



# **Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden in Zellkultursystemen und im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sven Ruhl**

aus Langenfeld (Rheinland)

Düsseldorf, Dezember 2009

aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. P. Proksch  
Koreferent: PD. Dr. W. Wätjen

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltsverzeichnis

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>                                          | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Polyphenolische Verbindungen</b>                       | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Flavonoide als Antioxidantien                           | 2         |
| 1.1.2 Flavonoide und zelluläre Signaltransduktion             | 4         |
| 1.1.3 Flavonoide und der Transkriptionsfaktor NFκB            | 6         |
| 1.1.4 Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen      | 6         |
| 1.1.5 Polyphenole zur Krankheitsprävention                    | 8         |
| 1.1.6 Polyphenole als Nahrungsergänzungsmittel.               | 9         |
| <b>1.2 Verwendete Flavonoide</b>                              | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Zelltod – Apoptose und Nekrose</b>                     | <b>13</b> |
| <b>1.4 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i></b> | <b>15</b> |
| <b>1.5 Zielsetzung</b>                                        | <b>16</b> |
| <b>2. Material</b>                                            | <b>17</b> |
| <b>2.1 Zelllinien</b>                                         | <b>17</b> |
| <b>2.2 Zellkulturmedien</b>                                   | <b>17</b> |
| <b>2.3 Lösungen und Puffer</b>                                | <b>17</b> |
| <b>2.4 Chemikalien</b>                                        | <b>18</b> |
| <b>2.5 Molekulargewichtsmarker</b>                            | <b>20</b> |
| <b>2.6 Antikörper</b>                                         | <b>20</b> |
| <b>2.7 Geräte</b>                                             | <b>20</b> |
| <b>2.8 Computersoftware</b>                                   | <b>22</b> |
| <b>2.9 Sonstige Materialien</b>                               | <b>22</b> |
| <b>3. Methoden</b>                                            | <b>23</b> |
| <b>3.1 Kultivierung von Zellen</b>                            | <b>23</b> |
| <b>3.2 Mikroskopische Analyse von Zellen</b>                  | <b>23</b> |
| 3.2.1 Durchlichtmikroskopie                                   | 23        |
| 3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie                                  | 24        |
| <b>3.3 Zytotoxizitäts-Assay / MTT-Assay</b>                   | <b>24</b> |
| <b>3.4 Apoptose-Assays</b>                                    | <b>24</b> |
| 3.4.1 ApoONE (Homogeneous-Caspase-3/7-Assay)                  | 24        |
| 3.4.2 Hoechst-Färbung                                         | 25        |
| 3.4.3 DNA-Fragmentations-Assay                                | 25        |

|             |                                                          |           |
|-------------|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.5</b>  | <b>Nekrose-Assays</b>                                    | <b>26</b> |
| 3.5.1       | Laktat-Dehydrogenase-Assay                               | 26        |
| 3.5.2       | Propidiumiodid-Färbung                                   | 26        |
| <b>3.6</b>  | <b>Nachweis von antioxidativen Eigenschaften</b>         | <b>26</b> |
| 3.6.1       | TEAC-Assay                                               | 26        |
| 3.6.2       | DPPH-Assay                                               | 27        |
| <b>3.7</b>  | <b>Nukleinsäuren</b>                                     | <b>27</b> |
| 3.7.1       | Konzentrationsbestimmung von DNA                         | 27        |
| 3.7.2       | Elektrophoretische Auftrennung von DNA                   | 27        |
| <b>3.8</b>  | <b>Proteine</b>                                          | <b>27</b> |
| 3.8.1       | Isolation von Proteinen                                  | 27        |
| 3.8.2       | Proteinbestimmung nach Lowry                             | 28        |
| 3.8.3       | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli         | 28        |
| 3.8.4       | Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) | 29        |
| 3.8.5       | Färbung filtergebundener Proteine                        | 29        |
| 3.8.5.1     | Coomassie                                                | 29        |
| 3.8.5.2     | Ponceau-S                                                | 29        |
| 3.8.6       | Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine           | 30        |
| 3.8.7       | Chemilumineszenz Detektion                               | 30        |
| 3.8.8       | Wiederholtes Umsetzen von PVDF-Membranen - Strippen      | 30        |
| <b>3.9</b>  | <b>Reporter Assay / SEAP-Assay.</b>                      | <b>30</b> |
| <b>3.10</b> | <b>Aufnahmestudien <i>in vitro</i></b>                   | <b>31</b> |
| 3.10.1      | Detektion der Polyphenole                                | 31        |
| 3.10.1.1    | DAD-HPLC                                                 | 31        |
| 3.10.1.2    | UV-HPLC                                                  | 32        |
| 3.10.1.3    | HPLC-ESI-MS                                              | 33        |
| 3.10.1.4    | Photometer                                               | 33        |
| 3.10.2      | Quantifizierung der Polyphenole                          | 33        |
| 3.10.2.1    | Bestimmung des Detektionslimits                          | 33        |
| 3.10.2.2    | Erstellung der Eichgerade                                | 34        |
| 3.10.3      | Bestimmung der Metabolite                                | 34        |
| 3.10.3.1    | Identifikation der Metabolite mittels HPLC-ESI-MS        | 34        |
| 3.10.3.2    | Identifikation der Metabolite mittels Koelution          | 34        |
| 3.10.4      | Stabilität der Polyphenole                               | 34        |
| 3.10.5      | Kulturbedingungen der Aufnahmeversuche                   | 35        |
| 3.10.5.1    | Aufarbeitung der Zellen                                  | 35        |
| 3.10.5.2    | Aufarbeitung der Überstände                              | 36        |

|             |                                                                                                  |           |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.11</b> | <b>Aufnahme von Flavonoiden in <i>C. elegans</i></b>                                             | <b>36</b> |
| 3.11.1      | Der Modelorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>                                                | 36        |
| 3.11.1.1    | Alterssynchronisation von <i>Caenorhabditis elegans</i>                                          | 36        |
| 3.11.1.2    | Bestimmung der Quercetinaufnahme in <i>C. elegans</i>                                            | 37        |
| 3.11.1.3    | Nachweis der intrazellulären Quercetinlokalisation                                               | 37        |
| <b>3.12</b> | <b>Aufnahme von Flavonoiden in SpragueDawley Ratten</b>                                          | <b>37</b> |
| 3.12.1      | Haltung                                                                                          | 37        |
| 3.12.2      | Versuchsdesign                                                                                   | 37        |
| 3.12.3      | Organentnahme                                                                                    | 38        |
| 3.12.3.1    | Blut                                                                                             | 38        |
| 3.12.3.2    | Organe                                                                                           | 38        |
| 3.12.4      | Aufarbeitung der Organe                                                                          | 39        |
| 3.12.4.1    | Blut                                                                                             | 39        |
| 3.12.4.2    | Organe                                                                                           | 39        |
| <b>3.13</b> | <b>Statistische Auswertungen.</b>                                                                | <b>40</b> |
| <b>4.</b>   | <b>Ergebnisse</b>                                                                                | <b>40</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Untersuchung zur Wirkung von Flavonoiden</b>                                                  | <b>40</b> |
| 4.1.1       | Antioxidatives Potential der Flavonoide                                                          | 40        |
| 4.1.1.1     | Antioxidative Aktivität ausgesuchter Flavonoide                                                  | 40        |
| 4.1.1.2     | Vergleich der antioxidativen Aktivität von Flavonoiden und ihren<br>Methylderivaten              | 42        |
| 4.1.1.3     | Vergleich der antioxidativen Aktivität aus <i>Eupatorium semialatum</i><br>isolierter Flavonoide | 44        |
| 4.1.2       | Zytotoxizität der Flavonoide                                                                     | 46        |
| 4.1.2.1     | Zytotoxizität der Flavonoide in verschiedenen Zelllinien                                         | 46        |
| 4.1.2.2     | Zytotoxizität der aus <i>Eupatorium semialatum</i> isolierten<br>Verbindungen                    | 48        |
| <b>4.2</b>  | <b>Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden</b>                                                 | <b>50</b> |
| 4.2.1       | Stabilisierung der Flavonoide in Dulbeccos Modified Eagle Medium                                 | 50        |
| 4.2.2       | Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden in verschiedenen<br>Zelllinien                         | 52        |
| 4.2.2.1     | Aufnahme verschiedener Flavonoide in Hct116 Zellen                                               | 52        |
| 4.2.2.2     | Aufnahme von Apigenin in verschiedene Zelllinien                                                 | 54        |
| 4.2.2.3     | Aufnahme von Quercetin in verschiedene Zelllinien                                                | 56        |
| 4.2.2.4     | Aufnahme von Quercetin in HepG2 Zellen                                                           | 57        |
| <b>4.3</b>  | <b>Identifikation der Metabolite in Hct116- und HepG2 Zellen</b>                                 | <b>58</b> |

|            |                                                                                                 |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.4</b> | <b>Komparative Studien der Methylderivate . . . . .</b>                                         | <b>66</b> |
| 4.4.1      | Zytotoxizität der Quercetinderivate . . . . .                                                   | 66        |
| 4.4.2      | Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes in HepG2 Zellen . . . . .                    | 69        |
| 4.4.2.1    | Apoptosenachweis in HepG2 Zellen via Caspase-3/7-Aktivität . . . . .                            | 69        |
| 4.4.2.2    | Apoptosenachweis in HepG2 Zellen<br>via DNA-Fragmentations-Assay . . . . .                      | 71        |
| 4.4.2.3    | Fluoreszenzmikroskopischer Apoptose- und Nekrosenachweis<br>in HepG2 Zellen . . . . .           | 72        |
| 4.4.2.4    | Nekrosenachweis in HepG2 Zellen via LDH-Aktivität . . . . .                                     | 73        |
| 4.4.3      | Effekte von Quercetin und Isorhamnetin auf MAPKinasen<br>in HepG2 Zellen . . . . .              | 74        |
| 4.4.3.1    | Mitogen Aktivierte Protein Kinase - JNK . . . . .                                               | 74        |
| 4.4.3.2    | Mitogen Aktivierte Protein Kinase – p38 . . . . .                                               | 75        |
| 4.4.3.3    | Mitogen Aktivierte Protein Kinase - ERK . . . . .                                               | 76        |
| 4.4.4      | Effekte von Quercetin und Isorhamnetin auf NFκB . . . . .                                       | 78        |
| 4.4.5      | Zytotoxizität der Luteolinderivate in Hct116 Zellen . . . . .                                   | 79        |
| 4.4.6      | Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes in Hct116 Zellen . . . . .                   | 81        |
| 4.4.6.1    | Apoptosenachweis in Hct116 Zellen . . . . .                                                     | 81        |
| 4.4.6.2    | Apoptose- und Nekrosenachweis in Hct116 Zellen . . . . .                                        | 83        |
| <b>4.5</b> | <b>Einfluss von Inhibitoren auf die Aufnahme und die Toxizität von Quercetin . . . . .</b>      | <b>85</b> |
| 4.5.1      | Wirkung von Verapamil auf die Quercetintoxizität . . . . .                                      | 85        |
| 4.5.2      | Wirkung von Verapamil und weiteren Inhibitoren auf<br>die Quercetinaufnahme . . . . .           | 88        |
| <b>4.6</b> | <b>Aufnahme von Quercetin in <i>C. elegans</i> . . . . .</b>                                    | <b>90</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Untersuchung zur Wirkung von Catechinen . . . . .</b>                                        | <b>91</b> |
| 4.7.1      | Antioxidatives Potential der Catechine . . . . .                                                | 91        |
| 4.7.2      | Zytotoxizität der Catechine in HepG2- und Hct116 Zellen . . . . .                               | 93        |
| <b>4.8</b> | <b>Aufnahme und Metabolismus von Epigallocatechingallat<br/>und Epicatechingallat . . . . .</b> | <b>94</b> |
| 4.8.1      | Stabilisierung von Epigallocatechingallat in<br>Dulbeccos Modified Eagle Medium . . . . .       | 94        |
| 4.8.2      | Aufnahme von Catechinderivaten in verschiedene Zelllinien . . . . .                             | 95        |
| 4.8.3      | Aufnahme von EGCG bei 4°C in Hct116 Zellen . . . . .                                            | 98        |
| <b>4.9</b> | <b>Aufnahme und Verteilung von EGCG im Rattenmodell . . . . .</b>                               | <b>99</b> |
| 4.9.1      | Gewichte der Tiere und Organe, Allgemeine Beobachtungen . . . . .                               | 99        |
| 4.9.2      | Detektion von Epigallocatechingallat im Blut . . . . .                                          | 100       |
| 4.9.3      | Detektion von Epigallocatechingallat in der Lunge der Muttertiere . . . . .                     | 102       |

|           |                                                                            |            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.9.4     | Detektion von Epigallocatechingallat in der Leber der Muttertiere          | 107        |
| 4.9.5     | Detektion von Epigallocatechingallat im Gehirn der Muttertiere             | 110        |
| 4.9.6     | Detektion von Epigallocatechingallat im Gehirn der Nachkommen              | 112        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b>                                                          | <b>115</b> |
| 5.1       | Antioxidatives Potential                                                   | 115        |
| 5.2       | Zytotoxisches Potential der Flavonoide                                     | 119        |
| 5.3       | Aufnahme und Metabolismus der Flavonoide in verschiedene Zelllinien        | 122        |
| 5.3.1     | Stabilität von Quercetin und EGCG in DMEM                                  | 122        |
| 5.3.2     | Aufnahme und Metabolismus der Flavonoide in verschiedene Zelllinien        | 123        |
| 5.3.3     | Aufnahme des Quercetin in den multizellulären Organismus <i>C. elegans</i> | 131        |
| 5.4       | Untersuchungen zu zellulären Wirkungen der Flavonoidmetabolite             | 132        |
| 5.4.1     | Untersuchungen zur Art des Zelltodes                                       | 132        |
| 5.4.2     | Einfluss von Quercetin und Isorhamnetin auf MAPKinasen                     | 134        |
| 5.4.3     | Einfluss von Quercetin und Isorhamnetin auf NFκB                           | 136        |
| 5.5       | Aufnahme und Verteilung von Epigallocatechingallat im Rattenmodell         | 137        |
| 5.6       | Abschlussbetrachtung – Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel             | 144        |
| 5.7       | Ausblick der Arbeit                                                        | 147        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                     | <b>148</b> |
| 6.1       | Zusammenfassung                                                            | 148        |
| 6.2       | Summary                                                                    | 149        |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                | <b>152</b> |
| <b>8.</b> | <b>Abkürzungen</b>                                                         | <b>158</b> |
| <b>9.</b> | <b>Anhang</b>                                                              | <b>159</b> |
|           | Tabellen der Originaldaten                                                 | 159        |
|           | Veröffentlichungen                                                         | 191        |
|           | Lebenslauf                                                                 | 193        |
|           | Danksagung                                                                 | 194        |
|           | Eidesstattliche Erklärung                                                  | 195        |

## 1. Einleitung

---

### 1.1 Polyphenolische Verbindungen

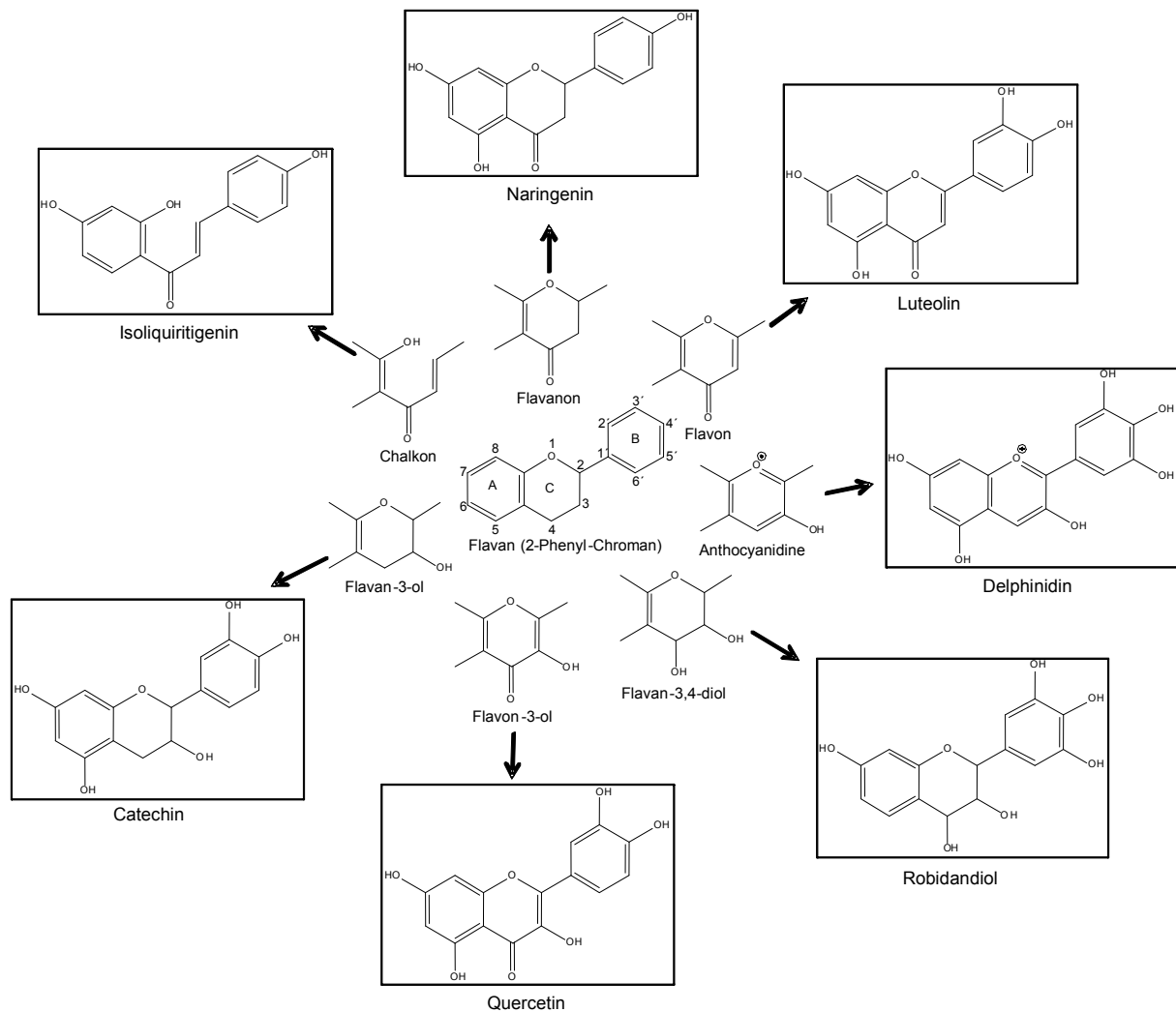
Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Die Vertreter dieser Klasse sind sehr vielgestaltig und zeichnen sich durch das Auftreten mindestens eines hydroxylsubstituierten aromatischen Ringes aus. Neben Stilbenen, Lignanen und Phenolsäuren gehört auch die Gruppe der Flavonoide zu diesen Vertretern. Die Flavonoide gehen aus der Kondensation eines aktivierten Zimtsäurederivates (aus dem Shikimat-Weg der Pflanze) und drei aktivierten Malonyl-CoA (aus dem Acetat-Malonat-Weg der Pflanzen) hervor. Je nach Grundgerüst und Substitution des Heteroringes unterscheidet man in Chalcone, Flavane, Flavanone, Flavanole, Flavone und Flavonole, sowie in Anthocyanidine und Flavan-3,4-diole. Die Einteilung nach dem Substitutions- und Oxidationsgrads des C-Ringes ist in Abbildung 1 dargestellt. Aufgrund der Vielzahl an möglichen Modifikationen, wie zum Beispiel Substitution der Grundgerüste mit verschiedensten Zuckern aber auch dem Auftreten von Prenylierungen, Methylierungen und Kondensationsprodukten der verschiedenen Grundgerüste, sind mittlerweile über 6500 verschiedene Flavonoide beschrieben worden (Harborne und Williams 2000).

In den Pflanzen geben die Flavonoide häufig den Früchten (u.a. Anthocyanidine in Kirschen oder Rotkohl) oder Blüten (lat. Flavus gelb) ihre Farbe. Sie absorbieren Licht im UV-Bereich und dienen der Pflanze dadurch als Schutz vor UV-Strahlung (u.a. (Rozema et al. 2002), (Bieza und Lois 2001)). Zusätzlich verleihen sie der Pflanze einen Fraßschutz gegenüber Herbivoren (Cipollini et al. 2008) und weisen zudem ein antimikrobielles Potential auf (Orhan et al. 2009).

Flavonoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie liegen nahezu in jeder höheren Pflanze in Form ihrer wasserlöslichen Glykoside in den Vakuolen der Zellen vor. Eine Ausnahme von der Regel bilden die zu den Flavonoiden gehörenden Flavanole (Catechinderivate). Diese liegen in der Nahrung als Aglyka vor. Aufgrund des Schutzes der Pflanze vor Umwelteinflüssen akkumulieren Flavonoide vorwiegend in den äußeren Teilen der Pflanzen. Durch die weite Verbreitung im Pflanzenreich und die teilweise hohen Mengen an Polyphenolen in Obst und Gemüse wird die durchschnittliche täglich aufgenommene Menge eines Amerikaners auf 1 g (Übersichtsartikel mit Angaben weiterer Länder: (Manach et al. 2004)) geschätzt. Die tatsächliche Exposition hängt dabei stark von den persönlichen Essgewohnheiten ab. Neben den Früchten ist Tee eine der Hauptquellen von Flavonoiden, besonders den Catechinen. Der Großteil der Flavanole wird in Früchten in der Regel von Catechin und Epicatechin gebildet. Epigallocatechin, Galocatechin und Epigallocatechingallat bilden dagegen in Tee aber auch Weintrauben den Großteil des polyphenolischen Anteils. Neben den beschriebenen Monomeren treten auch

Kondensationsformen der Catechine auf, welche dann als Proanthocyanidine bezeichnet werden.

Flavonole wie Quercetin und Kämpferol sind die am weitesten verbreiteten Flavonoide (Übersichtsartikel: (Crozier et al. 2009)). Sie treten in hohen Konzentrationen in gelben Zwiebeln und Grünkohl auf. Generell sind Flavone weniger stark vertreten. Die einzigen bisher bekannten Flavone welche in relevanten Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden sind Apigenin und Luteolin (Crozier, Jaganath et al. 2009). Sie werden vor allem in Sellerie und Petersilie in nennenswerten Mengen gebildet.



**Abbildung 1: Einteilung der Flavonoide nach dem Substitutions- und Oxidationsgrad des C-Ringes mit beispielhaften Verbindungen.**

(modifiziert nach Richter, Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 1998)

### 1.1.1 Flavonoide als Antioxidantien

Antioxidantien sind Verbindungen, welche in niedrigen Konzentrationen verglichen mit einem oxidierbaren Substrat die Oxidation dieses Substrates inhibieren bzw. reduzieren (Sies 1993). Eine Disbalance zwischen der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies und antioxidativen Abwehrsystemen kann *in vivo* zu einer Reihe pathophysiologischer Prozesse

führen. Neben einer Lipidperoxidation, welche unter anderem für initiale Prozesse in der Arteriosklerose verantwortlich gemacht wird, können auch Makromoleküle der Zelle wie zum Beispiel die DNA oder Proteine oxidiert werden. Diese Effekte können je nach Stärke der Schädigung und Funktion der betroffenen Proteine bzw. Orte der DNA-Schädigungen zur Ausprägung verschiedener Krankheiten führen. Neben Enzymen welche direkt oder indirekt an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind (u.a. Superoxid-Dismutase, Katalase, Gluthathionperoxidase), existieren endogene Antioxidantien wie Gluthation, Ubichinon, Bilirubin oder Harnsäure. Mit der Nahrung werden unter anderem die Antioxidantien Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) aufgenommen.

Es konnte gezeigt werden, dass Flavonoide *in vitro* als Antioxidantien wirken können. Je nach Substitutionsmuster weisen sie ein antioxidatives Potential auf, welches auf dem Niveau von Ascorbinsäure liegt. Aufgrund ihrer Eigenschaft zweiwertige Metallionen zu chelatieren, können sie zusätzlich die Generation von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion reduzieren. Die Voraussetzungen für eine radikalfangende Eigenschaft sind das Auftreten mindestens einer der folgenden Strukturmerkmale: Eine Catechol-Funktion (vicinale Hydroxylgruppen) im B-Ring, eine 4-Oxogruppierung mit benachbarter Hydroxylgruppe an Position 3 bei vorhandener 2,3-Doppelbindung und/oder das Auftreten einer 2,3-Doppelbindung bei gleichzeitiger Existenz einer Hydroxylfunktion an Position 3 und 4' (Rice-Evans et al. 1996; Pannala und Rice-Evans 2001). In der Zellkultur kann das antioxidative Potential der Flavonoide auch intrazellulär nachgewiesen werden. Neben der Reduktion des basalen intrazellulären ROS-Niveaus verringert eine Vorinkubation der Zellen für 1 h mit Flavonoiden die zytotoxischen Effekte einer Inkubation mit Wasserstoffperoxid (Watjen et al. 2005). Ob die *in vitro* detektierten antioxidativen Eigenschaften eine Relevanz für die *in vivo* Situation haben wird kontrovers diskutiert. Eine aktuelle Humanstudie konnten bei einer Applikation von 150 mg Quercetin/d über zwei Wochen keine Verbesserung der antioxidativen Kapazität des Plasmas bzw. eine Abnahme von mit oxidativem Stress korrelierten Markern (oxLDL u.a.) dokumentieren (Egert et al. 2008). Die Gabe von flavonoidreichen Lebensmitteln (Zwiebel) hingegen konnte Marker für oxidativen Stress (z.B. das Verhältnis von GSH zu GSSG) in verschiedenen Geweben von Mäusen verbessern (Meyers et al. 2008).

Neben der strukturell bedingten antioxidativen Kapazität determiniert die Bioverfügbarkeit, d.h. die tatsächlich im Organismus zur Verfügung stehende Menge an Substanz, das Ausmaß der antioxidativen Wirkung *in vivo*. Bisherige Studien ergaben eine Akkumulation von Flavonoiden in Blutplasma und Organen (z.B. Gehirn) im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich. Den relativ niedrigen Flavonoidkonzentrationen stehen jedoch hohe mikromolare Konzentrationen des wasserlöslichen Antioxidants Ascorbinsäure gegenüber.

Eine direkte Verbesserung des Redox-Status der Zellen als Hauptwirkmechanismus der Flavonoide ist daher als fraglich anzusehen.

### 1.1.2 Flavonoide und zelluläre Signaltransduktion

Es konnte in mehreren *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Flavonoide in verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege eingreifen können. Dies kann durch ihre radikalfangenden Eigenschaften und die damit verbundenen Modifikationen im Redox-Status der Zellen oder durch die direkte Interaktion mit Proteinen erfolgen.

Das Flavonoide die Aktivität von Proteinen regulieren können, wurde schon 1975 von Di Petro nachgewiesen. Di Pietro et al. (1975) konnten in ihrer Studie die Aktivität von isolierten mitochondrialen ATPasen durch eine Inkubation mit verschiedenen Flavonoiden inhibieren. Conseil et al. (1998) belegten in einer nachfolgenden Studie, dass manche Flavonoide an die ATP-Bindestelle vom para-Glycoprotein (pGP) binden können und dadurch dessen Aktivität inhibieren. Die Autoren erklären so auch die inhibierende Wirkung der Flavonoide auf weitere ATP-bindende Proteine wie z.B. die mitochondrialen ATPasen (siehe Di Petro), die Serin/Threonin-Kinasen oder die Proteinkinase C. Neben der Regulation durch die Bindung der Flavonoide an die ATP-Bindestelle, wies Conseil zusätzlich die Bindung von Flavonoiden an die ebenfalls untersuchte Steroid-Bindestelle des pGP nach. Somit scheint die Wirkung von Flavonoiden bifunktionell zu sein und nicht nur auf einer Bindung an die ATP-Bindestelle zu beruhen.

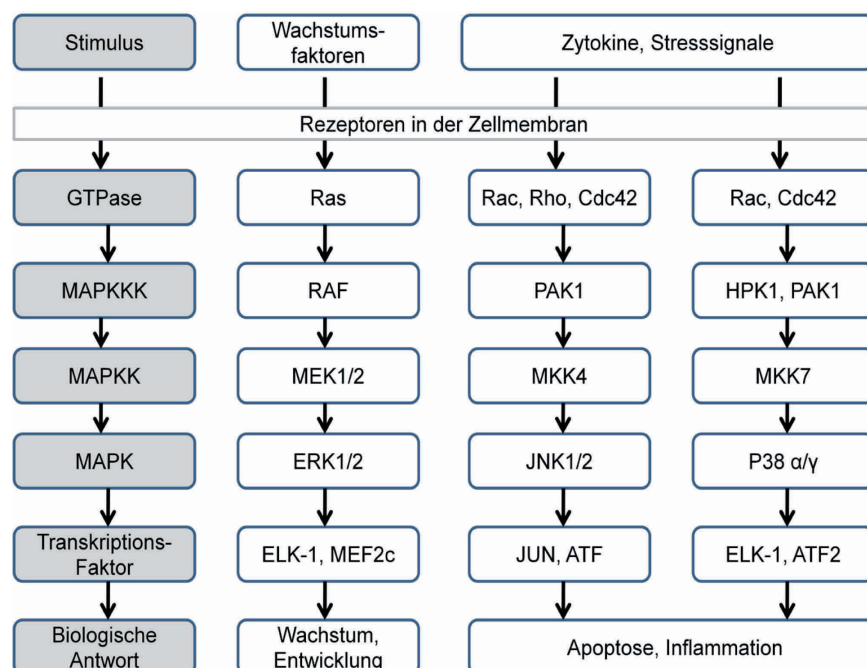
Zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen, welche (nach Conseil) durch die Bindung der Flavonoide an die ATP-Bindestelle potentiell dereguliert werden können, gehören die Mitogen Aktivierten Protein Kinasen. Aufgrund ihrer zentralen Stellung in der intrazellulären Signaltransduktion wird im Folgenden kurz auf die MAPKinasen und ihre Regulation durch Flavonoide eingegangen.

Die Aktivität der MAPKinasen wird durch membranständige Rezeptoren reguliert, welche extrazelluläre Signale, wie z.B. die Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, in das Zellinnere weiterleiten. Die Agonistenbindung an den Rezeptor führt zur Dimerisierung bzw. Konformationsänderung des Rezeptors, was die Phosphorylierung einer membranständigen GTPase zur Folge hat. Diese bindet an den N-Terminus der ersten nachgeschalteten Kinase (MAPKinase Kinase Kinase) und aktiviert diese hierdurch. Über die Phosphorylierung einer zweiten Kinase (der MAPKinase Kinase) wird schließlich die dritte, terminale MAPKinase aktiviert. Diese kann in den Zellkern translozieren und über die Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zelluläre Prozesse beeinflussen. Von den bisher sechs bekannten MAPKinase-Wegen sind die Extracellular signal Regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38 Kinase die am besten erforschten (Pearson et al.

2001). Eine Übersicht über die MAPKinase-Kaskade mit den drei wichtigsten Vertretern ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die Effekte der ERK- und der JNK-Aktivität werden als Gegenläufig angesehen. Während die ERK-Aktivität allgemein mit Proliferation und Wachstum assoziiert wird (Bonni et al. 1999), kann die JNK-Aktivität mit der Induktion von transkriptionsabhängiger Apoptose korreliert werden. Die Aktivität der p38-Kinase wird in diesem Kontext ebenfalls als advers auf das Überleben der Zellen eingestuft (Mielke und Herdegen 2000). In Experimenten an murinen striatal Neuronen konnten Schroeter et al. (2001) durch eine Behandlung mit Epicatechin eine, durch oxidiertes LDL induzierte, Apoptose unterdrücken. Die Ergebnisse der Studie legen die Beteiligung der c-Jun N-terminalen Kinase sowie der Caspase-3 nahe, so dass protektive Effekte der Verbindungen auf das Überleben bei erhöhtem oxidativen Stress postuliert wurden. Weitere Studien belegen eine Aktivierung der p38-Kinase (Nam et al. 2008) bei einer Inkubation mit 20  $\mu$ M Quercetin in Osteoblasten. Granado-Serrano et al. (2006) wiesen bei der Inkubation einer Hepatomzelllinie mit Quercetin eine Reduktion der als Proliferativ geltenden ERK-Aktivität nach, welche von einer Induktion von Apoptose begleitet war. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Flavonoide die Proliferation von Krebszellen hemmen und Apoptose einleiten können. Allerdings variieren die Effekte der Flavonoide zwischen verschiedenen Zelltypen. Sogar innerhalb einer Zelllinie können je nach Inkubationsbedingungen unterschiedliche Effekte auf die Zellen ermittelt werden.

Die Komplexität der durch Flavonoide beeinflussten zellulären Signalwege wird durch Wechselwirkungen mit Mitgliedern weiterer pro- und anti-apoptotischer Signalwege wie z.B. der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K, Hwang et al. (2009)) weiter erhöht.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der MAPKinase-Signalkaskade**

### 1.1.3 Flavonoide und der Transkriptionsfaktor NFκB

Als NFκB (nuclear factor κappa light chain B) bezeichnet man eine aus zwei Untergruppen bestehende Familie von Transkriptionsfaktoren. Neben den NFκB-Proteinen gehören die Rel-Proteine zu dieser Klasse der Transkriptionsfaktoren. Durch Homo- oder Heterodimerisierung bilden sich die eigentlichen, im Zytosol der Zellen vorliegenden, Transkriptionsfaktoren. Die inhibitorischen κB-Proteine (IκB) binden an den Transkriptionsfaktor, maskieren dadurch seine Kerntranslokationssequenz und halten ihn im Zytosol der Zelle. Extrazelluläre Stimuli wie Zytokine (u.a. TNF-α, IL-1β) oder Lipopolysaccharide führen zu einer Aktivierung von κB-Kinasen (IKK), welche anschließend das IκB phosphorylieren und dadurch seinen Abbau initiieren. Durch die folgende Ubiquitinierung und proteasomale Degradation des IκB liegt der Transkriptionsfaktor frei im Zytosol vor und kann in den Kern translozieren. Die Bindung des Transkriptionsfaktors an κB-Bindestellen im Promotor verschiedener Zielgene führt unter anderem zur Induktion antiapoptotischer und antioxidativer Zielgene, wie Bcl-xl oder MnSOD (Liston et al. 2003), (Wright und Duckett 2005), (Bernard et al. 2001) aber auch zur Induktion proapoptotischer Gene wie Bax und TNF-α (Grimm et al. 2005).

Neben den erwähnten Faktoren kann auch der intrazelluläre Redoxstatus den Transkriptionsfaktor NFκB regulieren. Verschiedene Studien implizieren den Schluss, dass eine ROS-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors vom Stimulus und dem Zelltyp abhängt (u.a. (Schoonbroodt und Piette 2000))

Eine Regulation der NFκB-Aktivität durch Flavonoide ist ebenfalls dokumentiert. Unter anderem wiesen Gupta et al. (2004) eine Induktion des IκB, begleitet von einer erniedrigten Kerntranslokation von NFκB durch die Behandlung epidermaler Krebszellen mit Epigallocatechingallat nach. Auch eine Induktion der NFκB-Kerntranslokation nach Stimulation mit verschiedenen Noxen (LPS, UV-Licht) konnte durch die Behandlung mit Flavonoiden unterdrückt werden (Afaq et al. 2003), (Lin und Lin 1997).

### 1.1.4 Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Die biologische Wirksamkeit einer Substanz hängt neben der Wirkstärke vor allem von der tatsächlich vorhandenen Wirkstoffkonzentration im jeweiligen Organ ab. Die Bioverfügbarkeit wird durch die vier grundlegenden Vorgänge: Absorption, Distribution (Verteilung), Metabolismus sowie Exkretion bestimmt (ADME). Im Falle von Pharmaka spricht man zusätzlich von der Liberation der Substanz aus dem Präparat. Bei der Aufnahme der Flavonoide in Form von Nahrungsergänzungsmitteln oder mit der Nahrung muss das Flavonoid ebenfalls freigesetzt werden um einen biologischen Effekt zu erzielen. Die Freisetzung aus der komplexen Matrix der Nahrung bzw. aus der eingenommenen Tablette sind demnach ebenfalls wichtige Determinanten für die letztlich am Wirkort zu erzielenden

Konzentrationen. Kenntnisse über die Bioverfügbarkeit sowie die möglicherweise noch vorhandene Aktivität der Metabolite sind, neben der Kenntnis der Aufnahme- und Eliminationskinetik essentiell, um Effekte einer Substanz *in vivo* abschätzen zu können.

Die meisten Flavonoide kommen in ihrer glykosilierten Form in der Nahrung vor. Day et al. (2000) und Wilkinson et al. (2003) konnten zeigen, dass verschiedene Flavonoidglykoside mit Hilfe der Lactate-Phlorizine-Hydrolase, einer membranständigen beta-Glukosidase im Bürstensaumepithel des Dünndarms, hydrolysiert werden. Man nimmt an, dass die resultierenden Aglyka aufgrund ihrer niedrigeren Polarität passiv in und durch den Enterozyten diffundieren. Die Aufnahme glykosylierter Flavonoide durch den natriumabhängigen Glukose-Aufnahmetransporter SGLT1 wurde von Day et al. (2003) nachgewiesen. In dem Enterozyten finden neben der Deglykosylierung der aufgenommenen Flavonoidglykoside durch die zytosolische  $\beta$ -Glukosidase (Nemeth et al. 2003) erste Umsetzungen des Flavonoids statt. Dabei werden die Flavonoide zu einem großen Teil durch die typischen Phase-II-Enzyme wie die UDP-Glucuronyl-Transferasen (UGT) und die Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) umgesetzt (Kuhnle et al. 2000). Möglicherweise dienen sie noch im Enterozyten den pGP- bzw. MRP2-Transportern als Substrat und werden in das Lumen des Dünndarms ausgeschieden. In der Leber, dem Organ in welchem der Großteil des Metabolismus stattfindet, werden die Flavonoide extensiv metabolisiert, so dass die aufgenommenen Flavonoide einem hohen FirstPass-Effekt unterliegen (Kang et al. 2009). Es werden auch mehrfach substituierte Metabolite detektiert. Glukuronidierte oder mehrfach substituierte Flavonoide können in der Leber mit der Galle in den Darm sezerniert und über den enterohepatischen Kreislauf erneut aufgenommen werden. Auf diese Weise wird die Verweildauer im Körper erhöht. Die im Plasma detektierten Mengen variieren je nach Flavonoid und Dosis. Die  $C_{\max}$  von Quercetin lag bei einer Dosis von 100 mg bei 0,3  $\mu\text{M}$  bis 0,75  $\mu\text{M}$  während die Aufnahme von 200 mg Naringenin in einer  $C_{\max}$  von 6  $\mu\text{M}$  resultierte (Manach et al. 2004). Auffallend ist, dass für das Flavonol Quercetin keine bis sehr geringe Mengen an freien Aglyka im Blutplasma gefunden werden können, während Epigallocatechingallat auch als nicht konjuguierte Verbindung im Blutplasma detektiert werden konnte (Stalmach et al. 2009). Zusätzlich konnte in dieser Studie eine verlängerte  $T_{\max}$  von Epigallocatechingallat (ca. 1,6 h) im Vergleich zu Quercetin (0,6 bis 0,8 h) bestätigt werden. In den meisten Studien liegt die insgesamt aufgenommene Menge an Flavonoid deutlich unter 1 % der eingesetzten Dosis.

Der Transport der Flavonoide erfolgt im Blut an Albumin gebunden (Boulton et al. 1998). Eine Akkumulation in spezifischen Geweben oder der Transport über einen spezifischen Transporter ist zurzeit noch unklar. Allerdings wird in mehreren Studien die Interaktion von Flavonoiden mit diversen Transportern der ABC-Familie beschrieben (u.a. van Zanden et al.

(2007)). In wieweit diese allerdings mit einer spezifischen Akkumulation der Flavonoide einhergeht ist weitgehend unbekannt.

### **1.1.5 Polyphenole zur Krankheitsprävention**

Ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung und dem Risiko an bestimmten degenerativen Krankheiten zu erkranken, wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien untersucht. Knekt et al. (2002) berichten bei Männern, welche mit der Nahrung höhere Dosen an Quercetin aufgenommen haben, von einer niedrigeren Inzidenz an Lungentumoren. Eine niedrigere Inzidenz für Krebserkrankungen durch die Einnahme von Flavonoiden wird zum einen mit der Inhibition des proliferativen MEK/ERK-Signalweges bei gleichzeitiger Caspase-Aktivierung (Granado-Serrano et al. 2006), sowie der Fähigkeit der Flavonoide, proapoptotische Kinasen wie p38 oder JNK in Krebszellen zu aktivieren, erklärt (siehe auch 1.1.2). Die Auswirkungen auf nicht tumorigene Zielzellen sind meist nicht untersucht worden und eine Flavonoidbehandlung könnte somit auch in gesunden Zellen Apoptose einleiten.

Das antioxidative Potential der Flavonoide wird im Zusammenhang mit Arteriosklerose diskutiert. Diese entsteht durch vermehrtes Auftreten von oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) im Blut, welches von Makrophagen aufgenommen wird. Die resultierende Anreicherung von Cholesterol im Makrophagen initiiert dessen Umwandlung in sogenannte Schaumzellen, welche die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques begünstigen (Steinberg und Witztum 2002). Egert et al. (2009) konnten durch die Gabe von 150 mg Quercetin pro Tag in einer placebokontrollierten doppelblinden Cross-Over Studie die Plasmakonzentration von oxLDL in übergewichtigen Freiwilligen reduzieren. Demgegenüber geben Studien über die antioxidative Kapazität des Blutplasmas nach der Gabe von Flavonoiden kein homogenes Bild. Die Theorie der Atheroskleroseprophylaxe durch eine Reduktion des oxidativen Stresses im Plasma durch Flavonoide wird daher zurzeit kontrovers diskutiert.

Ob Polyphenole tatsächlich präventiv vor der Ausbildung verschiedener Krankheiten schützen können und ob das Risiko/Nutzen-Verhältnis einer erhöhten Polyphenolaufnahme *in vivo* positiv ist, muss in weiteren klinischen und tierexperimentellen Studien überprüft werden.

### **1.1.6 Polyphenole als Nahrungsergänzungsmittel**

Ungeachtet der unklaren Sachlage werden Polyphenole seit einiger Zeit als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Neben den Monopräparaten von Quercetin, Resveratrol oder dem Isoflavon Genistein werden auch Mischpräparate bzw. Extrakte polyphenolhaltiger Pflanzen angeboten (u.a. Grünteeextrakt). Nahrungsergänzungsmittel

sind nach der Europäischen Direktive 2002/46 "Konzentrate von Nährstoffen oder anderer Substanzen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung, alleine oder in Kombination, welche die normale Nahrung ergänzen sollen und in dosierter Form (Kapseln, [...], Pulverbeutel) vermarktet werden." In Deutschland fallen die Nahrungsergänzungsmittel unter die Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung (NemV) und unterliegen nur einer Anzeigepflicht beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Allerdings besteht in Deutschland eine Kennzeichnungspflicht welche besagt, dass die Produkte „kein Ersatz für eine ausgewogene Ernährung“ sind sowie der Hinweis, dass die ebenfalls zu deklarierende „empfohlene tägliche Verzehrmenge nicht überschritten“ werden darf. Mit Einführung der Verordnung EG Nr. 1924/2006 („Health Claims Verordnung“) über mögliche Produktaussagen (u.a. Nährwerts- und gesundheitsbezogene Aussagen) in der Werbung, will die EU irreführende Werbung und falsche Produktaussagen zum Schutze des Verbrauchers verbieten. Der Umsatz mit Nahrungsergänzungsmitteln wurde im Jahre 2005 alleine in Europa auf 5,8 Milliarden Euro geschätzt, wobei Italien und Deutschland die größten Märkte innerhalb der EU sind. Vor allem in den osteuropäischen Staaten mit weniger gesättigten Märkten wurde im Jahre 2005 ein Umsatzplus von 15 % geschätzt. (Meisterernst et al. 2008).

