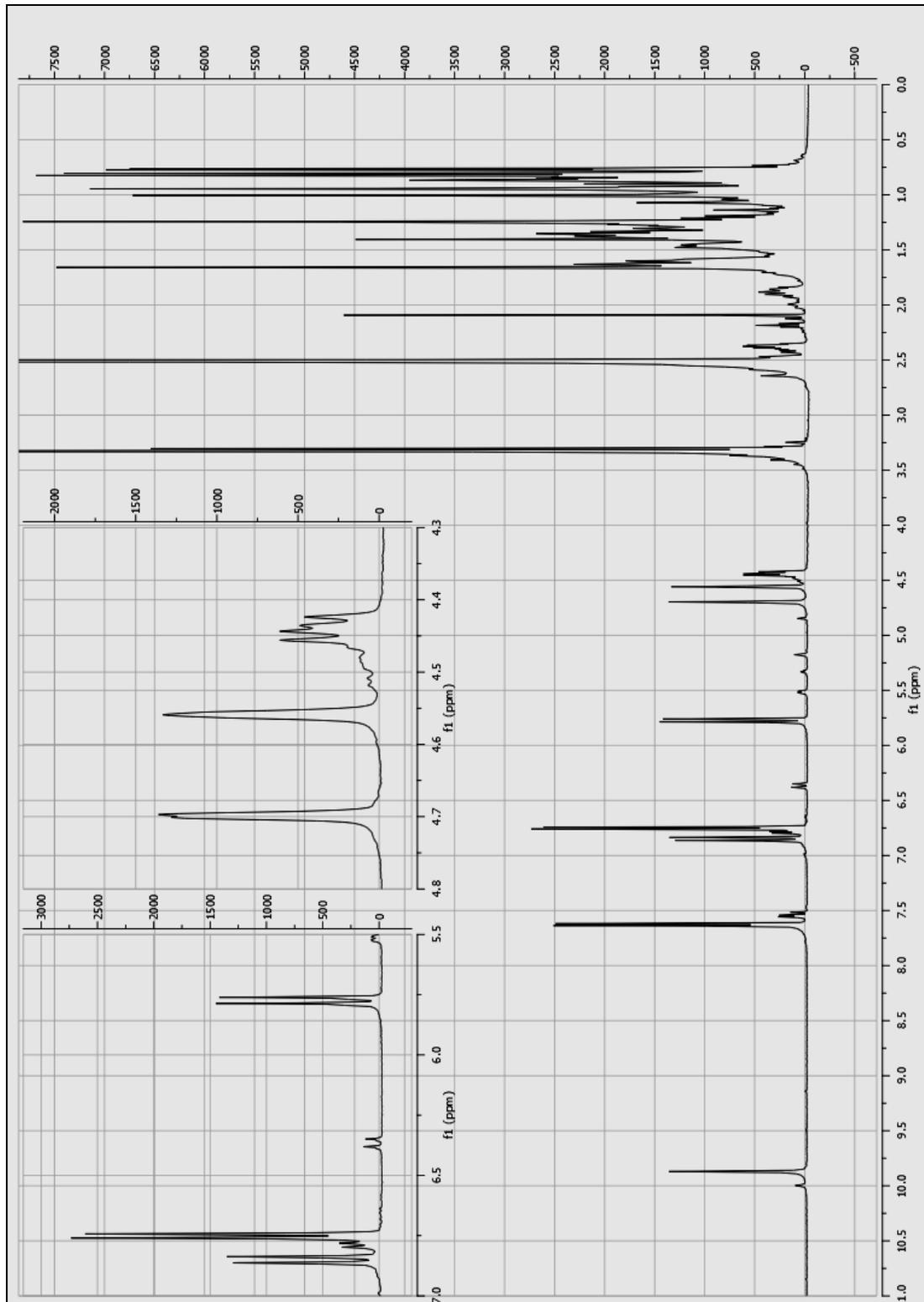


Abb. 7.4.3.a: ^1H NMR Spektrum von *Z*-Coumaroyl-Lupeol in $\text{DMSO-}d_6$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.3.a)

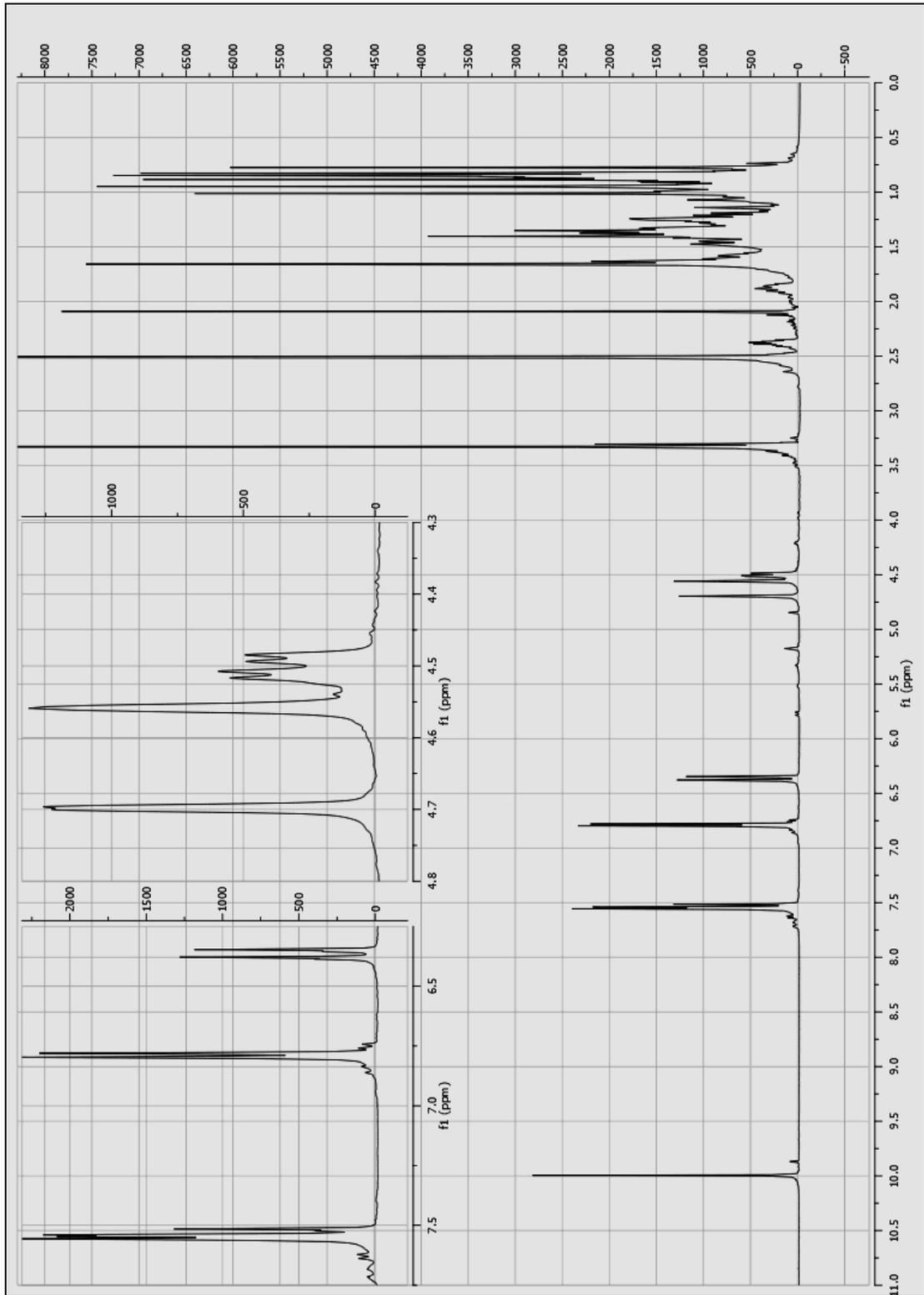


Abb. 7.4.3.b: ^1H NMR Spektrum von *E*-Coumaroyl-Lupeol in $\text{DMSO-}d_6$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.3.a)

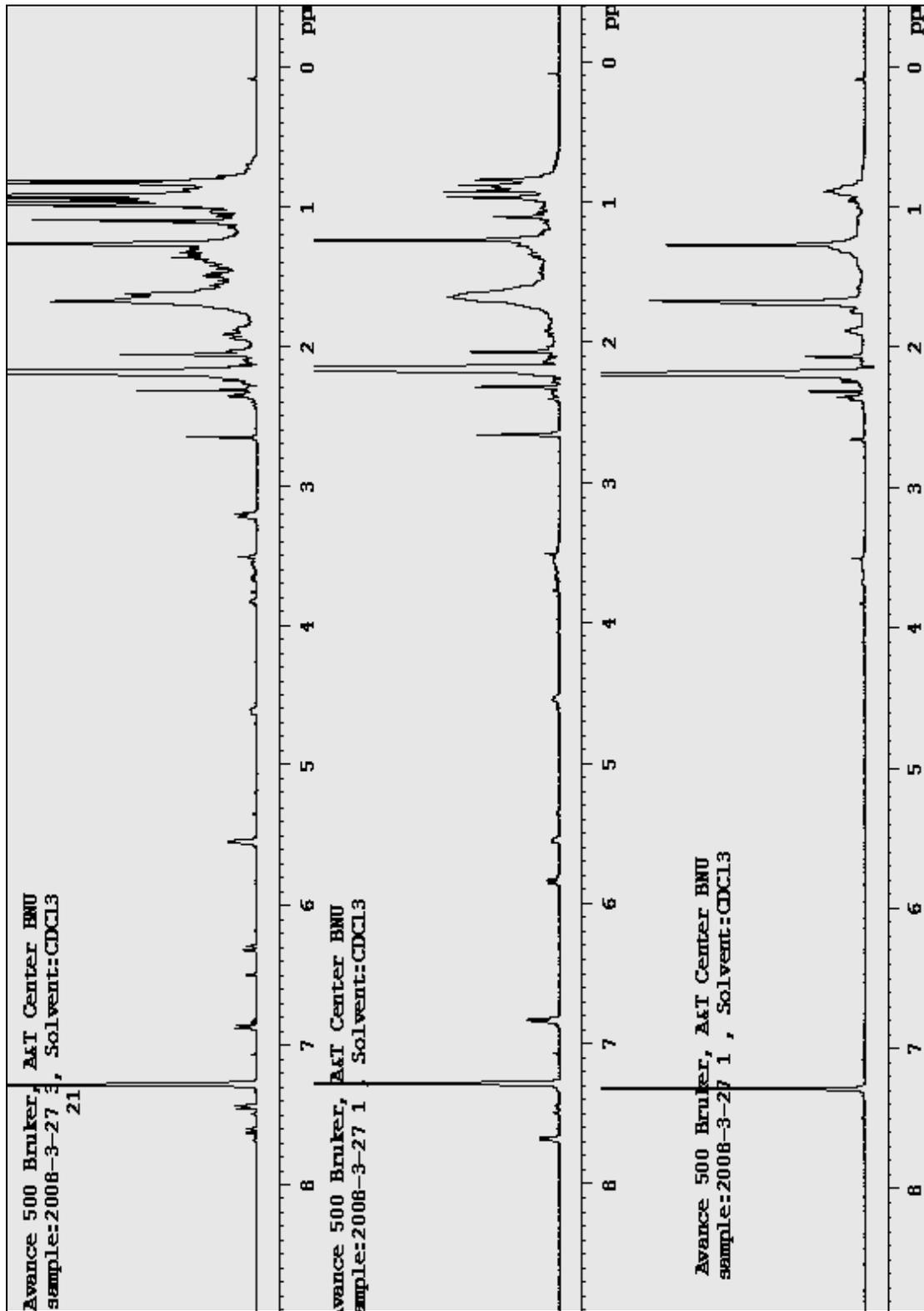


Abb. 7.4.3.c: ¹H NMR Spektren: Z-Coumaroyl-Taraxerol und Taraxerol als Gemisch (Verhältnis 1:2) oben; E-Coumaroyl-Taraxerol mitte; Fettsäuren, in die alle Taraxerolderivate in der Kutikula von *Rhizophora stylosa* eingebettet sind (unten) in CDCl₃ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.4.b)

7.4.4. NMR Spektren der semisynthetischen Lupeol-, Cholesterol- und β -Sitosterol – Derivate

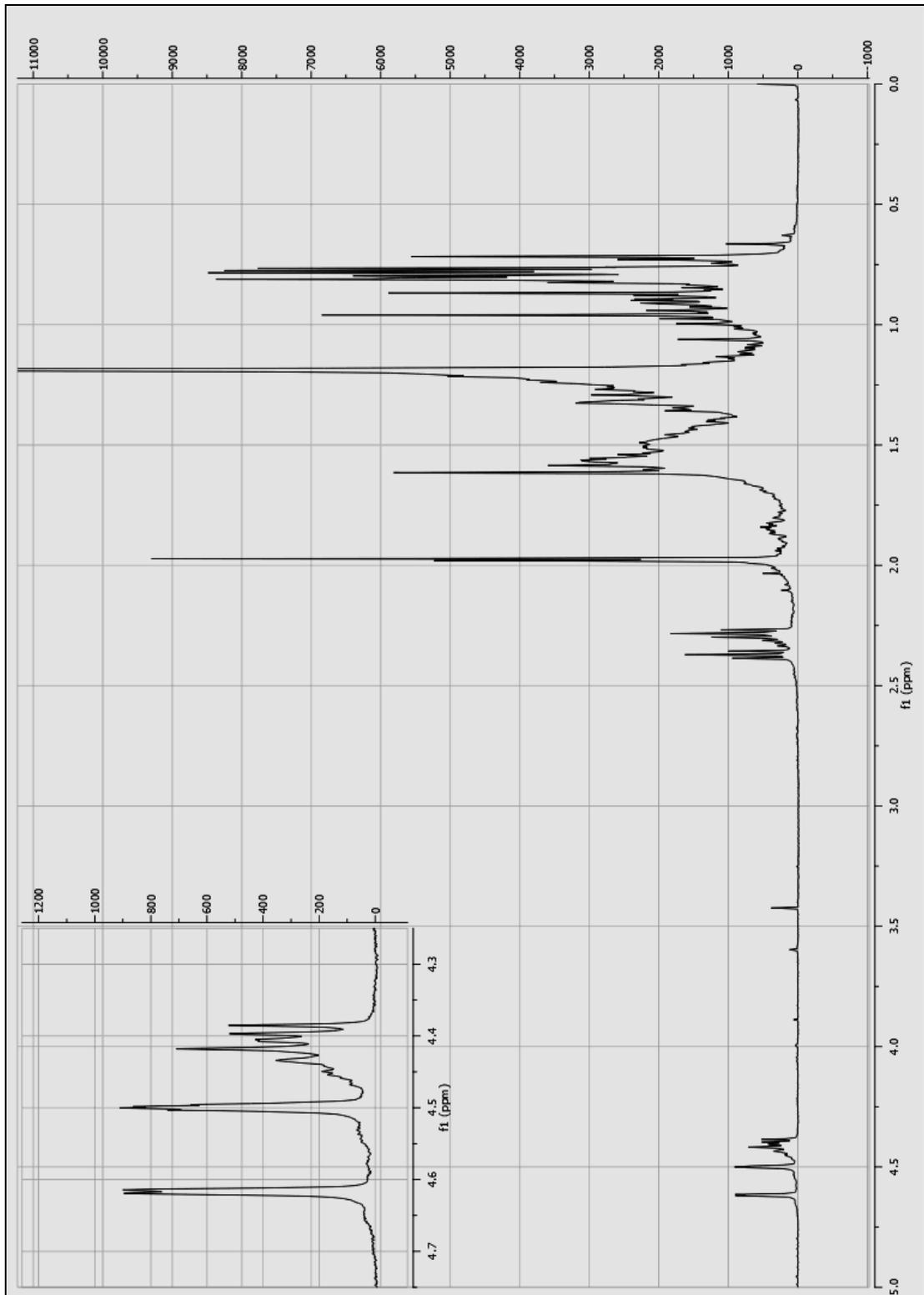


Abb. 7.4.4.a: ^1H NMR von Acetyl-Lupeol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.3.4.b)

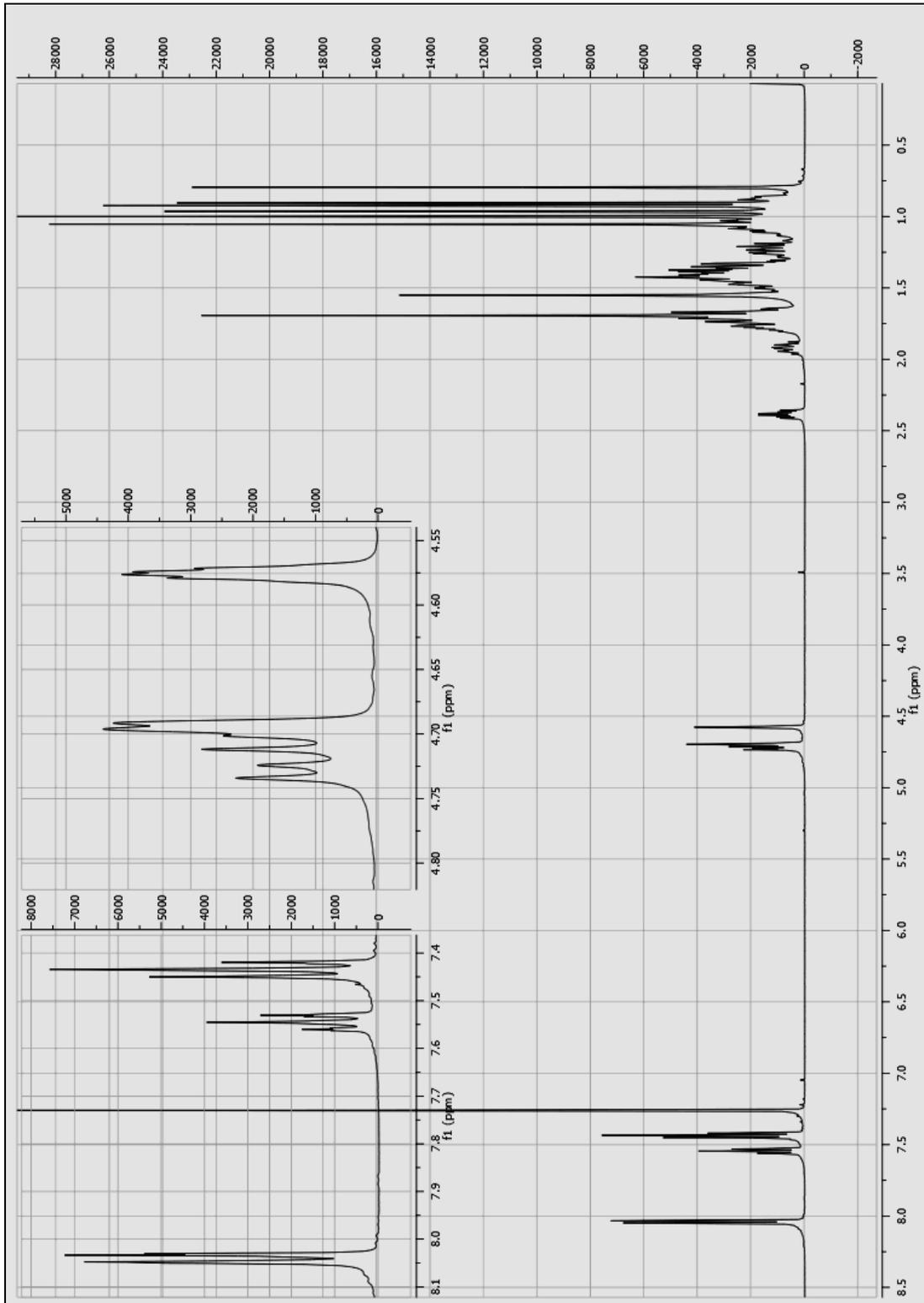


Abb. 7.4.4.b: ^1H NMR von Benzoyl-Lupeol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.3.4.c)