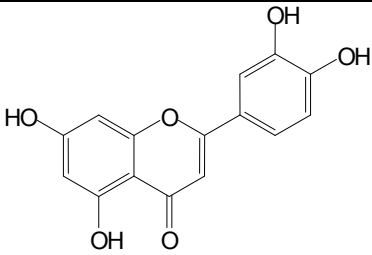
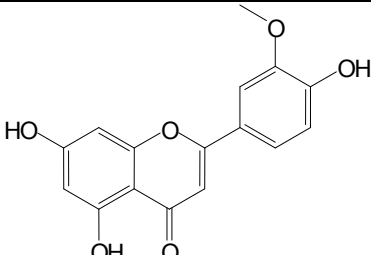
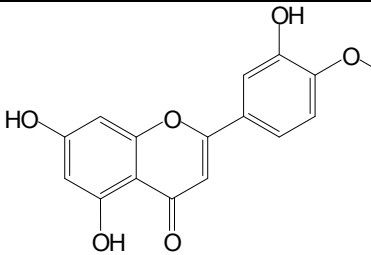
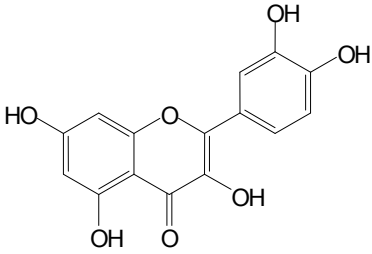
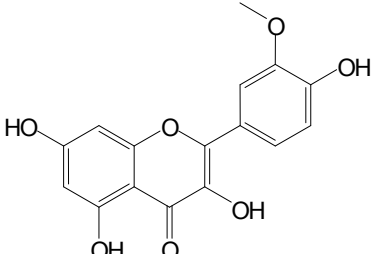
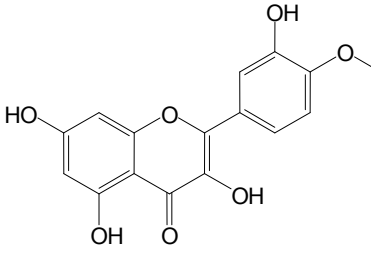
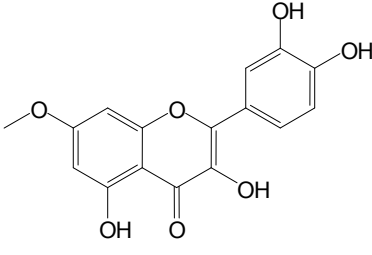
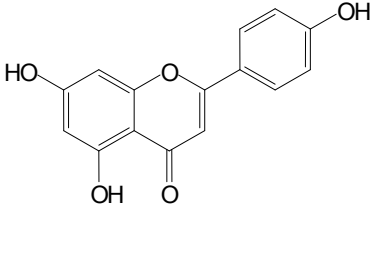
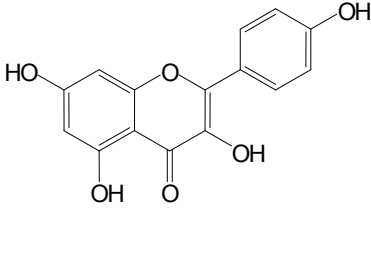
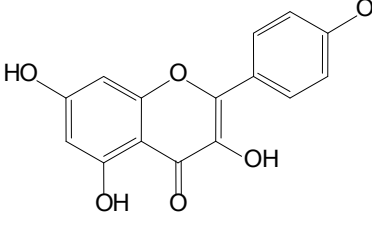
Unberücksichtigt bei der Aufstellung bleibt der Vertrieb über das Internet. Neben der Tatsache, dass die Hersteller aufgrund fehlender tolerierbarer täglichen Aufnahmemengen für Polyphenole bei der Deklaration einer „gesunden Dosis“ halbwegs freie Hand haben, und die Anzahl an Konsumenten welche ihre Nahrungsergänzungsmittel von vornherein im Internet beziehen nicht überschaubar ist, können Überdosierungen mit Polyphenolen nicht ausgeschlossen werden. Das protektive Effekte *in vitro* keine gesundheitsfördernde Wirkung beim Menschen, sondern sogar eine gegenteilige Wirkung haben können, hat die CARET-Studie veröffentlicht (Omenn et al. 1996). Zudem wurde in einer Nachevaluation des Kollektivs von Goodman et al. (2004) berichtet, dass die erhöhte Lungenkrebsinzidenz bei Rauchern, welche in der CARET-Studie bei der Verabreichung von 30 mg  $\beta$ -Carotin/d beobachtet wurde, persistiert. Adverse Effekte einer Überdosierung mit Polyphenolen können daher nicht ausgeschlossen werden.

## 1.2 Verwendete Flavonoide

In dieser Arbeit wurden neben den bekanntesten Vertretern der Flavonole und Flavonone (Quercetin und Kämpferol sowie Apigenin und Luteolin) zusätzliche Vertreter der Catechine sowie deren Gallussäureester untersucht. Neben Quercetin und Kämpferol wurden auch die *in vivo* Metabolite von Quercetin Isorhamnetin und Tamarixetin, welche eine Methylierung im B-Ring tragen, untersucht. Das im A-Ringe methylierte Quercetinderivat Rhamnetin sowie das 3'-Methoxykämpferol wurden zur Erfassung von Struktur-Wirkungsbeziehungen im

Hinblick auf die Position der Methylierung ebenfalls analysiert. Die Methylderivate des Luteolins Chrysoeriol und Diosmetin dienen ebenfalls der Erfassung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

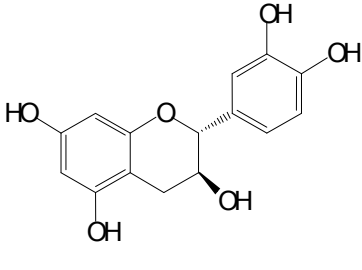
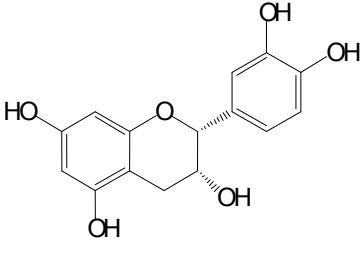
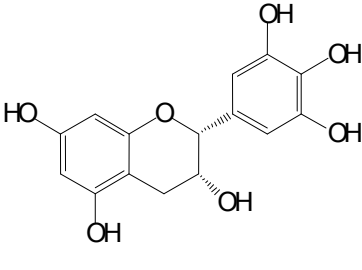
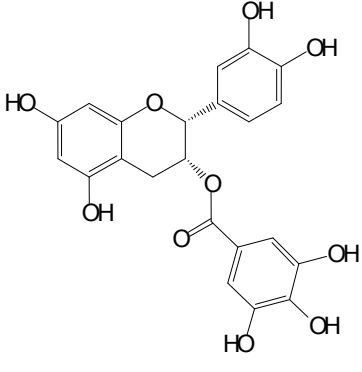
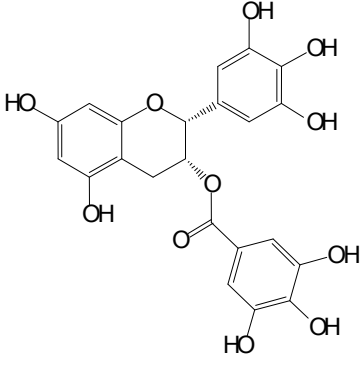
**Tabelle 1: Struktur- und Summenformeln der erworbenen Flavonoide**

|                                                                                                                           |                                                                                                                              |                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Luteolin</b> $C_{15}H_{10}O_6$<br>    | <b>Chrysoeriol</b> $C_{16}H_{12}O_6$<br>   | <b>Diosmetin</b> $C_{16}H_{12}O_6$<br>    |
| <b>Quercetin</b> $C_{15}H_{10}O_7$<br>  | <b>Isorhamnetin</b> $C_{16}H_{12}O_7$<br> | <b>Tamarixetin</b> $C_{16}H_{12}O_7$<br> |
| <b>Rhamnetin</b> $C_{16}H_{12}O_7$<br> | <b>Apigenin</b> $C_{15}H_{10}O_5$<br>    | <b>Kämpferol</b> $C_{15}H_{10}O_6$<br>  |
| <b>Kämpferid</b> $C_{16}H_{12}O_6$<br> |                                                                                                                              |                                                                                                                              |

Neben Flavonen und Flavonolen wird auch Grünteeextrakt häufig als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Die aktiven Hauptbestandteile des Grünteeextrakts sind Catechine und ihre Gallatester. Diese wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Die Gallussäure gehört als Phenolsäure ebenfalls zu den

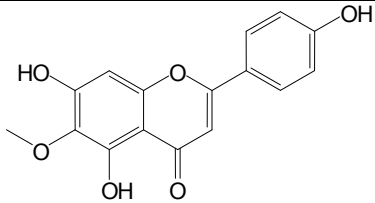
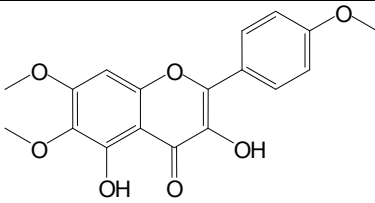
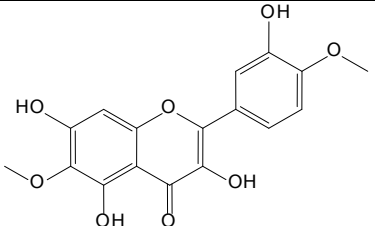
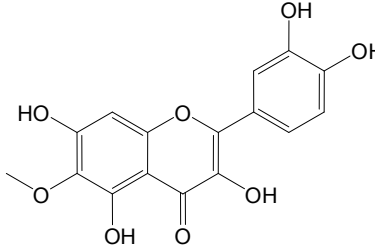
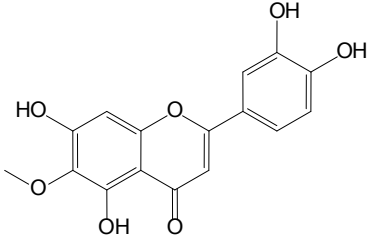
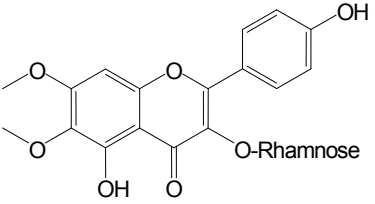
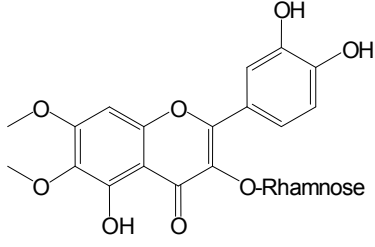
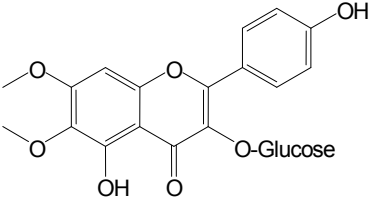
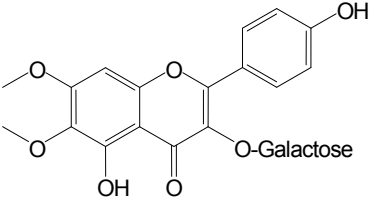
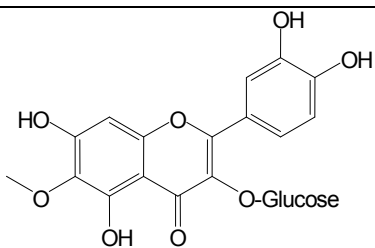
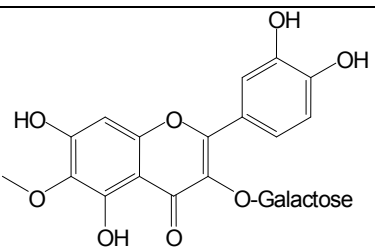
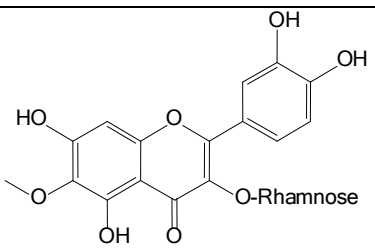
Polyphenolen. Sie liegt im Allgemeinen aber nicht frei, sondern als Ester, in Pflanzen vor und wurde daher nicht einzeln analysiert.

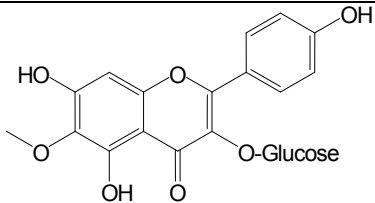
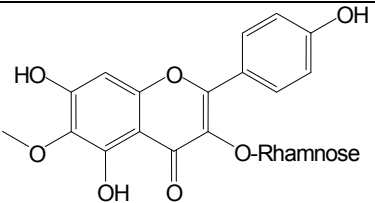
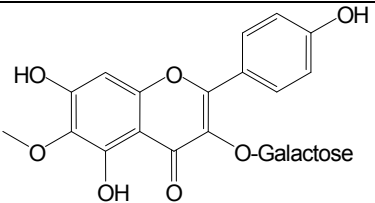
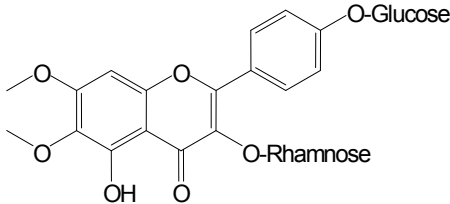
**Tabelle 2: Struktur- und Summenformeln der erworbenen Catechine**

| <b>(+)-Catechin</b><br>$C_{15}H_{14}O_6$                                           | <b>(-)-Epicatechin</b><br>$C_{15}H_{14}O_6$                                        | <b>(-)-Epigallocatechin</b><br>$C_{15}H_{14}O_7$                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|   |   |  |
| <b>(-)-Epicatechingallat</b><br>$C_{22}H_{18}O_{10}$                               | <b>(-)-Epigallocatechingallat</b><br>$C_{22}H_{18}O_{11}$                          |                                                                                     |
|  |  |                                                                                     |

Aufgrund besonderer Strukturmerkmale wurden im Rahmen einer Kooperation mit Professor Passreiter aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf 16 von Dr. Günther Lang aus *Eupatorium semialatum* isolierte Flavonoide untersucht. Diese wurden auf Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich ihres antioxidativen Potentials sowie ihrer Zytotoxizität untersucht. Die Trivialnamen und ihre internen Kürzel sind mit den Strukturformel und Molekulargewichten in Tabelle 3 vorgestellt. Bei den isolierten Flavonoiden handelt es sich um bekannte, mit verschiedenen Zuckern substituierte, methylierte Flavonoide.

**Tabelle 3: Struktur- und Summenformeln sowie die Molekulargewichte der aus *Eupatorium semialatum* isolierten Flavonoide.** In Klammern ist das interne Kürzel der Verbindung angegeben.

|                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hispidulin</b> C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (1)<br>Molekulargewicht: 300 g/mol<br>                  | <b>Mikanin</b> C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> (5)<br>Molekulargewicht: 344 g/mol<br>                       | <b>Laciniatin</b> C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> (4)<br>Molekulargewicht: 346 g/mol<br>                   |
| <b>Patuletin</b> C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> (3)<br>Molekulargewicht: 346 g/mol<br>                   | <b>Eupafolin</b> C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> (2)<br>Molekulargewicht: 316 g/mol<br>                     | <b>Eupalin</b> C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> (6)<br>Molekulargewicht: 476 g/mol<br>                     |
| <b>Eupatolin</b><br>C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> (10)<br>Molekulargewicht: 492 g/mol<br>            | <b>Eupatilin-3-glucosid</b><br>C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> (8)<br>Molekulargewicht: 492 g/mol<br>    | <b>Eupatilin-3-galactosid</b><br>C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> (9)<br>Molekulargewicht: 492 g/mol<br> |
| <b>Patuletin-3-glucosid</b><br>C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub> (16)<br>Molekulargewicht: 494 g/mol<br> | <b>Patuletin-3-galactosid</b><br>C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> (14)<br>Molekulargewicht: 478 g/mol<br> | <b>Patuletin-3-rhamnosid</b><br>C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> (15)<br>Molekulargewicht: 478 g/mol<br> |

|                                                                                   |                                                                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>6-Methoxykämpferol-3-glucosid (11)</b> $C_{22}H_{22}O_{12}$                    | <b>6-Methoxykämpferol-3-rhamnosid (13)</b> $C_{22}H_{22}O_{11}$                   | <b>6-Methoxykämpferol-3-galactosid (12):</b> $C_{22}H_{22}O_{12}$                   |
| Molekulargewicht: 478 g/mol                                                       | Molekulargewicht: 462 g/mol                                                       | Molekulargewicht: 478 g/mol                                                         |
|  |  |  |
| <b>Eupatilin-3-rhamnosid-4'-glycosid</b> $C_{29}H_{34}O_{16}$ (7)                 |                                                                                   |                                                                                     |
|  |                                                                                   | Molekulargewicht: 638 g/mol                                                         |

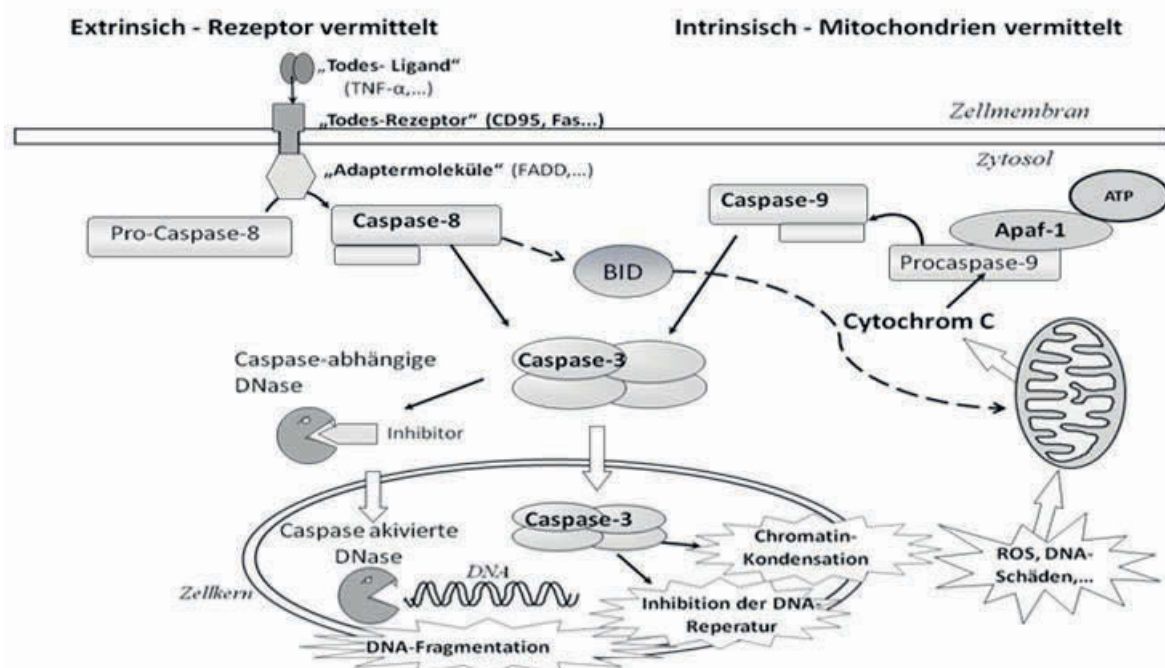
### 1.3 Zelltod – Apoptose und Nekrose

Zelltod wird hauptsächlich in den nekrotischen und den apoptotischen Zelltod unterschieden. Während der apoptotische Zelltod geregelt zum Absterben der Zelle führt, ist die Nekrose ein pathologischer Prozess. Durch die akute Schädigung kommt es zu einem Verlust der Membranintegrität der Zelle. Dies bewirkt aufgrund des osmotischen Druckes einen starken Einfluss von Wasser, was zur Lyse der Zelle führt. Die resultierende Freisetzung von Zellbestandteilen in den Extrazellularraum führt zu Entzündungsprozessen, welche das umgebende Gewebe schädigen können (Van Cruchten und Van Den Broeck 2002).

Bei dem kontrollierten Zelltod handelt es sich um einen aktiven Prozess der Zelle. Er kann durch intrinsische oder extrinsische (über sogenannte Todesrezeptoren) Prozesse eingeleitet werden und spielt eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen sowie der Gewebemöostase. Der intrinsische bzw. mitochondriale Signalweg kann durch intrazelluläre Signale, wie DNA-Schäden oder reaktive Sauerstoffspezies, sowie exogen, durch UV-Strahlen, Zytostatika oder einer kontinuierlichen Restriktion von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden (Foo et al. 2005). Letztlich resultieren die Signale in einem Efflux von Cytochrom C, einem Protein der Atmungskette, in das Zytosol der Zelle. Das Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) unter Beteiligung von ATP, und anschließender Rekrutierung der Procapase-9 im Zytosol der Zelle, das Apoptosom. Die Spaltung der Procapase-9 und die Dimerisierung der beiden Untereinheiten führt zur aktiven Initiatorcaspase-9 (Degterev et al. 2003), welche ihrerseits die Effektorcaspasen-3 und/oder-7 durch Spaltung der Procaspasen aktiviert. Dies bewirkt eine Verstärkung des ursprünglichen Signals. Die aktivierten Effektorcaspasen sind an

vielfältigen Prozessen der Signalweiterleitung des apoptotischen Signales sowie der Vermittlung der Apoptose selbst beteiligt. Sie bewirken eine Kondensation des Chromatins der Zelle, aktivieren spezielle DNasen welche die DNA-Fragmentation einleiten und inaktivieren DNA-Reperaturenzyme (z.B. PARP, PolyADP-RibosePolymerase). Des Weiteren sind sie an der Aufhebung der Membranpolarität beteiligt. Dadurch wird Phosphatidylserin an der Oberfläche der Zelle präsentiert, welches die Zelle für Makrophagen als apoptotisch kennzeichnet. Diese Prozesse bewirken ein Schrumpfen und Herauslösen der Zelle aus dem Zellverband. Im Weiteren Verlauf wird der Zellinhalt durch das sogenannte „Membran-Blebbing“ in Vesikel (sogenannte apoptotische Körperchen) verpackt, welche im Gewebe von Makrophagen aufgenommen und eliminiert werden (de Bruin und Medema 2008).

Der extrinsische Signalweg resultiert ebenfalls in einer Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und/oder -7. Durch die Bindung eines Todesliganden (u.a. das Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$ ) kommt es zur Rekrutierung von Adaptermolekülen an den Rezeptor (u.a. FADD, Fas associated death domain protein), welche durch die Bindung von ProCaspase-8/-10 den sogenannten DISC-Komplex bilden (death inducing signaling complex). Dieser Komplex bewirkt die Aktivierung der Initiatorcaspasen (Kischkel et al. 1995). Die Initiatorcaspasen spalten und aktivieren wiederum die Effektorcaspasen-3/7, welche dann die oben beschriebene Kaskade einleiten. Zusätzlich können die Initiatorcaspasen-8/-10 über das zytosolische Protein Bid die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien bewirken und so zusätzlich die Caspase-9 aktivieren (Rust und Gores 2000).



**Abbildung 3: Stark vereinfachtes Schema der Caspase-Aktivierung und Weiterleitung des apoptotischen Signals.**

#### 1.4 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Der Nematode *C. elegans* hat als Modellorganismus besondere Vorzüge, welchen ihn für diverse biologische, medizinische und pharmazeutische Fragestellungen, wie zum Beispiel die Altersforschung, besonders geeignet machen (Olsen et al. 2006). Neben der einfachen Kultivierung und der Möglichkeit die Stämme durch Kryokonservierung über lange Zeiträume zu konservieren (Lewis und Fleming 1995), ist die Transparenz des Fadenwurmes für diese Arbeit besonders hervorzuheben. Des Weiteren handelt es sich bei *C. elegans* um einen multizellulären Organismus, welcher sich überwiegend durch Selbstbefruchtung fortpflanzt (Inzidenzrate von Männchen ca. 0,2). Dadurch entstehen Klone sich entsprechender Würmer, so dass homogene Populationen auftreten. Bei 25°C beträgt der Lebenszyklus drei Tage. Insgesamt durchläuft der Nematode vier Larvenstadien (L1 - L4) bis zum adulten Wurm, kann unter Stressbedingungen aber ein Dauerstadium ausprägen. Die mittlere Überlebensspanne variiert je nach Stamm und betrug bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm ca. 20 Tage. Der Hermaphrodit besteht aus 959 Zellen (Zellkonstanz, Hall et al. (2006)) welche das komplexe physiologische System des Nematoden einschließlich Muskeln, Nervensystem aber auch Verdauungstrakt und Reproduktionssystem bilden. Weitere interessante Eigenschaften sind der Zellstammbaum und die leichte genetische und molekularbiologische Manipulierbarkeit.

Aufgrund der Homologie wichtiger Gene in *C. elegans* und höheren Spezies wurden und werden viele grundlegende Fragestellungen wie das Altern, bzw. der Einfluss von diversen Verbindungen auf diesen Vorgang, sowie deren molekularen Grundlagen in *C. elegans* untersucht. In mehreren Studien an *C. elegans* konnte ein lebensverlängernder Effekt von diversen Flavonoiden auf den Nematoden nachgewiesen werden. Durch eine Behandlung mit Quercetin konnten Smith und Luo (2003) das intrazelluläre ROS-Level, sowie Gerstbrein et al. (2005) die Akkumulation des Alterspigments Lipofuszin erniedrigen. Dies war von einer erhöhten Stressresistenz begleitet. Eine Verlängerung der Lebensspanne durch die Behandlung mit Flavonoiden konnte, unter anderem für Epigallocatechingallat (Abbas und Wink 2009) und Quercetin (Saul et al. 2008), nachgewiesen werden. Eine erhöhte Stressresistenz und verlängerte Lebensspanne durch die Behandlung mit Quercetin konnte von Kampkotter et al. (2008) bestätigt werden. Neben den antioxidativen Eigenschaften konnte in der Arbeit von Kampkötter et al. zusätzlich die differentielle Kernlokalisierung des Foxo-Homologs Daf16 zwischen Behandlung und Kontrolle nachgewiesen werden. Eine folgende Studie mit Daf16<sup>-/-</sup>-mutanten *C. elegans* Stämmen konnte die Lebensspanne der Mutante durch die Behandlung mit Quercetin ebenfalls verlängern (Saul, Pietsch et al. 2008). Die Aufklärung der, an den Effekten der Flavonoide beteiligten, Signalwege steht somit noch am Anfang der Untersuchungen. Eine lebensverlängernde Wirkung bestimmter Flavonoide in *C. elegans* konnte unter Laborbedingungen gezeigt werden.

## 1.5 Zielsetzung

Eine stark auf pflanzlichen Produkten basierende Ernährung wird epidemiologisch mit einer reduzierten Inzidenz von unterschiedlichen degenerativen Krankheiten korreliert. Dieser Effekt wird auf die in den Pflanzen vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere die Polyphenole, zurückgeführt (u.a.(Hertog et al. 1995), (Knekt et al. 1997), (Youdim et al. 2002)). Aufgrund dieser Korrelation entstand in den letzten Jahren ein sehr großes Angebot an polyphenolhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln und sogenanntem „Funktional Food“. Neben den „verkaufsfördernden“ antioxidativen Modifikationen des Redoxstatus der Zellen, können Polyphenole ihre Wirkung durch die Interaktion mit diversen Proteinen ausüben. Diese Interaktion erfolgt mit zentralen Signalwegen der Zelle welche mit Apoptose und Proliferation assoziiert sind ((Schroeter et al. 2001), (Nam et al. 2008), (Granado-Serrano et al. 2006), (Lin et al. 2008), (Hwan et al. 2009)). Adverse Effekte einer hochdosierten Flavonoidaufnahme durch die Akkumulation in verschiedenen Geweben können daher nicht ausgeschlossen werden. Wissen über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Flavonoiden, sowie eine mögliche Akkumulation dieser Verbindungen in Zielgeweben, sind daher neben dem Wissen über die pharmakologischen Wirkungen der Metabolite essentiell um die tatsächlich bioaktiven Substanzen zu identifizieren. Auf dieser Grundlage könnte eine Bewertung der künstlich erhöhten Aufnahme von Polyphenolen durch die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln erfolgen.

Zielsetzung der Arbeit war daher, die kinetischen Parameter der Aufnahme strukturverwandter Flavonoide sowie deren verschiedenen Metabolitenprofile in unterschiedlichen Zelllinien zu charakterisieren. Neben der Aufnahme und dem Metabolitenprofil der Flavonoide sollten diese im MTT-Assay auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht werden. Mögliche proapoptotische Eigenschaften der Flavonoide und ihrer Derivate sollten mit diversen Methoden ermittelt werden, um eine Korrelation der Daten mit den im DPPH- und TEAC-Assay ermittelten antioxidativen Eigenschaften der Einzelverbindungen (bzw. der Metaboliten der Verbindungen) und den intrazellulären Konzentrationen in den Zelllinien zu ermöglichen. Durch die Verwendung pharmakologischer Inhibitoren sollten darüber hinaus mögliche aktive Transportvorgänge der Flavonoidaufnahme bzw. des Effluxes aus den Zellen ermittelt werden.

Am Beispiel Epigallocatechingallat sollten Effekte einer subchronischen Aufnahme von Flavonoiden im Rattenmodel untersucht werden. Dabei lag das Augenmerk auf einer möglichen Akkumulation der Verbindung oder ihrer Metabolite in verschiedenen Zielgeweben im Muttertier, und der Möglichkeit eines Transfers der Flavonoide auf den Embryo.

## 2. Material

---

### 2.1 Zelllinien

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| Hct116 | humane Kolonkarzinomzellen (Fogh et al. 1977)                   |
| HepG2  | humane hepatozelluläre Karzinomzellen (Knowles et al. 1980)     |
| MCF-7  | humane Mammakarzinomzellen (Soule et al. 1973)                  |
| HUH-7  | humane hepatozelluläre Karzinomzellen (Nakabayashi et al. 1982) |
| H4IIE  | murine hepatozelluläre Karzinomzellen (Reuber 1961)             |

### 2.2 Zellkulturmedien

|                |                                                                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM           | + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin                                                          |
| DMEM (farblos) | + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin                                                          |
| RPMI           | + 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, nicht essentielle Aminosäuren (1x), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin |

### 2.3 Lösungen und Puffer

|                                                                            |                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acrylamid-Lösung                                                           | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid                                                                                                                |
| Anodenpuffer                                                               | 200 mM Tris, 20 % MeOH, pH 10,4                                                                                                                   |
| Antikörper-Inkubationslg.                                                  | 5 % Trockenmilch in TBST                                                                                                                          |
| Antikörper-Inkubationslg.<br>(für AK der Fa. Cell signaling)               | 1X TBS, 0,1 % Tween-20 + 5 % BSA                                                                                                                  |
| APS 10 % [w/v]                                                             | 1 g APS ad 10 ml dH <sub>2</sub> O, aliquotiert; Lagerung bei -20°C                                                                               |
| Blockierlösung                                                             | 5 % Trockenmilch in TBST                                                                                                                          |
| Coomassie-Entfärbelösung<br>(Membran)                                      | 50 % [v/v] Methanol, 1 % [v/v] Essigsäure                                                                                                         |
| Coomassie-Färbelsg<br>(Membran)                                            | 40 ml Ethanol, 2 ml Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brilliantblau auffüllen auf 100 ml mit dH <sub>2</sub> O                                          |
| DNA - Auftragspuffer                                                       | 0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylenxyanol, 50 % [v/v] Glycerol, in 1x TBE                                                               |
| EDTA-Lösung                                                                | 0,5 M EDTA, pH 8,0                                                                                                                                |
| Einfriermedium (Zellen)                                                    | 900 µl FCS + 100 µl DMSO                                                                                                                          |
| Entwickler (Western Blot)<br>(Kodak GBX <i>developer and replenisher</i> ) | 250 ml Entwickler Lösung + 750 ml dH <sub>2</sub> O                                                                                               |
| Extraktionslg. (MTT - Test)                                                | 5 % Ameisensäure, 95 % Isopropanol                                                                                                                |
| FCS                                                                        | Alliquotiert; Lagerung bei -20°C                                                                                                                  |
| Fixierer (Western Blot)                                                    | 600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfid ad 2L dH <sub>2</sub> O                                                                              |
| Kathodenpuffer                                                             | 25 mM Tris, 20 % Methanol, ε-Aminocapronsäure, pH 9,4                                                                                             |
| Laufpuffer (10x)                                                           | 250 mM Tris, 1,92 M Glycin                                                                                                                        |
| Lysepuffer<br>(DNA-Leiter)                                                 | 10 ml TrisHCl (1 M pH 8,0), 30 ml 20 % [w/v] SDS, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad 1 L, Lagerung bei 4°C                                                |
| MTT Stammlösung (5x)                                                       | 3,5 mg/ml MTT in dH <sub>2</sub> O, lichtgeschützt 4°C                                                                                            |
| MTT-Gebrauchslösung (1x)                                                   | MTT-Stammlösung mit Wachstumsmedium verdünnt                                                                                                      |
| NaCl-Lösung (DNA-Leiter)                                                   | 5 M NaCl                                                                                                                                          |
| PBS (10x)                                                                  | 1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                           |
| Phenol-Chloroform (DNA-Leiter)                                             | 250 µl Chloroform, 500 µl Rotiphenol                                                                                                              |
| Phosphatase inhibitor cocktail                                             | 200 mM Imidazol, 100 mM Natriumfluorid, 115 mM Natriummolybdat, 100 mM Natriumvanadat, 400 mM Natriumtartrat in dH <sub>2</sub> O                 |
| Phosphatpuffer pH 7, 50 mM                                                 | Lsg1: 6,81 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 L; Lsg2: 8,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 L; mit Lsg1 pH auf 7,0 bei Lsg2 einstellen |
| Ponceau-S Färbelsg.                                                        | 2 g Ponceau Rot S, 30 g Sulfosalicylsäure, 60 ml 50 % Trichloressigsäure, ad 100 ml dH <sub>2</sub> O                                             |

|                           |                                                                                                                             |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Propidiumiodid            | 1,5 mM (1mg/ml) in dH <sub>2</sub> O, filtrieren (0,2 µm), Lagerung in Aliquots bei -20°C                                   |
| Protease inhibitor (100x) | Leupeptin-hemisulfat 1µM, Aprotinin 150 nM, EDTA 0,5 mM, E-64 Proteaseinhibitor 1 µM, AEBSF 500µM                           |
| RIPA – Puffer             | 50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] NP40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat                     |
| RIPA-Gebrauchspuffer      | RIPA-PUFFER + 1x Proteinase Inhibitor Cocktail (aliquotiert, -20°C), + 1x Phosphatase inhibitor Cocktail+ 1µl/ml Okadasäure |
| RNAse A                   | 10 mg RNAse A in 1 ml Wasser, sterilfiltrieren, 15 min bei 90°C denaturiert, Lagerung in Aliquots bei -20°C                 |
| Sammelgelpuffer (2x)      | 250 mM Tris, 0,2 % [w/v] SDS, pH 6,8                                                                                        |
| SDS – Laufpuffer (1x)     | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS                                                                                  |
| SDS Probenpuffer (4x)     | 40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β-Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenolblau                                     |
| SDS 10 % oder 20 % [w/v]  | 100 g oder 200 g SDS ad 1 L H <sub>2</sub> O unter langsamem Rühren lösen                                                   |
| Stabilisierungslösung     | Acetonitril + 2,4 % Ameisensäure                                                                                            |
| TBE (5x)                  | 0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0                                                                            |
| TBS (10x)                 | 100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4                                                                                             |
| TBST                      | 1x TBS + 0,1 % [v/v] Tween 20                                                                                               |
| TE - Puffer               | 10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0                                                                                     |
| Trenngelpuffer (4x)       | 1,5 M Tris, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8                                                                                         |
| TrisHCl pH 8,0            | 0,1 M Trizma®-Base                                                                                                          |

## 2.4 Chemikalien

|                                                     |                        |                              |
|-----------------------------------------------------|------------------------|------------------------------|
| 2-Butanol                                           | Acros Organics         | Geel, Belgien                |
| 2-Mercaptoethanol                                   | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| 6x Loading dye (green)                              | MBI Fermentas          | St. Leon-Rot, Deutschland    |
| Acrylamid-Lösung (37,5:1)                           | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Agarose Neeo Ultra                                  | Roth                   | Karlsruhe, Deutschland       |
| Ammoniumperoxodisulfat                              | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| APO-ONE® Homogenous Caspase-3/-7 Assay              | Promega                | Madison, Wisconsin/ USA      |
| Bio-Rad DC Protein Assay                            | Bio-Rad                | München, Deutschland         |
| Bis-Benzimid (Hoechst33342)                         | Sigma                  | Steinheim, Deutschland       |
| BM-Chemiluminescence Western Blotting Kit           | Roche Applied Sciences | Mannheim, Deutschland        |
| Borsäure                                            | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Bromphenolblau                                      | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| BSA Proteinstandard                                 | Bio-Rad                | München, Deutschland         |
| Calciumchlorid                                      | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Chloroform                                          | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Coomassie Brilliantblau R250                        | Serva                  | Heidelberg, Deutschland      |
| CSDP-Substrat                                       | Tropix                 | Bedford, Massachusetts / USA |
| Di-Natriumhydrogenphosphat                          | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| DMEM (farblos)                                      | GIBCO                  | Karlsruhe, Deutschland       |
| DMEM ( <i>high glucose</i> , L-Glutamin, Phenolrot) | GIBCO                  | Karlsruhe, Deutschland       |
| DMSO                                                | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| EDTA                                                | MP Biomedicals         | Solon, Ohio / USA            |
| Entwickler                                          | Kodak                  | Stuttgart, Deutschland       |
| Essigsäure                                          | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Ethanol                                             | Merck                  | Darmstadt, Deutschland       |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml)                           | Roth                   | Karlsruhe, Deutschland       |

|                                               |                  |                                  |
|-----------------------------------------------|------------------|----------------------------------|
| FCS gold                                      | PAA Laboratories | Pasching, Österreich             |
| Formaldehyd 37 % [v/v]                        | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| Glycerol (≥99,5 %)                            | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| Glycin                                        | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| Great Escape                                  | Clontech         | Mountain view, Kalifornien / USA |
| Chemiluminescent Detection Kit                |                  |                                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%             | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| Isopropanol                                   | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Kaliumchlorid                                 | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Kaliumdihydrogenphosphat                      | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Kaliumdisulfit                                | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Methanol                                      | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| MTT                                           | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Na <sub>2</sub> EDTA                          | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| NaCl                                          | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Natriumacetat                                 | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Natriumfluorid                                | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Natriumhydroxid                               | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Natriumpyruvat                                | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Natriumthiosulfat                             | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Natriumvanadat                                | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| nicht-essentielle Aminosäuren                 | GIBCO            | Karlsruhe, Deutschland           |
| Nonidet-P40                                   | Fluka            | Steinheim, Deutschland           |
| Okadasäure                                    | Calbiochem       | San Diego, Kalifornien / USA     |
| Penicillin/Streptomycin                       | GIBCO            | Karlsruhe, Deutschland           |
| Phenol (Rotiphenol®)                          | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| Ponceau-S                                     | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Propidiumiodid                                | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Proteinase Inhibitorcocktail 10x              | Calbiochem       | Darmstadt, Deutschland           |
| RNAse A                                       | Serva            | Heidelberg, Deutschland          |
| Rotiphorese Gel 30                            | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| RPMI (L-Glutamin, Phenolrot)                  | PAA Laboratories | Pasching, Österreich             |
| rrTNF-α                                       | R&D Systems      | Minneapolis, Minneapolis / USA   |
| Salzsäure 37 % [v/v]                          | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| SDS                                           | Serva            | Heidelberg, Deutschland          |
| Stripping Buffer                              | PIERCE           | Rockford, Illinois / USA         |
| SuperSignal West Pico                         | PIERCE           | Rockford, Illinois / USA         |
| Chemiluminescent Substrate                    |                  |                                  |
| TEMED                                         | Serva            | Heidelberg, Deutschland          |
| Trichloressigsäure                            | Merck            | Darmstadt, Deutschland           |
| TrisHCl                                       | MP Biomedicals   | Solon, Ohio / USA                |
| Triton X-100                                  | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Trizma-Base                                   | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Trizol (Tri <sup>®</sup> Reagent)             | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Trockenmilch (Nonfat-Dried Milk<br>- Bovine)  | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |
| Trolox                                        | Calbiochem       | San Diego, Kalifornien / USA     |
| Trypsin (0,5 % Trypsin,<br>5,3 mM EDTA – HNa) | GIBCO            | Karlsruhe, Deutschland           |
| Tween 20                                      | MP Biomedicals   | Solon, Ohio / USA                |
| Wasserstoffperoxid                            | Roth             | Karlsruhe, Deutschland           |
| ε-Aminocapronsäure                            | Sigma            | Steinheim, Deutschland           |

## 2.5 Molekulargewichtsmarker

|                       |                                                                                                                                                         |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DNA-Marker:</b>    | <b>Gene Ruler® 1 kb DNA ladder:</b><br>10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1000 / 750 / 500 / 250 bp (MBI Fermentas) |
|                       | <b>Gene Ruler® 100 bp DNA ladder:</b><br>1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100 / 80 bp (MBI Fermentas)                             |
| <b>Proteinmarker:</b> | <b>Page Ruler® Protein ladder:</b><br>200 / 150 / 120 / 100 / 85 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 25 / 20 / 15 / 10 kDa, unstained (MBI Fermentas)            |
|                       | <b>Page Ruler® Prestained Protein ladder:</b><br>170 / 130 / 100 / 72 / 55 / 40 / 33 / 24 / 17 / 11 kDa (MBI Fermentas)                                 |

## 2.6 Antikörper

| Zielprotein                        | Hersteller/Firma                     | Verdünnung | Größe (kDa) |
|------------------------------------|--------------------------------------|------------|-------------|
| ERK 1/2                            | Santa Cruz, sc-94                    | 1:1000     | 44 + 42     |
| phospho-ERK 1/2<br>(Thr202/Tyr204) | Cell signaling, #9101                | 1:1000     | 44 + 42     |
| JNK/SAPK1                          | Upstate, 06-748,                     | 1:1000     | 46          |
| phospho-JNK (Thr183/Tyr185)        | Cell Signaling, #9251,               | 1:1000     | 46 + 52     |
| p38                                | Santa Cruz, sc-535                   | 1:1000     | 38          |
| phospho-p38 (Thr180/Tyr182)        | Cell signaling, #9219                | 1:1000     | 38          |
| <b><u>Sekundär-Antikörper</u></b>  |                                      |            |             |
| Goat-anti-mouse IgG                | HRP Konjugat, Serotec                | 1:5000     |             |
| Goat-anti-rabbit IgG               | HRP Konjugat, Southern Biotechnology | 1:5000     |             |
| Pig-anti-Goat                      | HRP-Konjugat, Biocarta               | 1:5000     |             |

## 2.7 Geräte

Bakterienschüttler  
Blotting Apparaturen

INFORS AG CH-4103  
Biometra, Pharmacia LKB Multiphor II  
OWL HEP-1, Thermo Scientific  
Peqlab  
Icematic F90, Compact Electronics  
Axiolab, Zeiss  
BIO-RAD  
Ori-Block® DB-3, Techne  
Dry Bath System, Starlab

Eismaschine  
Fluoreszenzmikroskop  
Geldokumentationsanlage 2000  
Heizblock

P 580, Dionex  
ASI-100, Dionex (20 µl Injektionsvolumen)  
UVD 340 S, Dionex  
STH585, Dionex  
Eurospher 100-C18, Knauer (5µM, 125 mm x 4mm)

HPLC-DAD  
Pumpe  
Probengeber  
Detektor  
Säulenofen  
Säule  
UV-HPLC  
Pumpe  
Probengeber  
Detektor

322, Kontron  
360, Kontron  
320, Kontron

|                             |                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Säule                       | Eurospher 100-C18, Knauer (5 µM, 125 x 4 mm)                                                                                                                        |
| Inkubator                   | Jouan IG 150<br>Binder Serie BC                                                                                                                                     |
| inverses Lichtmikroskop     | Axiovert 100, Zeiss                                                                                                                                                 |
| Kamera Fluoreszenzmikroskop | CoolSNAP-Pro (INAS)                                                                                                                                                 |
| LCMS                        |                                                                                                                                                                     |
| HPLC                        | HP 1100, Agilent                                                                                                                                                    |
| Detektor                    | G1315 B DAD 1100, Agilent                                                                                                                                           |
| Injektor                    | G1313 A ALS 1100, Agilent                                                                                                                                           |
| Säule                       | Eurosphere 100-C18, Knauer                                                                                                                                          |
| MS                          | Finnigan LCQ Deca, Thermoquest                                                                                                                                      |
| Vakuumpumpe                 | Edwards 30, BOC                                                                                                                                                     |
| pH - Meter                  | Radiometer Copenhagen PHM 93                                                                                                                                        |
| Photometer                  | Lambda 25 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer<br>Lambda 12 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer                                                                          |
| Plattenlesegerät            | Wallac Victor 1420 Multilable Counter, Perkin Elmer                                                                                                                 |
| Power Supply                | E143, Consort<br>EV231, Consort<br>E835, Consort<br>PS3002, GIBCO BRL Life Technologies                                                                             |
| Rührer                      | Heidolph MR2002                                                                                                                                                     |
| Schüttler                   | Swip, Edmund Bühler (EB)<br>Roto-Shake Genie, Scientific Industries                                                                                                 |
| Sterilbänke                 | Jouan IC2.12<br>Gelaire BSB4                                                                                                                                        |
| Thermoprinter               | Mitsubishi P91                                                                                                                                                      |
| Ultra-Turrax                | T25 basic, IKA-Werke                                                                                                                                                |
| Waage                       | Sartorius 3716MP<br>Sartorius Analysenwaage MC1                                                                                                                     |
| Wasserbad                   | W22, Mendingen<br>Thermomix_1420, B. Braun<br>Certomat WR, B. Braun<br>Köttermann                                                                                   |
| Wasser-Deionisierungsanlage | Millipore                                                                                                                                                           |
| Zentrifugen                 | Hettich universal 30F<br>Eppendorf 5415R<br>Jouan MR 18 12<br>Beckman Microfuge R<br>Beckman Coulter Avant J – 25<br>Minifuge2, Heraeus Christ<br>Hettich R 24 – 48 |

**2.8 Computersoftware**

|                                       |                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Quantity One 4.1.0                    | Bio Rad                              |
| Word, Excel, Powerpoint, Photo Editor | Microsoft Corporation (Version 2007) |
| Wallac 1420 Workstation               | Perkin Elmer                         |
| Tina 2.0                              | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH      |
| Endnote 1.0                           | Thomson Reuters                      |
| UV-Winlab                             | Perkin Elmer                         |
| DAD-HPLC                              | Chromeleon 6.30                      |
| UV-HPLC                               | Datasystem 450 MT 2                  |
| HPLC-MS                               | Xcalibur, Version 1.3                |

**2.9 Sonstige Materialien**

|                        |                                        |
|------------------------|----------------------------------------|
| Proteinmembranen       | PVDF Western Blotting Membranes, Roche |
| Chromatographie Papier | 3MMCHR, Whatman                        |
| Filme                  | Kodak X-OMAT AR Film XAR-5             |
|                        | CL-X Posure™ Film, Thermo Scientific   |
| HPLC-Zubehör           | Machery&Nagel                          |
| Membranfilter          | Porengröße 0,22 und 0,4 µm, Santorius  |
| SPE-Säulen             | Machery&Nagel                          |
| Zählkammer             | Neubauer                               |

### 3. Methoden

---

#### 3.1 Kultivierung von Zellen

In Rahmen der Dissertation wurden folgende Zelllinien verwendet: Hct116 humane Kolonkarzinomzellen, HepG2 humane Leberkarzinomzellen, MCF-7 humane Mamakarzinomzellen, HUH-7 humane Leberkarzinomzellen und H4IIE murine Leberkarzinomzellen. Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer Dichte ausgesät, die es erlaubte die Subkultivierung einmal wöchentlich durchzuführen. Abhängig von der Teilungsgeschwindigkeit entsprach dies  $1,5 \times 10^6$  Zellen für die Hct116 Kolonkarzinomzellen und reichte bis zu  $3 \times 10^6$  Zellen pro T75 Kulturflasche bei den humanen hepatozellulären Karzinomzellen HepG2 und HUH-7 sowie den Rattenhepatomzellen H4IIE. Die Aussaat der humanen Mamakarzinomzellen MCF-7 erfolgte in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen in RPMI-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 1mM Natriumpyruvat, 1x nicht essentiellen Aminosäuren sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die restlichen Zelllinien wurden in DMEM-Komplettmedium (High Glucose, mit 10 % FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach dem entfernen des Mediums wurden die Zellen mit Hilfe einer 0,5 %igen Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst (1 ml, für 2-3 min im Brutschrank) und anschließend in 9 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Ein Aliquot von 50 µl wurde 1:10 verdünnt und diente der Zellzahlbestimmung. Die pelletierten Zellen (5 min, 560 rpm) wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt und entsprechend ihrer weiteren Verwendung eingesetzt.

Um Zellen einzufrieren wurden sie in der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 50 % Konfluenz) von der Flask gelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 900 µl FCS aufgenommen, im Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO durchmischt und bei -80 °C gelagert. Zum Wiederverwenden der Zellen wurde diese Suspension aufgetaut und in 20 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen konnten nach weiteren zwei bis drei Tagen für die Versuche ausgesät werden.

Vor jeder Verwendung der Zellen wurde der Zustand und die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch untersucht und gegebenenfalls dokumentiert.

#### 3.2 Mikroskopische Analyse von Zellen

##### 3.2.1 Durchlichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte am Zeiss Axiovert 100. Die Zellen wurden in den für die Versuche benötigten Dichten auf die entsprechenden Wellformate oder Schalen ausplattiert und 24 h später mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen im Lichtmikroskop betrachtet und bei 32x Objektiv-Vergrößerung die Morphologie der Zellen (Habitus, Schädigungen, ...) sowie weitere Auffälligkeiten (ausgefallene Substanz, Kontamination, Konfluenz...) auf dem Begleitprotokoll vermerkt.

### 3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde am Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für verschiedene Zeitpunkte in 35 mm Zellkulturschalen inkubiert. Vor der Betrachtung der Zellen bei 40x Objektiv-Vergrößerung musste das Medium abgenommen und die Zellen mit einem 10x10 mm Deckgläschen abgedeckt werden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer CCD schwarz-weiß Kamera (CoolSnap) und die Auswertung über Image-Pro plus (Media cybernetics). Neben der Fluoreszenz wurde auch das jeweilige Durchlichtbild festgehalten. Bei Bedarf wurden die Bilder in der Nachbearbeitung eingefärbt.

### 3.3 Zytotoxizitäts-Assay / MTT-Assay

Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan.

Man geht davon aus, dass hauptsächlich mitochondriale Dehydrogenasen sowie die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH für die Reduktion des Tetrazoliumsalzes zuständig sind. Aufgrund der Tatsache dass beide mit der Energiegewinnung der Zellen zusammenhängen zeigt eine Verringerung der Fähigkeit der Zellen das blaue Formazan zu bilden einen geringeren Energiestoffwechsel an. Dieser dient daher als Marker für die Viabilität der Zellen.

Nach der Behandlung mit verschiedenen Noxen für unterschiedliche Zeiträume konnte so die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Hct116 Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen im 96-Well ausgesät. Die HepG2, HUH-7 und MCF-7 Zellen wurden aufgrund ihres langsameren Wachstums in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro 96-Well verwendet.

Nach der Behandlung der Zellen wurden diese mit 100  $\mu$ l MTT-Gebrauchslösung für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der wasserunlöslichen Kristalle mit Hilfe der MTT-Extraktionslösung und die Menge an gebildetem Formazan wurde bei dessen Absorptionsmaximum (560 nm) photometrisch bestimmt.

### 3.4 Apoptose-Assays

#### 3.4.1 ApoONE (Homogeneous-Caspase-3/7-Assay)

Bei diesem Assay der Fa. Promega wird die Aktivität der Effektorcaspasen-3 und -7 als Maß für den apoptotischen Zelltod verwendet. Die Caspasen spalten spezifisch die Aminosäuresequenz DEVD des nicht fluoreszenten ApoONE-Substrates ab. Die Fluoreszenzintensität dieses nun fluoreszenten Spaltproduktes ist daher proportional der Aktivität der Caspasen. Die Messung erfolgte im Plattenlesegerät (Ex: 485 nm, Em: 535 nm) bei 37 °C über einen Zeitraum von 3 h. Die Zelldichte lag bei  $2,5 \times 10^4$  für die HCT116 Zellen und bei  $3 \times 10^4$  für die HepG2 Zellen. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten durchgeführt. Vor der Zugabe der 50  $\mu$ l ApoONE-Substrat erfolgte eine Volumenreduktion auf 50  $\mu$ l.

### 3.4.2 Hoechst-Färbung

Bei der Hoechst-Färbung wird die DNA der Zellen mit dem membrangängigen DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (0,5 - 1 µl einer 50 mM Stocklösung in DMSO pro 2 ml Kulturmedium) angefärbt. Dieser interkaliert in die kleine Furche der DNA und emittiert bei einer Anregung mit 350 nm blaues Licht von 460 nm. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes konnten nach der Abnahme des Inkubationsmediums die apoptotischen Körperchen (DNA-haltige Vesikel welche beim apoptotischen Zelltod zu späteren Zeitpunkten auftreten und sich durch die Morphologie und die Fluoreszenzintensität gut von normalen Zellen unterscheiden lassen) ausgezählt werden. Um eventuell abgelöste Zellen zu erfassen, wurde das Medium zentrifugiert (2 min, 500 rcf) und das Pellet in 10 µl PBS aufgenommen. Dieses wurde in die Mitte des 35 mm Schälchens pipettiert und mit einem 10x10 mm Deckgläschen bedeckt. Die Auswertung erfolgte jeweils an den vier Ecken des Deckgläschens und der apoptotische Index berechnete sich dann nach der Formel:

Apoptotischer Index =  $\frac{\text{Anzahl der apoptotischen Zellen} \cdot 100}{\text{Anzahl Zellen gesamt}}$

Die verwendete Zelldichte lag bei  $1,5 \times 10^5$  für die HCT116 Zellen und bei  $2 \times 10^5$  bei den HepG2 Zellen.

### 3.4.3 DNA-Fragmentations-Assay

Als weiterer Nachweis des apoptotischen Zelltodes wurde der so genannte DNA-Fragmentations-Assay verwendet. Nach Einleitung der Apoptose kommt es in den Zellen zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen. Diese schneiden die DNA in der Linkerregion zwischen den Histonen. Dadurch entstehen charakteristische Fragmente mit einem Vielfachen von 180 bp, welche nach der Auftrennung im elektrischen Feld ein charakteristisches Bandenmuster bilden („DNA-Leiter“).

Für die DNA-Fragmentierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf 6-Wellplatten ausplattiert, 24 h adhären lassen und 24 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Um neben den anhaftenden auch die abgelösten Zellen zu erfassen wurden die Zellen mit dem Inkubationsmedium abgespült und pelletiert (2 min, 1000 rcf). Nach einem Waschschriff mit 1x PBS und erneuter Zentrifugation (2 min, 1000 rcf) erfolgte die Lyse der Zellen durch die Zugabe von 500 µl Lysepuffer. Nach vorsichtigem Resuspendieren des Pellets und einer 40-minütigen Inkubation mit 7,5 µl RNase A (10mg/ml) bei 37°C unter leichtem Schütteln, wurden die Proteine durch Zugabe von 125 µl NaCl für 60 min bei 4°C gefällt und dann (15 min, 13400 rcf, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu wurde der Überstand mit 250 µl Chloroform und 500 µl Rotiphenol® gründlich gemischt. Die obere wässrige Phase (zum Beschleunigen: 15 min, 13400 rcf, 4°C) wurde erneut mit 650 µl Chloroform extrahiert und zentrifugiert (15 min, 13400 rcf, 4°C). Die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte mit 1 ml vorgekühltem (-20°C) Isopropanol für eine Stunde bei -20°C oder über Nacht bei 4°C. Nach Zentrifugation (15 min, 16000 rcf) wurden die Pellets für 10 min luftgetrocknet, in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Quantifizierung am Photometer erfolgte nach einer 1:200 bzw. 1:100 Verdünnung in TE-Puffer.

Für die Auftrennung der Proben wurde ein 1,75 %-iges Agarosegel verwendet. 5 µg DNA wurden mit 1x DNA-Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und das Gel unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage dokumentiert.

### 3.5 Nekrose-Assays

#### 3.5.1 Laktat-Dehydrogenase-Assay

Bei dem Cytotoxicity Detection Kit der Fa. Roche wird die Aktivität der cytosolischen Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen als Maß für das Ausmaß an Nekrose verwendet. Dabei wird die Aktivität der LDH im Überstand durch das Reduktionsäquivalent  $\text{NADH} + \text{H}^+$  an eine nachgeschaltete Farbreaktion gekoppelt. Durch die Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes mit Hilfe des  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , wird zum einen das von der LDH benötigte  $\text{NAD}^+$  regeneriert und zum anderen das Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazan reduziert. Der Absorptionsanstieg bei 490 nm ist proportional zu der LDH-Aktivität im Überstand. Die Zelldichte lag bei  $1 \times 10^4$  für die HCT116-Zellen und bei  $2 \times 10^4$  für die HepG2-Zellen. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen durch die Zugabe eines Lysepuffers (im Assay-Kit enthalten) lysiert und die Absorptionen der behandelten Zellen auf diese maximale LDH-Freisetzung normiert.

#### 3.5.2 Propidiumiodid-Färbung

Für diesen Nekrosenachweis werden die Zellen mit Propidiumiodid (1 - 2 µl einer 1 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$  konzentrierten Stocklösung pro 2 ml Kulturmedium) angefärbt. Im Gegensatz zu Hoechst 33343 ist Propidiumiodid nicht membrangängig. Im Falle eines nekrotischen Zelltodes kommt es unter anderem zu einer gestörten Membranintegrität, so dass der geladene Farbstoff die Membran passieren und in die DNA interkalieren kann. Nach der Interkalation zwischen die Basen der DNA emittiert das Propidiumiodid bei einer Anregung mit 535 nm orangerotes Licht bei 620 nm. Somit werden nur nekrotische Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes detektiert. Die weitere Vorgehensweise ist analog der Hoechst-Färbung. Der nekrotische Index ergab sich nach der Formel:

$$\text{Nekrotischer Index} = \text{Anzahl der nekrotischen Zellen} \times 100 / \text{Anzahl Zellen gesamt}$$

Die verwendete Zelldichte lag bei  $1,5 \times 10^5$  für die HCT116 Zellen und bei  $2 \times 10^5$  bei den HepG2 Zellen.

### 3.6 Nachweis von antioxidativen Eigenschaften

#### 3.6.1 TEAC-Assay

Der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) - Assay beruht auf der Dekolorisation eines farbigen, stabilen Radikals durch Übertragung des freien Elektrons vom Donor auf ein Akzeptormolekül. Dazu wird die radikalische Lösung am Abend vor der Messung durch eine 1:1 Mischung von 4,9 mM APS und 14 mM ABTS (beide in  $\text{dH}_2\text{O}$  angesetzt) hergestellt. Die Absorption dieser Stammlösung wird mit 80 %-igem Ethanol auf eine Absorption von 1,4 eingestellt und die antioxidativen Eigenschaften der entsprechenden Substanzen photometrisch bei 734 nm bestimmt. Dazu wurden 500 µl der radikalischen Lösung mit 500 µl der jeweiligen Substanz (in 80 % Ethanol gelöst) durchmischt. Die antioxidative Kapazität (= Entfärbung der Radikallösung) wird hierbei in Bezug zum synthetischen Vitamin E-Derivat Trolox analysiert.

### 3.6.2 DPPH-Assay

Während bei dem TEAC-Assay das ABTS-Radikal erst durch eine vorherige Reaktion gebildet werden muss, ist Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) selbst ein stabiles Radikal, welches, nach Lösen in Ethanol, sofort zu verwendenden ist. Die Absorption der Radikallösung wird bei 517 nm auf 1,4 eingestellt. Die restliche Vorgehensweise ist analog der des TEAC-Assays. Die antioxidative Kapazität wird auch beim DPPH in Bezug zum synthetischen Vitamin E-Derivat Trolox analysiert.

## 3.7 Nukleinsäuren

### 3.7.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Quantifizierung der DNA erfolgte am Photometer. Die Proben wurden zuvor jeweils 1:100 bzw 1:200 verdünnt und mittels einer Quarzküvette bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Basen) und 280 nm (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) gemessen.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Angaben für  $\lambda = 260 \text{ nm}$ :

DNA: 1 OD = 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA

Durch Berechnung des Verhältnisses 260/280 nm konnte die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Für reine DNA und RNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Gelelektrophorese mit einer Agarosematrix trennt die Nukleinsäuren nach ihrer Größe auf. Für doppelsträngige und nach Denaturierung als „*random coil*“ vorliegende einzelsträngige Nukleinsäuren ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichts und ihrer Laufweite im Gel. Allerdings sind zu große oder zu kleine Fragmente ausgenommen, da sie entweder zu stark gestaucht werden können bzw. im umgekehrten Fall zu klein sind um durch den Siebeffekt des Geles aufgetrennt zu werden (Southern 1979).

Für die DNA Elektrophoresen wurden 1,75 %ige Agarosegele (w/V in TBE-Puffer) verwendet. Agarose bestehend aus einem Heteroglucan aus  $\beta$ -D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose in alternierender  $\alpha$ -1,3/ $\beta$ -1,4-Verknüpfung eignet sich durch die Bildung eines molekularen Netzes zur Trennung von DNA mit einer Größe zwischen 0,1 - 60 kb. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgeköcht, unter Rühren bis auf ca. 60 °C abgekühlt und mit EtBr versetzt (interkaliert zwischen die „*gestapelten*“ Basen). Nach dem Einfüllen in die Apparatur und dem Festwerden des Geles wurde dieses mit 1x TBE überschichtet und die Proben, die zuvor mit DNA-Auftragspuffer Puffer versetzt wurden, in den Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 60 V durchgeführt, bis die untere Blaumarkerfront ca. 75 % der Trennstrecke durchlaufen hatte. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage.

## 3.8 Proteine

### 3.8.1 Isolation von Proteinen

Die Zellen wurden einmal mit einfach PBS gewaschen und anschließend mit PBS vom Boden abgespült. Nach der Zentrifugation (2 min, 1000 rcf) wurden die Pellets in einer

geeigneten Menge RIPA-Puffer, versetzt mit Inhibitorlösung (1x) (Protease- und Phosphataseinhibitoren) und Okadasäure (0,01 µg/µl), resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach drei Einfrier-/Auftauzyklen und einer Zentrifugation (10 min, 13400 rcf, 4 °C) wurden die Proteinmengen der Proben aus einer 1:5 Verdünnung mit Hilfe des Lowry-Assays bestimmt.

### **3.8.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem „BIO-RAD DC Protein Assay“ von BIO RAD Laboratories nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten. Die Farbentwicklung wurde im Plattenlesegerät bei 590 nm bestimmt. Die enthaltene Proteinmenge wurde mit Hilfe einer Eichreihe des Proteinstandards BSA berechnet.

### **3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld in denaturierenden Polyacrylamidgelen. Hierzu wurde eine Lösung aus Acrylamid und Bisacrylamid durch APS und TEMED zur radikalischen Polymerisation angeregt. Dabei reagiert das Acrylamid zu langen Ketten welche durch das bifunktionelle Bisacrylamid vernetzt werden. Je nach Prozentigkeit des Trenngels (zwischen 9 % bis 15 % für größere bzw. kleinere Fragmente) können unterschiedliche Größenbereiche schärfer aufgetrennt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich Proteine in ihrer Ladung. Durch das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken der Proteine aufgelöst. Die zusätzliche Anlagerung des SDS bei einer kurzen Hitzedenaturierung in Anwesenheit des Detergenz stabilisiert die entfaltete Struktur der Proteine und sorgt gleichzeitig für eine negative Ladung der entfalteten Proteine. Dadurch ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel hauptsächlich von der relativen Molekülmasse und nicht von der Nettoladung des Proteins abhängig.

Die Polymerisation des Trenngels erfolgte zwischen zwei Glasplatten für 1 h. Dabei wurde das Gel mit Butanol überschichtet. Nach dem Abgießen des Butanols und Spülen der Trenngeloberfläche mit demineralisiertem Wasser wurde das Sammelgel (4,5 %) gegossen, der Kamm luftblasenfrei eingeführt und das Gel 30 min aushärten gelassen.

Die Proteinproben wurden auf 2 bis 40 µg Protein eingestellt und mit ¼ Volumen SDS Auftragspuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95°C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und am Deckel gebildetes Kondensat kurz herunter zentrifugiert. Für die Gelelektrophorese wurde 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Die Einwanderung der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 15 mA für ein kleines bzw. 30 mA für ein großes Gel bis das Trenngel erreicht war. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte für weitere 90 - 120 Minuten bei 150 V.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der PAGE-Gele; Mengen für die Herstellung eines kleinen Gels (6x9 cm)**

|                                                           | Trenngel<br><b>9%</b> | Trenngel<br><b>10%</b> | Trenngel<br><b>15 %</b> | Sammelgel<br><b>4,5%</b> |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30% ig)<br>= Rotiphorese 30 | 1,8 ml                | 2 ml                   | 3 ml                    | 0,6 ml                   |
| Trenn- bzw. Sammelgelpuffer                               | 1,5 ml                | 1,5 ml                 | 1,5 ml                  | 2 ml                     |
| dH <sub>2</sub> O                                         | 2,7 ml                | 2,5 ml                 | 1,5 ml                  | 1,388 ml                 |
| APS 10 % ig [w/v]                                         | 30 µl                 | 30 µl                  | 30 µl                   | 24 µl                    |
| TEMED                                                     | 5 µl                  | 5 µl                   | 5 µl                    | 4 µl                     |

### 3.8.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Der Proteintransfer aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte als „*semi-dry*“ Blot. Für den Aufbau des Blotts wurden jeweils 3 Whatmannpapiere in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt und das Trenngel und die PVDF-Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Die Membran wurde in Methanol aktiviert und in Wasser gehalten. Nun erfolgte der Aufbau des Blotts entsprechend der Vorgabe durch die Position der jeweiligen Elektrode (Anode oder Kathode) mit den in Anoden- oder Kathodenpuffer getränkten Whatmannpapieren. Die Reihenfolge von PVDF-Membran und Gel erfolgte so, dass die Membran immer Kontakt zu den in Anodenpuffer getränkten Papieren hatte. Die Proteine wurden bei 250 mA und 30 W für 30 min transferiert.

### 3.8.5 Färbung filtergebundener Proteine

#### 3.8.5.1 Coomassie

Coomassie Brilliant Blue (ein Triphenylmethan-Farbstoff) bindet unspezifisch an basische Amino- und Iminogruppen der Aminosäuren. Um die membrangebundenen Proteine nach dem Transfer nachzuweisen, wurde die Membran so lange in Coomassie Färbelösung geschwenkt, bis sich eine einheitlich blaue Färbung zeigte. Mit Wasser oder bei einer sehr starken Färbung der Membran mit Coomassie-Entfärbelösung wurden die Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund sichtbar gemacht, um einen homogenen Transfer der Proteine nachzuweisen.

#### 3.8.5.2 Ponceau-S

Im Gegensatz zur Coomassie-Färbung kann die Bindung von Ponceau-S an geladene Aminogruppen leicht abgespült werden. Daher wurde sie in erster Linie dazu verwendet direkt nach dem Blotten den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen zu überprüfen. Direkt nach dem Blotten wurde die Membran dazu kurz mit dH<sub>2</sub>O gespült und in Ponceau-S Lösung geschwenkt bis eine gleichmäßige Färbung auftrat. Die Entfärbung der Membran erfolgte in dH<sub>2</sub>O, bis die Proteinbande gut erkennbar waren.

### 3.8.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Zum Blockieren des unspezifischen Hintergrundes wurde die PVDF-Membran in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Primär-Antikörperinkubation erfolgte in Blockierlösung oder spezifischer Erst-Antikörperlösung (bei Antikörpern der Fa. Cell signalling) über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran 3 - 5x 10 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte in Blockierlösung für 1 h bei RT. Danach wurde erneut für 3 - 5x 10 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen.

### 3.8.7 Chemilumineszenz Detektion

Die Chemilumineszenz Detektion erfolgte mittels des „*BM Chemiluminescence Blotting Substrate* (POD)“ der Fa. Roche oder dem „*Super Signaling Kit*“ der Fa. PIERCE. Durch die HRP-gekoppelten Zweit-Antikörper kann in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Substrat Luminol zu einem Licht emittierenden Intermediat oxidiert und die resultierende Lumineszenz mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert werden. Die exponierten Filme wurden anschließend kurz in Entwicklerlösung geschwenkt, in Wasser getaucht und die nicht reagierten Silberhalogenide im Fixierer entfernt. Nach Ende des Fixierens wurden die Filme für einige Minuten gewässert.

### 3.8.8 Wiederholtes Umsetzen von PVDF-Membranen - Strippen

Um auf einer bereits verwendeten Membran noch ein weiteres Protein immunologisch zu detektieren, wurden die PVDF-Membranen „gestrippt“. Dazu wurden bereits getrocknete Membranen in Methanol reaktiviert und anschließend zehn Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurden die schon gebundenen Antikörper für 30 min bei 37°C in zuvor auf 37°C erwärmten Stripping Buffer (Fa. PIERCE) unter leichtem Schütteln entfernt. Am Ende des Vorgangs wurde die Membran erneut für zehn Minuten in TBST gewaschen und für 1 h mit Blockierlösung blockiert. Die Membran konnte nun mit den gewünschten Antikörpern erneut umgesetzt werden.

## 3.9 Reporter Assay / SEAP-Assay

Im SEAP-Assay wird das rekombinante Gen der sekretierten alkalischen Phosphatase als Reportergen unter Expressionskontrolle eines spezifischen Promotors verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete Reporterkonstrukt (stabil transfiziert in Rattenhepatomzellen H4IIE) stellte die sekretierte alkalische Phosphatase unter die Kontrolle eines sechs kappaB-sites tragenden Promotors. Diese stabil transfizierte Zelllinie wurde von Frau Dr. Yvonne Chovolou generiert. Die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgte mit Hilfe des Substrates CSPD. Dieses wird von der Phosphatase zum instabilen Dioxetanion dephosphoryliert. Der Zerfall des Anions kann aufgrund der Emission von Licht im Photomultiplier detektiert werden. Der Anstieg der Chemolumineszenz ist proportional zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase und erlaubt somit den Nachweis der NFκB-abhängigen SEAP-Aktivität.

4\*10<sup>5</sup> Zellen pro Well wurden vor der einstündigen Vorinkubation mit Flavonoiden in 24-Well Platten für 24 h anwachsen gelassen. Nach der Vorinkubation (1 h) erfolgte die Behandlung

mit 4 ng/ml rattenrekombinantem TNF $\alpha$  für 24 h. Die Überstände der behandelten Zellen wurden nach jeweiliger Inkubation zentrifugiert, der Überstand 1:4 mit Verdünnungspuffer verdünnt und endogene Phosphatasen für 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Anschließender Zentrifugation (30 s, 20000 rcf) folgte ein herunter kühlen der Proben auf Eis. 30  $\mu$ l der hitzeinaktivierten Überstände wurden in weiße 96-Well Platten überführt, 5 min mit 30  $\mu$ l Assaypuffer inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 30  $\mu$ l Substratlösung gestartet. Die erste Messung erfolgte nach einer Wartezeit von fünf Minuten. Die NF $\kappa$ B-abhängige Phosphatase-Aktivität im Überstand der Zellen wurde durch TNF- $\alpha$  induziert. Um toxische Effekte der Verbindungen auszuschließen wurde die Viabilität der Zellen mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Lumineszenz wurde anschließend auf die Kontrolle bezogen.

### 3.10 Aufnahmestudien *in vitro*

#### 3.10.1 Detektion der Polyphenole

Die Detektion der verschiedenen Flavonoide und Catechine erfolgte je nach Anwendung in einer HPLC-Anlage der Firma Kontron mit UV-Detektor, einer HPLC mit Dioden-Array-Detektor und interner UV-Spektren-Datenbank (Fa. Dionex) oder durch die Aufnahme des UV-Spektrums in einem Photometer der Fa. Perkin Elmer.

Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie lassen sich Substanzgemische mit einer hohen Auflösung trennen. Die hohe Trennleistung beruht auf der sehr kleinen Korngröße der stationären Phase, welche gleichzeitig den Gegendruck erhöht. Dadurch muss die mobile Phase mit Hilfe von Pumpen durch die Säule gepresst werden (Dominik et al. 1996).

##### 3.10.1.1 DAD-HPLC

Die Anlage mit DAD und integrierter Spektrenbibliothek wurde bevorzugt verwendet um Anhaltspunkte für die zu erwartende Retentionszeit, das Absorptionsspektrum sowie die Identität (durch Abgleich mit der internen Datenbank) einer gesuchten Substanz zu erhalten. Standardmäßig wurde ein binäres Lösungsmittelgemisch verwendet um die in Methanol bzw. einem Methanol-Wassergemisch gelösten Substanzen aufzutrennen. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte automatisch bei 235 nm, 254 nm, 280 nm und 340 nm.

**Tabelle 5: Standardgradient für die analytische HPLC, Flussrate: 1ml/min**

| Zeit (min) | NANOpur Wasser, pH2 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) | Methanol |
|------------|-------------------------------------------------------|----------|
| 0          | 90                                                    | 10       |
| 5          | 90                                                    | 10       |
| 35         | 0                                                     | 100      |
| 45         | 0                                                     | 100      |
| 50         | 90                                                    | 10       |
| 60         | 90                                                    | 10       |

### 3.10.1.2 UV-HPLC

Bei weniger komplexen Substanzgemischen bzw. nachdem eine Zuordnung der Substanzen zu den Peaks im Chromatogramm mit Hilfe der DAD-HPLC durchgeführt wurde, konnten die anschließenden Wiederholungen mit dieser weniger ausgelasteten Anlage durchgeführt werden. Die Detektion erfolgte standardmäßig bei 254 nm. Bei der Bestimmung von Epigallocatechingallat wurde diese Einstellung auf 275 nm geändert. Der Standardgradient aus 100 % Methanol (Gradienten Grade) und dH<sub>2</sub>O (mit 1% Ameisensäure) zur Separierung und anschließender Quantifizierung der Verbindungen ist in Tabelle 6 angegeben.

Die Anpassung des Gradienten und des Fließmittels zur Auftrennung der beiden Methylderivate des Quercetins Tamarixetin und Isorhamnetin wurden ebenfalls mit dieser Anlage durchgeführt. Aufgrund seiner besseren Trenneigenschaften wurde das Methanol durch Acetonitril ersetzt und die Menge an Ameisensäure zur Verbesserung der Peakschärfe für diese Trennung auf zwei Prozent angehoben (siehe Tabelle 7).

Der Standardgradient zur Separierung der Proben bei der Bestimmung der Stabilität von Quercetin in DMEM ist in Tabelle 8 angegeben.

**Tabelle 6: Standardgradient zur Auftrennung der Flavonoidproben, Flussrate: 1ml/min**

| Zeit (min) | dH <sub>2</sub> O, 1 % HCOOH | Methanol |
|------------|------------------------------|----------|
| 0          | 90                           | 10       |
| 5          | 90                           | 10       |
| 40         | 0                            | 100      |
| 48         | 0                            | 100      |
| 55         | 90                           | 10       |
| 60         | 90                           | 10       |

**Tabelle 7: Modifizierter Gradient zur Auftrennung von Tamarixetin und Isorhamnetin, Flussrate: 1ml/min**

| Zeit (min) | dH <sub>2</sub> O, 2 % HCOOH | Acetonitril |
|------------|------------------------------|-------------|
| 0          | 73                           | 27          |
| 5          | 73                           | 27          |
| 30         | 72,5                         | 27,5        |
| 30,2       | 0                            | 100         |
| 35         | 0                            | 100         |
| 35,2       | 73                           | 27          |
| 40         | 73                           | 27          |

**Tabelle 8: Standardgradient zur Detektion der Stabilität von Quercetin, Flussrate: 1ml/min**

| Zeit (min) | ddH <sub>2</sub> O, 1 % HCOOH | Methanol |
|------------|-------------------------------|----------|
| 0          | 90                            | 10       |
| 5          | 90                            | 10       |
| 30         | 0                             | 100      |
| 35         | 0                             | 100      |
| 40         | 90                            | 10       |
| 45         | 90                            | 10       |

### 3.10.1.3 HPLC-ESI-MS

Die HPLC-MS koppelt ein hochleistungsflüssigchromatographisches Verfahren mit der Elektrospray-Massenspektrometrie. Dadurch können Substanzgemische erst chromatographisch aufgetrennt und anschließend die relativen Molekülmassen der Einzelverbindungen ermittelt werden. Das Verfahren der MS/MS-Fragmentierung liefert zusätzlich weitere Hinweise auf die Struktur der Verbindung. Des Weiteren konnte zusätzlich nach erwarteten Molekulargewichten gesucht werden um einen Überblick über die Anzahl einer bestimmten Modifikation zu erhalten. Das Fließmittel wurde zu Beginn aus einem binären Gradienten aus NANOpur Wasser (versetzt mit 0,1% Ameisensäure) und Acetonitril bei einer Flussrate von 0,4 ml/min gebildet (siehe Tabelle 9). Aus ökonomischen Gründen wurde dieser Gradient auf einen binären Gradienten aus NANOpur Wasser (versetzt mit 0,1% Ameisensäure) und HPLC-Methanol bei einer Flussrate von 0,25 ml/min gewechselt (siehe Tabelle 10). Die Proben wurden in Methanol resuspendiert und standardmäßig im positiven als auch im negativen Probenmodus gemessen.

**Tabelle 9: Standardgradient der HPLC-MS mit Acetonitril, Flussrate: 0,4 ml/min**

| Zeit (min) | NANOpur Wasser, pH 2,0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) | Acetonitril |
|------------|----------------------------------------------------------|-------------|
| 0          | 90                                                       | 10          |
| 5          | 90                                                       | 10          |
| 35         | 0                                                        | 100         |
| 45         | 0                                                        | 100         |
| 50         | 90                                                       | 10          |
| 60         | 90                                                       | 10          |

**Tabelle 10: Standardgradient der HPLC-MS mit Methanol, Flussrate 0,25 ml/min**

| Zeit (min) | NANOpur Wasser, pH 2,0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) | Methanol |
|------------|----------------------------------------------------------|----------|
| 0          | 90                                                       | 10       |
| 5          | 90                                                       | 10       |
| 35         | 0                                                        | 100      |
| 45         | 0                                                        | 100      |
| 50         | 90                                                       | 10       |
| 60         | 90                                                       | 10       |

### 3.10.1.4 Photometer

Da Flavonoide sehr charakteristische Absorptionsspektren aufweisen, wurde die Abnahme des Absorptionsmaximums als Maß für die noch vorhandene Menge des Flavonoids in verschiedenen Lösemitteln verwendet. Da hierbei keine Separierung der Substanzen erfolgt wurde diese Methode nur bei der Stabilitätsbestimmung der Einzelverbindungen verwendet (siehe Punkte 3.10.4).

## 3.10.2 Quantifizierung der Polyphenole

### 3.10.2.1 Bestimmung des Detektionslimits

Das Detektionslimit (Limit Of Detection, LOD) gibt die niedrigste noch zu detektierende Konzentration einer Verbindung an. Diese wird über das Rausch zu Peak-Verhältnis

bestimmt. In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung des Detektionslimits ein Rausch zu Signal-Verhältnis von 1:2 festgelegt.

### **3.10.2.2 Erstellung der Eichgeraden**

Die Quantifizierung der Polyphenole erfolgte bei den für die Aufnahmeversuche verwendeten Wellenlängen. Dies entsprach 254 nm für die Flavonoide und 275 nm für die Catechine. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte mit externen Standards. Die AUC stieg im getesteten Konzentrationsbereich linear zur Konzentration an, so dass mit Hilfe der Geradengleichung die Konzentration einer Probe durch die detektierte Peakfläche berechnet werden konnte.

### **3.10.3 Bestimmung der Metabolite**

#### **3.10.3.1 Identifikation der Metabolite mittels HPLC-ESI-MS**

Zur Bestimmung der Metabolite wurde neben der Retentionszeit in der HPLC-Anlage die Methode der Massenspektrometrie verwendet. Neben dem Abgleich des erwarteten und tatsächlich detektierten Molekulargewichtes gaben die Fragmentierungsmuster im MS/MS-Experiment weitere Hinweise auf die Identität der Substanz.

Dazu wurden die Proben nach der Aufarbeitung (siehe dazu 3.9.6 und 3.9.7 sowie 3.10.5) in 100% Methanol gelöst und jeweils 10 µl in das HPLC-System injiziert. Die weiteren Spezifikationen der Anlage wurden unter Punkt 3.9.1.3 erläutert.

#### **3.10.3.2 Identifikation der Metabolite mittels Koelution**

Nachdem die Modifikation der Ausgangsverbindung im Massenspektrometer nachvollzogen wurde, musste die genaue Position der Modifikation durch die Koelution mit einem Standard ermittelt werden. Dabei limitierte zum Teil die Verfügbarkeit an käuflichen Standards die Möglichkeit der exakten Metabolitbestimmung. Die Koelution wurde mit der UV-HPLC-Anlage durchgeführt. Die Trennbedingungen sind unter Punkt 3.9.1.2 beschrieben.

#### **3.10.4 Stabilität der Polyphenole**

Die Stabilität von Quercetin in An- oder Abwesenheit von Glutathion bzw. Ascorbinsäure wurde mit Hilfe der UV-HPLC ermittelt. Dazu wurde verschieden konditioniertes DMEM mit 50 µM Quercetin versetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot von 200 µl abgenommen. Dieses wurde mit einem Volumen Acetonitril (versetzt mit 2,4 % Ameisensäure) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 16.000 rcf). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 5 min im Ultraschallbad in Methanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 16.000 rcf) wurden die Überstände vereinigt, das Lösemittel unter Vakuum abgedampft und die verbleibende wässrige Phase bei -80 °C eingefroren. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte das Lyophilisat in 300 µl Methanol resuspendiert, erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 rcf) und die Überstände in die HPLC-Anlage injiziert werden.

Die Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte auf die Stabilität von Quercetin wurden photometrisch bestimmt. Das phenolrothaltige DMEM wurde mit 50 µM Quercetin inkubiert und zum Vermessen des Absorptionsspektrums 1:1 mit Wasser verdünnt (Referenz: DMSO in DMEM). Die Abnahme des jeweiligen Absorptionsmaximums diente als Anhaltspunkt für die Menge an noch vorhandenem Quercetin in der jeweiligen Probe.

Die Auswirkungen von Ascorbinsäure auf die Stabilität von Epigallocatechingallat in Dulbeccos Modified Eagles Medium wurden photometrisch bestimmt. Abweichend von der Vorgehensweise bei Quercetin wurde hier an verschiedenen Zeitpunkten ein 500 µl Aliquot der jeweiligen Versuchsansätze abgenommen und dieses einmal mit demselben Volumen Ethylacetat extrahiert. Dies war nötig, da die Absorption des DMEM die des Epigallocatechingallates überlagerte. Die Subtraktion der Absorption am Absorptionsmaximum (272 nm) und der niedrigsten Absorption (340 nm) wurde als Maß für den Gehalt an EGCG in der Ethylacetatphase bestimmt.

### **3.10.5 Kulturbedingungen der Aufnahmeversuche**

Die Untersuchung zur Aufnahme der Polyphenole erfolgte mit  $1 \times 10^6$  Zellen in 60 mm Zellkulturschalen welche 48 h nach der Aussaat durch einen Mediumwechsel erneut zur Proliferation angeregt wurden. Vor der Inkubation mit 50 bis 200 µM der entsprechenden Substanz wurde das Medium der Zellen mit 0,5 mM (Flavonoide) bzw. 1 mM (Epigallocatechingallat und seine Derivate) Ascorbinsäure konditioniert. Die Substanz wurde in diesem so behandelte Medium homogenisiert und anschließend die Zellen für verschiedene Zeiträume inkubiert.

Im Falle der Metabolitdetektion in der LCMS wurden die Ansätze in 100 mm Zellkulturschalen ( $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml) durchgeführt.

Für die Aufnahmeversuche bei 4 °C wurden die Ansätze vor der Inkubation mit Ascorbinsäure (0,5 bzw. 1 mM) und der jeweiligen Substanz für 15 min bei 4 °C herunter gekühlt. Anschließend erfolgte die Inkubation über den gesamten Zeitraum bei 4 °C.

Bei der Koinkubation mit Inhibitoren wurden die Ansätze 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt und bis zur Inkubation mit dem entsprechenden Polyphenol im Inkubator gelagert.

#### **3.10.5.1 Aufarbeitung der Zellen**

Nach der Behandlung wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 750 µl eiskaltem 1x PBS mit 1 % BSA gewaschen. Die Überstände wurden vereint und wie unter 3.10.5.2 beschrieben aufgearbeitet. Der Zellrasen wurde in einem Milliliter eiskaltem PBS mit 1% BSA aufgenommen und pelletiert (5 min, 2000 rcf, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes konnte das Pellet in 300 µl HPLC-Methanol aufgenommen und für zweimal 20 Sekunden bei 100 W mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen werden.

Anschließendes Zentrifugieren (5 min, 2000 rcf, 4°C) trennte die Zellbestandteile vom Methanol so das der Überstand anschließend direkt in die HPLC injiziert werden konnte (Injektionsvolumen 20 µl). Die Zellpellets wurden in 400 µl 10 % SDS aufgenommen, 1/10 verdünnt und der Proteingehalt bestimmt (Lowry). Der intrazelluläre Polyphenolgehalt wurde aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert.

Im Falle der Großansätze zur Bestimmung extrazellulärer Metabolite in den 100 mm Zellkulturschalen wurden die Zellen in zwei Milliliter des eiskalten PBS (inklusive 1% BSA) aufgenommen. Nach Zentrifugation konnte der Überstand mit dem Medium vereint und die Zellen anschließend zweimal mit einem Milliliter PBS + 1% BSA gewaschen werden. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet in 300 µl Methanol aufgenommen. Die restliche Aufarbeitung erfolgte nach Standardbedingungen.