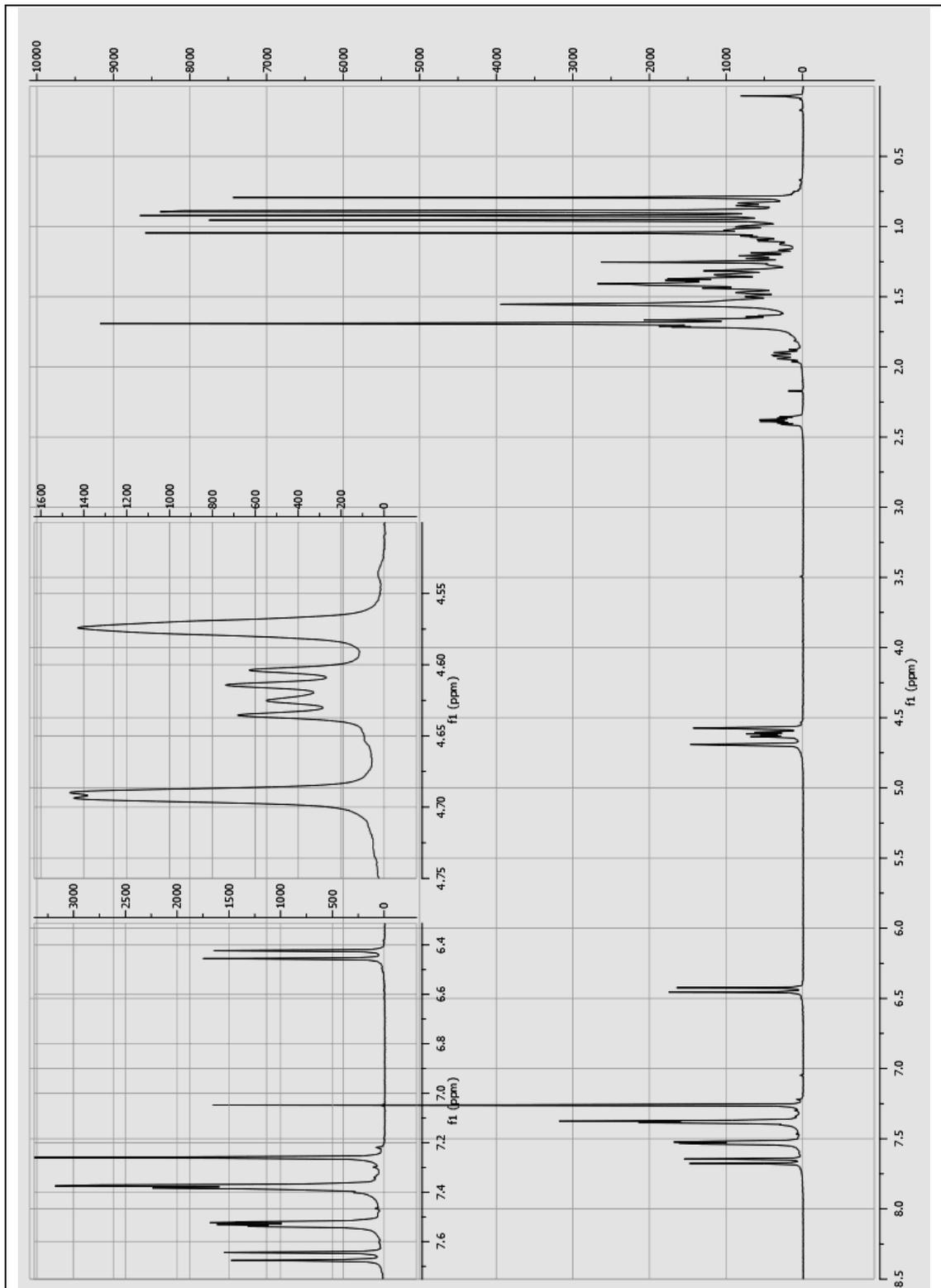


Abb. 7.4.4.c: ^1H NMR von Zinnamoyl-Lupeol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.3.4.d)

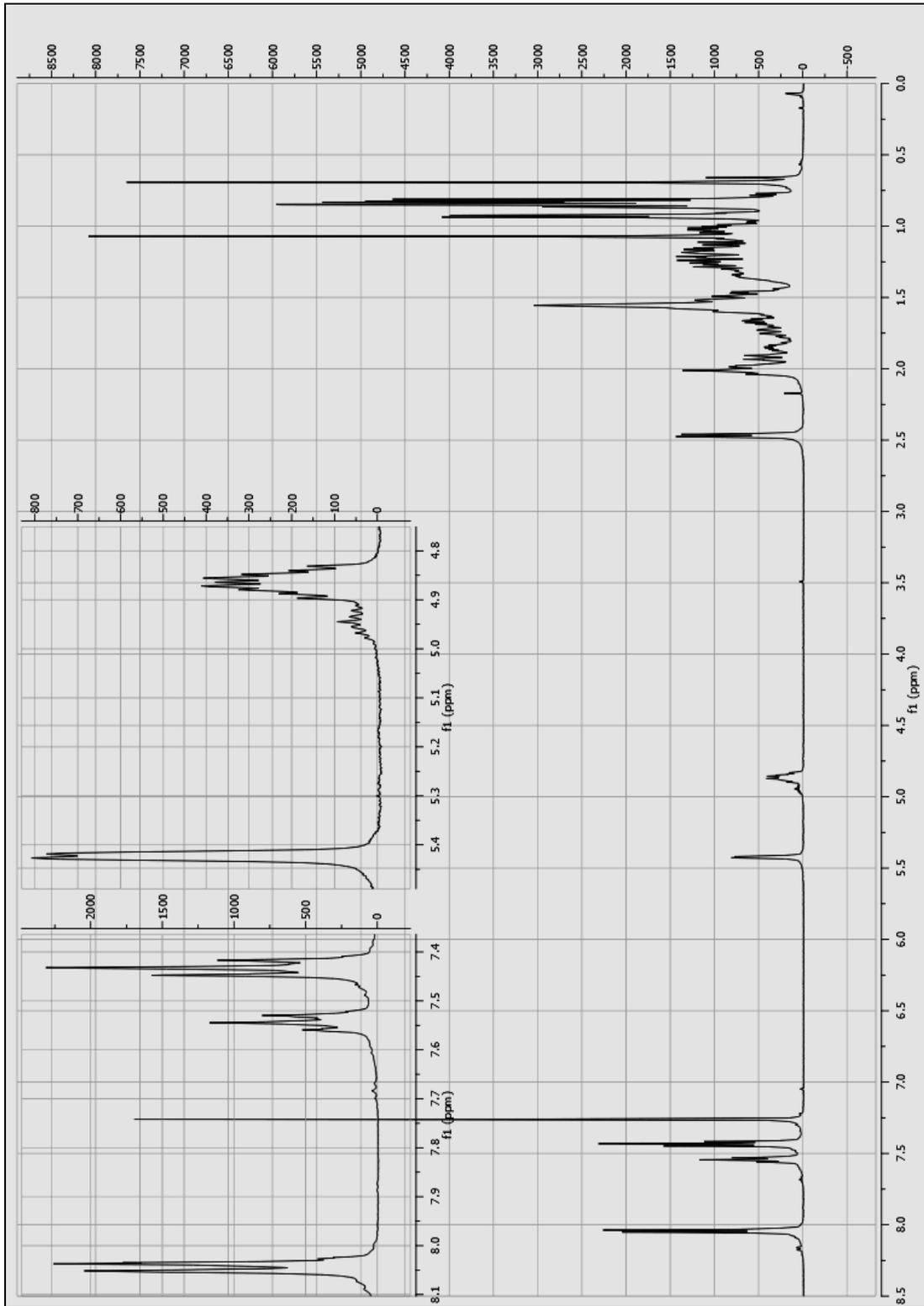


Abb. 7.4.4.d: ^1H NMR von Benzoyl-Cholesterol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.2.6.d)