### 3.10.5.2 Aufarbeitung der Überstände

Nachdem die Überstände mit dem PBS vereint wurden (siehe 3.10.5.1; Lagerung die ganze Zeit auf Eis) konnte ein Aliquot von 330 µl mit 250 µl ACN (angesäuert mit 2,4 % Ameisensäure) versetzt werden. Nach dem Abdampfen des flüchtigen Lösemittels unter Luftstrom wurde die wässrige Phase bei -80 °C eingefroren und das Wasser anschließend sublimiert. Das Lyophilisat wurde in 200 µl HPLC-Methanol resuspendiert und das Pellet nach Zentrifugation (5 min, 16000 rcf) erneut mit 100 µl HPLC-Methanol gewaschen. Die Überstände (5 min, 16000 rcf) konnten vereinigt und direkt in die HPLC injiziert (Injektionsvolumen 20 µl) werden.

Bei den Ansätzen mit EGCG wurden 500 µl des Wachstumsmediums mit 500 µl der Stabilisationslösung versetzt. Die restliche Aufarbeitung der Überstände erfolgte analog der Aufarbeitung der Flavonoide.

Die Großansätze zur Metabolitendetektion wurden ebenfalls mit einem Volumen der Stabilisationslösung versetzt, eingedampft, bei -80 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat konnte in 1 bis 2 ml Methanol aufgenommen und nach anschließender Zentrifugation (10 min, 16000 rcf) in die LCMS injiziert werden.

## 3.11 Aufnahme von Flavonoiden in *C. elegans*

Aufbauend auf den Vorversuchen zur Detektion von Flavonoiden und den Versuchen zur Stabilität und Detektion des Epigallocatechingallats geht dieser Abschnitt auf die Besonderheiten der jeweiligen Tierversuche ein.

### 3.11.1 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Nematoden handelte es sich um den Wildtyp Stamm N2 (var. Bristol). Der N2 Stamm sowie der *Escherichia coli* Stamm OP50 bzw. der streptomycinresistente *Escherichia coli* Stamm OP50-1 wurden vom *Caenorhabditis* Genetics Center der Universität von Minnesota bezogen. Die Fadenwürmer wurden standardmäßig bei 20 °C auf Nematode Growth Medium mit als Nahrungsquelle dienenden OP50 Bakterien gehalten (Lewis und Fleming 1995).

#### 3.11.1.1 Alterssynchronisation von *Caenorhabditis elegans*

Zur Alterssynchronisation der Population wurden die trächtigen Hermaphroditen mit Bleiche, bestehend aus 50 % Natriumhypochlorid und 1,5 M Natriumhydroxid, behandelt. Dazu wurden die Würmer mit M9-Puffer in Eppendorfgefäße überführt und durch Zentrifugation (1 min, 5000 rcf) pelletiert. Nach erneutem Waschen und Pelletieren wurden die Würmer mit 500 µl der Bleichelösung abgetötet und aufgelöst (zwei Minuten unter ständigem Invertieren). Der Überstand wurde durch Zentrifugation (1 min, 5000 rcf) entfernt und durch zweimaliges Waschen mit M9-Puffer von restlicher Bleichelösung gesäubert. Nach der finalen Zentrifugation wurden ca. 100 µl des Puffers über dem Pellet gelassen und dieses darin resuspendiert. Jeweils die Hälfte des resuspendierten Pellets konnte nun auf eine frische NGM/OP50-Platte überführt und bei 20 °C inkubiert werden.

Einzig die Eier, welche zum Zeitpunkt der Behandlung ausreichend entwickelt waren wurden durch ihre Eihülle geschützt. Aus diesen Eiern entwickelten sich L1 Larven, so dass eine homogene Population an Larven für die Versuche zur Verfügung stand.

### 3.11.1.2 Bestimmung der Quercetinaufnahme in *C. elegans*

Die hierfür verwendeten N2 Würmer entwickelten sich vier bis sechs Tage nach der Synchronisation auf NGM/OP50 Agarplatten und wurden anschließend in flüssiges NGM mit 50 µg/ml Streptomycin überführt. Dieses enthielt neben streptomycinresistenten *E. Coli* (als Nahrungsquelle) und 100 µM Quercetin bzw. DMSO auch 1 % BSA um eine Präzipitation des Quercetin zu verhindern. Nach 20 h wurden die Würmer pelletiert und dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen. Einem weiteren Waschschriff mit PBST (PBS + 1 % Tween20) folgte ein abschließender mit PBS. Das gewaschene Wurmpellet wurde über Nacht bei minus 20°C in 500 µl Methanol inkubiert. Der Aufschluss der Proben erfolgte in ST-20 Röhrchen unter Zugabe von 1 ml Methanol und 1,5 ml Glassbeads (Durchmesser 0,5 mm) im Ultra Turrax Tube drive für fünf Minuten und anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Der Aufschluss wurde wiederholt und nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 rcf) die Überstände mit einer Utraschallspitze für zehn Sekunden weiter aufgeschlossen. Die verwendeten Glassbeads wurden in einem Milliliter Methanol gewaschen und die Überstände vereint. Nach einem letzten Einfrier/Auftau-Zyklus wurden die Proben 10 Minuten bei 13000 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf ungefähr einen Milliliter reduziert. Die konzentrierte Probe wurde nach erneuter Zentrifugation (wie zuvor) in die DAD-HPLC injiziert und das Quercetin mit Hilfe seiner Retentionszeit und des UV-Spektrums identifiziert.

### 3.11.1.3 Nachweis der intrazellulären Quercetinlokalisation

Die Lokalisation von Quercetin in distinkten Körperregionen des Nematoden wurde fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Dabei machte man sich die Eigenfluoreszenz des Quercetins zu nutze. Die Anregungswellenlänge lag bei 365 nm, der Langpass trennte Wellenlängen unter 420 nm ab. Die Aufnahme wurde dabei nur qualitativ erfasst, da eine Quantifizierung mit dieser Methode nicht möglich war. Die Inkubationsbedingungen waren identisch mit denen von 3.11.1.2.

## 3.12 Aufnahme von Flavonoiden in SpragueDawley Ratten

Bei den verwendeten Ratten handelte es sich um Ratten des 1925 von R. Worthington Dawley entwickelten Stammes Sprague Dawley. Seit seiner Entwicklung wird der Rattenstamm von der Sprague Dawley Farm in den USA weitergeführt. Die bei der Firma Janvier verpaarten und steril gelieferten Tiere wurden in zwei Gruppen von je vier Tieren geliefert.

### 3.12.1 Haltung

Die verpaarten, weiblichen Ratten wurden einzeln in Käfigen vom Typ 4 gehalten. Alle Tiere hatten über den gesamten Versuchszeitraum freien Zugang zu Futter und Wasser. Neben dem Einstreu stand Nistmaterial zum Nestbau zur Verfügung. Die Ratten wurden bei Temperaturen von 22 +/-2 °C in einem künstlichen Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 h hell und 12 h dunkel bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 +/-5 % gehalten.

### 3.12.2 Versuchsdesign

Der Tierversuch wurde in Kooperation mit dem Institut für Umweltmedizinische Forschung durchgeführt. Mit diesem Pilotversuch sollten erste Verdachtsmomente einer embryonalen

Entwicklungsstörung bei maternalen Exposition gegenüber EGCG erhärtet werden. Des Weiteren sollte durch das Versuchsdesign die Möglichkeit einer Akkumulation von Epigallocatechingallat in weiblichen Ratten und deren Nachkommen untersucht werden. Der Versuch wurde unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.116 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

Die Ratten wurden Verpaart und am Tag Eins an das Tierhaus des Instituts für Umweltmedizinische Forschung geliefert. Nach der Gewöhnungsphase in welcher alternierend alle drei bzw. vier Tage die Gewichtsentwicklung der Muttertiere erhoben wurde, begann an Tag 13 der Gestation die Fütterung mit 1000 mg EGCG pro kg Körpergewicht. Das Epigallocatechingallat wurde dazu in 37 °C warmen Wasser gelöst und per Schlundsonde verabreicht. Den Kontrolltieren wurden anstelle des EGCGs die durch vorherige Gewichtsbestimmung ermittelten Mengen an ebenfalls warmem Wasser verabreicht. Am Tag 16 der Schwangerschaft erfolgte die Gabe von 40 mg BrdU pro kg Körpergewicht intraperitoneal.

Am Morgen nach der Geburt (Gestationstag 22 bzw. 23) wurden die Muttertiere erneut mit Epigallocatechingallat behandelt und von den Neugeborenen isoliert.

Um den Stress der Neugeborenen durch die fehlende Mutter zu minimieren wurden sie nach vorheriger Geschlechts- und Gewichtsbestimmung per Dekapitation getötet und schnellstmöglich präpariert.

Am Tag 1 postnatal erfolgte 60 Minuten bevor die Muttertiere per CO<sub>2</sub>-Begasung getötet wurden eine erneute Gabe von EGCG bzw. Wasser per Schlundsonde.

### **3.12.3 Organentnahme**

Die Organe wurden unsteril entnommen und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Der Transport erfolgte in Trockeneis und die Lagerung bei -80°C. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Organe kurz vor der Verwendung angetaut und wie unter 3.12.4 beschrieben aufgearbeitet.

#### **3.12.3.1 Blut**

Bei den Neugeborenen wurde das Blut unsteril im Rahmen der Dekapitation entnommen und in 50 µl Phosphatpuffer mit 1% EDTA sowie 1 M Ascorbinsäure aufgenommen (Olson et al. 2008).

Den per CO<sub>2</sub>-Begasung getöteten Muttertieren wurde durch Herzpunktion eine Menge von circa zwei Millilitern entnommen. Im Falle geringerer Mengen wurde das Tier geöffnet und durch einen Schnitt in der Aorta entblutet. Dabei konnten Teile des ausströmenden Blutes möglichst nah an der Austrittsstelle mit einer Spritze aufgenommen werden. Auch diese Proben wurden in ¼ Volumen Puffer mit EDTA und Ascorbinsäure aufgenommen.

#### **3.12.3.2 Organe**

Nach der Dekapitation wurden die Gehirne der Jungtiere möglichst rasch entnommen, in 1x PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Körper lagerten in der Zwischenzeit bei 0 °C im Eis. Nach der Präparation der Gehirne wurden die Körper der Neugeborenen geöffnet, Herz, Lunge, Leber, Gedärm sowie Magen mitsamt Inhalt entnommen, in 1x PBS gewaschen und eingefroren.

Bei den Muttertieren erfolgte nach der Herzpunktion das Öffnen der Bauchhöhle. Die Leber, der Magen, der Darm, die Ovarien, die Nieren, das Herz, die Lunge sowie das Gehirn wurden entnommen, in 1x PBS gewaschen und eingefroren. Der Magen und der Darm wurden vor dem Einfrieren mit PBS gespült.

#### **3.12.4 Aufarbeitung der Organe**

Vor der Aufarbeitung der Organe wurden die jeweiligen Gewichte ermittelt. Im Falle der Leber wurde jeweils ein Gramm (bzw. ein Milliliter), im Falle der Gehirne und der Lungen der Muttertiere 0,75 g und bei der Gehirnaufarbeitung der Neugeborenen wurde das gesamte zur Verfügung stehende Material der Aufarbeitungsprozedur zugeführt.

##### **3.12.4.1 Blut**

Nach dem Auftauen kam es trotz der Verwendung von EDTA zu einer Koagulation der Blutproteine. Daher wurden 500 µl des Vollblutes mit 3 ml Phosphatpuffer (+ 0,5 M Ascorbinsäure) versetzt. Anschließend erfolgte eine dreimalige Extraktion mit zwei Volumen Ethylacetat. Die organische Phase wurde unter Luftstrom getrocknet und das Pellet in zweimal 500 µl HPLC-Methanol aufgenommen, für 10 min bei 20000 rcf zentrifugiert und die Überstände vereint. Nach Abkühlen der Proben für ca. 30 min bei 4 °C und erneuter Zentrifugation wurden 1:1 Verdünnungen der Proben erstellt und 20 µl in die HPLC injiziert. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert im Ultraschallbad resuspendiert, in 1 ml Methanol aufgenommen und zentrifugiert. Nach Überführen des Überstandes wurde das Pellet 2x mit 500 µl Methanol gewaschen und die Überstände vereint. 20 µl der auf 450 µl eingeeengten Proben wurden nach erneuter Zentrifugation in die HPLC injiziert. Die Bestimmung der Konzentration an EGCG erfolgte mit Hilfe der Eichreihen und die Aufklärung der Metabolite erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie (Injektionsvolumen 10 µl).

##### **3.12.4.2 Organe**

Die unter 3.11.6 beschriebenen Organmengen wurden grob mechanisch zerkleinert und auf Eis in 6 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,8 (versetzt mit 0,5 M Ascorbinsäure) mit einem Ultra-Turrax bei 9600 rpm homogenisiert. Die Extraktion des Catechins und seinen möglichen Metaboliten erfolgte mit drei Mal zwei Volumen Ethylacetat. Die Phasentrennung wurde durch eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 5000 rpm beschleunigt. Nach Eindampfen der vereinten organischen Phase wurde das resultierende Pellet in 2x 500 µl Methanol rückgelöst in neue Gefäße überführt, zentrifugiert und das resultierende Pellet erneut mit 500 µl HPLC-Methanol gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden auf 500 µl eingeeengt und 20 µl in die HPLC injiziert. Im Falle der Lungenhomogenate wurde von den vereinten Waschschritten der organischen Phase (2x 500 µl) direkt 20 µl in die HPLC injiziert.

Die Bestimmung der Konzentration an EGCG erfolgte mit Hilfe der Eichreihen. Metabolite wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt.

#### **3.13 Statistische Auswertungen**

Wenn nicht anders angegeben sind alle Daten als Mittelwerte +/- SEM von mindestens drei unabhängigen Ergebnissen dargestellt. Für die Analyse der statistischen Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (oneway ANOVA) mit anschließendem Bonferroni Posthoc-Test durchgeführt. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

---

In der Arbeit sollten pharmakologische Eigenschaften pflanzlicher Polyphenole sowie die Aufnahme der Verbindungen in verschiedene Zelllinien untersucht werden. Die Bioverfügbarkeit einer ausgewählten Verbindung wurde später *in vivo* untersucht.

Im ersten Teil der Ergebnisse werden die Effekte von Flavonoiden behandelt. Neben dem antioxidativen Potential, der Zytotoxizität und der Aufnahme der Flavonoide wird exemplarisch an zwei Beispielen die differentielle Wirkung von methylierten Metaboliten im Vergleich zu der jeweiligen Ausgangsverbindung beschrieben. Die Aufnahme des als Leitsubstanz verwendeten Flavonoids Quercetin wird anhand des Modellorganismus *C. elegans* zum Abschluss des ersten Teiles der Arbeit dargestellt. Im zweiten Teil der Arbeit werden pharmakologische Eigenschaften und die Aufnahme verschiedener Catechinderivate sowie die Bioverfügbarkeit des Epigallocatechingallats im Rattenmodell beschrieben.

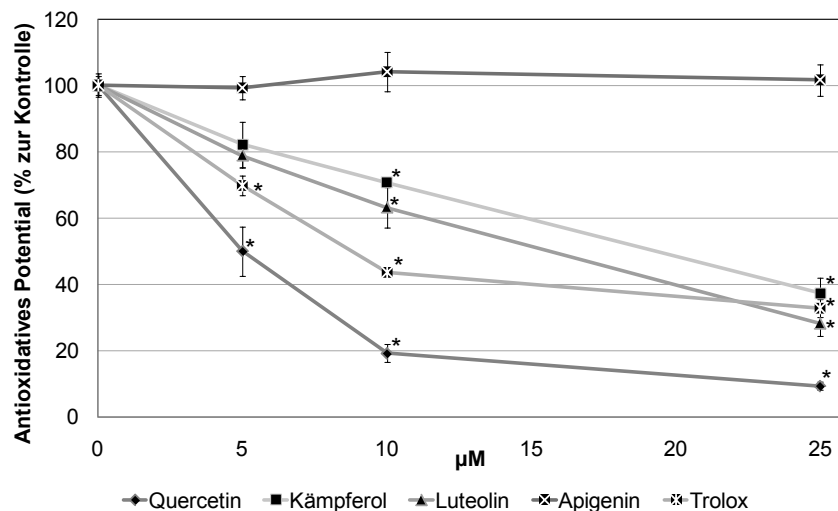
### 4.1 Untersuchung zur Wirkung von Flavonoiden

#### 4.1.1 Antioxidatives Potential der Flavonoide

Eine polyphenolreiche Ernährung wird mit einer erniedrigten Inzidenz an verschiedenen degenerativen Erkrankungen korreliert. Dies wird unter anderem auf das antioxidative Potential der Polyphenole und der damit verbundenen radikalfangenden Wirkung zurückgeführt. Das Potential der Verbindungen als Radikalfänger zu fungieren wurde mittels der Dekolorisation der beiden stabilen Radikallösungen DPPH und ABTS ermittelt.

##### 4.1.1.1 Antioxidative Aktivität ausgesuchter Flavonoide

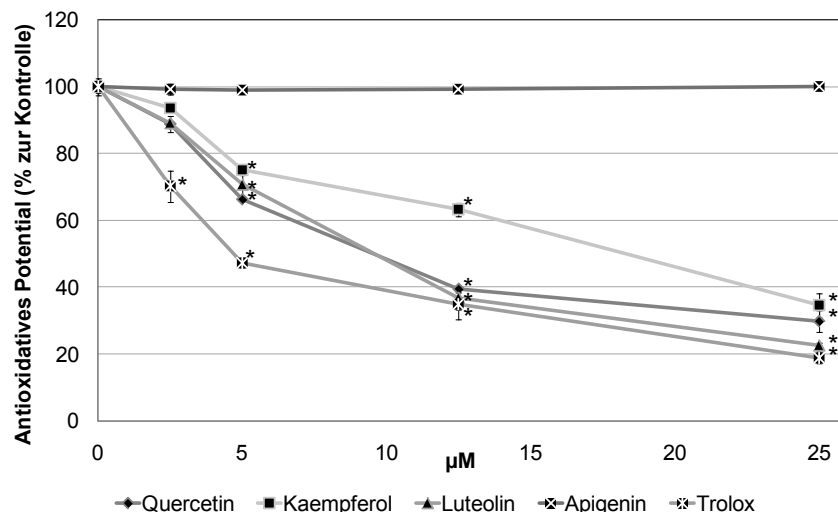
In diesem Abschnitt wird das antioxidative Potential der für die Aufnahmestudien verwendeten Flavonoide dargestellt. Sie sind zur besseren Vergleichbarkeit auf die Kontrolle normiert. Um eventuelle Effekte durch die Art des abzufangenden Radikals zu bestimmen wurde das antioxidative Potential jeweils mit dem DPPH- und dem TEAC-Assay bestimmt. Die Fähigkeit das stabile ABTS-Radikal zu entfärben ist bei diesen Verbindungen ausgeprägter als die Fähigkeit das stabile 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin zu entfärben. Einzig Luteolin zeigte im Vergleich der beiden Methoden eine etwas höhere Fähigkeit das DPPH-Radikal zu reduzieren ( $EC_{50}$  von ca. 15  $\mu$ M und ca. 10  $\mu$ M).



**Abbildung 4: Antioxidatives Potential ausgewählter Flavonoide im TEAC-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen ABTS-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

Quercetin besitzt in beiden Methoden eine hohe radikalfangende Eigenschaft mit  $EC_{50}$ -Werten von 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M. Kämpferol weist in beiden Methoden eine effektive halbmaximale Konzentration von 15  $\mu$ M bis 20  $\mu$ M auf, während Apigenin keinen Einfluss auf die Absorption der Radikallösungen hatte.



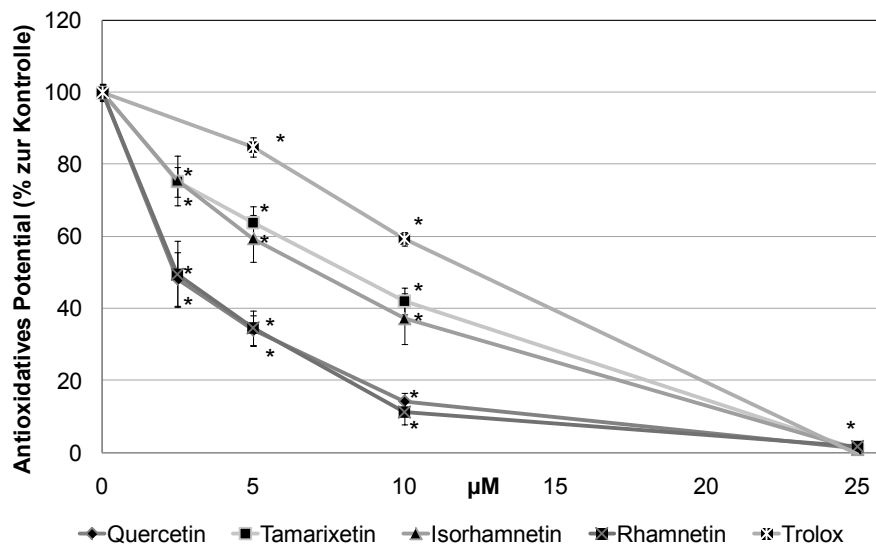
**Abbildung 5: Antioxidatives Potential ausgewählter Flavonoide im DPPH-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen DPPH-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet. Die Ergebnisse des DPPH-Assay wurden abweichend von später gezeigten DPPH-Ergebnissen im 96-Well Format bei 540 nm erhoben.

#### 4.1.1.2 Vergleich der antioxidativen Aktivität von Flavonoiden und ihren Methylderivaten

Die Effekte einer Methylierung von Flavonoiden auf die antioxidativen Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Position werden in diesem Teil der Arbeit anhand von Quercetin bzw. Luteolin dargestellt. Die Analyse der antioxidativen Eigenschaften erfolgte im TEAC- und DPPH-Assay.

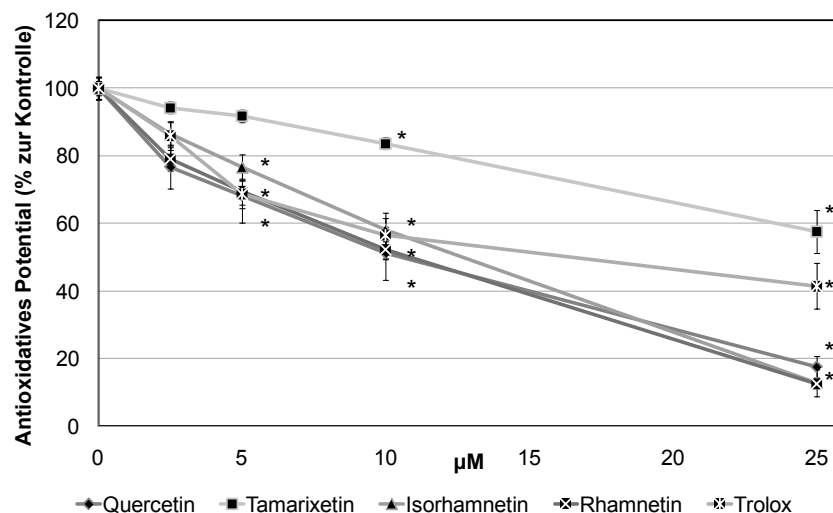
Im Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay ist die Fähigkeit das stabile ABTS-Radikal zu entfärben bei Quercetin und Rhamnetin annähernd gleich (siehe Abb.: 6). Einzig die beiden im B-Ring methylierten Quercetinderivate Tamarixetin und Isorhamnetin zeigen eine verminderte antioxidative Kapazität. Diese bleibt aber immer noch höher als das Potential der Referenzsubstanz Trolox.



**Abbildung 6: Antioxidatives Potential methylierter Quercetinderivate im TEAC-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen ABTS-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=4$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

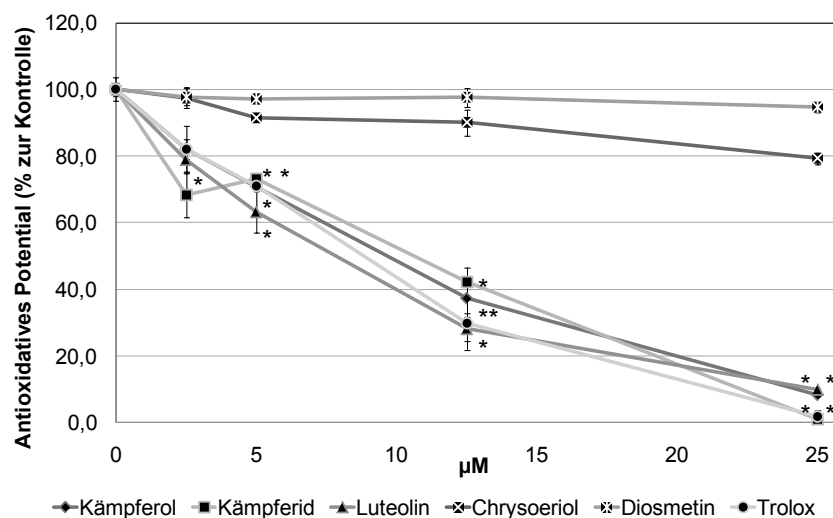
Im DPPH-Assay wurden zwischen Trolox, Quercetin, Rhamnetin und Isorhamnetin keine Unterschiede in der Fähigkeit das DPPH-Radikal zu reduzieren gefunden (Abb.: 7). Einzig das an 4'-Position methylierte Tamarixetin weist in diesem Experiment ein geringeres antioxidatives Potential auf.



**Abbildung 7: Antioxidatives Potential methylierter Quercetinderivate im DPPH-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen DPPH-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

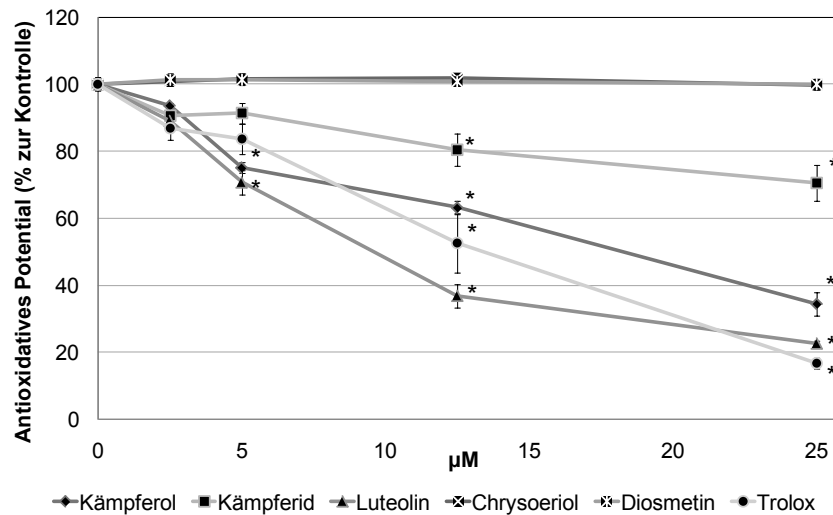
Neben den Methylderivaten des Quercetins wurden weitere erworbene Methylderivate der Flavonoide auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse im TEAC- bzw. im DPPH-Assay sind in Abbildung 8 bzw. 9 dargestellt.



**Abbildung 8: Antioxidatives Potential methylierter Luteolin- und Kämpferolderivate im TEAC-Assay.** Die Absorptionsabnahme der ethanolischen ABTS-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Der 25 µM Wert des Chrysoeriols ist nur zweimal erhoben worden und daher in der statistischen Auswertung nicht erfasst. Die Absorption der Kontrolle wurde als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

Im TEAC-Assay konnten erneut keine Unterschiede zwischen Luteolin und Kämpferol in der Fähigkeit das stabile ABTS-Radikal zu reduzieren detektiert werden. Die Methylierung im B-

Ring von Luteolin führt zu fast vollständigem Verlust der antioxidativen Eigenschaft, während eine Methylierung in 4'-Position von Kämpferol keinen Effekt auf das detektierte antioxidative Potential hatte.



**Abbildung 9: Antioxidatives Potential methylierter Luteolin- und Kämpferolderivate im DPPH-Assay.** Die Absorptionsabnahme der ethanolischen DPPH-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0% antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

Die geringere antioxidative Eigenschaft der Methylderivate des Luteolin konnte im DPPH-Assay bestätigt werden. Beide weisen über den getesteten Konzentrationsbereich keine antioxidative Fähigkeit auf.

Das Methylderivat des Kämpferol zeigt ebenfalls ein vermindertes antioxidatives Potential. Der  $EC_{50}$  des Kämpferid konnte in dem getesteten Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden, während der  $EC_{50}$ -Wert von Kämpferol zwischen 15 und 20  $\mu$ M liegt.

#### 4.1.1.3 Vergleich der antioxidativen Aktivität aus *Eupatorium semialatum* isolierter Flavonoide

Insgesamt wurden 16 verschiedene aus *Eupatorium semialatum* isolierte Flavonoide auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Bei den von Dr. Günther Lang isolierten und durch Professor Claus Passreiter beide aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellten Verbindungen handelt es sich um O-methylierte Flavonoide und ihre Glycoside. Bei diesen Verbindungen lag das Augenmerk auf dem Einfluss der 6-Methoxyfunktion sowie dem Einfluss von verschiedenen Zuckerkonjugationen auf die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide. Zur besseren Übersicht wurden die Absolutwerte auf die Kontrolle normiert. Reduzierten die Substanzen bei einer eingesetzten Konzentration von 50  $\mu$ M die Absorption

der Radikallösung nicht um mindestens 50 % wurde die Konzentrationsabhängigkeit nicht verfolgt. Aufgrund der Vielzahl an Messwerten sind in der Tabelle 11 nur die aus den Konzentrationsreihen ermittelten  $EC_{50}$ -Werte dargestellt. Die fehlenden Konzentrationsreihen sind im Anhang dargestellt.

**Tabelle 11: Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden aus *Eupatorium semialatum* in TEAC- und DPPH-Assay.** Die Flavonoide wurden bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M auf ihr antioxidatives Potential untersucht. Die Absorptionsabnahme der ethanolischen ABTS- bzw. DPPH-Lösung wurde 3 Minuten nach Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen  $EC_{50}$ -Werte +/- SEM welche aus einer graphischen Darstellung ermittelt wurden. Dabei wurde die Absorption der Kontrolle als 0 % antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet. Die Kürzel entsprechen den Kürzeln der in der Einleitung vorgestellten Flavonoide.

| Kürzel | TEAC     | DPPH | Kürzel | TEAC     | DPPH       |
|--------|----------|------|--------|----------|------------|
| 1      | ➤ 50     | ➤ 50 | 10     | 42 +/- 3 | ➤ 50       |
| 2      | 42 +/- 4 | ➤ 50 | 11     | ➤ 50     | ➤ 50       |
| 3      | 15 +/- 6 | ➤ 50 | 12     | ➤ 50     | ➤ 50       |
| 4      | 15 +/- 9 | ➤ 50 | 13     | ➤ 50     | ➤ 50       |
| 6      | 30 +/- 3 | ➤ 50 | 14     | 14 +/- 1 | 48 +/- 5   |
| 7      | ➤ 50     | ➤ 50 | 15     | 20 +/- 2 | ➤ 50       |
| 8      | ➤ 50     | ➤ 50 | 16     | 22 +/- 1 | 33 +/- 6   |
| 9      | ➤ 50     | ➤ 50 | Trolox | 10 +/- 8 | 12,5 +/- 9 |

Die Fähigkeit das stabile ABTS-Radikal zu reduzieren ist bei allen Verbindungen ausgeprägter als die Fähigkeit das stabile 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin zu reduzieren. Im Vergleich mit der Positivkontrolle Trolox (ein synthetisches Vitamin E derivat) weisen die Strukturen ein schwächeres antioxidatives Potential auf. Einzig die Strukturen 14 und 16 reduzieren in dem getesteten Konzentrationsbereich die Färbung der DPPH-Lösung um 50 %. Bei den Verbindungen 15, 10 und 2 lag die Reduktion der Farblösung in der höchsten getesteten Konzentration mit 51 %, 54 % und 54 % in der Nähe der  $EC_{50}$ .

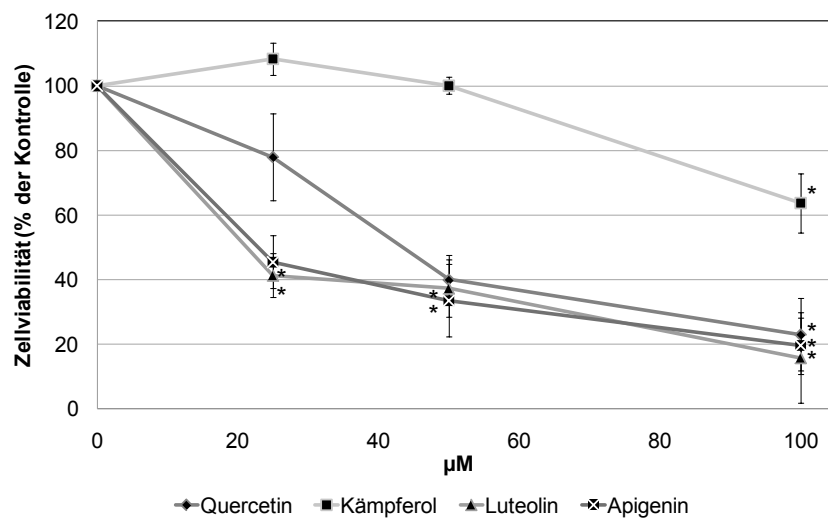
Die im DPPH effektiven Verbindungen zeigen auch im TEAC-Assay die Fähigkeit als Radikalfänger zu fungieren. Für die im DPPH-Assay nicht aktiven Verbindungen 3 und 4 konnte im TEAC-Assay ein niedriger  $EC_{50}$ -Wert von jeweils 15  $\mu$ M nachgewiesen werden.

## 4.1.2 Zytotoxizität der Flavonoide

### 4.1.2.1 Zytotoxizität der Flavonoide in verschiedenen Zelllinien

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der für die Aufnahmeuntersuchungen verwendeten Flavonoide auf die Viabilität der verschiedenen Zelllinien dargestellt. Da die Abnahme der Viabilität nach längeren Inkubationszeiten am stärksten war, werden nur die Ergebnisse der 48 h Inkubationen dargestellt. Die Viabilität der Zellen nach kürzeren Inkubationszeiten ist im Anhang dargestellt. Innerhalb der in den Aufnahmeuntersuchungen verwendeten Zeiten (bis 6 h) konnte keine Reduktion der Zellviabilität detektiert werden. Eine Koinkubation mit 0,5 mM Ascorbinsäure und Flavonoid, wie sie bei den Aufnahmeuntersuchungen auftrat, führte ebenfalls zu keiner erhöhten Zytotoxizität (Daten im Anhang).

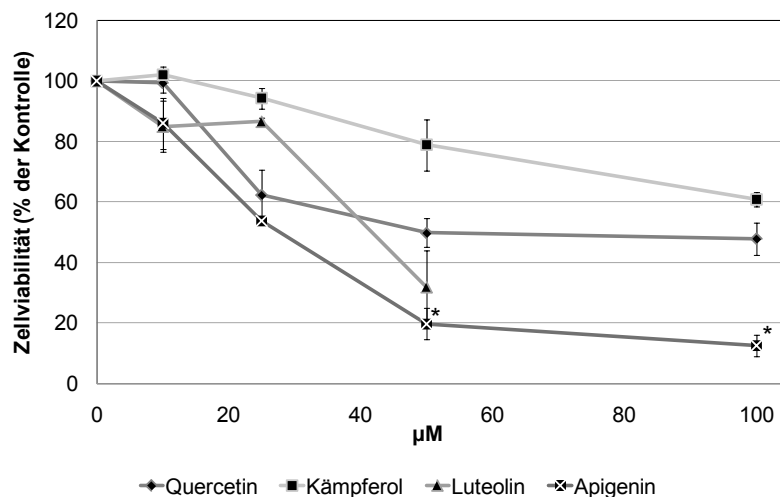
In der Abbildung 10 wird ersichtlich, dass Unterschiede in der Toxizität der Flavonoide auf die Kolonkarzinomzelllinie Hct116 existieren. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte liegen bei 20  $\mu$ M für Apigenin und Luteolin, 40  $\mu$ M für Quercetin und außerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches für Kämpferol.



**Abbildung 10: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n=3$ , \* $p<0,05$  vs. Kontrolle).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Mamakarzinomzelllinie MCF-7 (Abb.: 11). Während die Viabilität durch die Inkubation mit Kämpferol in dem getesteten Konzentrationsbereich nicht um 50 % reduziert werden konnte, erreichte Apigenin den niedrigsten  $IC_{50}$ -Wert (ca. 25  $\mu$ M). Die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen von Quercetin und Luteolin liegen zwischen beiden Verbindungen. Die Zytotoxizität von Quercetin stellte sich ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M auf einem Plateau von ca. 50 % Viabilität ein.

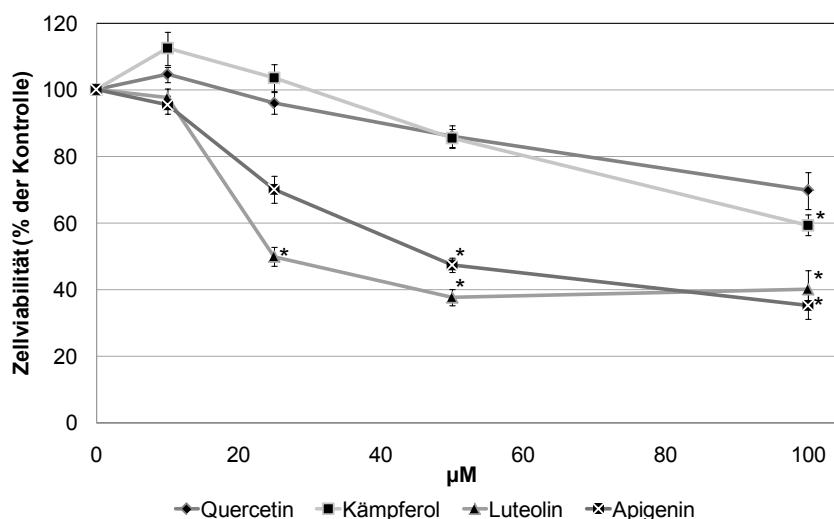


**Abbildung 11: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in MCF-7 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  MCF-7 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n=3$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle). Der 100  $\mu$ M Wert des Luteolins ist aufgrund divergierender Ergebnisse nicht dargestellt. Daten siehe Anhang.

Die in den bisher getesteten Zelllinien toxischsten Verbindungen Luteolin und Apigenin reduzierten in der höchsten Konzentration die Viabilität der Hepatomzelllinie HUH-7 auf annähernd 40 % im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Dieser Wert wird von Luteolin ab einer Konzentration von ca. 30  $\mu$ M erreicht, fällt dann aber nur noch moderat.

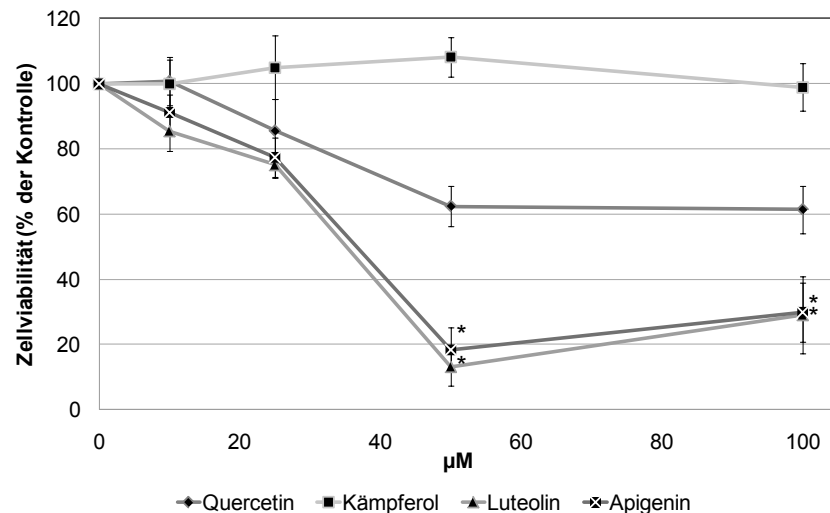
Inkubation der HUH-7 Zellen mit 100  $\mu$ M Kämpferol bzw. Quercetin reduzierte die Viabilität der Zellen auf ca. 60 % (Abb.: 12).



**Abbildung 12: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in HUH-7 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HUH-7 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n=6$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle).

Wie in Abbildung 13 erkenntlich wird vermittelt Kämpferol auch in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 keine Zytotoxizität. Quercetin zeigt eine moderate Toxizität, während Apigenin und Luteolin ein hohes toxisches Potential aufweisen. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen für beide Flavone bei 35  $\mu$ M.



**Abbildung 13: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in HepG2 Zellen.**

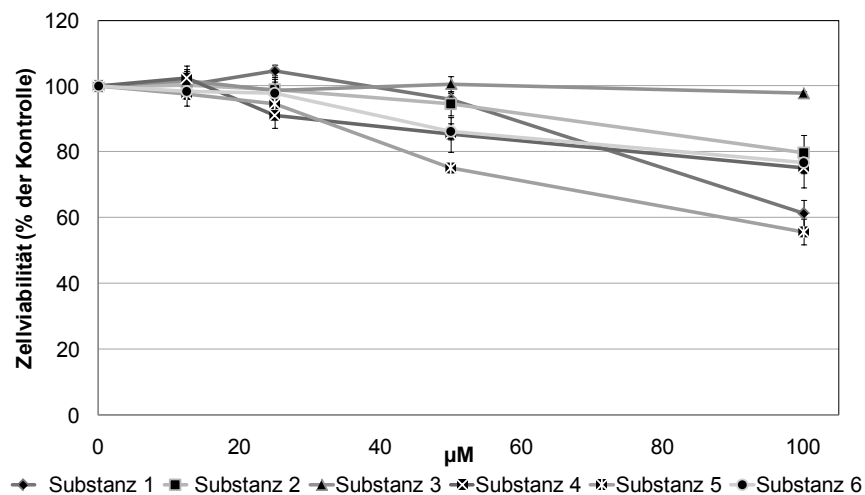
Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n=3$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle).

In den verwendeten Zelllinien weisen die Flavone Apigenin und Luteolin eine höhere Toxizität als die Flavonole Quercetin und Kämpferol auf.

#### 4.1.2.2 Zytotoxizität der aus *Eupatorium semialatum* isolierten Verbindungen

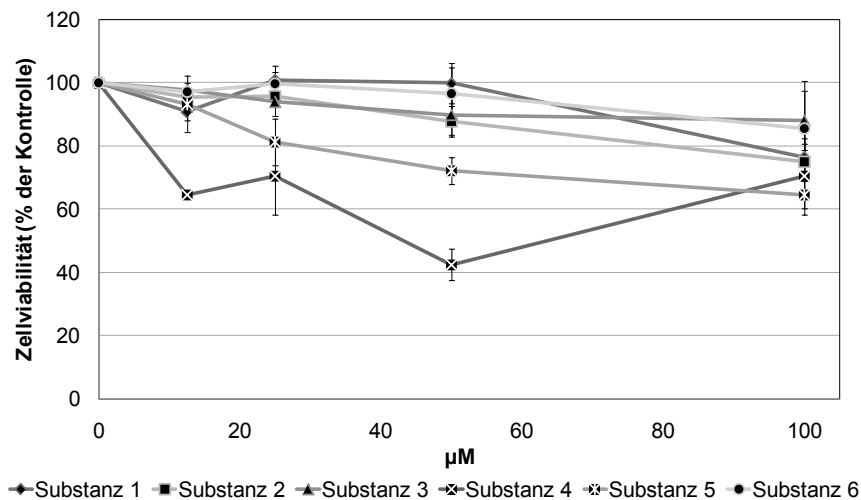
Die isolierten Verbindungen wurden in zwei verschiedenen Krebszelllinien auf ihr zytotoxisches Potential untersucht. Bei den Zelllinien handelte es sich um die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 sowie die Hepatomzelllinie HepG2. Zur Vereinfachung sind nur die 48 h Inkubationen der Verbindungen 1-6 aufgeführt. Die anderen Substanzen reduzierten bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M die Viabilität in keiner der beiden Zelllinien signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die vollständige Auswertung aller Substanzen ist im Anhang angeführt.