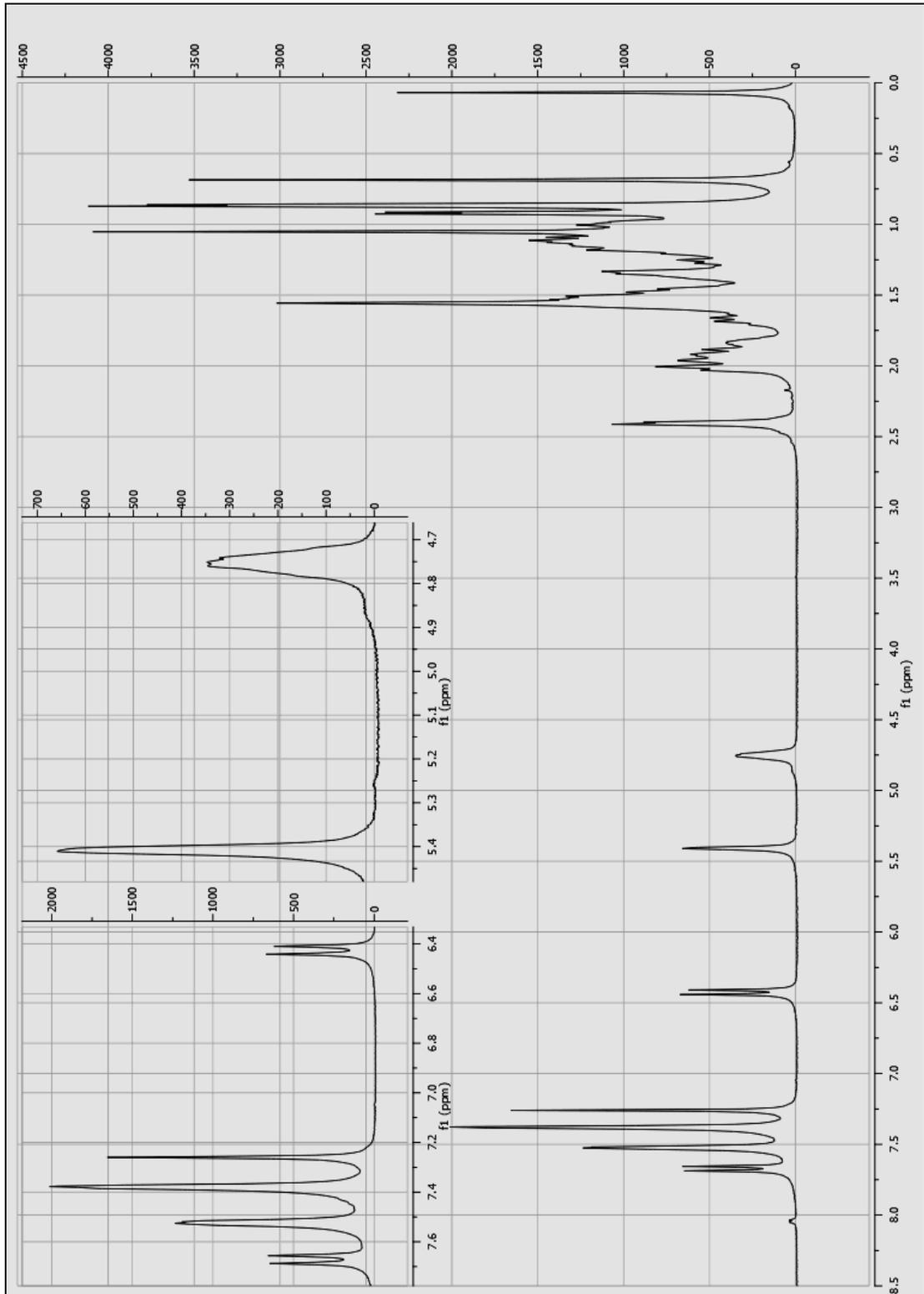


Abb. 7.4.4.e: ^1H NMR von Zinnamoyl-Cholesterol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.2.6.e)

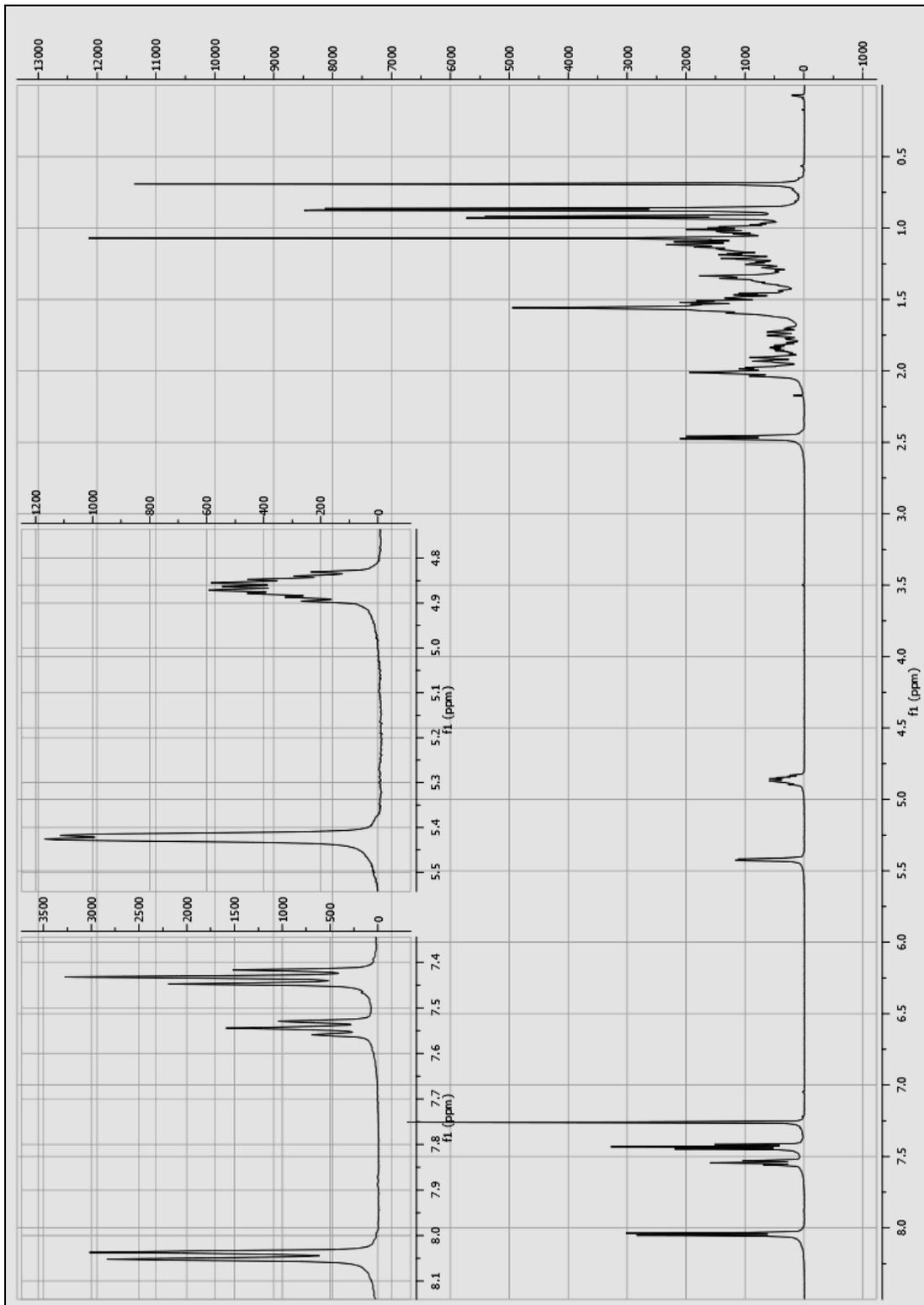


Abb. 7.4.4.f: ^1H NMR von Benzoyl- β -Sitosterol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.2.6.b)

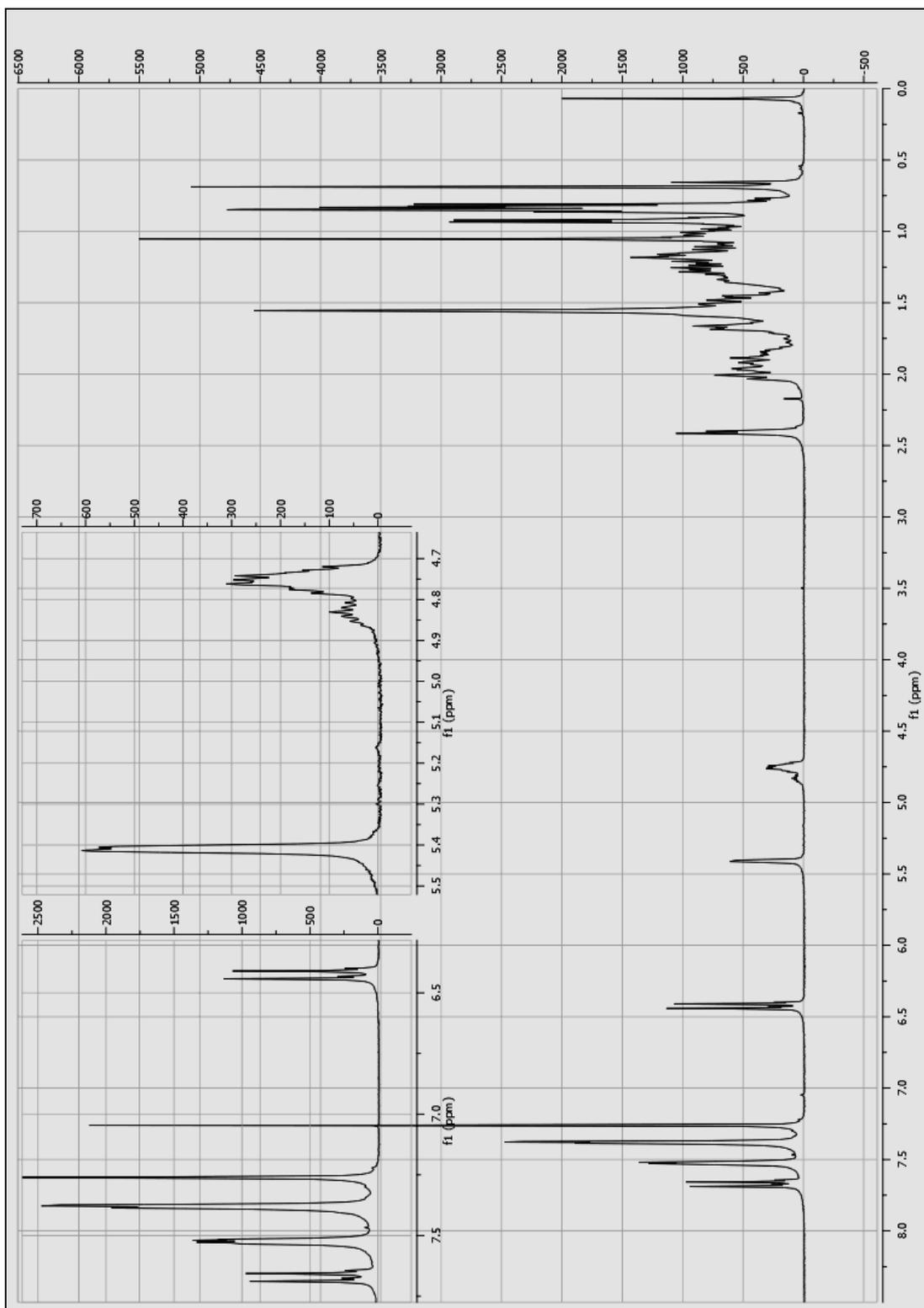


Abb. 7.4.4.g: ^1H NMR von Zinnamoyl- β -Sitosterol in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.2.6.c)