Die Verbindungen zeigen in keiner der beiden Zelllinien unter den getesteten Bedingungen eine ausgeprägte Zytotoxizität. Einzig Mikanin (Substanz 5) erreicht unter den getesteten Bedingungen annähernd eine halbmaximale Reduktion der Viabilität in HepG2 Zellen (Abb.: 14).



**Abbildung 14: 48 h Zytotoxizität aus *Eupatorium semialatum* isolierter Verbindungen in HepG2 Zellen.** Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM, Es konnte keine signifikante Abweichung zur Kontrolle festgestellt werden.

Laciniatin (Substanz 4) zeigte bei einer Inkubationsdauer von 48 h die Fähigkeit die Reduktion des MTT durch die Kolonkarzinomzellen um annähernd 50 % zu inhibieren (siehe Abb.: 15). Dieser Effekt war allerdings nicht dosisabhängig, sondern unterlag einer starken Schwankung. Nach 24 h konnte dieser Effekt noch nicht nachgewiesen werden. Neben Mikanin (5) und Laciniatin (4) zeigt nur noch Hispidulin (Verbindung 1) einen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen das MTT zu reduzieren. Dieser Effekt ist allerdings nur in der Hepatomzelllinie zu beobachten und erreicht selbst in der höchsten Konzentration nicht die halbmaximale Reduktion der Viabilität.



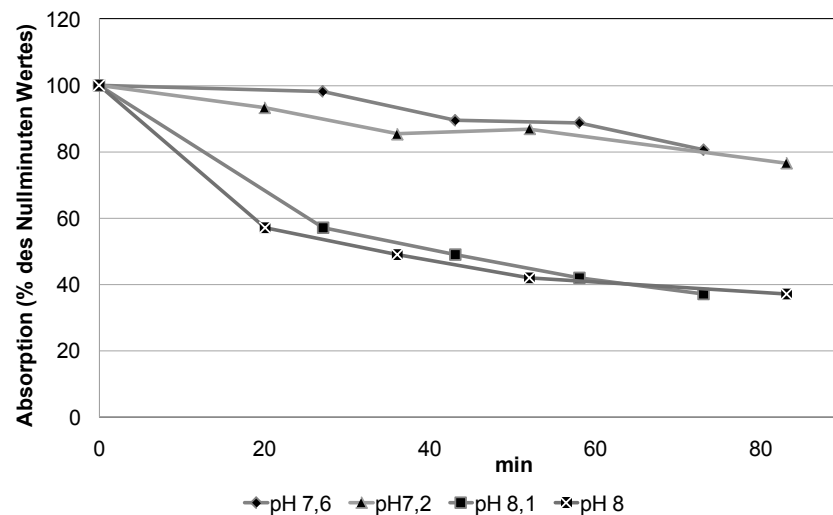
**Abbildung 15: 48 h Zytotoxizität aus *Eupatorium semialatum* isolierter Verbindungen in Hct116 Zellen.** Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM, Es konnte keine signifikante Abweichung (380 nm) zur Kontrolle festgestellt werden.

## 4.2 Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden

### 4.2.1 Stabilisierung der Flavonoide in Dulbeccos Modified Eagle Medium

Bei Vorversuchen zur Aufnahme von Quercetin in Hct116 Zellen konnte eine zelluläre Aufnahme des Flavonoids detektiert werden. Zeitgleich wurde ein starker Abbau bzw. eine starke Degradation des Quercetins im Medium über die Inkubationsdauer detektiert. Um mögliche Unterschiede in der intrazellulär detektierten Flavonoidmenge durch Unterschiede in der Menge des Flavonoids im Medium auszuschließen sowie um Metabolite von Artefakten durch die Behandlung unterscheiden zu können, wurden die Flavonoide in den nachfolgenden Experimenten für die Dauer der Inkubation im Medium stabilisiert. In diesem Abschnitt werden die Vorversuche zur Stabilisierung der Leitstruktur Quercetin im Medium dargestellt.

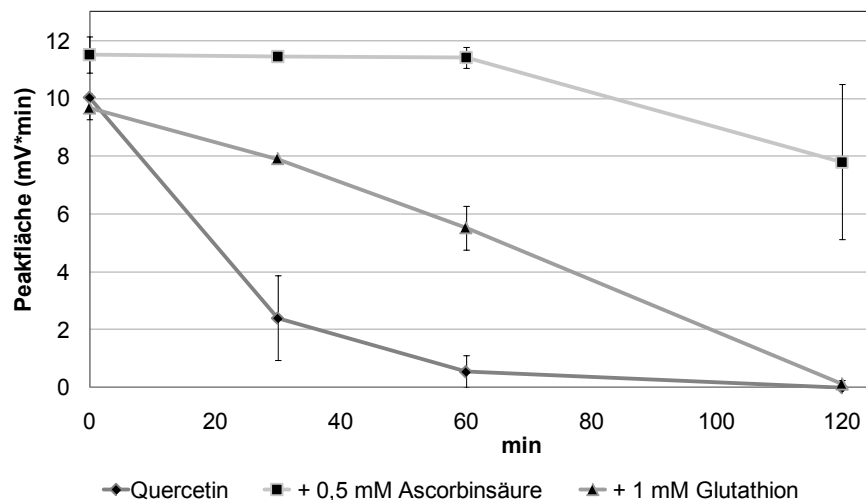
In Abbildung 16 ist die pH-Abhängigkeit der Quercetindegradation in Dulbeccos Modified Eagle Medium (supplementiert mit 10 % FCS) dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um die Daten zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. In beiden Versuchsreihen zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf der Absorption. Während die Absorption von Quercetin in dem neutral eingestellten Medium innerhalb der Inkubationszeitraums von 100 % auf ca. 70% im Vergleich zum Ausgangswert reduziert wurde, konnte bei dem auf pH 8 eingestellten Medium im selben Zeitraum eine Reduktion auf ca. 40 % ermittelt werden.



**Abbildung 16: Quercetinstabilität in Dulbeccos Modified Eagle Medium bei verschiedenen pH-Werten.** DME-Medium wurde auf verschiedene pH-Werte eingestellt und mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot des Mediums entnommen 1:1 mit Wasser verdünnt und die Absorption am Absorptionsmaximum (386 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Absorption in % der Kontrolle ( $t=0$ ).

Beim Abfangen von Radikalen durch Flavonoide werden diese oxidiert. Dadurch können oxidative Abbauprodukte der Flavonoide entstehen. Diese konnten in Form der jeweiligen Protocatechusäuren im Überstand der Zellen detektiert werden. Da ein Auftreten dieser Oxidationsprodukte als Produkte des Metabolismus unwahrscheinlich ist wurde in einer zweiten Versuchsanordnung versucht diesen Effekt durch reduzierende Bedingungen im Wachstumsmedium zu minimieren. Dazu wurde die Stabilität des Quercetins bei gleichzeitiger Gabe der Antioxidantien Glutathion (1000  $\mu\text{M}$ ) und Ascorbinsäure (500  $\mu\text{M}$ ) im DMEM untersucht.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, war Quercetin in unbehandeltem Medium nach einer Inkubationszeit von 1 h nur noch in Spuren in dem Medium zu detektieren. Durch die Koinkubation mit Glutathion wurde die Degradation im Medium deutlich reduziert. Nach 60 Minuten konnten ca. 50 % der ursprünglichen Quercetinmenge detektiert werden. Dieser Effekt ist nicht persistent, da nach 120 min auch in diesem Ansatz kein Quercetin mehr detektiert wurde. Die Koinkubation von Quercetin mit Ascorbinsäure erzielte einen dauerhaften Effekt auf die Stabilität von Quercetin. Innerhalb der ersten 60 Minuten konnte keine Reduktion der Peakfläche festgestellt werden. Erst nach 120 min fiel die Menge an detektiertem Quercetin auf ca. 70 % der ursprünglichen Menge.



**Abbildung 17: Quercetinstabilität in DMEM bei einer Koinkubation mit verschiedenen Antioxidantien.** DME-Medium mit 50  $\mu$ M Quercetin inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot des Mediums entnommen und der Quercetiningehalt mittels HPLC bestimmt. Dargestellt ist die ermittelte AUC ( $n=2 \pm$  SEM).

#### 4.2.2 Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden in verschiedenen Zelllinien

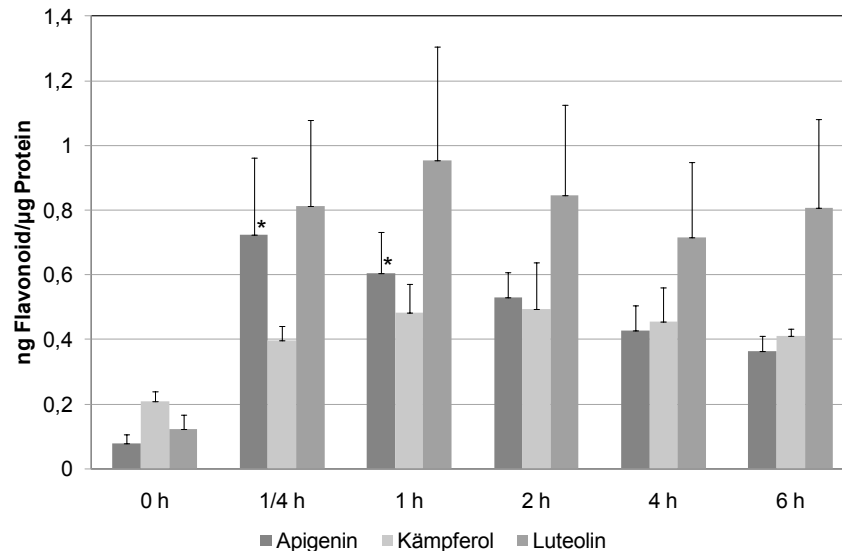
Als Leitsubstanz für die Aufnahme der verschiedenen Verbindungen in unterschiedliche Zelllinien wurde Quercetin in einer Konzentration von 100  $\mu$ M verwendet. Nachfolgende Versuche mit strukturverwandten Flavonoiden wurden abweichend mit 50  $\mu$ M durchgeführt um die Wahrscheinlichkeit eventueller toxisitätsbedingter Veränderungen der Flavonoidaufnahme zu verringern. Die Identifikation der in diesem Teil erwähnten Metabolite ist unter Punkt 4.3: Identifikation der Metaboliten in Hct116 und HepG2 Zellen genauer beschrieben. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden an der HPLC mit UV-Detektor erhoben. Aus den Peakflächen der Eichreihen wurden Quantifizierungslimits von ca. 900 ng/ml für Kämpferol und Apigenin sowie 450 ng/ml und 550 ng/ml für Quercetin bzw. Luteolin ermittelt.

##### 4.2.2.1 Aufnahme verschiedener Flavonoide in Hct116

Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit werden die Aufnahmeversuche von Quercetin welches mit 100  $\mu$ M eingesetzt wurde, nicht mit den anderen Flavonoiden gemeinsam dargestellt, da diese in einer Konzentration von 50  $\mu$ M eingesetzt wurden. Die intrazellulären Ergebnisse wurden immer auf die Menge des Proteins im Zellpellet normiert, um Unterschiede durch die Zellzahl auszuschließen.

In Abbildung 18 ist die intrazelluläre Menge des jeweiligen Flavonoids normiert auf die Proteinmenge über den getesteten Zeitraum in Hct116 Zellen dargestellt. Unmittelbar nach Zugabe des Flavonoids können geringe Mengen an Flavonoid in den Zellproben nachgewiesen werden. Die Menge erreicht nach 15 Minuten einen gleichbleibenden Wert von ca. 0,4 ng Kämpferol/ $\mu$ g Protein und 0,8 ng Luteolin/ $\mu$ g Protein. Apigenin erreicht nach

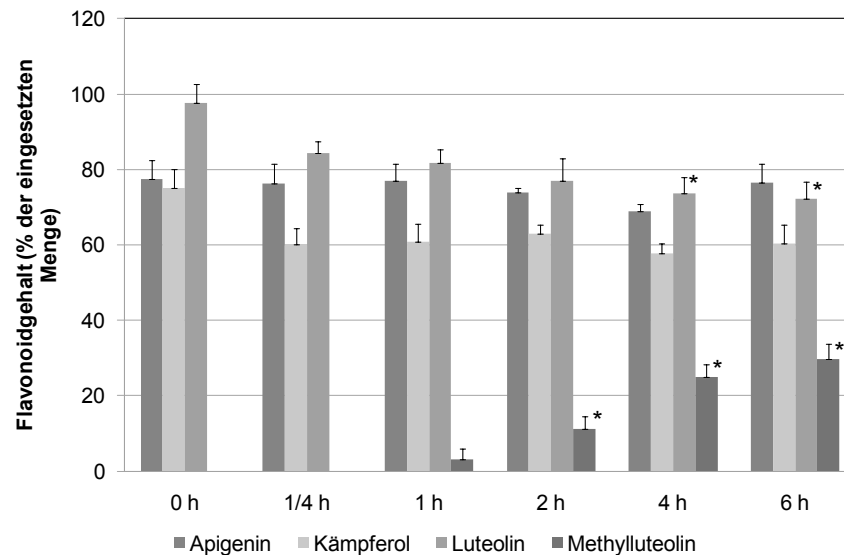
15 min in den Kolonkarzinomzellen ein maximales Niveau von ca. 0,7 ng Apigenin/ $\mu$ g Protein. Dieses fällt bei einer Inkubation von 6 h auf 0,4 ng Apigenin/ $\mu$ g Protein ab. Die Unterschiede in der intrazellulären Konzentration und der Abfall der detektierten Apigeninmenge sind jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 18: Intrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden (50  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, \*p<0,05 vs. 0 h).

Während intrazellulär keine Metaboliten detektiert wurden, konnte im Überstand der Hct116 Zellen im Falle einer Inkubation mit Luteolin ein Anstieg eines Peaks mit erhöhter Retentionszeit detektiert werden (siehe Abb.: 19). Massenspektrometrische Untersuchungen belegen, dass es sich bei dem Metaboliten um ein Methylderivat handelt. Poolen mehrerer Überstände lieferte zusätzlich detektierbare Menge an Sulfatderivat, welches aber nicht quantifiziert werden konnten (siehe Punkt 4.3). Die extrazelluläre Menge des Methylderivates nimmt über den getesteten Zeitraum kontinuierlich zu und erreicht nach sechs Stunden eine Konzentration von ca. 30 % der ursprünglich eingesetzten Luteolin Menge. Dies entspricht in diesem Ansatz  $17,1 \pm 2,2 \mu$ g.



**Abbildung 19: Extrazelluläre Flavonoidmengen der Inkubation der Hct116 Zellen**

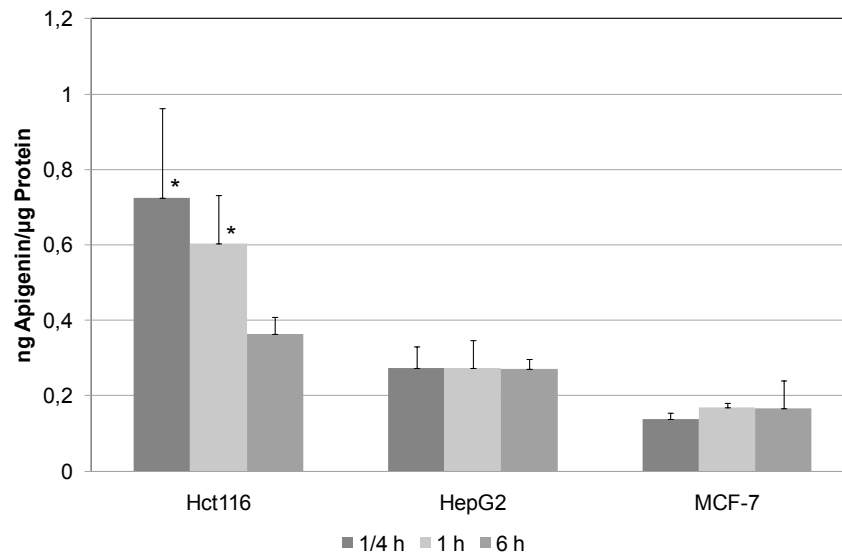
Die Inkubation mit den Flavonoiden (50  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Flavonoidgehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, \*p<0,05 vs. 0 h) in Prozent der zugegebenen Menge des jeweiligen Flavonoids.

#### 4.2.2.2 Aufnahme von Apigenin in verschiedene Zelllinien

Da für die humanen Kolonkarzinomzellen Hct116 eine Abnahme der intrazellulären Menge an Apigenin vermutet werden konnte wurde die Aufnahme dieses Flavons zusätzlich in den Hepatokarzinomzelllinien HepG2 und HUH-7, sowie der Mamakarzinomzelllinie MCF-7 durchgeführt.

Die Abbildung 20 gibt die intrazellulären Apigeninmengen pro  $\mu$ g Protein wieder. Neben den schon unter Punkt 4.2.2.1 beschriebenen Effekten der Aufnahme des Flavons in die Hct116 Zellen zeigt sich für die beiden Zelllinien HepG2 und MCF-7 keine Zeitabhängigkeit der Apigeninaufnahme. In den Proben der humanen Hepatomzelllinie HUH-7 lag die Menge an Apigenin unter dem Detektionslimit. Ein Vergleich der Proteinhalt der Ansätze mit HUH-7 Zellen ergab einen um 35 % niedrigeren Proteingehalt der Ansätze mit HUH-7 Zellen.

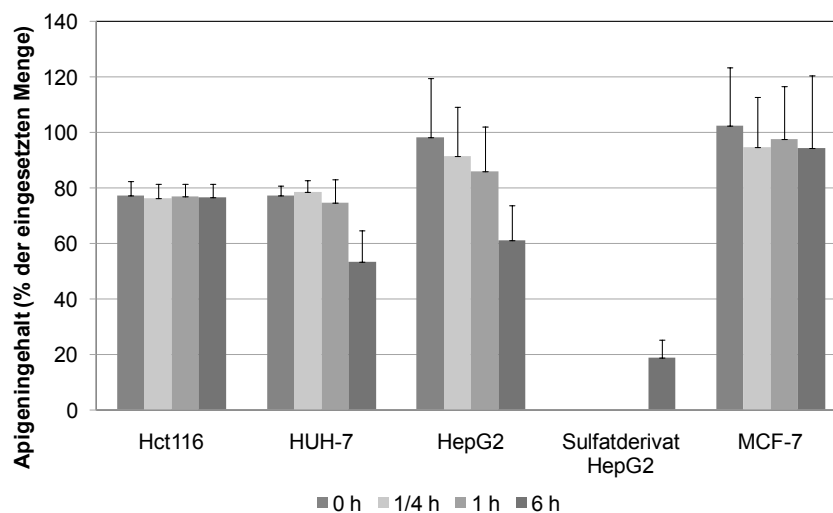
Die intrazellulär gefundenen Mengen an Apigenin sind zwischen den einzelnen Zelllinien nicht signifikant verschieden.



**Abbildung 20: Intrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien.**

Die Inkubation mit Apigenin (50 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$  für Hct116 und HepG2 bzw.  $n=3$  für MCF-7, \* $p<0,05$  vs. 0 h).

Extrazellulär können nur im Falle der HepG2 Zellen quantifizierbaren Mengen an Metabolit detektiert werden (Abb.: 21). Diese sind begleitet von einer Abnahme des detektierten Apigenins in gleichem Ausmaß.

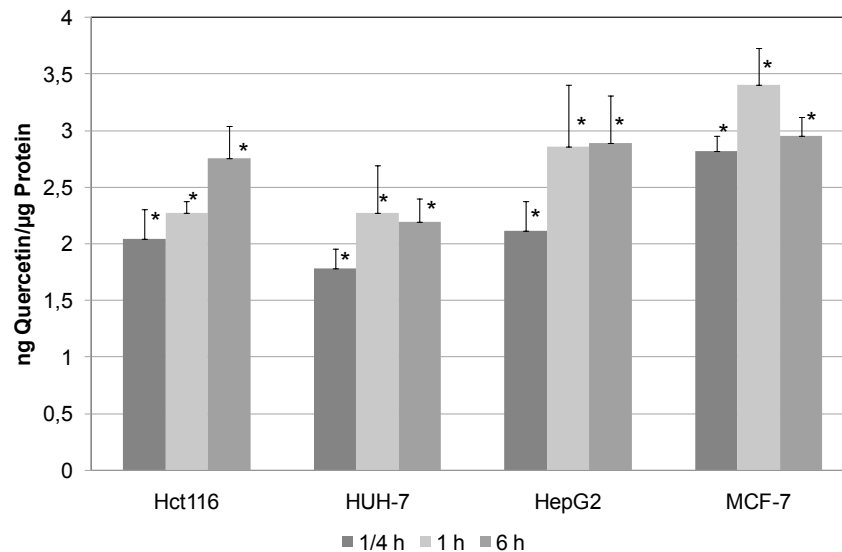


**Abbildung 21: Extrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien.**

Die Inkubation mit Apigenin (50 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Apigeningehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent der zugegebenen Menge Apigenin. Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber dem 0 h Wert.

#### 4.2.2.3 Aufnahme von Quercetin in verschiedene Zelllinien

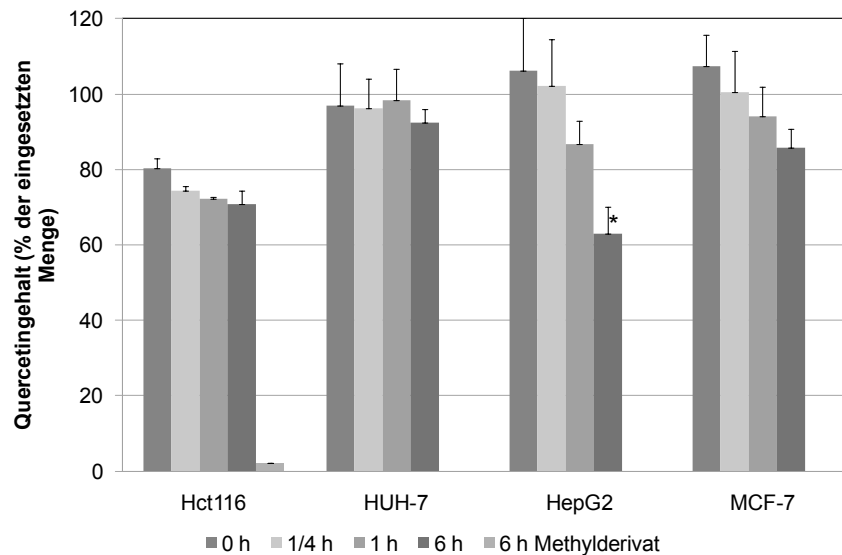
Die Aufnahmestudien mit Quercetin als Leitstruktur wurden mit 100  $\mu$ M des Flavonols durchgeführt und folgten wie die Aufnahmestudien mit Apigenin keiner Zeitabhängigkeit (Abb.: 22). Die intrazellulären Mengen lagen bei 2 bis 2,5 ng Quercetin/ $\mu$ g Protein im Falle der Hct116 und HUH-7 Zellen sowie bei annähernd 3 ng/ $\mu$ g bei den HepG2 und MCF-7 Zellen. In dieser Grafik werden die für die HepG2 detektierten intrazellulären Metabolite zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Auf die Metabolite wird unter Punkt 4.2.2.4 näher eingegangen.



**Abbildung 22: Intrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien.**

Die Inkubation mit Quercetin (100  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$  für HUH-7, HepG2 und MCF-7 bzw.  $n=3$  für Hct116, \* $p<0,05$  vs. 0 h)

In Hct116 Zellen konnten keine Metaboliten des Quercetins nachgewiesen werden. Während nach einer Inkubationszeit von 1 h die Menge an methyliertem Derivat unter der Detektionsgrenz lag konnten nach 6 stündiger Inkubation 2,6  $\pm$  0,23  $\mu$ g des Derivates extrazellulär detektiert werden. Dies entspricht in etwa 2 % der ursprünglich eingesetzten Flavonoidmenge. Der Abfall der extrazellulär detektierten Quercetinmenge ist bei der humanen Hepatomzelllinie HepG2 begleitet durch einen äquivalenten Anstieg an extrazellulär nachgewiesenem Metabolit. Die für die HepG2 Zellen detektierten Metabolite werden gesondert unter Punkt 4.2.2.4 behandelt.

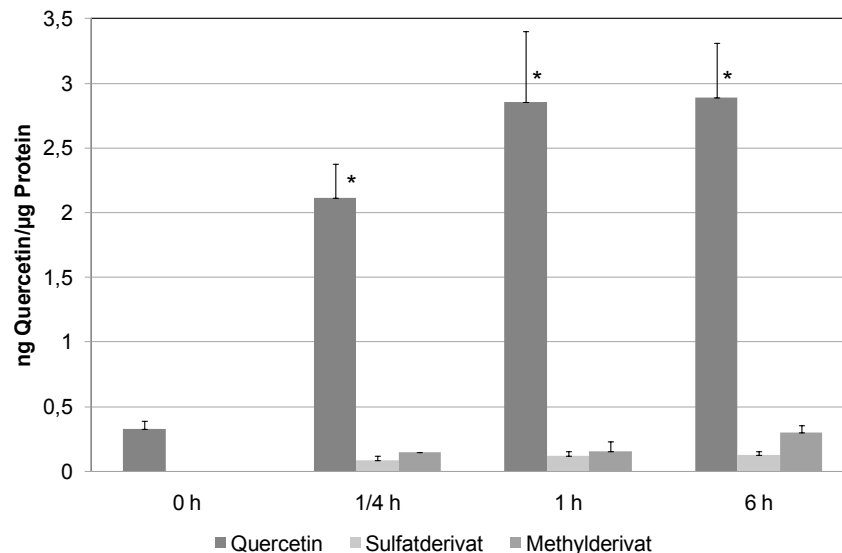


**Abbildung 23: Extrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien.**

Die Inkubation mit Quercetin (100  $\mu\text{M}$ ) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Quercetiningehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$  für HUH-7, HepG2 und MCF-7 bzw.  $n=3$  für Hct116,  $*p<0,05$  vs. 0 h) in Prozent der zugegebenen Menge Quercetin.

#### 4.2.2.4 Aufnahme von Quercetin in HepG2 Zellen

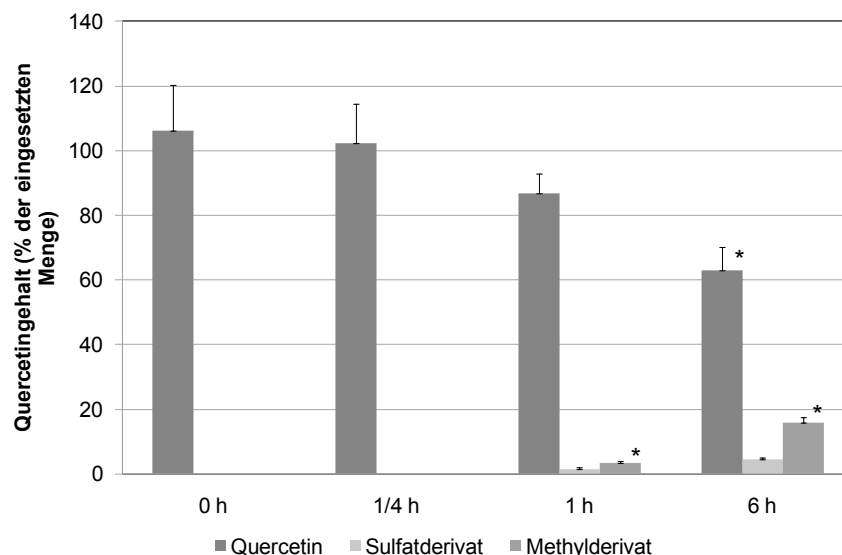
Um die Aufnahme und den Metabolismus des Quercetins in den HepG2 Zellen besser darstellen zu können wird dieser Teil der Arbeit gesondert dargestellt. Die Abbildung 24 geht auf die Aufnahme des Flavonols sowie die intrazellulär zu detektierenden Mengen an Metaboliten ein. Neben dem Metylderivat Isorhamnetin (siehe 4.2.2.5) konnte auch ein Sulfatderivat quantifiziert werden. Die Mengen beliefen sich auf 190  $\pm$  5 ng für das Sulfatderivat und auf 460  $\pm$  8 ng für das Methylderivat nach der 6 h Inkubation. Dies entsprach 0,13  $\pm$  0,03 und 0,3  $\pm$  0,06 ng Metabolit/ $\mu\text{g}$  Protein. Die Menge an intrazellulärem Quercetin blieb unbeeinflusst bei annähernd 3 ng Quercetin/ $\mu\text{g}$  Protein.



**Abbildung 24: Intrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Quercetin (100 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, \*p<0,05 vs. 0 h).

Extrazellulär zeigt die Metabolitenbildung eine Zeitabhängigkeit. Die Menge der Derivate stieg über den analysierten Zeitraum an (Abb.: 25). Die Gesamtmenge an Flavonoid und Metabolit lag nach einer Inkubationsdauer von 6 h bei ca. 80 % der eingesetzten Menge.



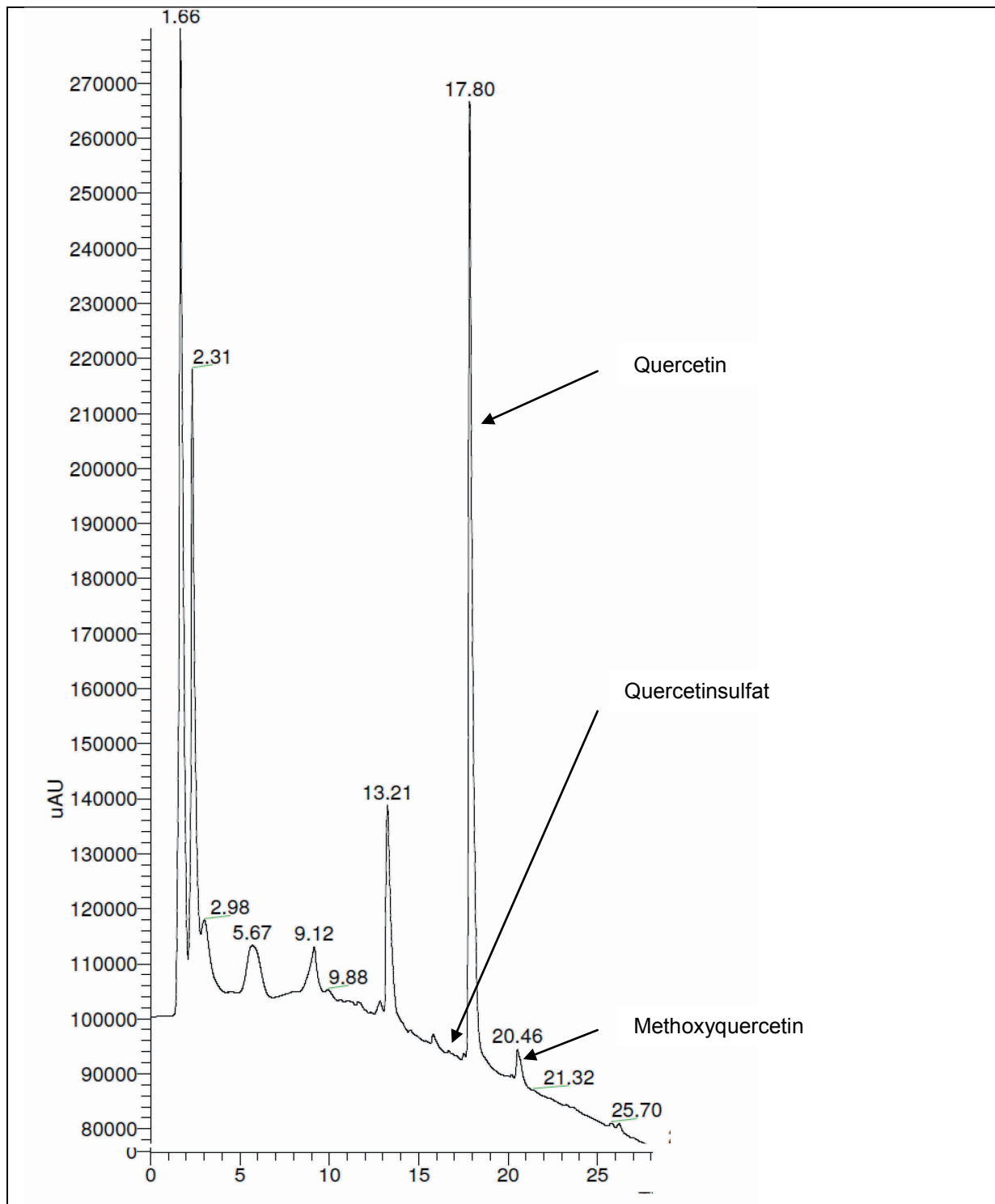
**Abbildung 25: Extrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Quercetin (100 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Quercetingehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4, \*p<0,05 vs. 0 h) in Prozent der zugegebenen Menge Quercetin.

Die extrazelluläre Menge an Isorhamnetin belief sich auf  $19 \pm 2,0 \mu\text{g}$ . Dies entsprach annähernd 16 % der eingesetzten Quercetinmenge, während von dem Sulfatderivat insgesamt  $5,3 \pm 0,9 \mu\text{g}$  entsprechend 4 % der eingesetzten Quercetinmenge nachgewiesen werden konnten. Die Wiederfindungsrate betrug nach einer Inkubationszeit von 6h 80 % der eingesetzten Menge.

#### **4.3 Identifikation der Metaboliten in Hct116 und HepG2 Zellen**

Unter Reversed Phase-Konditionen in der MS-gekoppelten HPLC eluierte ein Metabolit unter Standardbedingungen nach 20,5 min von der Säule (siehe Abb.: 26). Im Vergleich mit der Retentionszeit von 17,8 min für Quercetin musste es sich bei dem Metaboliten um eine unpolare Verbindung handeln. Die häufigsten Metabolismusschritte bei denen das Substrat durch die Anlagerung einer funktionellen Gruppe unpolarer wird sind Methylierungen und Acetylierungen. Massenspektrometrische Analyse der Überstände ergab ein Molekulargewicht von 316 g/mol für den Metaboliten gegenüber Quercetin mit 302 g/mol. Dieses Molekulargewicht würde dem eines Methoxyderivates des Quercetins entsprechen. Die im negativen Ionisierungsmodus durchgeführten MSMS-Experimente ergaben die Abspaltung einer Gruppe mit  $M/z = 15$  (siehe Tab.: 12). Dieses Masse-zu-Ladungsverhältnis trifft auf eine Methylgruppe als Fluchtgruppe zu und belegt das vorhanden sein eines Methoxyderivates. In der Abbildung 26 ist ein beispielhaftes Chromatogramm der LCMS mit den Strukturen der detektierten Metaboliten dargestellt. Die genaue Position der Sulfatgruppe wurde nicht bestimmt.



**Abbildung 26: Chromatogramm des Zellüberstandes nach einer 6 h Inkubation mit Quercetin inklusive Strukturformeln.** Die Position der Sulfatierung wurde nicht bestimmt.

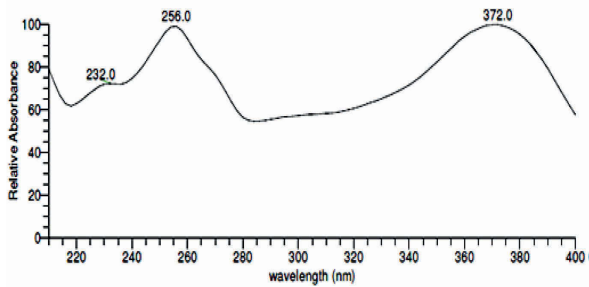
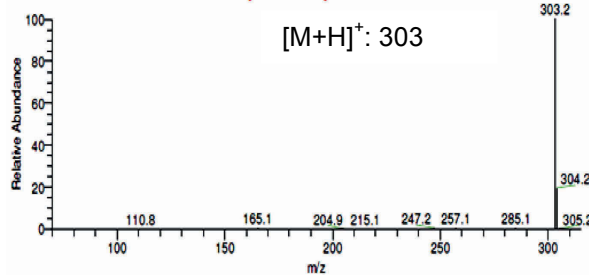
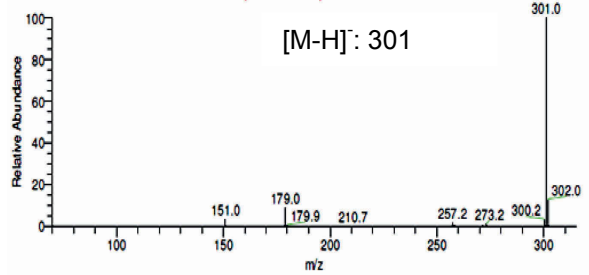
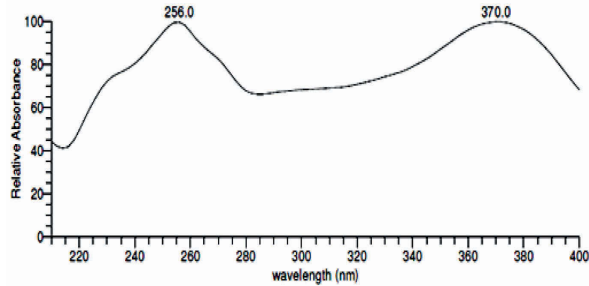
Neben dem Methylderivat trat nach 6 h Inkubationszeiten ein weiterer Peak im Chromatogramm auf. Die niedrigere Retentionszeit von 16,4 min im Vergleich zu Quercetin deutete auf einen polareren Metaboliten hin. Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben ein Molekülgewicht von  $[M-H]^- = 381$ . Das daraus resultierende Molekulargewicht von 382 entspricht dem eines Sulfatderivates. Die Abspaltung von  $[M-H]^- = 80$  im MSMS-Experiment spricht für die Abspaltung der Sulfatgruppe in Form von  $SO_3^-$ . Der Verbleib des

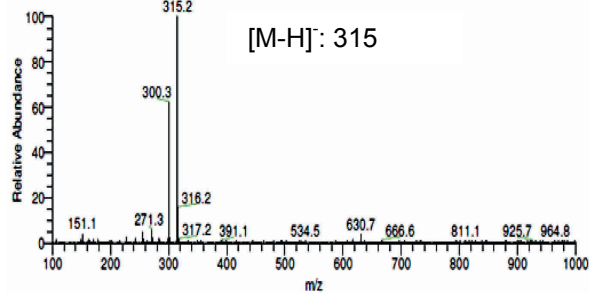
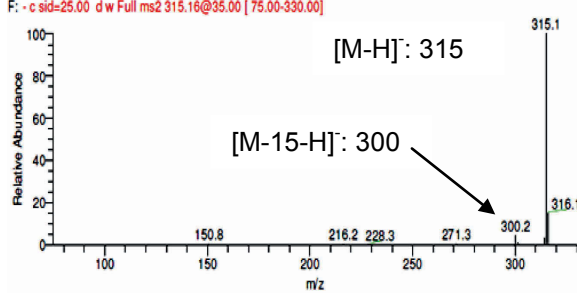
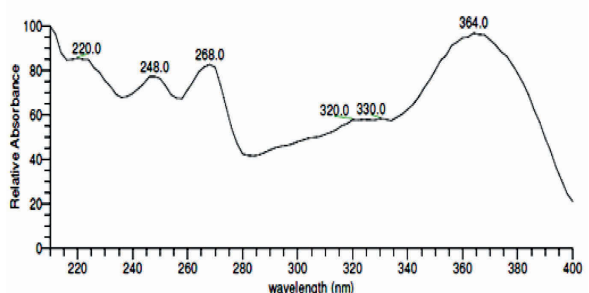
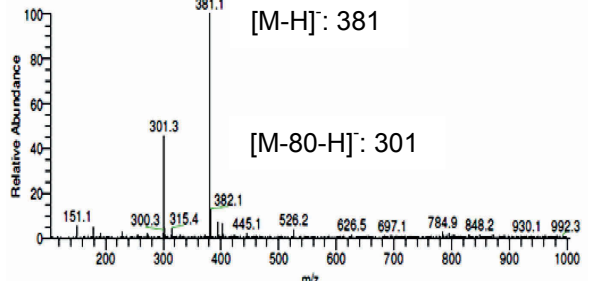
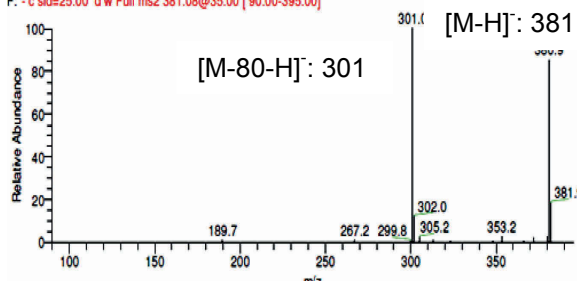
$[M-H]^- = 301$  weist auf die Existenz des Quercetins in diesem Molekül hin. Bei dem polaren Metaboliten handelt es sich somit um ein sulfatiertes Derivat des Quercetins. Da eine Sulfatierung von Verbindungen im Allgemeinen mit einer Exkretion und Detoxifikation einhergeht wurde darauf verzichtet die Position bzw. pharmakologische Effekte der Sulfatierung zu bestimmen.

In Tabelle 12 sind die wichtigsten Daten der Verbindungen sowie die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen dargestellt.