7.4.5. NMR Spektren der insektiziden Vergleichssubstanzen

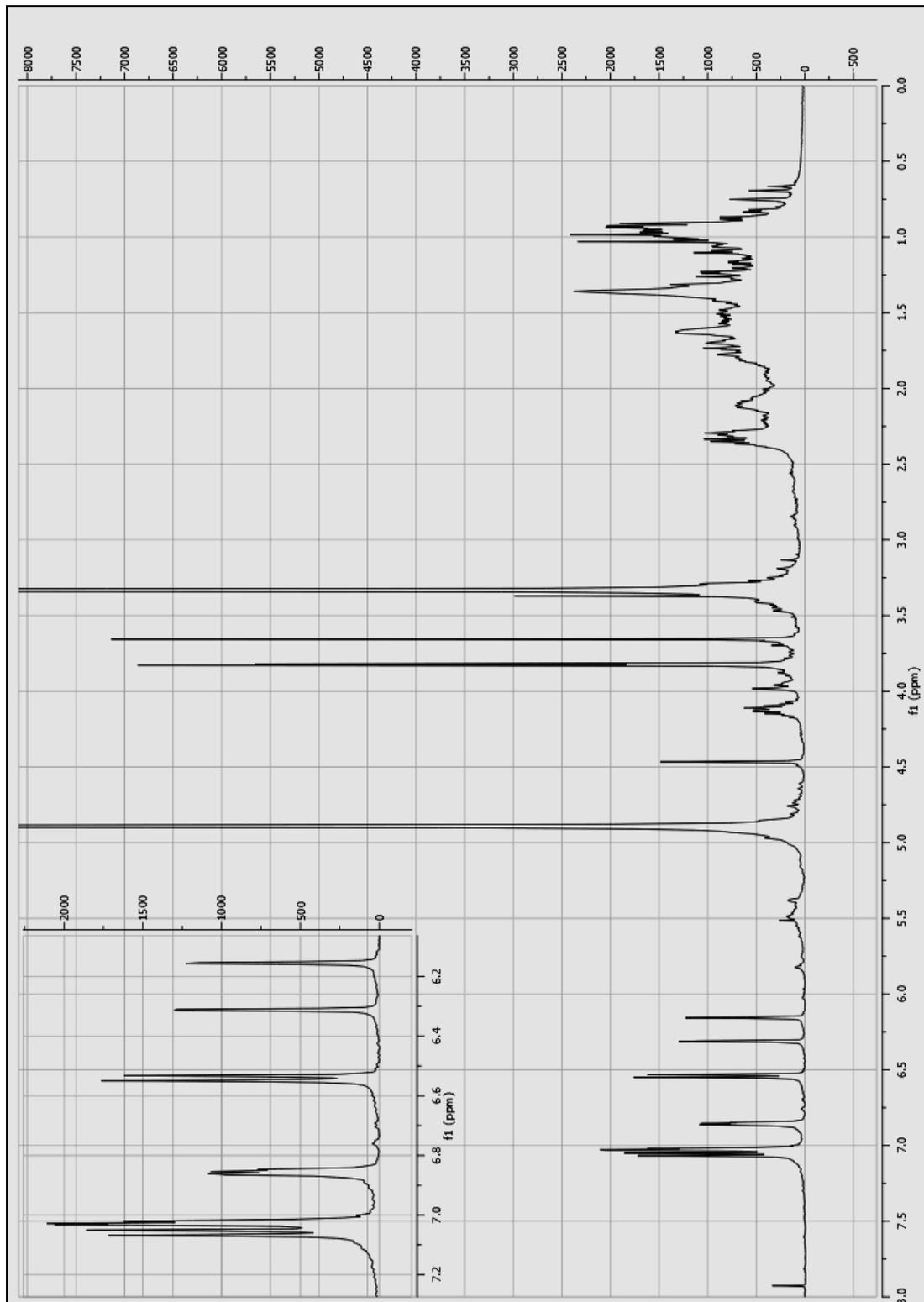


Abb. 7.4.5.a: ^1H NMR von Didehydroaglaistatin in MeOH-d_4 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.7.2.a)

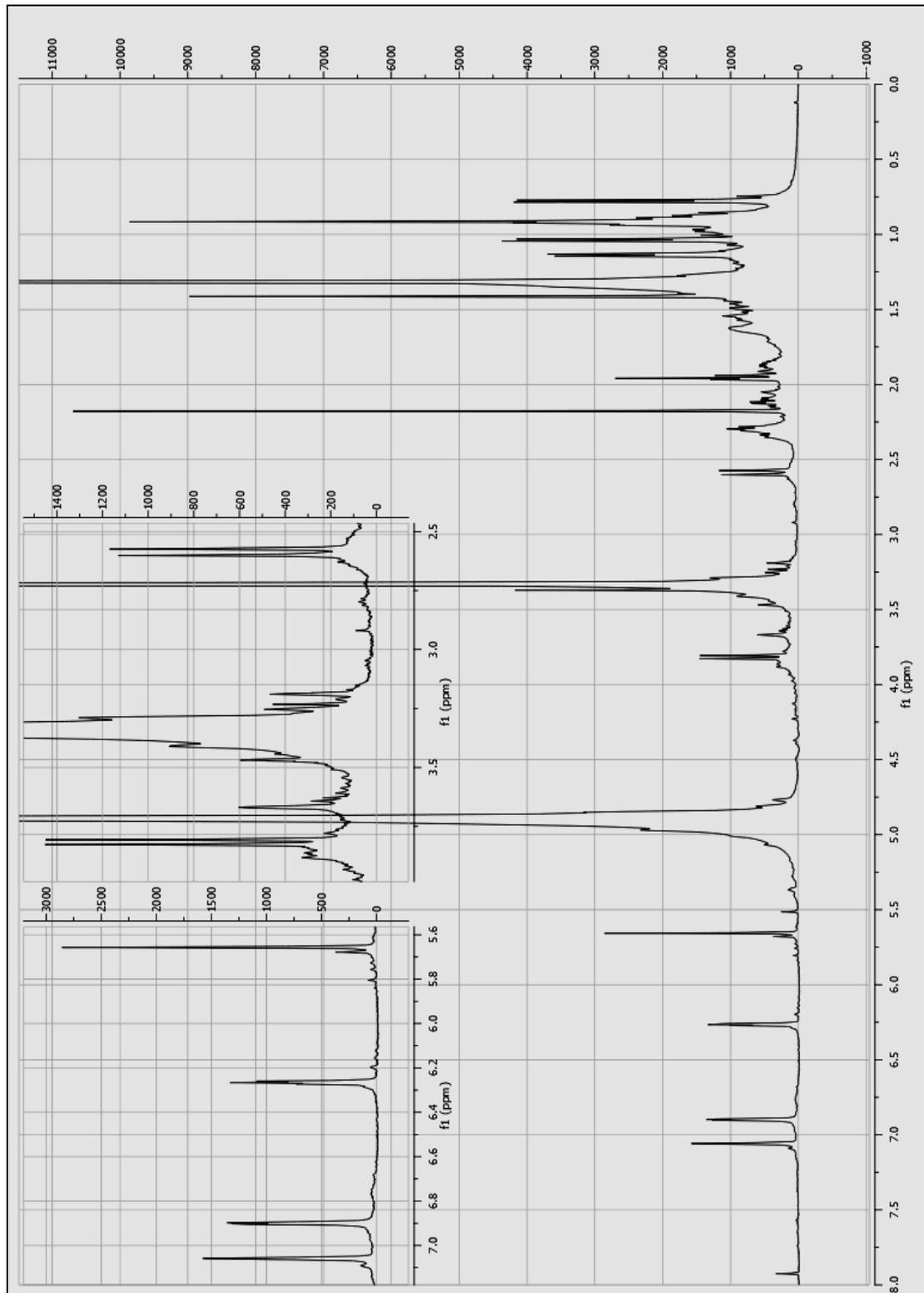


Abb. 7.4.5.b: ^1H NMR von Ryanodin in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.7.3.a)

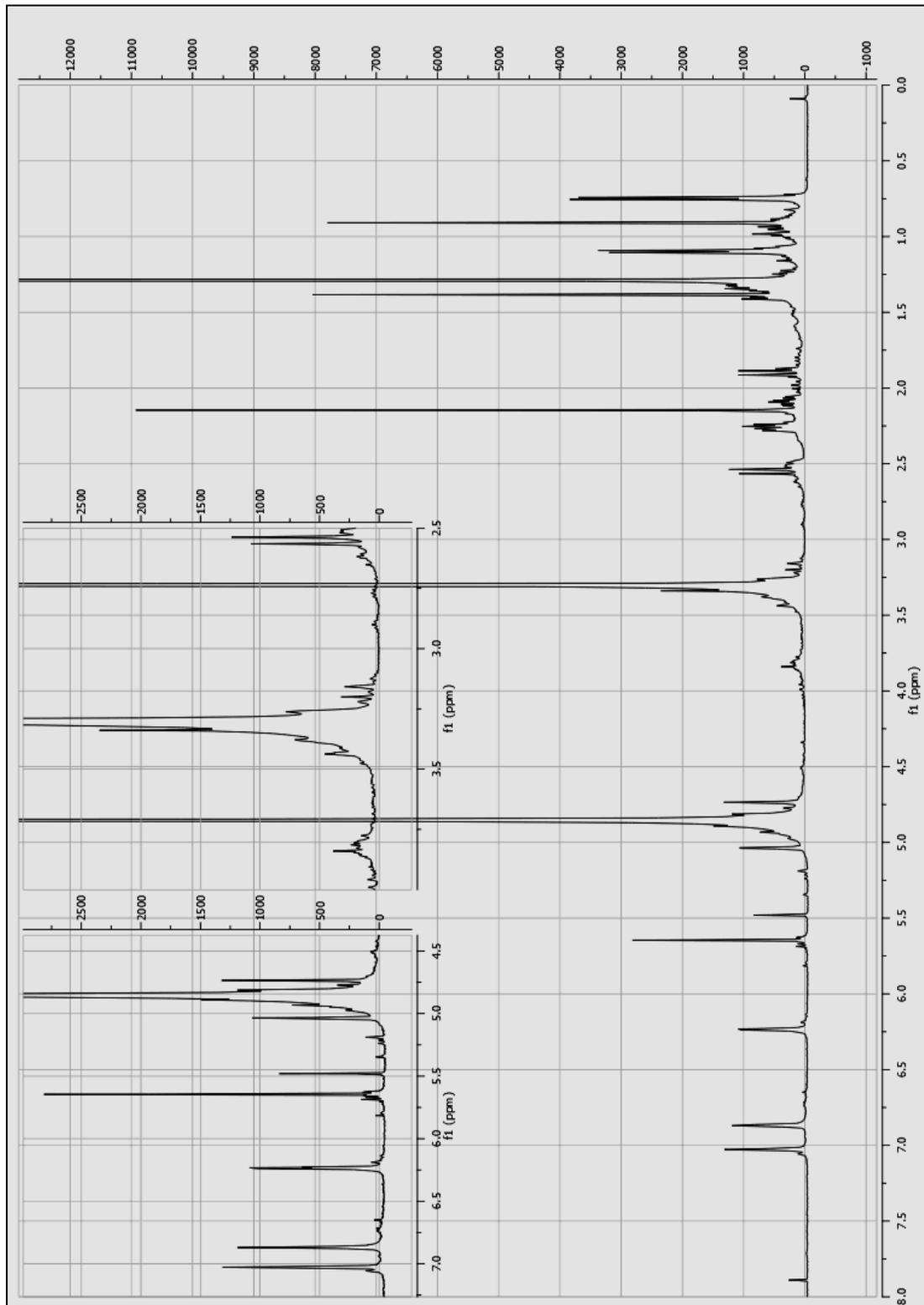


Abb. 7.4.5.c: ^1H NMR von 9,21-Didehydroryanodin in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.7.3.a)

7.4.6. Weitere Naturstoffe aus Mangroven

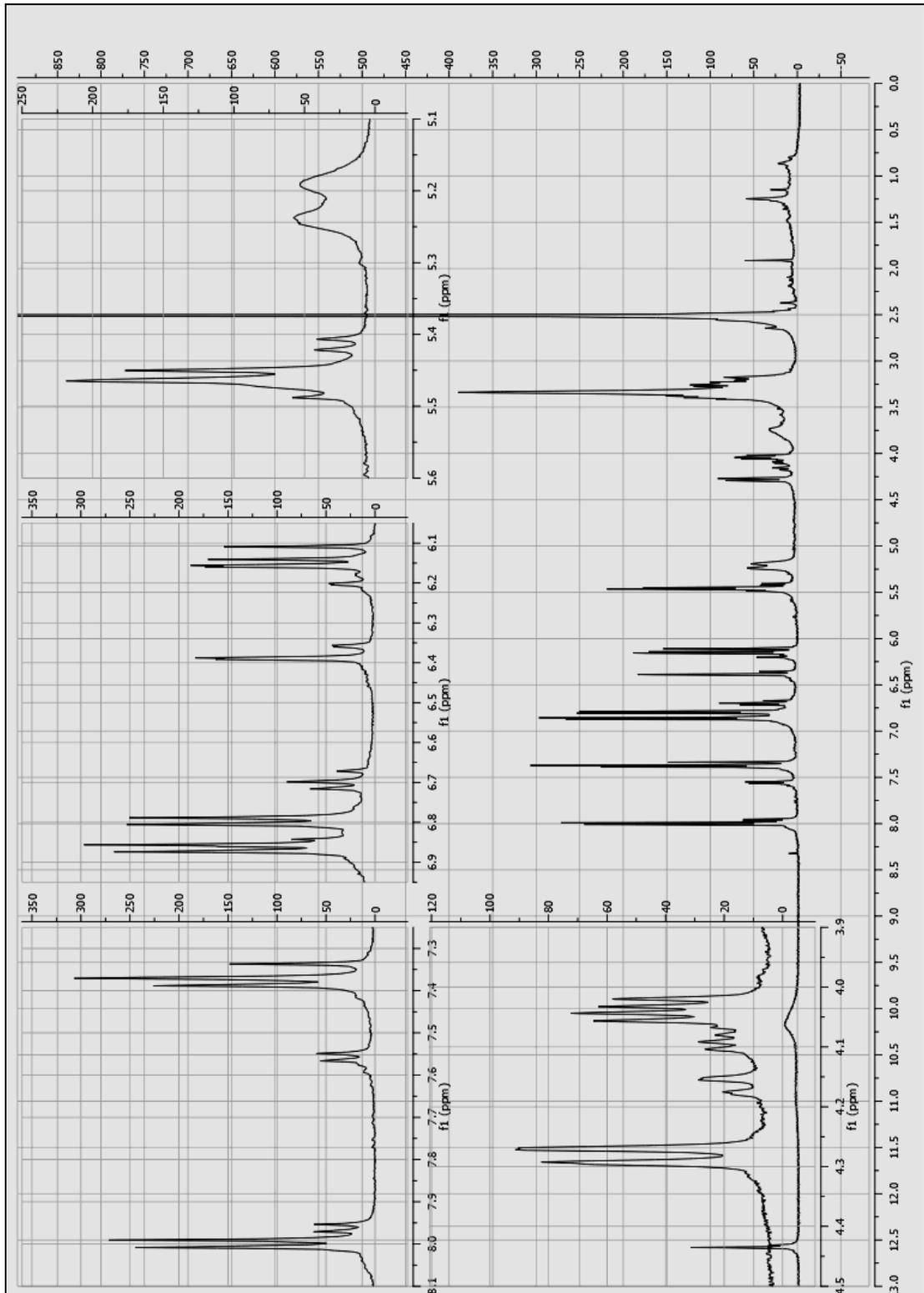


Abb. 7.4.6.a: ^1H NMR von Tilirosid in $\text{DMSO}-d_6$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.8.1.1.a)

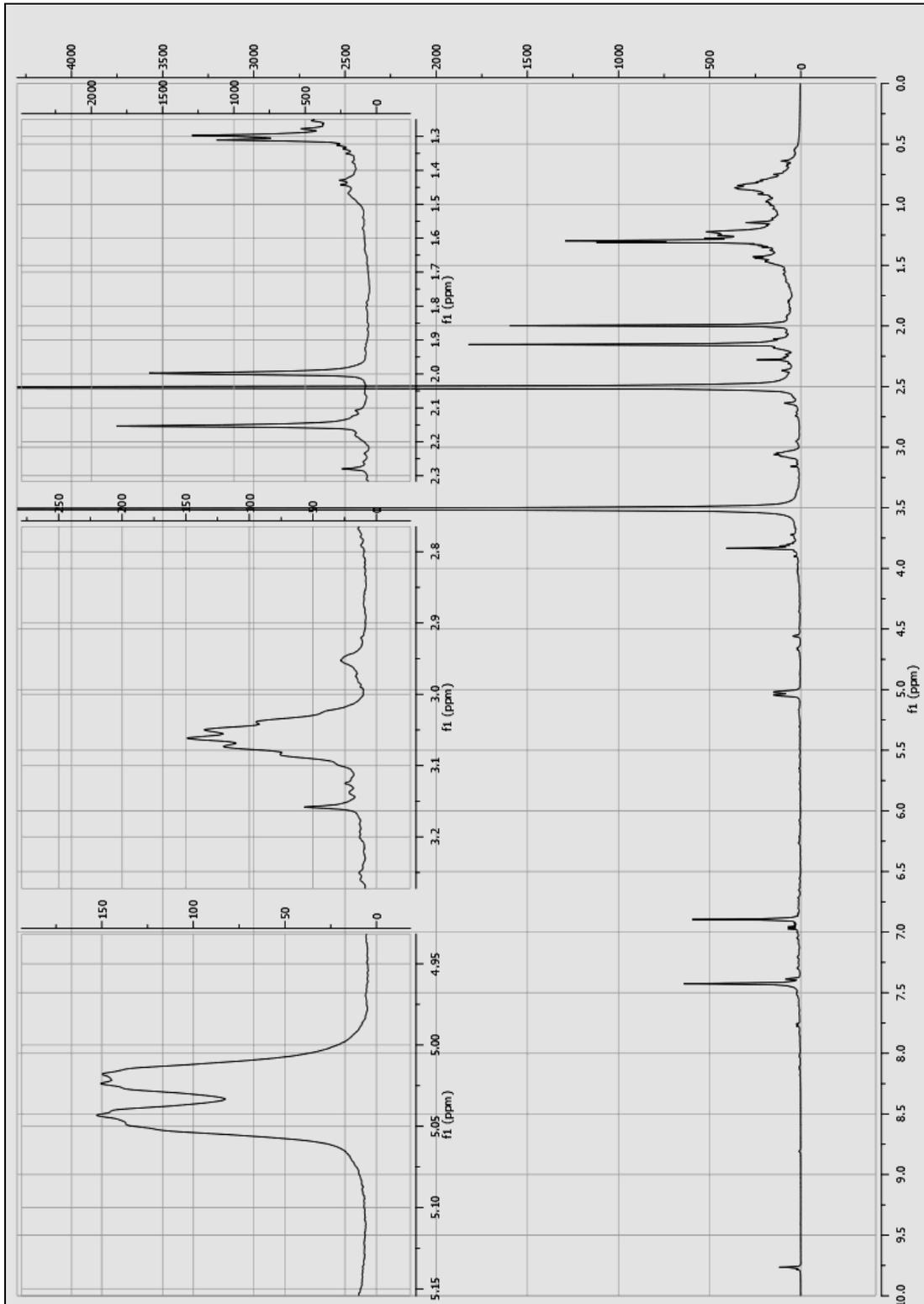


Abb. 7.4.6.b: ^1H NMR von Heritol in $\text{DMSO-}d_6$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.8.1.2.c)