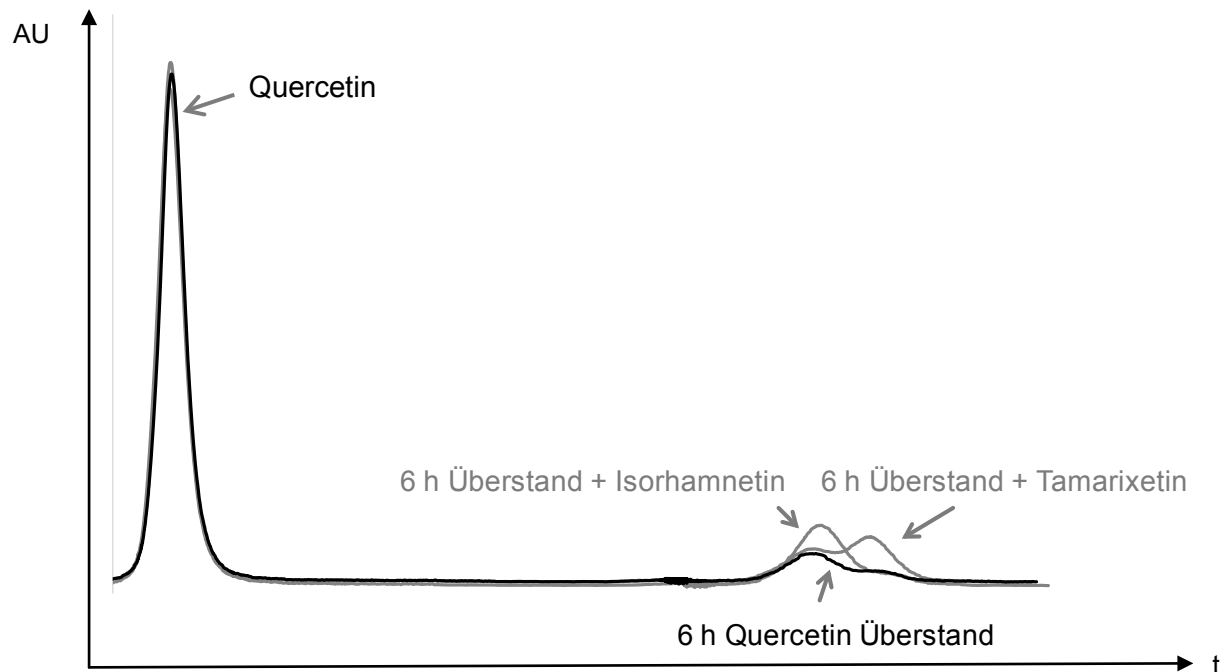
**Tabelle 12: Zusammenstellung der Daten von Quercetin, Isorhamnetin und dem Sulfatderivat.**

Dargestellt sind die UV- und Massenspektren der Verbindungen. Aufgrund der schlechten Ionisation im positiven Ionisationsmodus konnte nur für Quercetin eine Fragmentation in diesem Modus erreicht werden. Bei den Derivaten ist das Massenspektrum sowie das MSMS-Experiment im negativen Ionisationsmodus dargestellt.

| <b>Quercetin</b>                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UV-Spektrum                                                                                                                                                                           | Peak Daten                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                     | Retentionszeit: 17,8 min                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                       | UV-Maxima: 256 nm, 372 nm                                                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                       | Ermitteltes Molekulargewicht: 302 g/mol                                                                                                                                                |
| ESI-MS/MS+                                                                                                                                                                            | ESI-MS/MS-                                                                                                                                                                             |
| <p>F: + c sid=25.00 d w Full ms2 303.27@35.00 [70.00-315.00]</p>  <p><math>[M+H]^+</math>: 303</p> | <p>F: - c sid=25.00 d w Full ms2 301.20@35.00 [70.00-315.00]</p>  <p><math>[M-H]^-</math>: 301</p> |
| <b>Methylderivat des Quercetins</b>                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                        |
| UV-Spektrum                                                                                                                                                                           | Peak Daten                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                    | Retentionszeit: 20,5 min                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                       | UV-Maxima: 256 nm, 370 nm                                                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                       | Ermitteltes Molekulargewicht: 316 g/mol                                                                                                                                                |

|                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ESI-MS-</b><br> <p>[M-H]<sup>-</sup>: 315</p>                                    | <b>ESI-MS/MS-</b><br><p>F: -c sid=25.00 d w Full ms2 315.16@35.00 [ 75.00-330.00]</p>  <p>[M-H]<sup>-</sup>: 315</p> <p>[M-15-H]<sup>-</sup>: 300</p>   |
|                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Sulfatderivat des Quercetins</b>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>UV-Spektrum</b><br>                                                             | <b>Peak Daten</b><br><p>Retentionszeit: 16,7 min</p> <p>UV-Maxima: 268 nm, 330 nm, 364 nm</p> <p>Ermitteltes Molekulargewicht: 382 g/mol</p>                                                                                              |
| <b>ESI-MS-</b><br> <p>[M-H]<sup>-</sup>: 381</p> <p>[M-80-H]<sup>-</sup>: 301</p> | <b>ESI-MS/MS-</b><br><p>F: -c sid=25.00 d w Full ms2 381.08@35.00 [ 90.00-395.00]</p>  <p>[M-H]<sup>-</sup>: 381</p> <p>[M-80-H]<sup>-</sup>: 301</p> |

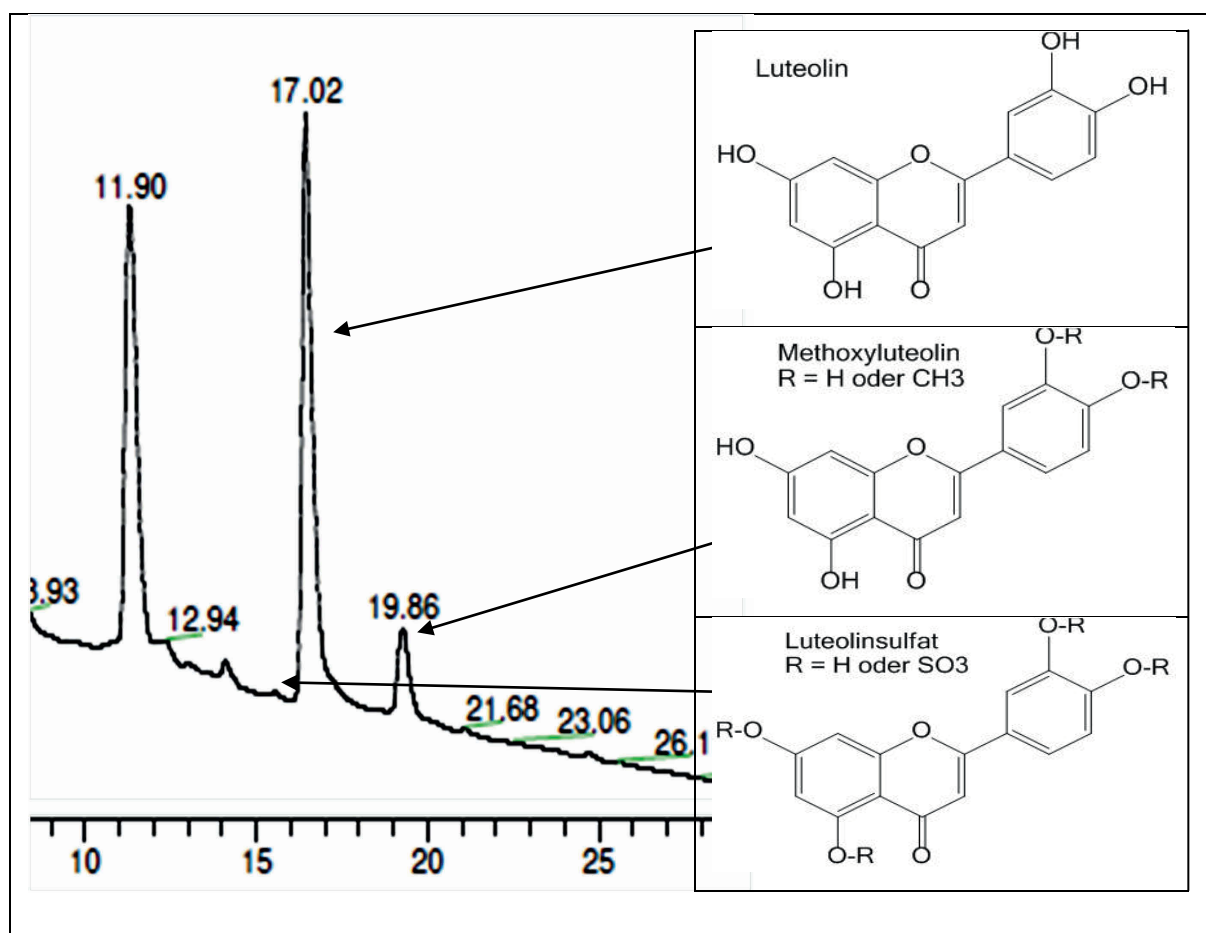
Die Beobachtung aus den Aufnahmeversuchen, dass eine Methylierung nur bei Flavonoiden mit ortho-ständigen Methylgruppen im B-Ring zu detektieren waren, sowie die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung legten den Verdacht nahe das es sich bei dem Metaboliten um ein im B-Ring methyliertes Quercetinderivat handelt. Um diesen Verdacht zu erhärten wurde mit Hilfe einer Koelution die Position der Methylierung bestimmt um eine aufwändige Isolation und spektroskopische Verfahren zu umgehen. Die Ergebnisse der Koelution mit dem 4'-Methoxyquercetin (Tamarixetin) und dem 3'-Methoxyderivat (Isorhamnetin) sind in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Overlay-Plot eines Chromatogrammes des Überstandes einer 6 h Inkubation mit Quercetin mit den Chromatogrammen derselben mit den Methoxyderivaten versetzten Probe.**

Durch den Wechsel des Lösemittels und die Anpassung des Lösemittelgradienten konnte der Metabolit im Überstand aufgetrennt werden. Dies führte zu einer Separierung in zwei getrennte Peaks. Die Zugabe von geringen Mengen an Isorhamnetin erhöhte die AUC des vorderen Peaks, was diesen als Isorhamnetin kennzeichnet. Die Zugabe von Tamarixetin resultierte in dem Anstieg der AUC des zweiten Peaks, wodurch belegt wurde, dass es sich dabei um Tamarixetin handelt. Bei dem Metabolitenpeak handelt es sich somit um eine Mischung von Isorhamnetin als Hauptkomponente und Tamarixetin als Nebenprodukt. Das Verhältnis betrug in diesen Großansätzen 3:1 bis 4:1.

Das Chromatogramm einer Inkubation von Hct116 Zellen mit Luteolin ergab ein ähnliches Bild wie die Inkubation der HepG2 Zellen mit Quercetin (Abb. 28). Das Auftreten eines unpolaren sowie eines polaren Metaboliten nach längeren Inkubationszeiten legte den Verdacht nahe, das auch Luteolin methyliert und sulfatiert wird. Massenspektrometrische Untersuchungen belegen, dass es sich bei dem unpolaren Metabolit erneut um ein Methylderivat handelt (Tab.: 13).

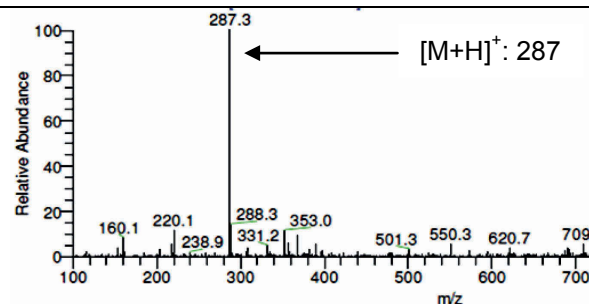
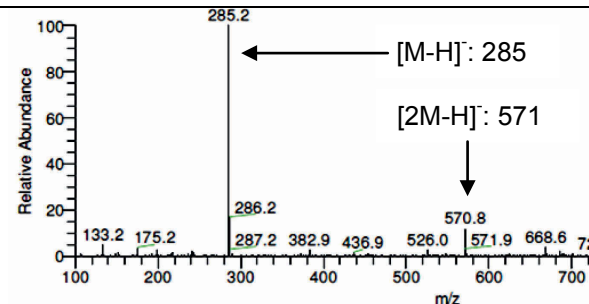
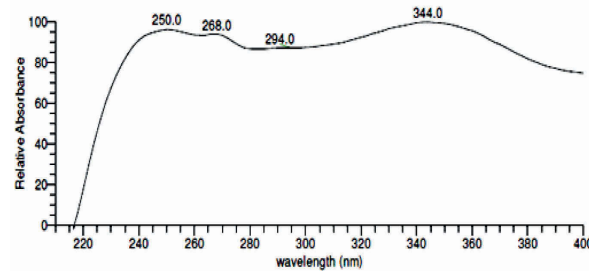
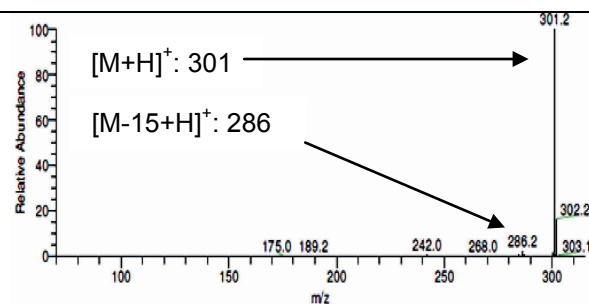
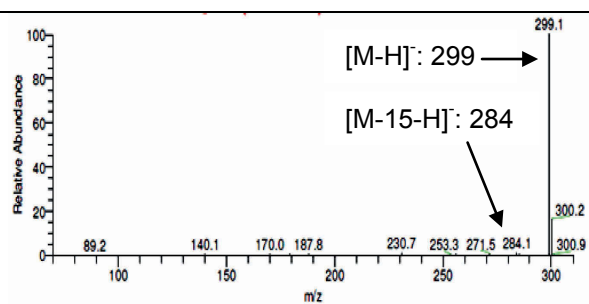
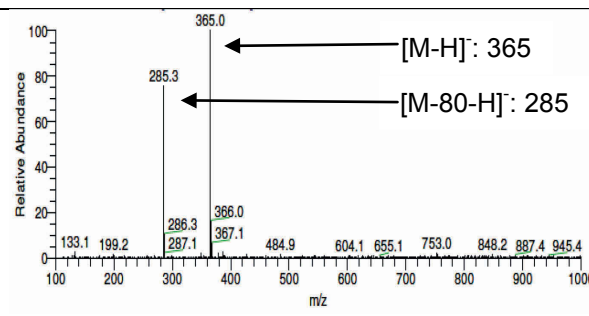
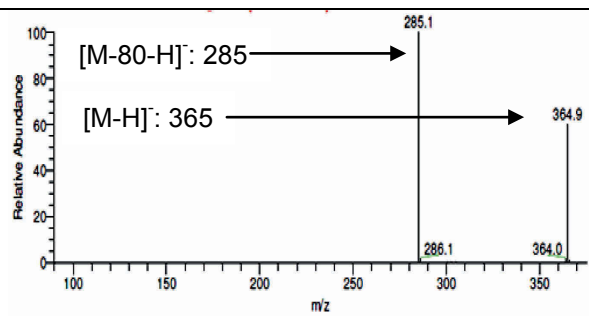


**Abbildung 28: Chromatogramm des Zellüberstandes nach einer 6 h Inkubation mit Luteolin inklusive Strukturformeln.** Die Position der Sulfatierung bzw. Methylierung wurde nicht bestimmt.

**Tabelle 13: Zusammenstellung der Daten von Luteolin sowie dem Methyl- und dem Sulfatderivat.**

Dargestellt sind die UV- und Massenspektren der Verbindungen. Aufgrund der schlechten Ionisation im positiven Ionisationsmodus konnte nur für Luteolin und sein Methylderivat eine Fragmentation in diesem Modus erreicht werden. Bei dem Sulfatderivat ist das Massenspektrum sowie das MSMS-Experiment im negativen Ionisationsmodus dargestellt.

| Luteolin    |                                         |
|-------------|-----------------------------------------|
| UV-Spektrum | Peakdaten                               |
|             | Retentionszeit: 17,0 min                |
|             | UV-Maxima: 252 nm, 266 nm, 348 nm       |
|             | Ermitteltes Molekulargewicht: 286 g/mol |

|                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>ESI-MS+</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M+H]^+</math>: 287</p> <p>m/z</p>                                         | <p><b>ESI-MS-</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M-H]^-</math>: 285</p> <p><math>[2M-H]^-</math>: 571</p> <p>m/z</p>        |
| <p><b>Methoxyluteolin</b></p>                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                         |
| <p><b>UV-Spektrum</b></p>  <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p>                                                         | <p>Retentionszeit: 19,9 min</p> <p>UV-Maxima: 250 nm, 268 nm, 344 nm</p> <p>Ermitteltes Molekulargewicht: 300 g/mol</p>                                                                                                 |
| <p><b>ESI-MSMS+</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M+H]^+</math>: 301</p> <p><math>[M-15+H]^+</math>: 286</p> <p>m/z</p> | <p><b>ESI-MS/MS-</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M-H]^-</math>: 299</p> <p><math>[M-15-H]^-</math>: 284</p> <p>m/z</p> |
| <p><b>Sulfatderivat des Luteolin</b></p>                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                         |
| <p><b>UV-Spektrum</b></p>                                                                                                                                                                                             | <p>Peakdaten</p>                                                                                                                                                                                                        |
| <p>n.d.</p>                                                                                                                                                                                                           | <p>Retentionszeit: 16,0 min</p> <p>UV-Maxima: n.d.</p> <p>Ermitteltes Molekulargewicht: 366 g/mol</p>                                                                                                                   |
| <p><b>ESI-MS-</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M-H]^-</math>: 365</p> <p><math>[M-80-H]^-</math>: 285</p> <p>m/z</p>   | <p><b>ESI-MS/MS-</b></p>  <p>Relative Abundance</p> <p><math>[M-80-H]^-</math>: 285</p> <p><math>[M-H]^-</math>: 365</p> <p>m/z</p> |

Für den Peak mit der Retentionszeit von 16 min konnten aufgrund der schlechten Ionisation der Flavonoide im positiven Ionisierungsmodus nur die massenspektrometrischen Daten des negativen Ionisierungsmodus erhoben werden. Es konnte ein Signal mit  $[M-H]^- = 365$  detektiert werden. Dieses verlor im MSMS eine Fragment mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 80. Dies deutet auf die Existenz eines Sulfatderivates (erwartetes Molekulargewicht: 366 g/mol) hin. Die exakte Positionierung der Sulfatierung wurde wie für das Sulfatderivat des Quercetins nicht ermittelt.

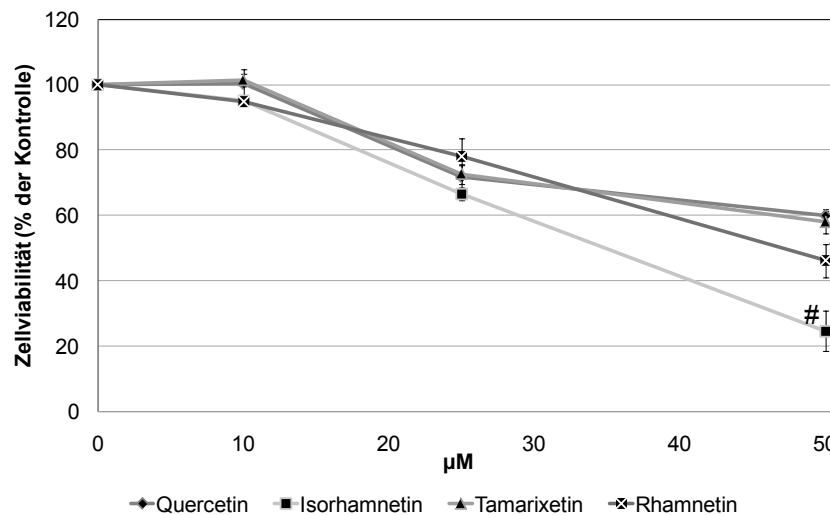
Aufgrund der hohen Menge an Methylderivat im Falle der Inkubation der Hct116 Zellen mit Luteolin (ca. 30% der eingesetzten Flavonoidmenge nach 6 h Inkubation) konnte für diesen im positiven Ionisierungsmodus ein MSMS-Spektrum aufgenommen werden. Es wurde ein Signal mit dem erwarteten Gewicht vom  $[M+H]^+ = 301$  aufgenommen, welches im MSMS-Experiment den Verlust eines Fragmentes von  $M/z = 15$  zeigt. Mit den Ergebnissen im negativen Ionisierungsmodus, wo ein Signal mit  $[M-H]^- = 299$  im MSMS-Experiment ebenfalls den Verlust einer Gruppe mit  $M/z = 15$  aufweist und den Ergebnissen der Methylierung des Quercetins ergibt sich das Bild eines Methylderivates, welcher die Methylgruppe vermutlich im B-Ring trägt. Die exakte Position der Methylierung wurde für das Methoxyluteolin nicht bestimmt, da die pharmakologischen Effekte der beiden Methylderivate des Luteolins Chrysoeriol und Diosmetin per se untersucht wurden. Die veränderten pharmakologischen Eigenschaften der Methylderivate wurden in den Hct116 Zellen untersucht, da diese in der Lage sind das Methylderivat in relevanten Menge zu bilden.

#### **4.4 Komparative Studien der Methylderivate**

Im ersten Teil werden die vergleichenden Studien zwischen Quercetin und den drei Methylderivaten Isorhamnetin, Tamarixetin und Rhamnetin in HepG2 Zellen dargestellt. Im zweiten Teil werden die pharmakologischen Effekte von Luteolin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen vorgestellt.

##### **4.4.1 Zytotoxizität der Quercetinderivate**

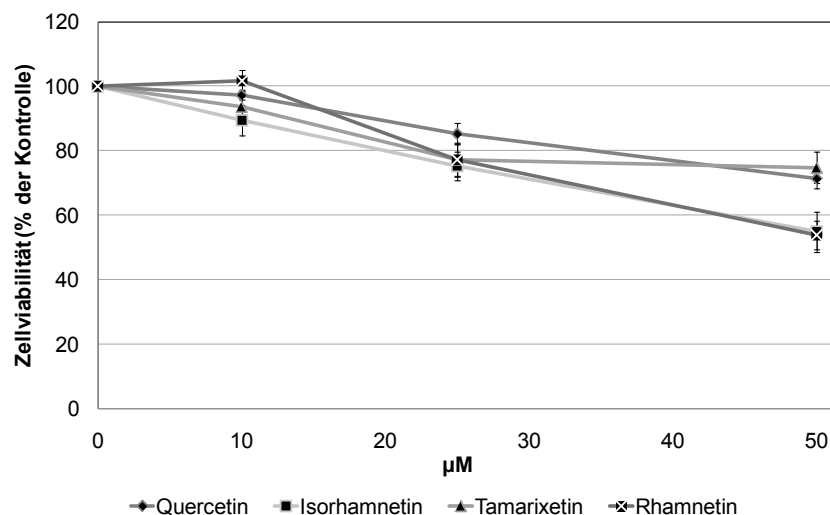
In Abbildung 29 und 30 ist die Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 nach 48 h bzw. 24 h dargestellt. Diese Zelllinie wurde verwendet da sie wie die humane Kolonkarzinomzelllinie Hct116 in der Lage sind das Methylderivat in relevanten Mengen zu synthetisieren. Wie in vorhergehenden Untersuchungen zur Zytotoxizität der Flavonoide (siehe 4.2.2) zeigt Quercetin in den HepG2 Zellen nach 48 h eine moderate Toxizität. Die Methylierung des Quercetins in Position 4' bzw. 7 hat keinen Effekt auf diesen Endpunkt. Die Verwendung des 3'-Methoxyquercetins führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität nach 48 h im Vergleich mit Quercetin.



**Abbildung 29: 48 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM (n=4, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, #:  $p < 0,05$  vs. 50 µM Quercetin im Students T-Test).

Im Vergleich zur 48 h Toxizität ist der Effekt auf die Viabilität nach einer kürzeren Inkubationszeit weniger stark. Tendenziell erscheint Isorhamnetin auch nach kürzeren Inkubationszeiten toxischer zu sein als Quercetin. Neben Isorhamnetin zeigt auch Rhamnetin nach der 24 h Inkubation eine leicht erhöhte Toxizität gegenüber Quercetin. Beide sind nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich mit der entsprechenden Quercetinkonzentration.

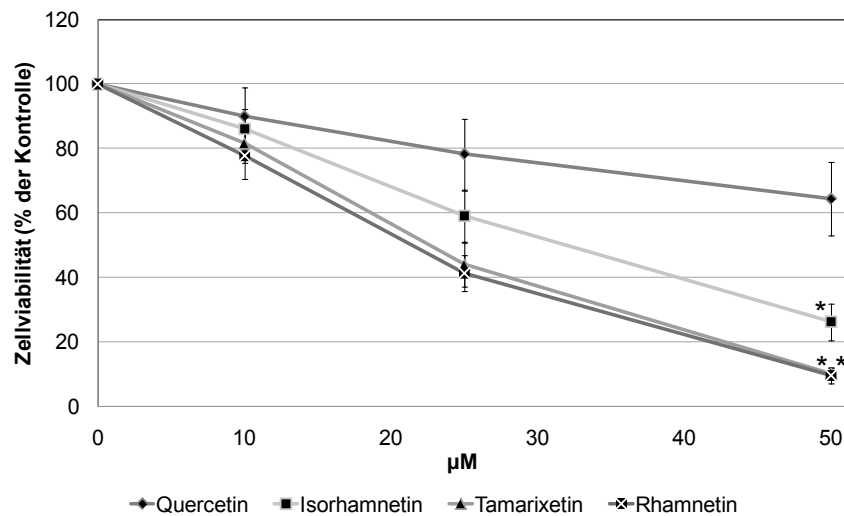


**Abbildung 30: 24 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivate in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 24 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM (n=8, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant).

Die für die HepG2 Zellen erhaltenen Ergebnisse wurden mit den ebenfalls zur Methylierung befähigten Hct116 Zellen bestätigt (Abb.: 31). Eine erhöhte Toxizität des Isorhamnetin

konnte hier ebenfalls dargestellt werden. Zusätzlich zeigten die Methylderivate Tamarixetin und Rhamnetin in dieser Zelllinie eine deutliche Abnahme der Viabilität.



**Abbildung 31: 48 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

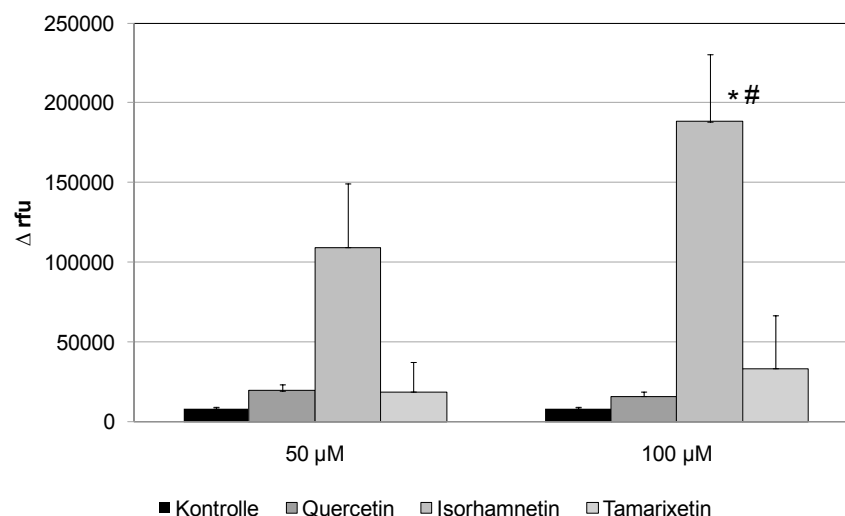
Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

#### 4.4.2 Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes in HepG2 Zellen

Im ersten Teil des Kapitels werden die Effekte der Methylierung des Quercetins auf verschiedene mit der Art des Zelltods verknüpfte Endpunkte in den HepG2 Zellen vorgestellt, bevor die Beteiligung verschiedener Kinasen an der Vermittlung dieser Effekte präsentiert wird.

##### 4.4.2.1 Apoptosenachweis in HepG2 Zellen via Caspase-3/7-Aktivität

Als Marker für einen apoptotischen Zelltod wurde der Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität nach den jeweiligen Behandlungen erfasst. Nach einer Inkubation der HepG2 Zellen für 24 h mit 50  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M Flavonoid konnte nur für die mit Isorhamnetin inkubierten Zellen ein Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität ermittelt werden (Abb.:32). Dieser Anstieg war für beide Konzentrationen zu detektieren. Keine der anderen Substanzen war in der Lage innerhalb dieses Zeitraumes die Aktivität der Caspasen-3/7 deutlich zu erhöhen. Rhamnetin fiel bei einer eingesetzten Konzentration von 100  $\mu$ M in dem Medium aus und zeigte bei 50  $\mu$ M ebenfalls keinen Effekt auf die Caspaseaktivität. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wurde daher verzichtet.



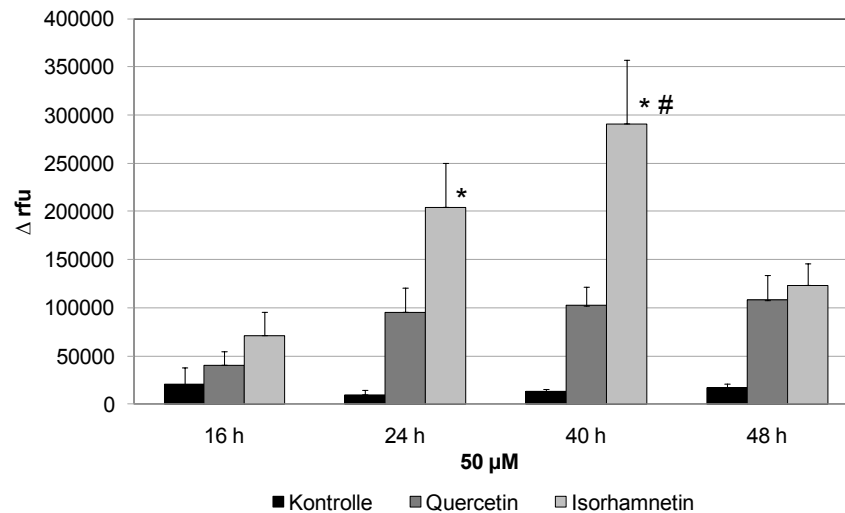
**Abbildung 32: Konzentrationsabhängige Caspase-3/7-Aktivität nach 24 h Inkubationen in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an Flavonoid erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $3 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 24 h. Die Aktivität der Caspase-3/7 wurde als Fluoreszenzanstieg (Ex: 485 nm, Em: 535 nm) im Plattenlesegerät mit Hilfe des ApoONE-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz nach 105 min  $\pm$  SEM (n=3, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, #:  $p < 0,05$  vs. 100  $\mu$ M Quercetin).

Da Tamarixetin in den HepG2 Zellen keine höhere Zytotoxizität aufwies als Quercetin und die Caspase-3/7-Aktivität auch mit 100  $\mu$ M nicht erhöhte, wurden weiterführende Versuche nur mit Isorhamnetin und Quercetin durchgeführt.

In Abbildung 33 ist der zeitliche Verlauf der Caspase-3/7-Aktivierung in HepG2 dargestellt. Bei einer Inkubation mit 50  $\mu$ M Isorhamnetin erreicht die Aktivierung der Caspase-3/7

zwischen 24 h und 48 h ein Maximum, wobei nach 48 h ein Abfall der Caspase-3/7-Aktivität detektiert wird. Durch die Behandlung der Zellen mit 50  $\mu$ M Quercetin kann die Caspase-3/7-Aktivität leicht induziert werden. Diese bewegt sich allerdings ab 24 h auf einem gleichbleibenden Niveau.

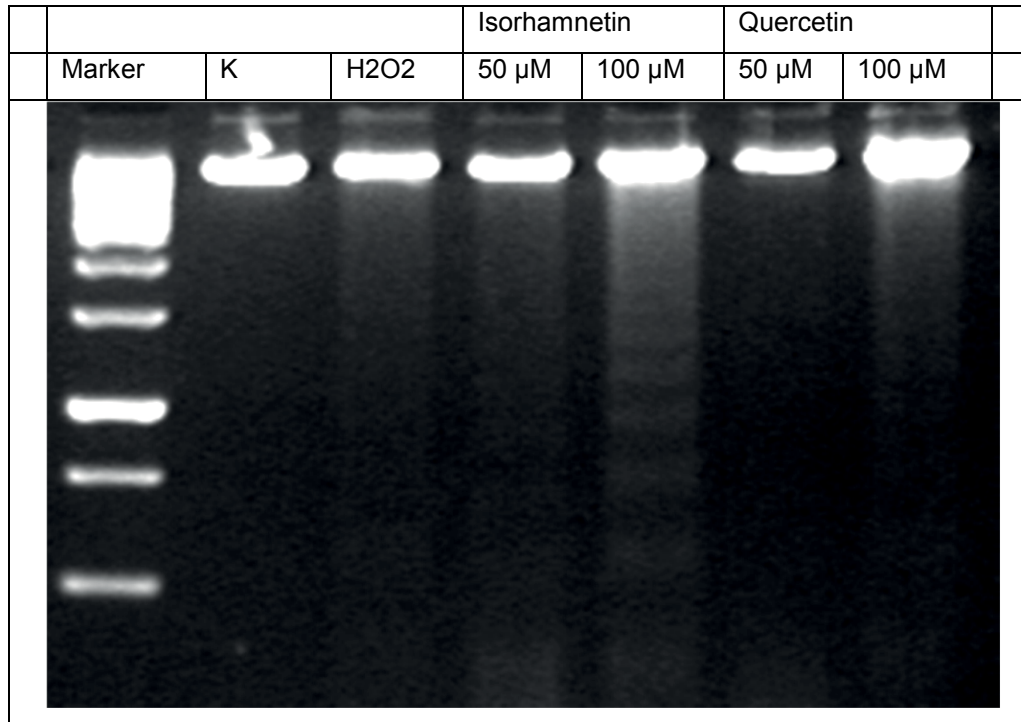


**Abbildung 33: Zeitabhängige Caspase-3/7-Aktivität in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit 50  $\mu$ M des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $3 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für die angegebenen Zeitspannen. Die Aktivität der Caspase-3/7 wurde als Fluoreszenzanstieg (Ex: 485 nm, Em: 535 nm) im Plattenlesegerät mit Hilfe des ApoONE-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz nach 105 min  $\pm$  SEM (n=4, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, #:  $p < 0,05$  vs. Quercetin).

#### 4.4.2.2 Apoptosenachweis in HepG2 Zellen via DNA-Fragmentations-Assay

Die Induktion der Apoptose wurde mit Hilfe des Kernfragmenations-Assays nachgewiesen. Abbildung 34 gibt ein repräsentatives Bild der elektrophoretisch aufgetrennten DNA von HepG2 Zellen welche 24 h mit den entsprechenden Flavonoiden inkubiert waren.



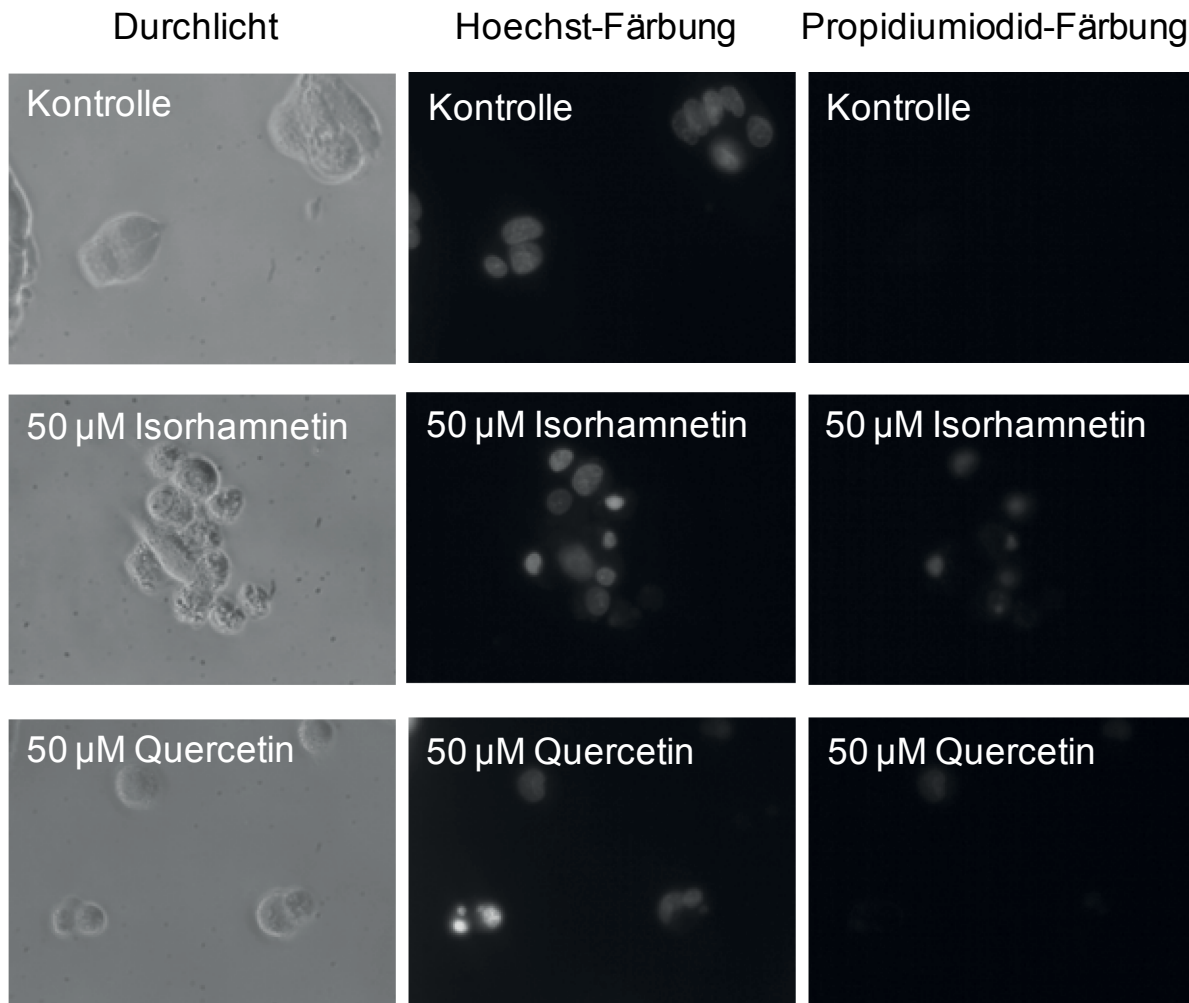
**Abbildung 34: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentation in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $10^6$  HepG2 Zellen in einer 6-Wellplate für 24 h. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA wurden jeweils 5  $\mu$ g der isolierten DNA in einem Agarosegel im elektrischen Feld getrennt und unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage dokumentiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, K= Kontrolle.

In Spur 2 und 3 konnte nur jeweils eine distinkte Bande detektiert werden. Dies deutet auf eine intakte DNA der Zellen hin. Eine anschließende Überprüfung der Zytotoxizität des Wasserstoffperoxids in dieser Zelllinie ergab, dass der  $IC_{50}$  von  $H_2O_2$  in HepG2 Zellen bei annähernd 2 mM liegt. Somit war die Konzentration bei der geplanten Positivkontrolle zu niedrig, um einen apoptotischen Zelltod zu induzieren. Während die Behandlung der Zellen mit 50  $\mu$ M Isorhamnetin eine minimale Induktion der DNA-Fragmentierung erkennen lässt, zeigt die DNA der mit der höchsten Konzentration belasteten Zellen ein eindeutiges Leiternmuster (Spuren 4 und 5). Im Vergleich mit Quercetin ist das Potential von Isorhamnetin die oligonucleosomale DNA-Fragmentierung zu induzieren höher als das des Quercetins, da dieses in keiner der beiden Spuren einen eindeutigen Leitereffekt aufweist.

#### 4.4.2.3 Fluoreszenzmikroskopischer Apoptose- und Nekrosenachweis in HepG2 Zellen

Als weiterer Nachweis des apoptotischen Zelltodes diente die Kombination der Hoechst 33342- und der Propidiumiodid-Färbung. Dabei konnten nekrotische von apoptotischen Zellen differenziert und statistisch ausgewertet werden. Desweiteren erlaubte die Färbung der DNA mit Hoechst 33342 durch die Identifizierung mitotischer Zellen einen Rückschluss auf die Proliferationsrate der Zellen.



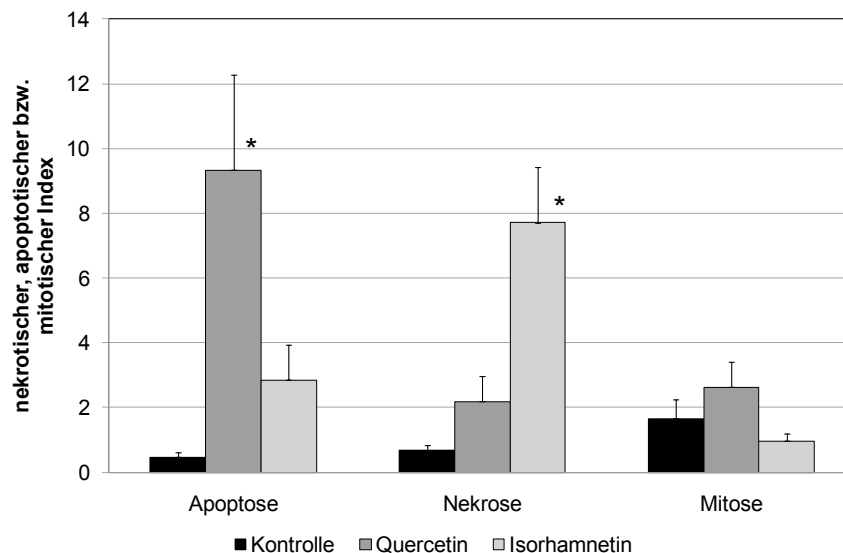
**Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HepG2 Zellen mit Hoechst und PI-Färbung.**

Die Inkubation mit 50 µM des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^5$  HepG2 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen für 24 h. Nach Zugabe von 1 µl Hoechst 33342 und 2 µl Propidiumiodid wurden die Überstände zentrifugiert und pelletierte Zellen in 10 µl PBS zurück auf die Zellkulturschale gegeben. Die Auswertung erfolgte bei 535 nm<sub>ex</sub> und 620 nm<sub>em</sub> bei Propidiumiodid und bei 365 nm<sub>em</sub> und 420 nm<sub>ex</sub> bei Hoechst 33342. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines von drei unabhängigen Versuchen.

Die Inkubation der Zellen mit 50 µM Isorhamnetin (24 h) führt zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie von HepG2 Zellen. Die Zellen erscheinen im lichtmikroskopischen Bild abgerundet und granulös. Die starke Kondensation der DNA in der Hoechst-Färbung könnte auf eine Apoptose hinweisen. Aufgrund der Gegenfärbung mit

Propidiumiodid welches nekrotische Zellen anfärbt wurden solche Zellen in der Auswertung als nekrotisch eingestuft.

Die Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin bewirkte ebenfalls eine Abrundung der Zellen. Im Gegensatz zu der Inkubation mit Isorhamnetin erscheinen sie nicht granulös. In der Hoechst-Färbung konnten apoptotische Körperchen (weiße Pfeile) und bei einer Anregung mit 535 nm nekrotische Zellen nachgewiesen werden. In der statistischen Auswertung (Abb.: 36) ist neben dem nekrotischen und dem apoptotischen Index auch der mitotische Index angegeben. Während Quercetin in dieser Methode unter den gegebenen Bedingungen in ca. 9 % der Zellen Apoptose auslöste, war Isorhamnetin dazu nicht in der Lage. Stattdessen zeigte Isorhamnetin ein nekrotisches Potential, da bis zu 8 % der Zellen als nekrotisch eingestuft wurden. Zusätzlich konnte für Isorhamnetin jedoch nicht für Quercetin eine leichte Abnahme der Mitoserate detektiert werden.

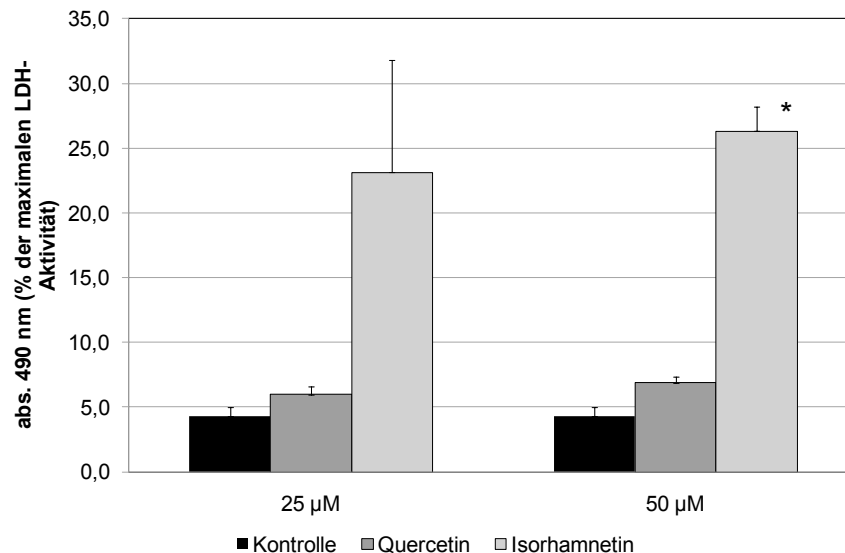


**Abbildung 36: Statistische Auswertung der Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung der HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^5$  HepG2 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen für 24 h. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Hoechst 33342 und 2  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid wurden die Überstände zentrifugiert und pelletierte Zellen in 10  $\mu\text{l}$  PBS zurück auf die Zellkulturschale gegeben. Die Auswertung erfolgte bei 535 nm<sub>ex</sub> und 620 nm<sub>em</sub> bei Propidiumiodid und bei 365 nm<sub>em</sub> und 420 nm<sub>ex</sub> bei Hoechst33342. Dargestellt ist die Anzahl der entsprechend eingestuft Zellen prozentual zur Gesamtzahl der erfassten Zellen +/- SEM (n=6 für Apoptose und Nekrose und n=4 für Mitose, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

#### 4.4.2.4 Nekrosenachweis in HepG2 Zellen via LDH-Aktivität

Der Anstieg des nekrotischen Index durch die Behandlung der HepG2 Zellen mit Isorhamnetin war in der statistischen Auswertung der Propidiumiodid-Färbung nicht signifikant. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurden die Ansätze (50  $\mu\text{M}$ , 24 h) wiederholt und der Efflux des zytosolischen Proteins Laktat-Dehydrogenase im Überstand der Zellen gemessen.