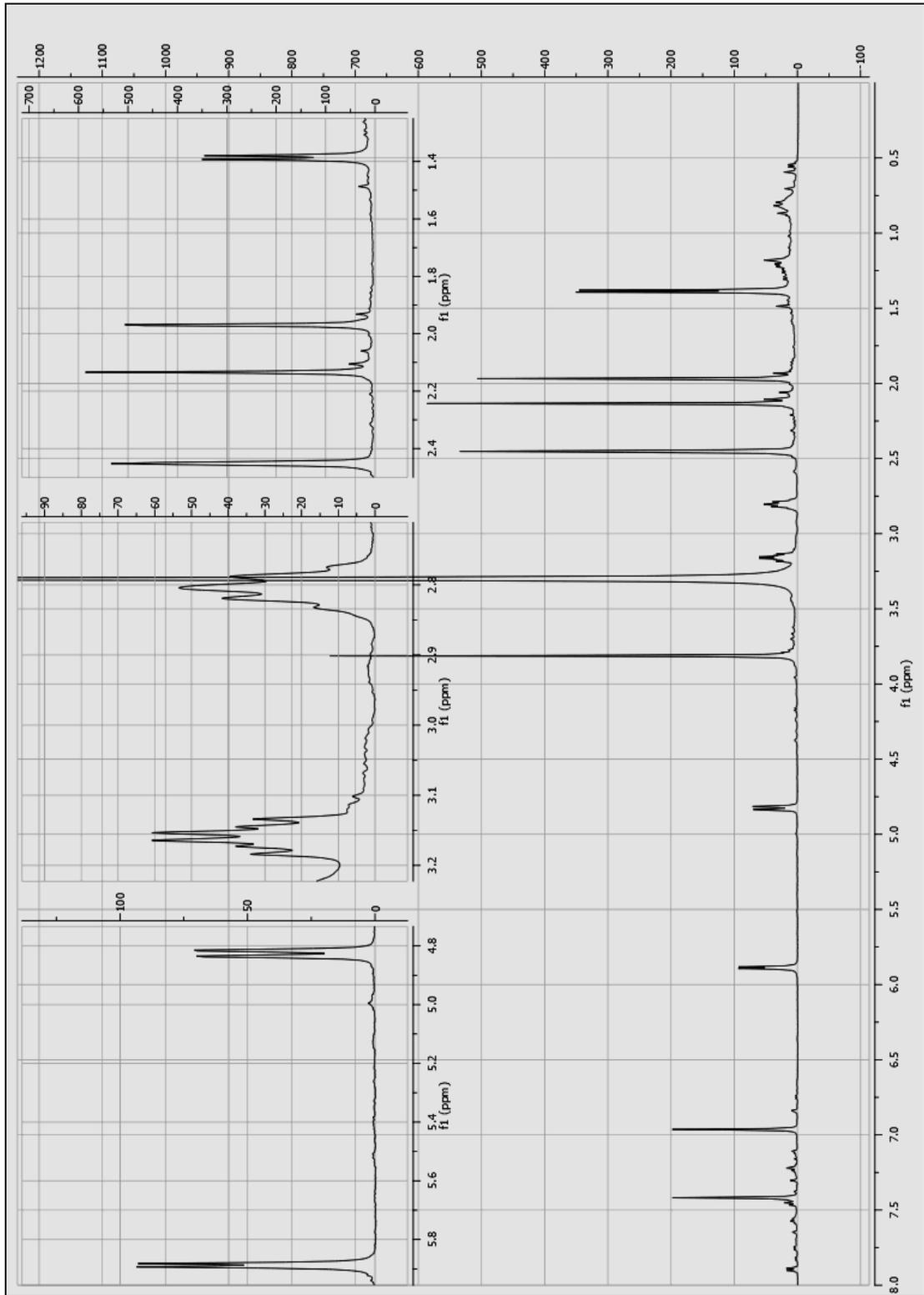


Abb. 7.4.6.c: ^1H NMR von Heritonin in $\text{MeOH-}d_4$ bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.8.1.2.b)

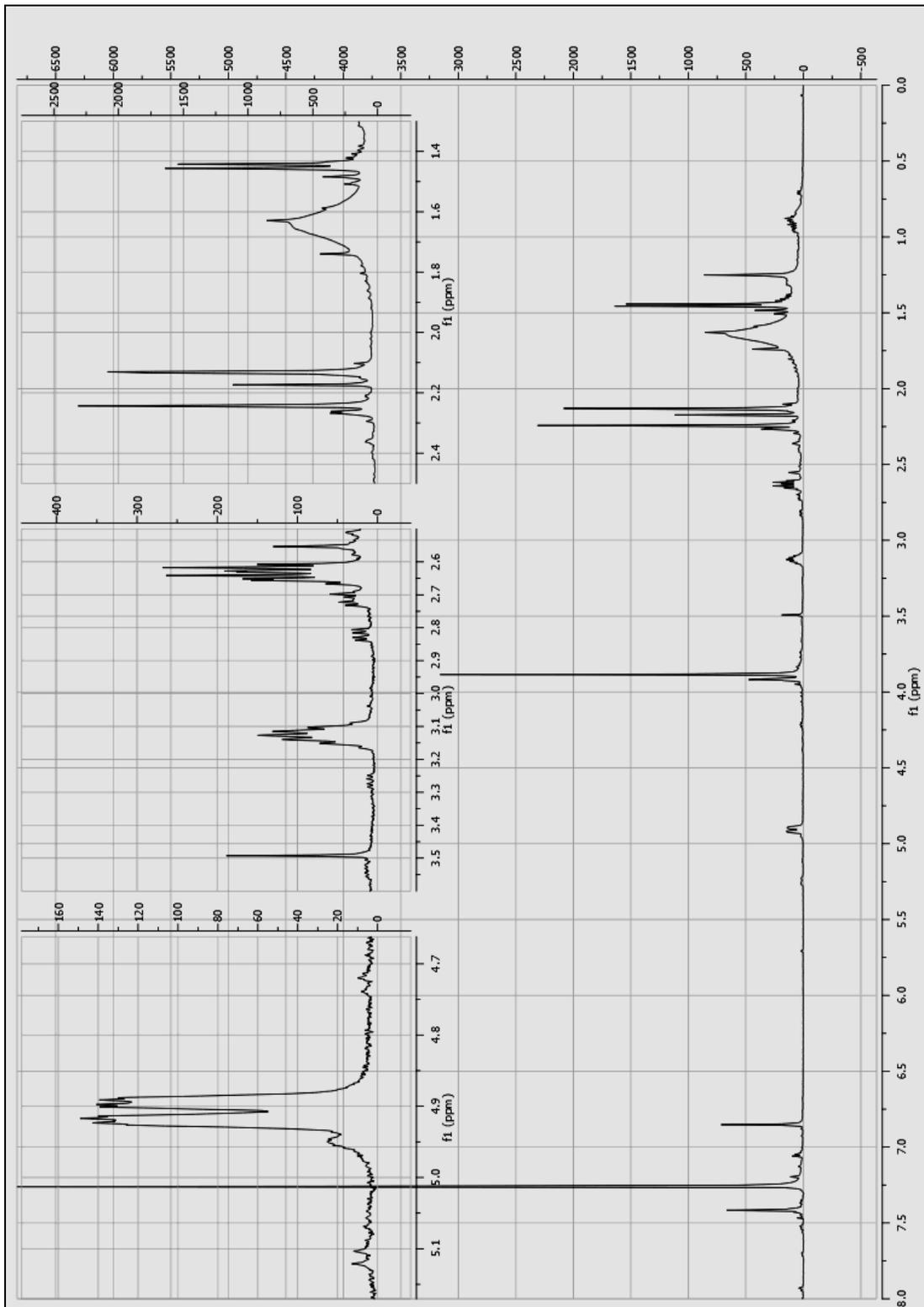


Abb. 7.4.6.d: ^1H NMR von Vallapin in CDCl_3 bei 500 MHz (Werte der chemischen Verschiebungen siehe Tab. 3.8.1.2.a)

7.5. Kooperationspartner

Für die Beschaffung des Pflanzenmaterials der Mangroven und die Erhebung verschiedener Bioassayergebnisse wurden Kooperationen mit folgenden Partnern durchgeführt (Tab. 7.5.):

Tab. 7.5.: Kooperationspartner

Sammlung der Mangrovenpflanzen und Bereitstellung der wissenschaftlichen Infrastruktur für Laborarbeiten während der Forschungstätigkeiten in Peking	Prof. Dr. Wenhan Lin National Research Laboratories of Natural and Biometric Drugs Universität Peking 100083 Peking Volksrepublik China
ICAM-1 Bioassay	PD Dr. Susanne Grether-Beck Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH Universität Düsseldorf 40225 Düsseldorf Deutschland
NF κ B Bioassay und Zytotoxizität von Dammarenolsäurederivaten	Dr. Yvonne Chovolou Institut für Toxikologie Universität Düsseldorf 40225 Düsseldorf Deutschland
Proteinkinase Assays	ProQinase GmbH 79106 Freiburg i.Br. Deutschland
Zytotoxizität auf murine Lymphomazellen (L5178Y)	Prof. Dr. WEG Müller Institut für Physiologische Chemie – Abteilung Angewandte Molekularbiologie Universität Mainz

	55099 Mainz Deutschland
Zytotoxizität von Ellagsäure auf humane Krebszelllinien	PD Dr. Wim Wätjen Dipl.-Biologe Sven Ruhl Institut für Toxikologie Universität Düsseldorf 40225 Düsseldorf Deutschland

7.6. Abkürzungen

%Gew	Gewichtsrate
%Überlebende	Überlebensrate
[α]	Substanzspezifischer Drehwinkel des polarisierten Lichtes
μg	Microgramm
μL	Microliter
μM	Micromol pro Liter
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BAKER.	John Gilbert Baker (1834 – 1920)
BAGI	Bioassay Guided Isolation (Isolierung und Aufreinigung der Substanzen nach ihrer in einem standardisierten Testsystem feststellbaren Bioaktivität)
BLUME.	Carl Ludwig Blume (1789 – 1862)
bzw.	Beziehungsweise
CDCl_3	Deuteriertes Chloroform
CHCl_3	Chloroform
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doublet
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doublet vom doublet
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\text{DMSO-}d_6$	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribunucleinsäure
EI	Electron Impact Ionisation
ENGL.	Heinrich Gustav Adolf Engler (1844 – 1930)
ESI	Electron Spray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol

evtl.	Eventuell
FORSSK.	Peter Forsskål (1732 – 1763)
g	Gramm
GAERTN.	Joseph Gaertner (1732 – 1791)
GAUDICH.	Charles Gaudichaud-Beaupré (1789 – 1854)
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPLC-DAD	HPLC mit Dioden array Detektor
Hz	Hertz
IC	Inhibitory Concentration (bei Enzymen die Aktivität, bei Insekten die Gewichtszunahme)
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
J.KOENIG	Johann Gerhard König (1728 – 1785)
L	Liter
L.	Carl von Linné (1707 – 1787)
LAM.	Jean-Baptiste Lamarck (1744 – 1829)
LC	Lethal Concentration
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry (HPLC gekoppelt mit einem Massenspektrometer)
LESS.	Christian Friedrich Lessing (1809 – 1862)
LOUR.	João de Loureiro (1717 – 1791)
m	Triplet
M	Molar
MeOH	Methanol
MeOH- <i>d</i> ₄	Deuteriertes Methanol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
<i>n</i> -hex	<i>n</i> -Hexan

nM	Nanomol pro Liter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionen Aktivität
Poir.	Jean Louis Marie Poiret (1755 – 1834)
ppm	Parts Per Million (Konzentrationsangabe Gewicht/Gewicht bzw. chemische Verschiebung)
RTSG	Retentionszeit bei der analytischen HPLC mit dem Standardgradient (Gradientenverlauf siehe Kapitel 2.7.8.)
s	Singulett
SEAP	Secreted form of humane alkaline phosphatase
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
SM.	James Edward Smith (1759 – 1828)
SPRENG.	Curt Polycarp Joachim Sprengel (1766 – 1833)
Stabw	Standardabweichung
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TNF α	Tumor necrosis factor Untereinheit α
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
usw.	Und so weiter
UV	Ultraviolettes Licht
VIERH.	Friedrich Vierhapper (1876 – 1932)
VLC	Vakuum Liquid Chromotography
WILLD.	Carl Ludwig Willdenow (1765 – 1812)

7.7. Danksagungen

Zuerst möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Proksch für die Betreuung und die die Unterstützung bei meiner Arbeit danken. Ich danke ihm für die für mich und für die Entwicklung meiner Arbeit wichtigen Auslandsaufenthalte. Nicht nur in wissenschaftlichen, sondern auch in privaten Belangen hatte er immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an PD Dr. Günter Schmahl für die Übernahme des Korreferates meiner Arbeit.

Als nächstes will ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wenhan Lin von der Universität Peking bedanken. Im Rahmen meiner beiden Aufenthalte in China hat er mich mit seiner freundschaftlichen Art immer ausgesprochen herzlich empfangen und betreut. Die unterhaltsame und fachlich hochkompetente Einführung in die NMR Spektroskopie während meines ersten Aufenthaltes im Frühjahr 2006 war für mich von unschätzbarem Wert.

Weiter will ich mich bei Herrn Prof. Dr. Zhiwei Deng von der Normal University in Peking für alle NMR Messung während meiner Aufenthalte in China bedanken.

Ein freundschaftliches und herzliches Institutsklima wurde durch Dr. Jandirk Sendker vermittelt, wofür ich mich an dieser Stelle ebenfalls ganz herzlich bedanken will.

Weiter will ich mich bei meinem ehemaligen Laborkollegen Dr. Mohamed Ashour bedanken, der mich als ich im Juni 2005 mit meiner Arbeit begonnen habe sehr gut in den Laboralltag eingeführt hat.

Bei Ehab Moustafa bedanke ich mich, da er über ein Jahr mit mir ein Labor geteilt hat und durch den die Laborarbeit immer lustig, entspannt und fachlich anregend war.

Bei den technischen Mitarbeitern Simone Miljanović, Waltraud Schlag, Klaus Dieter Jansen, Eva Müller möchte ich mich für das von ihnen ausgestrahlte sehr gute und lustige Institutsklima und die ausgesprochen gute Kompetenz bedanken. Frau Claudia Eckelskemper danke ich für ihre nette und hochkompetente Art, mit der sie den Institutsbetrieb vom Sekretariat aus unterstützt. Frau Angelika Simons danke ich für ihre Hilfe bei der Erledigung der Promotionsformalia.

Die an der Universität Düsseldorf gemessenen NMR Spektren wurden unter Leitung von Dr. Peters vom Institut für Anorganische Chemie durchgeführt. Für diesen Service möchte ich mich an dieser Stelle auch herzlich bedanken. Die EI-MS Daten wurden unter Leitung von Dr. Tommes vom Institut für Anorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Hierfür will ich mich auch sehr herzlich bedanken.

Weiter gilt mein besonderer Dank dem Industrieclub Düsseldorf e.V., durch dessen Stipendium es mir möglich war im Frühjahr 2008 einen längeren Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wenhan Lin zu finanzieren.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern für die Erhebung der Bioaktivitäten und allen anderen nicht namentlich genannten Kollegen und Kolleginnen aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie für die eine oder andere gelegentliche Hilfe bedanken.

Von privater Seite möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Dr. Udo und Gabriele Bayer für die finanzielle und mentale Unterstützung während meiner gesamten akademischen Ausbildung bedanken. Meiner Schwester Isabel Mattern und ihrem Mann Frank Mattern danke ich für die Unterstützung jeglicher Art.

Vor allem danke ich meiner Freundin Kristina Baier für ihre geduldige und liebevolle Unterstützung jeglicher Art. Weiter danke ich ihren Eltern Karl Josef und Brigitte Baier, ihrer Schwester Vanessa Baier und ihrer restlichen Familie ausgesprochen herzlich für ihre Unterstützung.

7.9. Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Mirko Bayer – Diplom-Biologe
Geburtsdatum	14. Juni 1981
Geburtsort	Ulm/Donau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Weißdornweg 7, 88471 Laupheim
e-Mail Adresse	mirko.bayer@web.de
Schulischer Werdegang	1987-1989 Ivo-Schaible-Grund- und Hauptschule Laupheim, Ortsteil Baustetten 1989-1991 Anna-von-Freyberg-Grundschule Laupheim 1991-1997 Carl-Laemmle-Gymnasium Laupheim 1997-2000 Wirtschaftsgymnasium der Gebhard- Müller-Schule Biberach/Riss Juni 2000 Abitur in Biberach/Riss (Note: 1,9)
Universitärer Werdegang	Oktober 2000 Immatrikulation an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg für den Diplomstudiengang Biologie Oktober 2002 Vordiplom in Biologie (Gesamtnote 3,0) Februar 2005 Abgabe der Diplomarbeit mit dem Titel „The Metabolic Control of Root Architecture“ April 2005 Erhalt des Diplomzeugnisses (Gesamtnote 2,0)
Postgraduierter Werdegang	01. Juni 2005 Beginn der Promotionsarbeit / Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Auslandsaufenthalte/ Forschungsaufenthalte	April-Mai 2006 & Februar-Mai 2008: University Peking, Peking, VR China November-Dezember 2006: Vietnamese Academy of Sciences, Hanoi, SR Vietnam Mai-Juni 2007: The Energy and Resources Institute, Neu-Delhi, R Indien
Veröffentlichungen	<u>Bayer M.</u> Johanniskraut – Ein aus dem Altertum bekanntes Heilmittel, Juni 2006 – Review für die Serie Apothekenpraxis im Apothekenmagazin Li X, <u>Bayer M.</u> , Lin WH, Proksch P. Two bromide phenols from sponge Dysideidae sp. (2007): Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, 19(7), 603-604 Proksch P, Ebel R, Edrada RA, Riebe, F, Liu HB, Diesel A, <u>Bayer M.</u> , Li X, Lin WH, Grebenyuk V, Müller, WEG, Draeger S, Zuccaro A, Schulz B. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: The <i>Suberis</i> case (2008): Botanica Marina, 51, 209-218 Ma A, Deng Z, van Ofwegen L, <u>Bayer M.</u> , Proksch P, Lin W. Dendropholidos A-R, cembranoid diterpenes from the Chinese soft coral <i>Dendronephthya</i> sp. (2008): Journal of Natural Products, 71, 1151-1160

7.8. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Dieser Dissertation wurde weder in gleicher noch in abgewandelter Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben habe, noch dies versucht habe.

Düsseldorf, den 16. März 2009

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized cursive letters that appear to read 'M. Bayer'.

Mirko Bayer