**Abbildung 37: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Überstand der HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in 96 Wellplates für 24 h. Nach der Inkubation wurden 50 µl des Überstandes mit 50 µl des Reaktionspuffers für die LDH zusammengegeben und die Aktivität der LDH durch den Anstieg der Absorption bei 490 nm bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Absorption bei 490 nm prozentual zu der maximalen Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Medium (ermittelt durch die Lyse der Zellen mit einem Detergenz)  $\pm$  SEM (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Isorhamnetin erhöhte die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Medium auf 22 % bzw. 25 % im Vergleich zu der maximal detektierbaren LDH-Aktivität. Für Quercetin war kein signifikanter Effekt auf die LDH-Aktivität im Überstand zu beobachten.

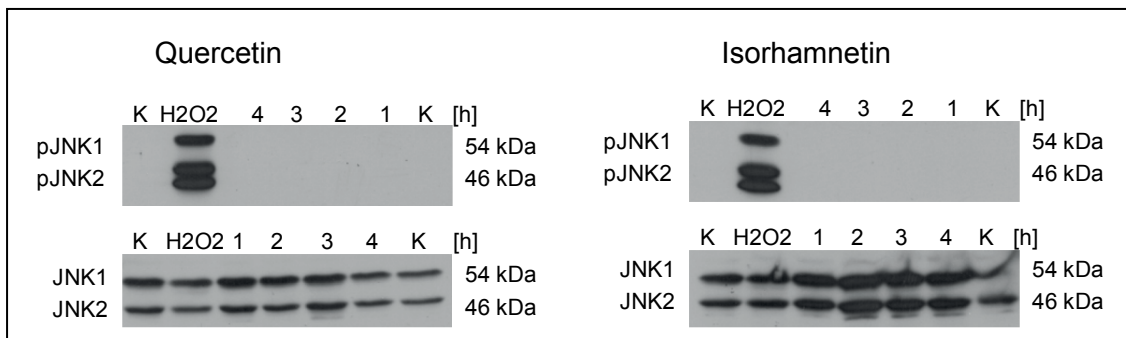
#### 4.4.3 Effekte von Quercetin und Isorhamnetin auf MAPKinasen in HepG2 Zellen

Um zu prüfen ob die erhöhte Zytotoxizität der Methylderivate auf einer differentiellen Regulierung von intrazellulären Signalwegen beruht, wurde die Aktivität verschiedener mitogen-aktivierter Kinasen nach der Behandlung mit den Verbindungen mittels Westernblot untersucht.

##### 4.4.3.1 Mitogen Aktivierte Protein Kinase - JNK

Die Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wird mit pro-apoptotischen Effekten korreliert. Eine Beteiligung dieser Kinase an der Induktion der Apoptose durch Isorhamnetin (erhöhte Effektorcaspase-Aktivität, Induktion einer DNA-Leiter) wurde auf Proteinebene mit der Westernblot-Technik untersucht. Inkubation der HepG2 Zellen mit einer Konzentration von 50 µM führte bei beiden Substanzen zu keinem Anstieg der phosphorylierten JNK im analysierten Zeitraum. Dem entgegen konnte durch eine Inkubation der Zellen mit 2 mM  $H_2O_2$  eine deutliche Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 erreicht werden (siehe Abb.: 38). Bei längeren Belichtungszeiten wurden für jede Inkubation eine schwache Banden mit der erwarteten Größe detektiert. Diese zeigten keine Veränderung in der Intensität und waren

begleitet von unspezifischen Banden. Die Wiederholung des Versuches mit längerer Belichtungszeit kam zum gleichen Ergebnis, so dass auf eine weitere Wiederholungen und die Darstellung der Blots verzichtet wurde.

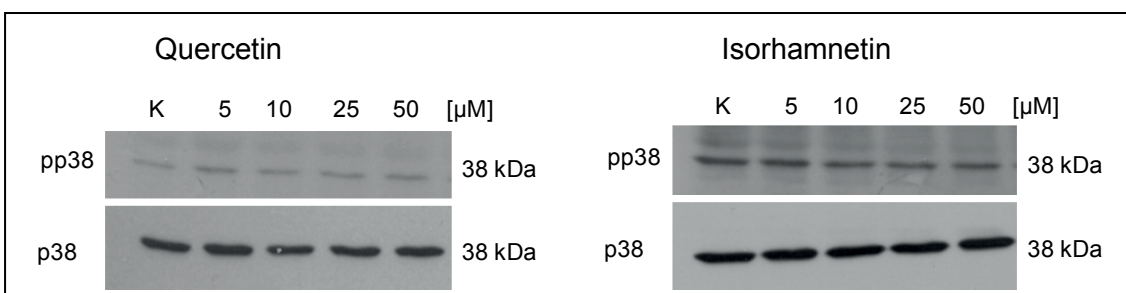


**Abbildung 38: Einfluß von Quercetin und Isorhamnetin auf die JNK-Aktivität.**

Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in 6 Wellplates für die angegebenen Zeiträume. Die Inkubation der Zellen mit 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte für 4 h. Nach der Proteinbestimmung und Denaturierung des Proteins wurden zur Detektion der phosphorylierten JNK jeweils 40  $\mu\text{g}$  Protein und zur Detektion der nicht-phosphorylierten JNK 20  $\mu\text{g}$  in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch eine Inkubation mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern sowie einer anschließenden lichtemittierenden Reaktion detektiert. Die entstandene Lumineszenz wurde auf Röntgenfilmen festgehalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

#### 4.4.3.2 Mitogen Aktivierte Protein Kinase - p38

Die Aktivierung der p38 Kinase wird ebenfalls mit pro-apoptotischen Effekten korreliert. Daher wurde mit der Westernblot-Technik die Beteiligung dieser Kinase an der Apoptose-Induktion durch die Flavonoide auf Proteinebene untersucht. Die Aktivität der p38 Kinase wurde konzentrationsabhängig bei einer Inkubationszeit von 2 h ermittelt. Wie in der Abbildung 39 zu sehen ist führt eine Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Flavonoid in diesem Zeitraum zu keiner Phosphorylierung der p38.

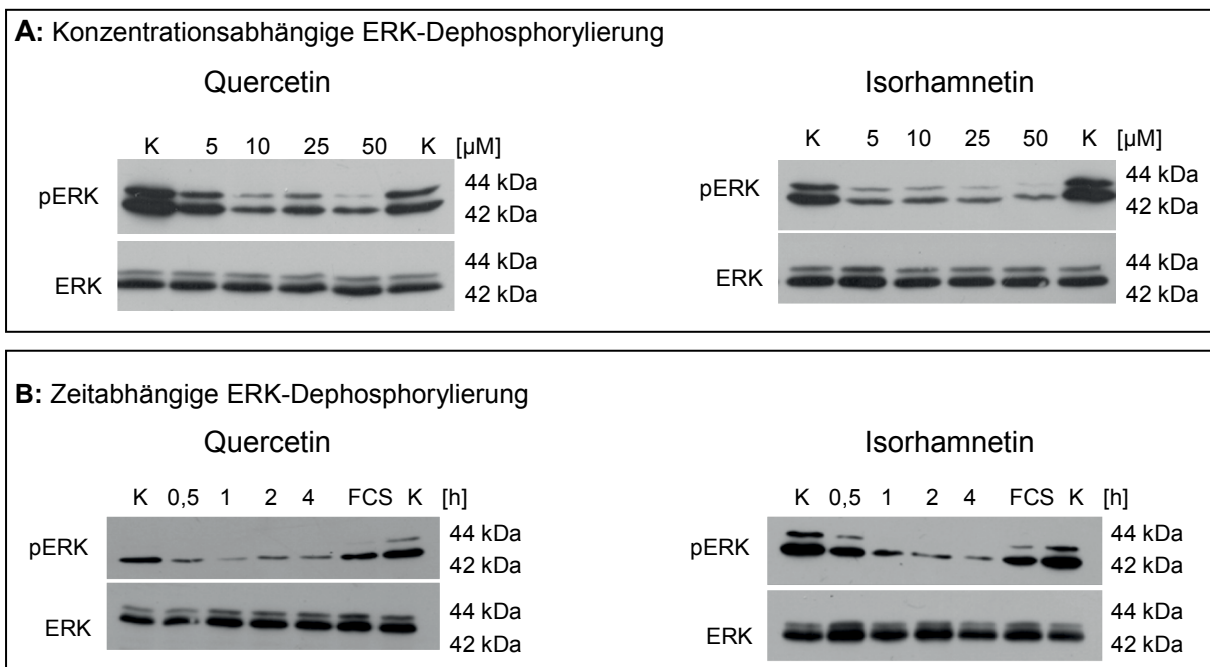


**Abbildung 39: Einfluß von Quercetin und Isorhamnetin auf die p38-Aktivität.**

Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in 6 Wellplates für 2 h. Nach der Proteinbestimmung und Denaturierung des Proteins wurden zur Detektion der phosphorylierten sowie der nicht phosphorylierten p38 Kinase jeweils 40  $\mu\text{g}$  Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch eine Inkubation mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern sowie einer anschließenden lichtemittierenden Reaktion detektiert. Die entstandene Lumineszenz wurde auf Röntgenfilmen festgehalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

#### 4.4.3.3 Mitogen Aktivierte Protein Kinase - ERK

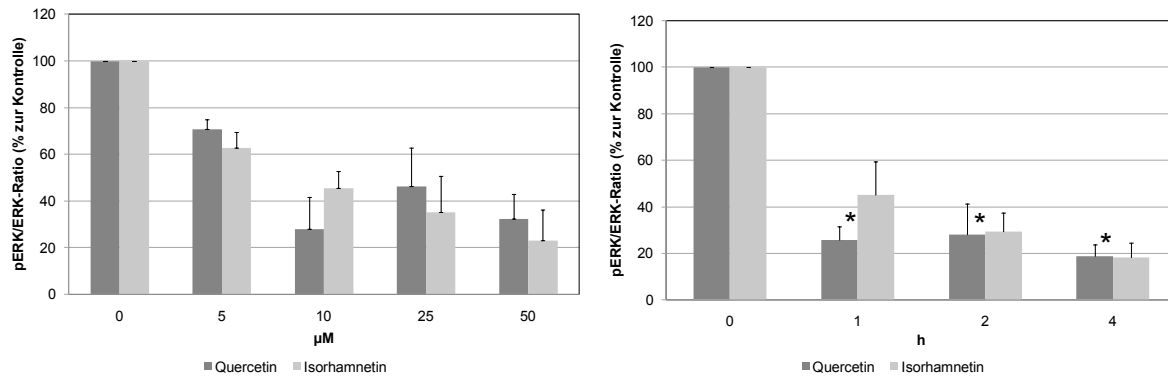
Die Aktivität der Extrazellulär-signal Regulierten Kinase wird hauptsächlich durch den EGF-Rezeptor reguliert. Sie wird daher durch Wachstumsfaktoren, welche in Form von FCS dem Medium zugesetzt sind aktiviert. Inkubation der HepG2 Zellen mit Quercetin bzw. Isorhamnetin für 2 h führt zu einer konzentrationsabhängigen (Abb.: 40A) Abnahme der ERK-Phosphorylierung. Dieser Effekt konnte ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin bzw. Quercetin detektiert werden. Isorhamnetin inhibierte die ERK-Phosphorylierung in den Versuchen tendenziell stärker als Quercetin jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 40: Konzentrations- (A) und zeitabhängige (B) ERK-Dephosphorylierung in HepG2 Zellen**

Die Inkubation mit **A** verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in 6 Wellplates für 2 h. Die Inkubation mit **B** 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in 6 Wellplates für die angegebenen Zeitpunkte. Nach der Proteinbestimmung und Denaturierung des Proteins wurden zur Detektion der phosphorylierten sowie der nicht-phosphorylierten ERK jeweils 25  $\mu\text{g}$  Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch eine Inkubation mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern sowie einer anschließenden lichtemittierenden Reaktion detektiert. Die entstandene Lumineszenz wurde auf Röntgenfilmen festgehalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

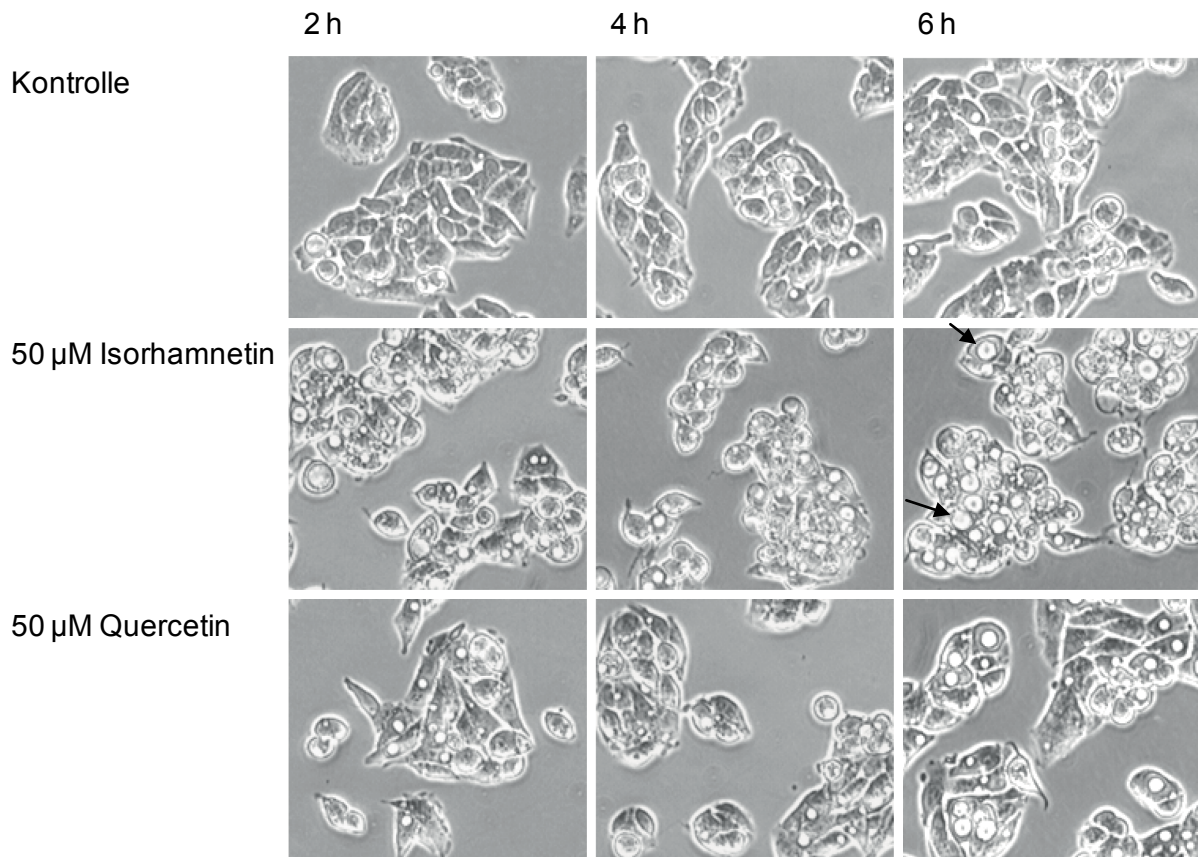
Im Weiteren wurde die Kinetik der Dephosphorylierung der ERK analysiert (Abb.: 40B). Die Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Substanz zeigt in beiden Fällen eine schnelle Abnahme der ERK-Phosphorylierung. Diese konnte schon ab einer Inkubationsdauer von 30 min nachgewiesen werden. Densitometrisch (siehe Abbildung 41) wurde dieser Zeitpunkt nicht erfasst, da die Daten dieses Zeitpunktes nur zweimal erhoben wurden.



**Abbildung 41: Densitometrische Auswertung der Konzentrations- und zeitabhängigen ERK-dephosphorylierung**

Die Inkubationsbedingungen sind unter den jeweiligen repräsentativen Bildern der Westernblots beschrieben. Die Bandenintensität (optische Dichte/ $\text{mm}^2$ ) auf den exponierten Röntgenfilmen wurde *in silico* ermittelt. Dargestellt sind die ermittelten Verhältnisse von pERK zu ERK als Prozent der Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle).

Die Effekte der Substanzen auf die ERK traten innerhalb kurzer Zeit und schon bei niedrigen Konzentrationen auf. Eine Kurzzeitinkubation der HepG2 Zellen mit den Flavonoiden führte zu keiner verringerten Viabilität der Zellen. Die Veränderung der Morphologie der Zellen wurde daher als sensibler Parameter erfasst um Effekte der verringerten ERK-Aktivität innerhalb der kurzen Inkubationszeit zu dokumentieren. Die Veränderung der Zellmorphologie ist graphisch in Abbildung 42 festgehalten. Die Kontrolle zeigt über den getesteten Zeitraum keine deutlichen Veränderungen. Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin führte zu einer zeitabhängigen Bildung von „Vakuolen“. Diese bestehen weder aus kondensierten Lysosomen noch enthalten sie den Zellkern oder das Flavonoid wie Färbungen mit Neutralrot bzw. Hoechst 33342 und die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergaben. Innerhalb einer Inkubationszeit von 2 h zeigten die mit Isorhamnetin inkubierten Zellen morphologische Veränderungen, welche im Inkubationszeitraum deutlicher wurde. Die mit Quercetin behandelten Zellen zeigen ebenfalls die Tendenz zur Vakuolisierung. Diese ist deutlich geringer ausgeprägt und erreicht bei der längsten Inkubationszeit mit 50  $\mu\text{M}$  kaum das Ausmaß der mit Isorhamnetin behandelten Zellen.



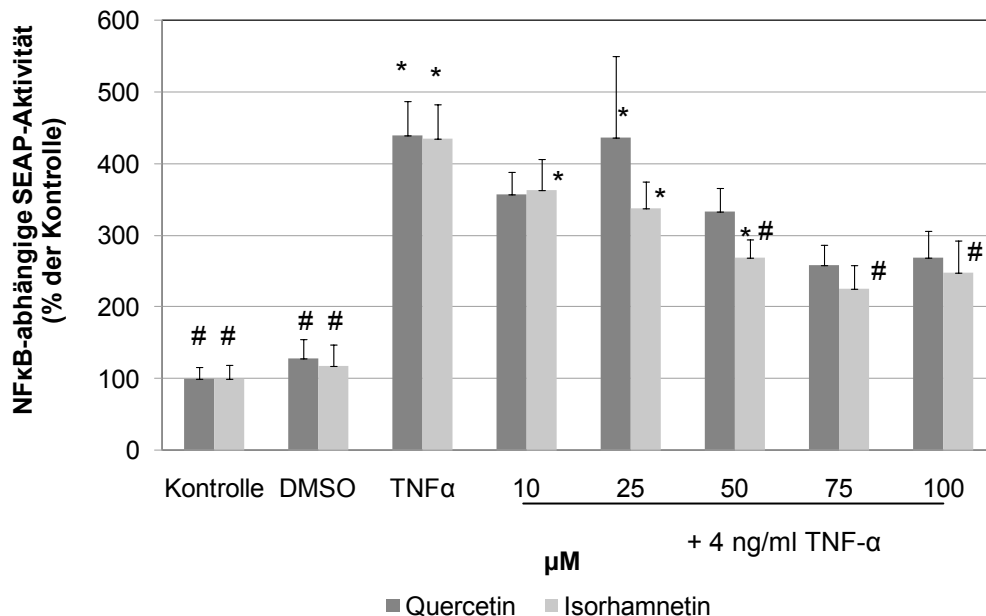
**Abbildung 42: Konzentrations- und zeitabhängige Veränderung der Zellmorphologie bei der Inkubation mit 50 µM Quercetin bzw. 50 µM Isorhamnetin in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit 50 µM des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^5$  HepG2 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen. Nach den angegebenen Zeiträumen wurde die Morphologie der Zellen mit der Farbkamera dokumentiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.4 Effekte von Quercetin und Isorhamnetin auf NFκB

Nach den beobachteten Effekten der Verbindungen auf die Extrazellulär-signal Regulierte Kinase wurde mit dem Transkriptionsfaktor NFκB ~~ähnliches~~ Element eines proliferativen Signalweges untersucht. Neben proliferativen Stimuli vermittelt dieser Transkriptionsfaktor nach der Freisetzung von seinem Inhibitor durch entsprechende Signale (z.B. Bindung von TNFα an den TNF-Rezeptor) inflammatorische Reaktionen von Zellen. Da Flavonoide bei entzündlichen Prozessen protektiv wirken sollen, wurde der Einfluß der Flavonoide auf die basale bzw. auf die induzierte NFκB-Aktivität untersucht. Die Effekte der Flavonoide auf den aktivierten NFκB-Signalweg, wurden durch eine Vorinkubation der Zellen für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen an Flavonoid und anschließender TNF-α Koinkubation untersucht. Quercetin und Isorhamnetin reduzieren die durch TNF-α induzierte SEAP-Aktivität im Medium der Zellen deutlich (Abb.: 43). Beide inhibieren die Aktivität des Transkriptionsfaktors um ca. 50 %. Dieser Effekt war nur für Isorhamnetin signifikant. Die basale Aktivität der sekretierten alkalischen Phosphatase blieb bei Quercetin unverändert, während Isorhamnetin die Aktivität tendenziell aber nicht signifikant erniedrigte (Daten siehe

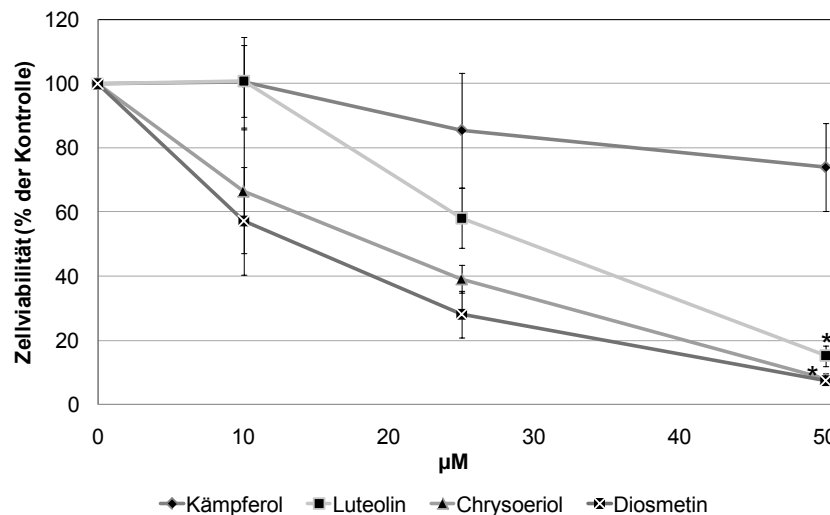
Anhang). Die ermittelten Lumineszenzen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Viabilität der Zellen normiert.



**Abbildung 43: Einfluß von Quercetin und Isorhamnetin auf die NFκB-abhängige SEAP-Aktivität.**  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well wurden vor der einstündigen Vorinkubation mit Flavonoiden in 24-Well Platten für 24 h anwachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 4 ng/ml rattenrekombinantem TNF-α für 24 h. Überstände der behandelten Zellen wurden nach jeweiliger Inkubation zentrifugiert, der Überstand 1:4 mit Verdünnungspuffer verdünnt und endogene Phosphatasen für 30 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. 30 μl der hitzeinaktivierten Überstände wurden in weiße 96-Well Platten überführt, 5 min mit 30 μl Assaypuffer inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 30 μl Substratlösung gestartet. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz in % der Kontrolle +/- SEM (n=4 bei 10 μM, 75 μM und 100 μM, n=8 bei Kontrolle, DMSO, TNF-α, 25 μM und 50 μM; \*: p<0,05 vs. DMSO, #: p<0,05 vs. TNF-α).

#### 4.4.5 Zytotoxizität der Luteolinderivate in Hct116 Zellen

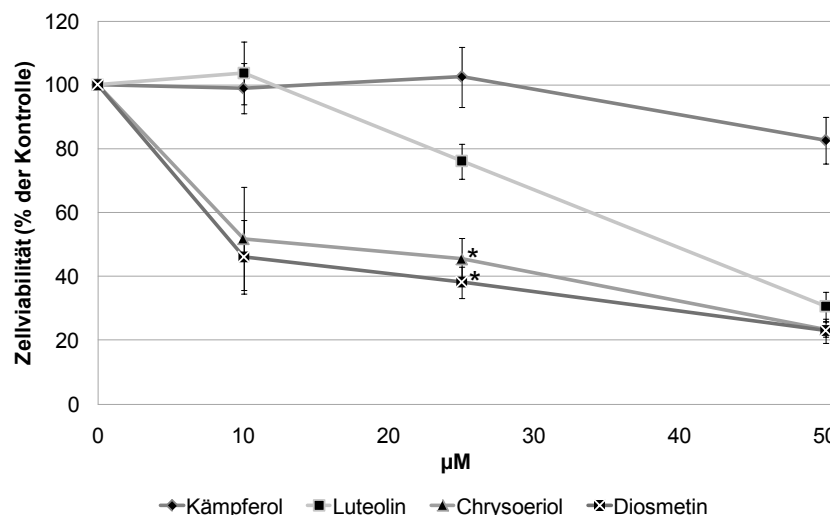
Aufgrund der erhöhten Zytotoxizität der Methylderivate des Quercetins in HepG 2 Zellen und Hct116 Zellen, wurden zusätzlich die Effekte der Methylderivate des Luteolins auf die Viabilität der Hct116 Zellen untersucht. Die Zytotoxizität der Luteolinderivate nach einer Inkubationszeit von 48 h auf Hct116 Zellen ist in Abbildung 44 dargestellt. Das Kämpferol ist als Bezugspunkt dargestellt um die Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen zu erleichtern, da Luteolin in den vorherigen Versuchen bei 48 h eine hohe Zytotoxizität aufwies. Aufgrund der hohen Zytotoxizität des Luteolin und den großen Abweichungen zwischen den einzelnen Experimenten sind die hier detektierten Unterschiede nicht signifikant. Im Niedrigdosisbereich in dem Luteolin noch keine Zytotoxizität ausübt zeigen die Methylderivate des Luteolins tendenziell eine gesteigerte Zytotoxizität.



**Abbildung 44: 48 h Zytotoxizität von Luteolin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle +/- SEM (n=6, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Um die Unterschiede im zytotoxischen Potential der Verbindungen besser darstellen zu können, ist in Abbildung 45 zusätzlich die 24 h Toxizität dargestellt. Auch nach kürzeren Inkubationszeiten weist Luteolin eine vergleichsweise hohe Zytotoxizität auf ( $IC_{50}$  ca. 35 µM). Die Methylderivaten übertreffen die Zytotoxizität der Muttersubstanz mit  $IC_{50}$ -Werten von 10 µM bis 15 µM auch im 24 h Ansatz. Aufgrund der hohen Standardabweichungen sind aber auch diese Unterschiede nicht signifikant. Kämpferol weist wie in den Vorversuchen nur eine geringe Zytotoxizität auf.



**Abbildung 45: 24 h Zytotoxizität von Luteolin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

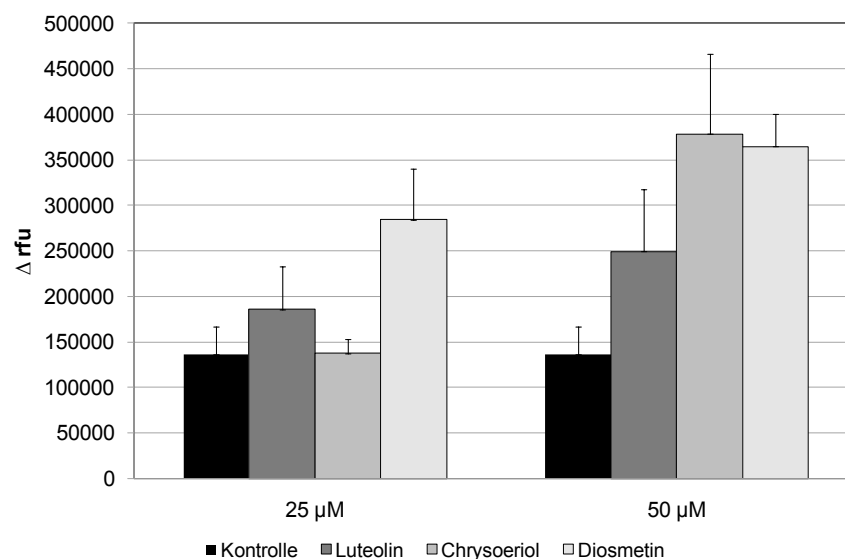
Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 24 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle +/- SEM (n=6, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

#### 4.4.6 Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes in Hct116 Zellen

Nachdem in den HepG2 Zellen deutliche Unterschiede zwischen Quercetin und Isorhamnetin in der Vermittlung des Zelltodes dargestellt werden konnten sollte mit diesem Ansatz überprüft werden, ob es sich bei der erhöhten Toxizität der im B-Ring methylierten Derivate um einen generellen Mechanismus handelt oder ob die Beobachtungen zelllinienspezifisch sind.

##### 4.4.6.1 Apoptosenachweis in Hct116 Zellen

Bei einer Inkubation von 24 h mit 50  $\mu\text{M}$  Luteolin bzw. seinen Methylderivaten konnte ein tendenzieller Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität im Lysat der Zellen nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen sind nicht signifikant, geben aber als Gesamtheit ein ähnliches Bild wie die Behandlung der HepG2 Zellen mit Quercetin und seinen Derivaten wieder. Im Unterschied zu den für die HepG2 Zellen beobachteten Ergebnisse scheinen beide Derivate ein höheres Potential zur Aktivierung der Caspase-3/7 zu besitzen.

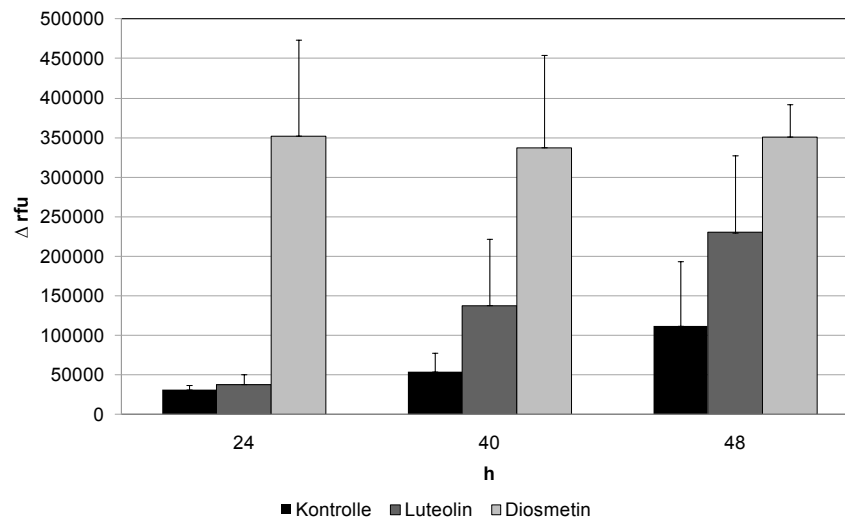


**Abbildung 46: Konzentrationsabhängige Caspase-3/7-Aktivität in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 24 h. Die Aktivität der Caspase-3/7 wurde als Fluoreszenzanstieg (Ex: 485 nm, Em: 535 nm) im Plattenlesegerät mit Hilfe des ApoONE-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz nach 195 min  $\pm$  SEM (n=4, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber der Kontrolle).

Die zeitabhängige Caspase-3/7-Aktivität wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen bei Chrysoeriol nur für Luteolin und Diosmetin ausgewertet, da Chrysoeriol bei längeren Inkubationszeiten im 96-Wellformat häufig ausfiel. Die Inkubation der Hct116 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Substanz führte bei Luteolin tendenziell zu einer Caspase-3/7-Aktivität welche über den gesamten Zeitraum anstieg (Abb.: 47). Die Inkubation mit Diosmetin führte innerhalb von 24 h zu einer starken Caspase-3/7-Aktivität welche auf konstant hohem Niveau stagnierte. Des Weiteren wurde ein Unterschied in der basalen Caspase-3/7-Aktivität

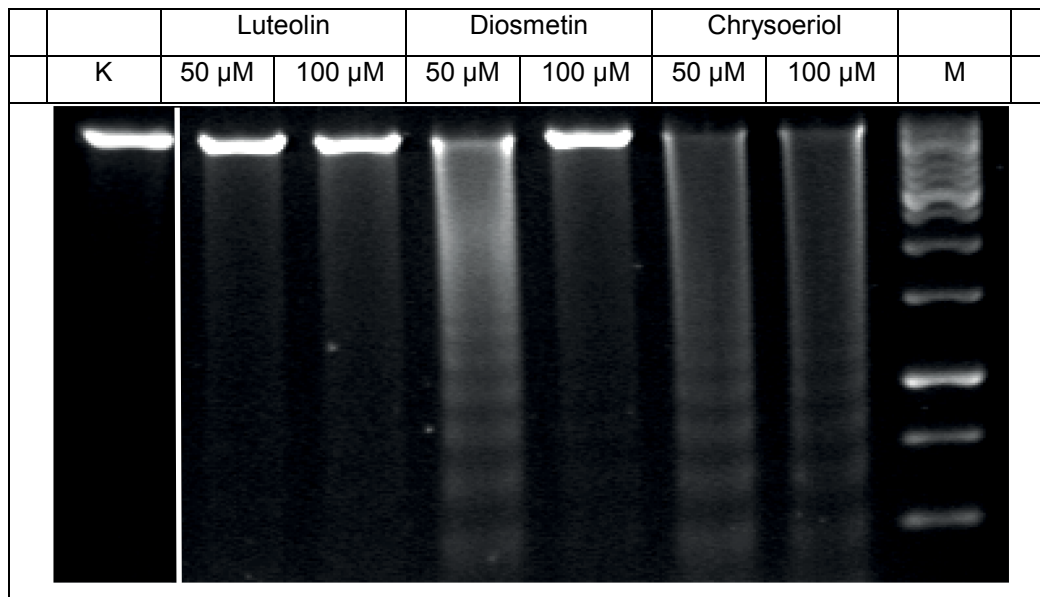
zwischen den Inkubationsmethoden detektiert. Die Zellen der Abbildung 46 sind 24 h nach der Aussaat für 24 h inkubiert worden, während die Zellen in Abbildung 47 nach 24 h nach der Aussaat für 48 h inkubiert und der 24 h Wert dementsprechend erst nach einer Ruhephase von 48 h inkubiert wurde.



**Abbildung 47: Zeitabhängige Caspase-3/7-Aktivität in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für die angegebenen Zeiträume. Die Aktivität der Caspase-3/7 wurde als Fluoreszenzanstieg (Ex: 485 nm, Em: 535 nm) im Plattenlesegerät mit Hilfe des ApoONE-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz nach 120 min  $\pm$  SEM (n=3, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber der Kontrolle).

Aufgrund der nicht signifikanten Anstiege wurde die Induktion der Apoptose in den Hct116 Zellen zusätzlich mit dem Kernfragmenations-Assay nachgewiesen. In Abbildung 48 ist ein repräsentatives Bild der im elektrischen Feld aufgetrennten DNA wiedergegeben. Während die Zellen nach einer Inkubation für 24 h mit Luteolin keine oligonukleosomale DNA-Fragmentation ausbildeten, konnte bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Diosmetin bzw. Chrysoeriol eine deutliche Kernfragmentation nachgewiesen werden.

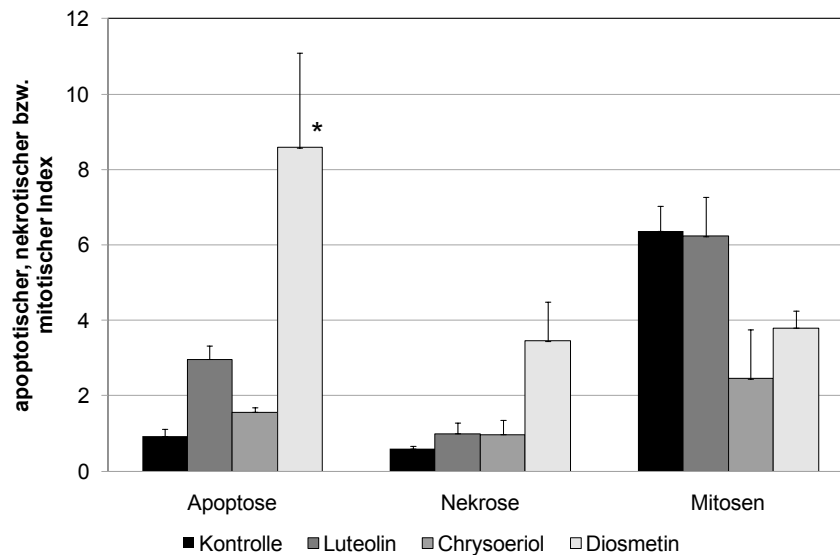


**Abbildung 48: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentation in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 6-Wellplate für 24 h. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA wurden jeweils 5  $\mu$ g der isolierten DNA in einem Agarosegel im elektrischen Feld getrennt und unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage dokumentiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. K = Kontrolle, M = DNA-Größenstandard. Bei dem Bild handelt es sich um das Foto eines Agarosegels. Zusätzliche in diesem Gel aufgetrennte Proben sind ausgeschnitten.

#### 4.4.6.2 Apoptose- und Nekrosenachweis in Hct116 Zellen

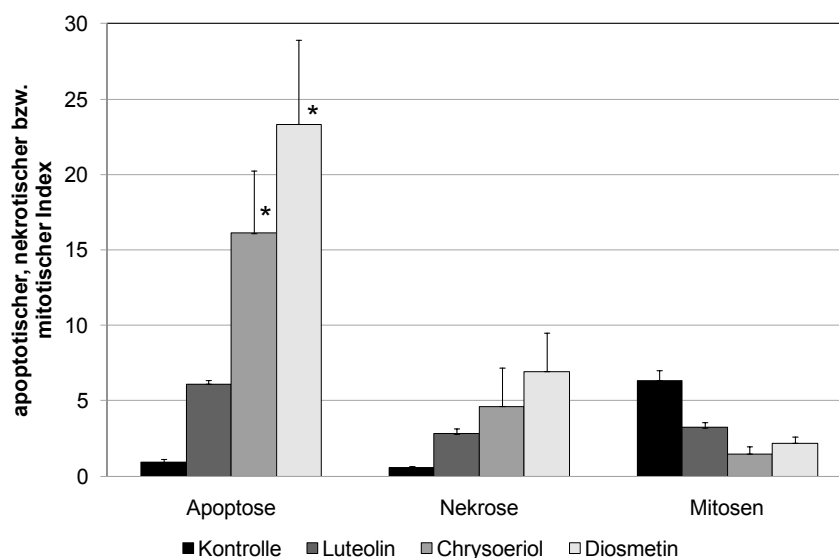
Um die Induktion der Apoptose zu verifizieren und um erste Hinweise auf einen möglichen nekrotischen Zelltod zu erhalten, wurde eine Kofärbung der Zellen mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid durchgeführt. Die Inkubation der Hct116 Zellen mit den verschiedenen Substanzen für 24 h (25  $\mu$ M) führte nur bei Diosmetin zu einer eindeutigen Induktion von apoptotischen Zellen (Abb.: 49). Des Weiteren konnte für die Inkubation mit Diosmetin ein leichter Anstieg der Nekrosen detektiert werden. Diese Effekte waren begleitet von einer Reduktion an mitotischen Zellen. Bei einer Inkubation mit 25  $\mu$ M Chrysoeriol konnte kein Anstieg an apoptotischen oder nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Mitoserate der Zellen wurde von Chrysoeriol reduziert.



**Abbildung 49: Statistische Auswertung der Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung der Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1,5 \cdot 10^5$  Hct116 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen für 24 h. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Hoechst 33342 und 2  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid wurden die Überstände zentrifugiert und pelletierte Zellen in 10  $\mu\text{l}$  PBS zurück auf die Zellkulturschale gegeben. Die Auswertung erfolgte bei 535  $\text{nm}_{\text{ex}}$  und 620  $\text{nm}_{\text{em}}$  bei Propidiumiodid und bei 365  $\text{nm}_{\text{em}}$  und 420  $\text{nm}_{\text{ex}}$  bei Hoechst33342. Dargestellt ist die Anzahl der entsprechend eingestuften Zellen prozentual zur Gesamtzahl der erfassten Zellen  $\pm$  SEM ( $n=3$ , Luteolin  $n=2$ , \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

Bei einer Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  der Flavonoide für 24 h konnte mit Luteolin und Chrysoeriol ein Anstieg der Apoptoserate detektiert werden (Abb.: 50). Mit ca. 6 % und 16 % liegen beide auch in der höheren Konzentration unter dem apoptotischen Index von Diosmetin mit ca. 23 %. Für alle drei Substanzen wurde eine Reduktion der Mitoserate und eine Induktion der nekrotischen Zellen detektiert. Die Nekroserate der Kontrolle von ca. 1 % wurde durch die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Diosmetin moderat auf 7 % erhöht.



**Abbildung 50: Statistische Auswertung der Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung der Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1,5 \cdot 10^5$  Hct116 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen für 24 h. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Hoechst 33342 und 2  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid wurden die Überstände zentrifugiert und pelletierte Zellen in 10  $\mu\text{l}$  PBS zurück auf die Zellkulturschale gegeben. Die Auswertung erfolgte bei 535  $\text{nm}_{\text{ex}}$  und 620  $\text{nm}_{\text{em}}$  bei Propidiumiodid und bei 365  $\text{nm}_{\text{em}}$  und 420  $\text{nm}_{\text{ex}}$  bei Hoechst 33342. Dargestellt ist die Anzahl der entsprechend eingestuftten Zellen prozentual zur Gesamtzahl der erfassten Zellen  $\pm$  SEM ( $n=3$ , Luteolin  $n=2$ , \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

Nach der Inkubation der Hct116 Zellen mit den Flavonoiden ergab die Färbung mit Propidiumiodid einen leichten Anstieg der nekrotisch gewerteten Zellen. Daher wurde die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität nach einer Inkubation (24 h) mit 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  untersucht. Keine der Substanzen erhöhte die LDH-Aktivität im Überstand der Zellen gegenüber der Kontrolle (Daten siehe Anhang).

#### 4.5 Einfluss von Inhibitoren auf die Aufnahme und die Toxizität von Quercetin

##### 4.5.1 Wirkung von Verapamil auf die Quercetintoxizität

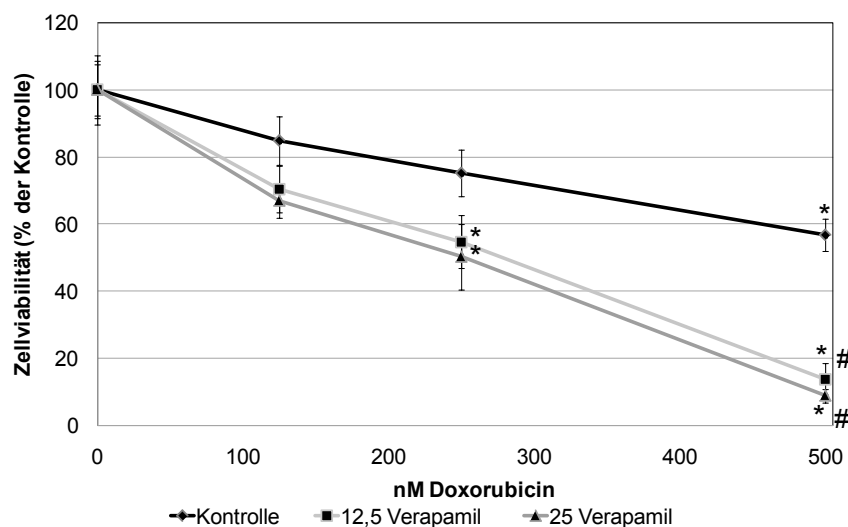
Der Einfluß des para-GlycoProtein-Transporters (pGP-Transporter) auf den Efflux von Quercetin sollte aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf diesen Transporter mit Verapamil untersucht werden. Eine erhöhte Zytotoxizität der Verbindungen in den HepG2 Zellen sollte als Nachweis eines gehemmten Austransports dienen. Die Eigentoxizität des Verapamil war in den HepG2 Zellen vergleichbar mit der des Quercetins (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: 48 h Zytotoxizität von Verapamil in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Verapamil erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM.

| $\mu\text{M}$ Verapamil      | 0   | 12,5         | 25           | 50         |
|------------------------------|-----|--------------|--------------|------------|
| Viabilität (% zur Kontrolle) | 100 | 83 $\pm$ 2,3 | 74 $\pm$ 3,5 | 62 $\pm$ 8 |

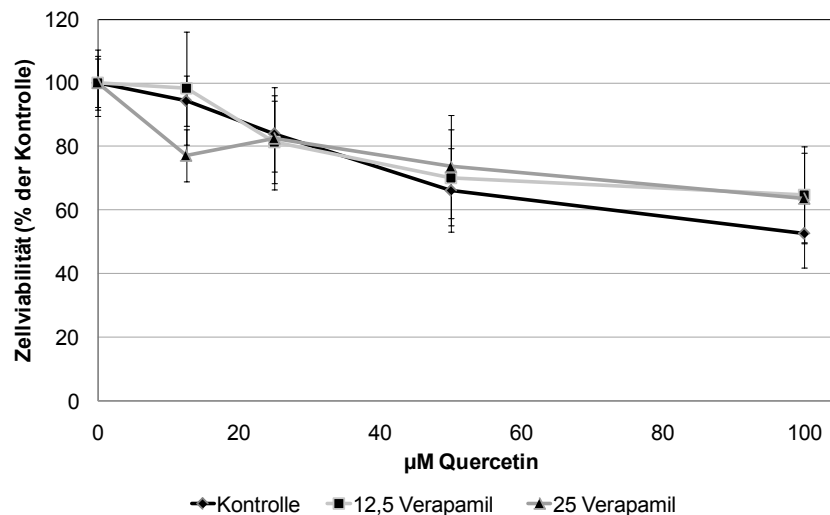
Die Funktionalität der Methode wurde zuvor mit dem Anthracyclinderivat Doxorubicin überprüft. Doxorubicin ist ein Zytostatikum welches aufgrund seiner guten Eignung als pGP - Substrat verwendet wurde um die Methode zu verifizieren. Tatsächlich konnte durch die Koinkubation mit Verapamil die Toxizität des Doxorubicins erhöht werden. Die Toxizität des Doxorubicins lag bei der 48 h Inkubation im hohen nanomolaren Konzentrationsbereich (Abb.: 51). Der  $IC_{50}$  wurde bis zu einer Konzentration von 500 nM nicht erreicht. Die Koinkubation mit 12,5  $\mu$ M bzw. 25  $\mu$ M Verapamil erhöhte die Toxizität des Doxorubicins deutlich. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte betrugen 300 nM und 250 nM für die entsprechenden Verapamilkonzentrationen.



**Abbildung 51: 48 h Zytotoxizität der Koinkubation von Verapamil und Doxorubicin in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an Doxorubicin und Verapamil erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der jeweiligen Kontrolle  $\pm$  SEM (n=3, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, #:  $p < 0,05$  vs. 500 nM Doxorubicin).

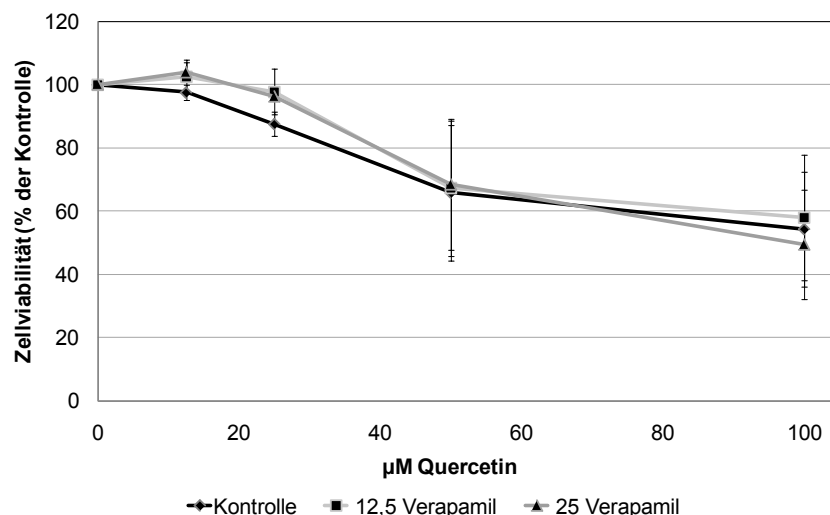
Die Koinkubation von Quercetin mit 12,5  $\mu$ M bzw. 25  $\mu$ M Verapamil führte zu keiner Veränderung im zytotoxischen Potential des Flavonols (Abb.: 52). Die Viabilität der HepG2 Zellen lag unverändert und wie schon in vorherigen Experimenten gezeigt bei einer Inkubation mit 100  $\mu$ M Quercetin bei ca. 60 % zur Kontrolle.



**Abbildung 52: 48 h Zytotoxizität der Koinkubation von Verapamil und Quercetin in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an Quercetin und Verapamil erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der jeweiligen Kontrolle  $\pm$  SEM (n=3, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber der Kontrolle).

Neben Verapamil wurden weitere Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Quercetintoxizität untersucht. Neben einem weiteren pGP-Inhibitor MK571 wurde auch der MonoCarboxylatTransporter (MCT)- Inhibitor DIDS verwendet. Es konnten keine Effekte der Inhibitoren auf die Quercetintoxizität in den HepG2 Zellen ermittelt werden (siehe Anhang). Die Ergebnisse der Koinkubation mit Verapamil wurden in Hct116 Zellen wiederholt, um einen zellspezifischen Effekt ausschließen zu können. Die Ergebnisse der 48 h Inkubation sind in Abbildung 53 dargestellt. Verapamil hatte in beiden Konzentrationen keinen Effekt auf die Zytotoxizität. Bei einer Konzentration von 100 µM erreichen sie annähernd eine halbmaximale Reduktion der Viabilität. Dieser Wert liegt für Quercetin etwas über der in vorherigen Experimenten ermittelten Zytotoxizität.



**Abbildung 53: 48 h Zytotoxizität der Koinkubation von Verapamil und Quercetin in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an Quercetin und Verapamil erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der jeweiligen Kontrolle  $\pm$  SEM (n=4, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber der Kontrolle).

#### 4.5.1 Wirkung von Verapamil und weiteren Inhibitoren auf die Quercetinaufnahme

Nachdem der indirekte Nachweis keinen Effekt von Verapamil auf die Zytotoxizität des Quercetins ergab, wurde die intrazellulär detektierbare Quercetinmenge bei einer Koinkubation mit Verapamil untersucht. Aufgrund der kürzeren Inkubationsdauer im Vergleich zum MTT-Assay konnte die eingesetzte Konzentration an Verapamil erhöht werden. Der Vergleich der Peakflächen lieferte keine Unterschiede zwischen der Inkubation der HepG2 Zellen mit Quercetin und der Koinkubation der Zellen mit Quercetin und Verapamil (Tab.: 15). Die Zellen der Koinkubation wurden 30 Minuten vor der Zugabe des Quercetins mit Verapamil vorbehandelt um die Aufnahme des Verapamils und dessen Interaktion mit dem Transporter zu ermöglichen.

**Tabelle 15: Vergleich der Peakflächen von Quercetin bei Koinkubation mit Verapamil in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Quercetin (50 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Bei der Koinkubation wurde 30 Minuten vor der Quercetininkubation der Inhibitor (0,5 mM) zu den Zellen gegeben. Der Quercetiningehalt wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die AUC des Quercetins bzw. dessen Metaboliten, n.d. = nicht in der HPLC detektiert (n=1).

|               | + 0,5 mM Verapamil | Metabolit | - 0,5 mM Verapamil | Metabolit |
|---------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
|               | AUC                | AUC       | AUC                | AUC       |
| 0 h Quercetin | 0,14               | n.d.      | 0,4                | n.d.      |
| ¼ h Quercetin | 7,0                | n.d.      | 7,5                | n.d.      |
| 1 h Quercetin | 6,7                | 0,8       | 7,9                | 0,4       |
| 6 h Quercetin | 4,3                | 1,1       | 5,4                | 1,6       |

Nachdem auch der direkte Nachweis der intrazellulären Menge an Quercetin keinen Effekt des Verapamils auf die Aufnahme bzw. den Efflux des Quercetins zeigte, wurde mit DIDS ein Inhibitor des MonoCarboxylatTransporters verwendet. Auch dieser pharmakologische Inhibitor veränderte unter nicht toxischen Bedingungen die intrazellulär detektierte Quercetinmenge nicht (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Vergleich der Peakflächen von Quercetin bei Koinkubation mit DIDS in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Quercetin (50  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Bei der Koinkubation wurde 30 Minuten vor der Quercetininkubation der Inhibitor (0,05 mM) zu den Zellen gegeben. Der Quercetiningehalt wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die AUC des Quercetins bzw. dessen Metaboliten +/- SEM (n=3), n.d. = nicht in der HPLC detektiert.

|                 | + 0,05 mM DIDS | Metabolit   | - 0,05 mM DIDS | Metabolit   |
|-----------------|----------------|-------------|----------------|-------------|
|                 | AUC            | AUC         | AUC            | AUC         |
| 5 min Quercetin | 3,6 +/- 0,5    | n.d.        | 3,6 +/- 0,6    | n.d.        |
| ¼ h Quercetin   | 6,4 +/- 0,4    | 0,3 +/- 0,3 | 7,3 +/- 0,3    | 0,3 +/- 0,3 |
| 1 h Quercetin   | 6,8 +/- 0,6    | 0,6 +/- 0,3 | 6,8 +/- 1,6    | 0,5 +/- 0,2 |

Um durch die Zelllinie bedingte Unterschiede ausschließen zu können wurde der Versuchsansatz in Hct116 Zellen wiederholt. Die intrazelluläre Menge an Quercetin konnte auch in den Hct116 Zellen durch die Koinkubation nicht erhöht werden (Tabelle 17). Die Ergebnisse harmonisieren mit den zuvor erhobenen, so dass dieser Versuch nicht wiederholt wurde. Um zu bestimmen ob die Aufnahme bzw. der Efflux des Quercetins in den Hct116 Zellen aktiv verläuft wurde zusätzlich die Aufnahme bei 4 °C untersucht (Tabelle 17). Dabei konnte kein Einfluss der Temperatur auf die Aufnahme von Quercetin nachgewiesen werden.

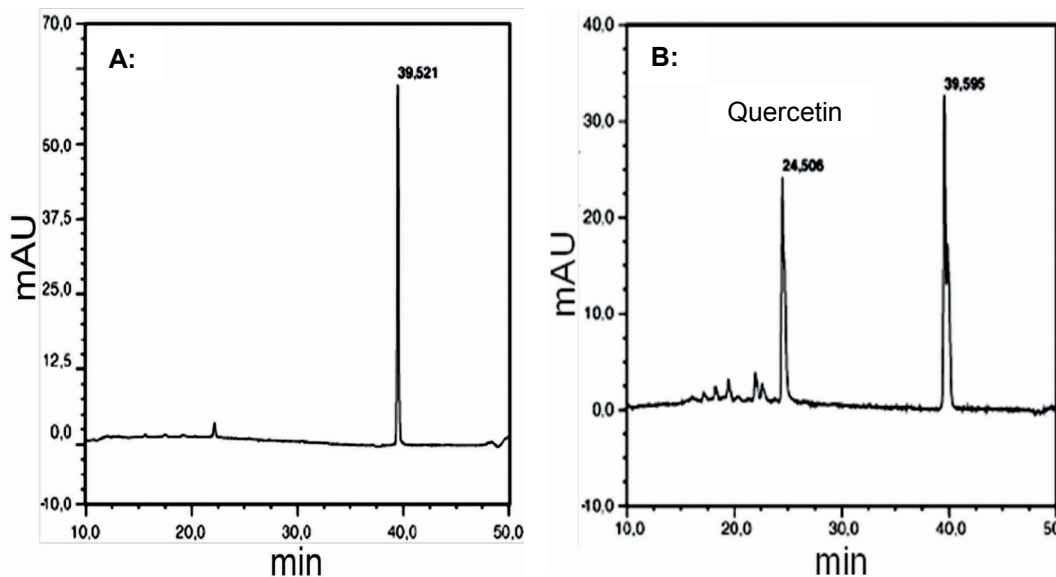
**Tabelle 17: intrazelluläre Peakflächen des Quercetins unter verschiedenen Bedingungen in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit Quercetin (50  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Bei der Koinkubation wurde 30 Minuten vor der Quercetininkubation der Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Bei der 4 °C Inkubation wurden die Zellen vor der Quercetininkubation für 15 min bei 4 °C äquilibriert. Der Quercetiningehalt wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die AUC des Quercetins (n=1), n.d. = nicht in der HPLC detektiert.

|                              | AUC  |      |      |
|------------------------------|------|------|------|
|                              | 0 h  | ¼ h  | 1 h  |
| Quercetin                    | n.d. | 7,49 | 8,44 |
| Quercetin + 0,1 mM Verapamil | 0,34 | 7,05 | 6,01 |
| Quercetin + 1 mM Verapamil   | n.d. | 6,97 | 6,36 |
| Quercetin bei 4 °C           | 0,29 | 7,61 | 7,63 |

#### 4.6 Aufnahme von Quercetin in *C. elegans*

Nachdem die Aufnahme von Quercetin in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden konnte wurde die Aufnahme des Flavonols in den Nematoden *C. elegans* untersucht. In der Abbildung 54 ist ein exemplarisches Chromatogramm des methanolischen Extrakts der behandelten Fadenwürmer (B) und ein Chromatogramm des methanolischen Extrakts der Kontrollfadenwürmer (A) abgebildet. Die Identität des Peaks in der Probe B als Quercetin wurde durch den Vergleich der Retentionszeit (24,5 min) mit der eines Standards sowie durch den Abgleich des erhaltenen Absorptionsspektrums mit dem einer internen UV-Spektren-Datenbank überprüft. Die Begleitsubstanz mit einer Retentionszeit von 39 min tritt in beiden Proben auf. Es handelt sich somit sehr wahrscheinlich nicht um ein Quercetinderivat. Die Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 17 min und 23 min konnten nicht in der Kontrollprobe nachgewiesen werden. Die Identität dieser Verbindungen ließ sich aufgrund der geringen Mengen weder durch massenspektrometrischen Methoden noch über den UV-Spektrenabgleich überprüfen.

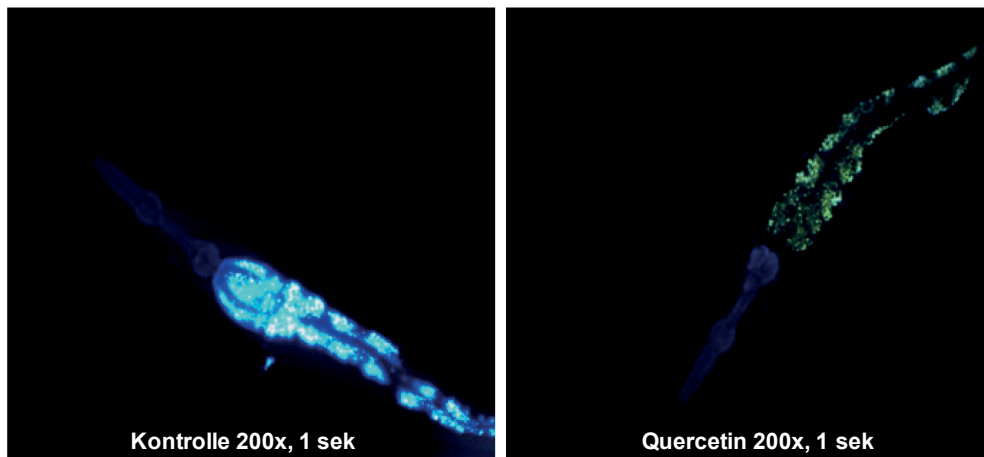


**Abbildung 54: HPLC-Chromatogramme der methanolischen Extrakte der Kontrolle bzw. der Quercetin-Behandlung von *C. elegans*.**

Die Inkubation der Nematoden erfolgte 4 – 6 Tage nach der Synchronisation in flüssigem NG-Medium für 20 h mit 100  $\mu$ M Quercetin bzw. DMSO. Nach Separierung der Nematoden wurden diese gewaschen und anschließend das Quercetin extrahiert. Dargestellt ist ein beispielhaftes Chromatogramm der Extrakte der **A** mit DMSO behandelten und **B** der mit Quercetin inkubierten Fadenwürmer.

Die Akkumulation und intrazelluläre Lokalisation des Flavonoids wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. In Abbildung 55 ist das Bild eines unbehandelten und eines mit Quercetin behandelten Nematoden dargestellt. In der Kontrolle wurde die Fluoreszenz des Alterspigmentes Lipofuszin in den Darmzellen des Tieres aufgenommen.

Unter äquivalenten Bedingungen detektiert man bei einer Quercetinbehandlung (20 h) einen Shift dieser Lichtemission von blau nach grün.



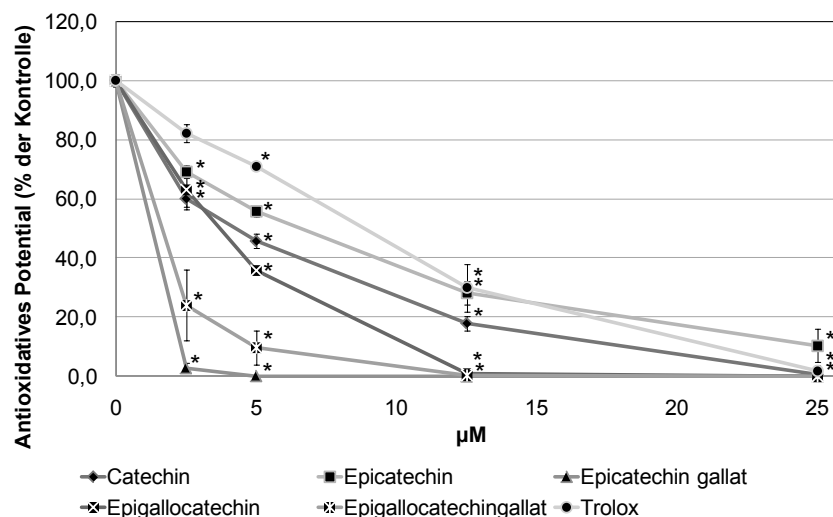
**Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von *C. elegans* nach DMSO- bzw. Quercetin-Behandlung.**

Die Inkubation der Nematoden erfolgte 4 – 6 Tage nach der Synchronisation in flüssigem NG-Medium für 20 h mit 100  $\mu\text{M}$  Quercetin bzw. DMSO. Die Nematoden wurden wiederholt gewaschen, auf Objektträger überführt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt ist der Fluoreszenzshift vom Lipofuszin nach einer Quercetinbehandlung bei 365 nm<sub>em</sub> und 420 nm<sub>ex</sub>.

## 4.7 Untersuchung zur Wirkung von Catechinen

### 4.7.1 Antioxidatives Potential der Catechine

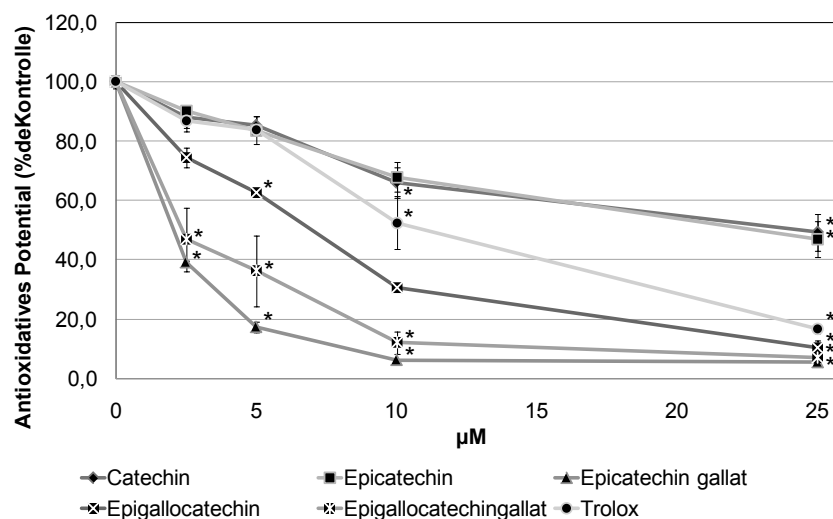
Neben dem antioxidative Potential einiger Flavonole und Flavonen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch das antioxidative Potential ausgesuchter Catechinderivate im DPPH- und TEAC-Assay untersucht. Die fünf untersuchten Catechinderivate zeigen im TEAC-Assay ein höheres antioxidatives Potential als die Positivkontrolle Trolox. Das Epicatechingallat sowie das Epigallocatechingallat reduzieren bei einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  die Absorption so stark das für diese Verbindungen keine halbmaximale Effektivkonzentration ermittelt werden konnte (Abb.: 56). Das Catechin, das Epicatechin sowie das Epigallocatechin besitzen ein vergleichbares antioxidatives Potential. Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 4  $\mu\text{M}$ , 7  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 56: Antioxidatives Potential ausgewählter Catechine im TEAC-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen ABTS-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0% antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

Im DPPH-Assay wurden  $EC_{50}$ -Werte von jeweils ca. 2,5  $\mu$ M der aktivsten Verbindungen Epicatechingallat und Epigallocatechingallat ermittelt. Diese entsprach der ersten verwendeten Konzentration, so dass dieser wie für den TEAC-Assay nur eine grobe Abschätzung liefert. Alle anderen Verbindungen zeigen eine deutlich schwächere Fähigkeit das DPPH-Radikal zu reduzieren. Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte liegen bei ca. 7,5  $\mu$ M für Epigallocatechin, 10  $\mu$ M für Trolox und ca. 25  $\mu$ M für das Catechin und das Epicatechin.

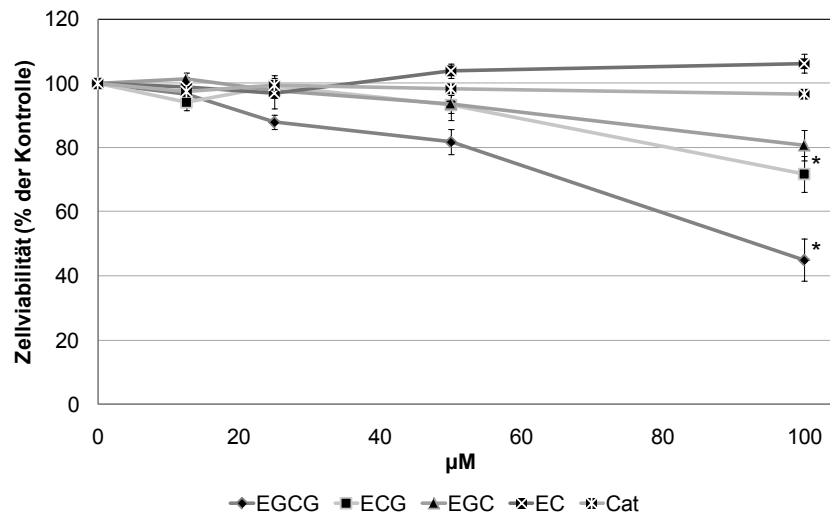


**Abbildung 57: Antioxidatives Potential ausgewählter Catechine im DPPH-Assay.**

Die Absorptionsabnahme der ethanolischen DPPH-Lösung wurde 3 Minuten nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionen in % zur Kontrolle  $\pm$  SEM. ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Die Absorption der Kontrolle wurde als 0% antioxidative Kapazität definiert. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin-E Derivat Trolox verwendet.

#### 4.7.2 Zytotoxizität der Catechine in HepG2- und Hct116 Zellen

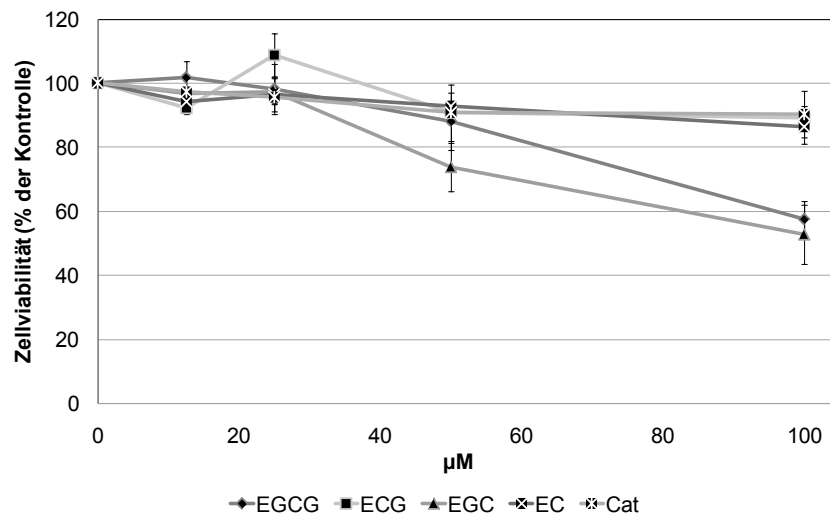
Neben dem antioxidativen wurde auch das zytotoxische Potential der Catechinderivate bestimmt. Dabei konnte nur für Epigallocatechingallat eine moderate Zytotoxizität in den HepG2 Zellen (48 h) erhoben werden. Die restlichen Verbindungen reduzierten bei einer 48 h Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Derivates die Viabilität um maximal 30 % (Abb.: 58).



**Abbildung 58: 48 h Zytotoxizität der Catechinderivate in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM (n=3, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant). EGCG = Epigallocatechingallat, ECG = Epicatechingallat, EGC = Epigallocatechin, EC = Epicatechin, Cat = Catechin.

In der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 weisen die Catechinderivate ebenfalls keine prominente Toxizität auf. Epigallocatechingallat und Epigallocatechin reduzierten die Viabilität der Hct116 Zellen bei einer 48 h Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  der Verbindung um ca. 50 %. Die weiteren untersuchten Verbindungen weisen unter den gegebenen Bedingungen keine Toxizität in dieser Zelllinie auf (Abb.: 59).



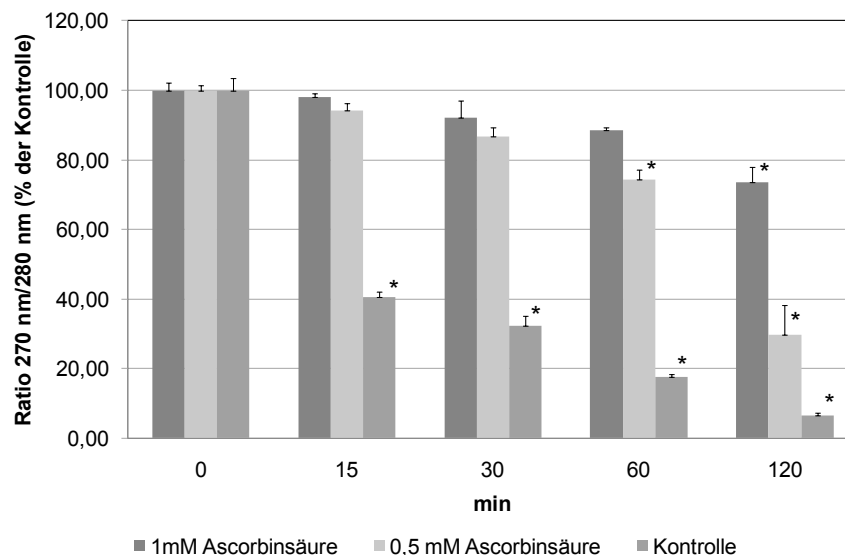
**Abbildung 59: 48 h Zytotoxizität der Catechinderivate in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit den Flavonoiden erfolgte 24 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Hct116 Zellen in einem 96 Wellplate für 48 h. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Absorption bei 540 nm) bestimmt. Dargestellt ist die Zellviabilität in % der Kontrolle  $\pm$  SEM (n=3, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant). EGCG = Epigallocatechingallat, ECG = Epicatechingallat, EGC = Epigallocatechin, EC = Epicatechin, Cat = Catechin.

#### 4.8 Aufnahme und Metabolismus von Epigallocatechingallat und Epicatechingallat

##### 4.8.1 Stabilisierung von Epigallocatechingallat in Dulbeccos Modified Eagle Medium

Aufgrund der Vorversuche mit Quercetin wurde das Epigallocatechingallat direkt mit verschiedenen Konzentrationen Ascorbinsäure im DMEM stabilisiert. In Abbildung 60 ist die Differenz der Absorption am Maximum des EGCGs mit der basalen Absorption (360 nm) als Prozent zum ersten Messwert (Null Minuten) dargestellt. Aufgrund der verwendeten Methode konnten Initiale Verluste beim Homogenisieren des EGCGs im Medium nicht erfasst werden. Die Zersetzung des Catechins erfolgt in nicht behandeltem DMEM sehr schnell. Innerhalb der ersten 15 Minuten fällt die Menge an Epigallocatechingallat auf ca. 40 % der ursprünglichen Menge ab. Die weitere Degradation verläuft etwas langsamer, so dass die detektierte Menge nach 2 h noch bei ca. 10 % liegt. Die Zugabe von 0,5 bzw. 1 mM Ascorbinsäure verringert den für DMEM ermittelten schnellen Abbau der Verbindung im Medium. Die gefundenen Absorptionen lagen nach 15 Minuten annähernd auf dem Ausgangsniveau. Erst mit längeren Inkubationszeiten erfolgt auch bei der Koinkubation mit Ascorbinsäure eine Degradation der Verbindung. Die Wiederfindungsrate erreicht bei der Koinkubation mit 0,5 mM Ascorbinsäure nach 2 h noch 30 %. Bei einer Koinkubation mit 1mM Ascorbisäure beträgt sie noch 75 %. Die Aufnahmeversuche wurden daher mit dieser Konzentration durchgeführt.

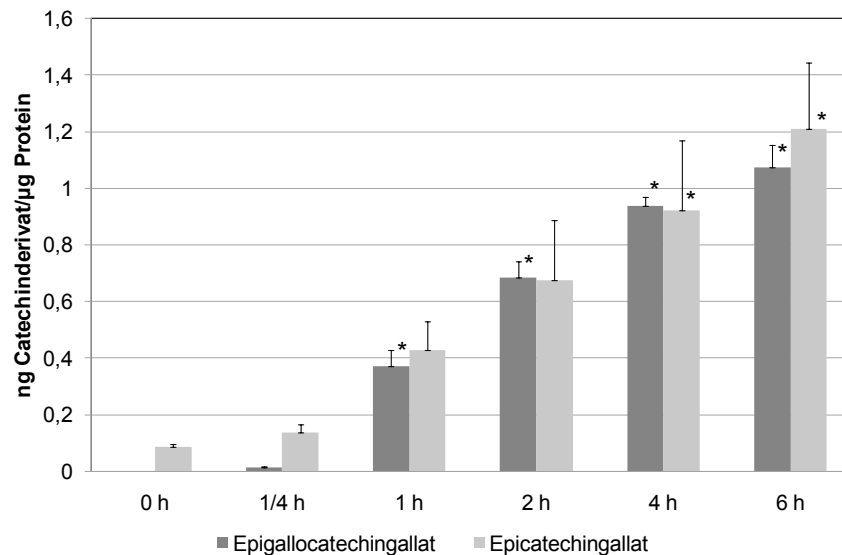


**Abbildung 60: Stabilität von Epigallocatechingallat in DMEM.**

Das DME-Medium wurde entsprechend der Beschriftung mit Ascorbinsäure versetzt. Nach der Zugabe von 50  $\mu$ M Epigallocatechingallat wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten Aliquots abgenommen, mit Ethylacetat extrahiert und der Gehalt an EGCG im Ethylacetat photometrisch bestimmt (Differenz der Absorption am Absorptionsmaximum (272 nm) und der Absorption bei 340 nm). Dargestellt ist das Absorptionsverhältnis in Prozent von  $t=0$   $\pm$  SEM ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. 0 h).

#### 4.8.2 Aufnahme von Catechinderivaten in verschiedene Zelllinien

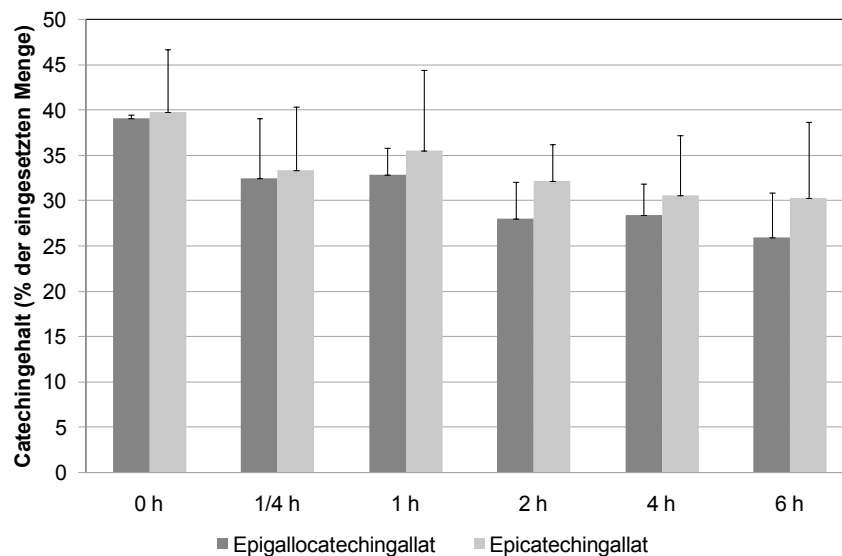
Die Aufnahmeversuche der Catechinderivate Epigallocatechingallat und Epicatechingallat wurden mit Hct116 Zellen durchgeführt. Für das Epigallocatechingallat konnte an der DAD-HPLC bei der verwendeten Eichreihe das Detektionslimit nicht exakt bestimmt werden. Bei der niedrigsten Konzentration (71,5 ng/ml) wurde ein Signal zu Rauschverhältnis von 5:1 ermittelt. Aufgrund des linearen Verlaufes der Eichreihe liegt das konservativ geschätzte Detektionslimit bei ca. 40 ng/ml entsprechend 87 nM EGCG. Aufgrund des Auftretens von Doppelpeaks im Falle des Epicatechingallates in der Eichgeraden sowie im Medium bzw. dem Zellextrakt wurde zur Bestimmung der Mengen jeweils die Fläche des Doppelpeaks integriert. Das Detektionslimit lag in der UV-HPLC mit ca. 1800 ng/ml vergleichsweise hoch. Aufgrund eines auch in der Kontrolle auftretenden Peaks mit einer ähnlichen Retentionszeit wurde im Falle des Epicatechingallates die ermittelte Peakfläche der Kontrolle von der Peakfläche der Inkubation subtrahiert. Wie die Abbildung 61 verdeutlicht folgt die Aufnahme der Catechingallate in dieser Zelllinie einer Zeitabhängigkeit. Beide Verbindungen wurden in gleichem Ausmaß in die Zellen aufgenommen. Nach sechs Stunden lag die aufgenommene Menge bei 1,2 ng/ $\mu$ g Protein. Die Aufnahme der Catechingallate verlief entsprechend einer Sättigungskinetik und flachte nach längeren Inkubationszeiten ab. Die Trendlinien vom logarithmischen Regressionstyp ergeben für EGCG ein Bestimmtheitsmaß von 0,989 und für ECG von 0,954.



**Abbildung 61: Intrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen.**

Die Inkubation mit dem jeweiligen Catechingallatderivat (200 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3, \*p<0,05 vs. 0 h).

Extrazellulär konnten von beiden Verbindungen trotz der Koinkubation mit 1 mM Ascorbinsäure zu Beginn der Aufnahme nur 40 % der eingesetzten Menge detektiert werden. Diese Werte fallen über den Inkubationszeitraum moderat auf 25 % bis 30 % ab (Abb.: 62).

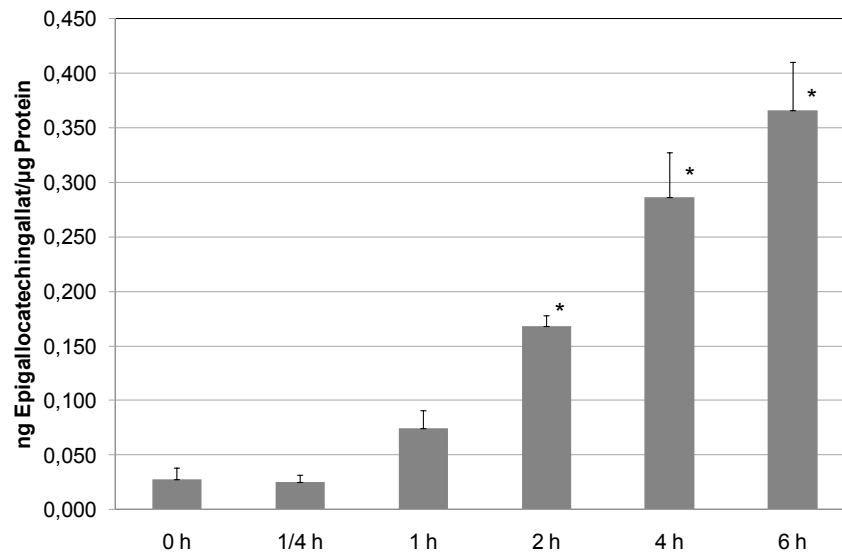


**Abbildung 62: Extrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen**

Die Inkubation mit den Catechinderivaten (200 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Flavonidgehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3, Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant gegenüber dem 0 h Wert) in Prozent der zugegebenen Menge des jeweiligen Flavonoids.

Die Aufnahmestudien mit Epigallocatechingallat wurden zusätzlich in HepG2 Zellen durchgeführt. Auch in dieser Zelllinie erfolgte eine zeitabhängige Aufnahme des EGCGs

(Abb.:63). In den HepG2 Zellen konnte nur 1/3 der in den Hct116 Zellen intrazellulär detektierten Menge nachgewiesen werden.



**Abbildung 63: Intrazelluläre Menge an EGCG in HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Epigallocatechingallat (200 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3, \*p<0,05 vs. 0 h)

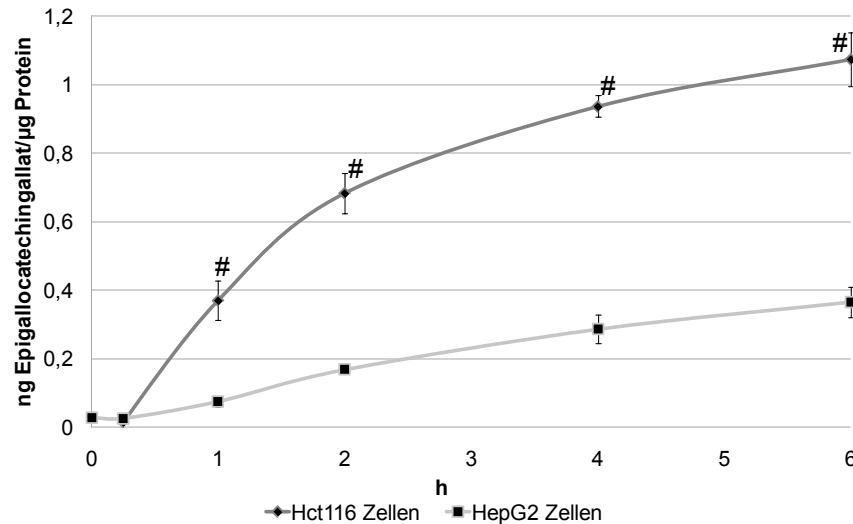
Die extrazellulären Mengen des Epigallocatechingallates sind in Tabelle 18 wiedergegeben. Die extrazelluläre Menge an Epigallocatechinderivat bleibt über den untersuchten Zeitraum bei ca. 50 % bis 55 % der zugesetzten Menge.

**Tabelle 18: Extrazellulär detektiertes EGCG der HepG2-Inkubationen.**

Die Inkubation mit Epigallocatechingallat (200 µM) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Der Flavonoidgehalt der Überstände wurde mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent der zugegebenen Menge des jeweiligen Flavonoids (n=3 bei 0 h und 1 h; n=2 bei 1/4 h und 4 h). Bei der Aufarbeitung des 2 h und des 6 h Wert ist jeweils ein Teil der Probe verloren gegangen. Die Werte sind daher nicht dargestellt worden. (Daten siehe Anhang).

| Zeit [h] | 0         | 1/4       | 1        | 4        |
|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| %        | 55 +/- 13 | 56 +/- 17 | 51 +/- 8 | 53 +/- 8 |

Um die Aufnahmecharakteristik zwischen den beiden Zelllinien besser vergleichen zu können sind die intrazellulären Epigallocatechingallat-Mengen in Abbildung 64 als XY-Diagramm dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß vom logarithmischen Regressionstyp der zeitabhängigen Catechinaufnahme lag in den Hct116 Zellen bei 0,99. Bei den HepG2 Zellen lag es für den logarithmischen Typ bei 0,90 und für den linearen Regressionstyp bei 0,98. Die XY-Graphik verdeutlicht zusätzlich die unterschiedlichen intrazelluläre Akkumulation in den beiden Zelllinien.



**Abbildung 64: XY-Diagramm der Epigallocatechingallataufnahme in Hct116- und HepG2 Zellen.**

Die Inkubation mit Epigallocatechingallat (200  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $2 \cdot 10^6$  HepG2 bzw.  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für die angegebenen Zeitpunkte. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3, #:  $p < 0,05$  vs. HepG2).

#### 4.8.3 Aufnahme von Epigallocatechingallat bei 4°C in Hct116 Zellen

Die Aufnahme in die Hct116 Zellen unterlag einer Sättigungskinetik, daher wurde eine aktive Aufnahme des EGCGs durch die Inkubation der Zellen für 4 h bei 4 °C unterbunden. Als Kontrolle dienten hierbei Zellen welche in einem Inkubator ohne erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert wurden. Die Ergebnisse in Tabelle 19 geben die intrazellulär detektierten Mengen an Epigallocatechingallat in ng/μg Protein wieder.

**Tabelle 19: Intrazelluläre Mengen an EGCG nach 4 h Inkubationen bei 4°C und 37°C ohne HCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>-Puffer.**

Die Inkubation mit Epigallocatechingallat (200  $\mu$ M) erfolgte 72 h nach der Aussaat von  $1 \cdot 10^6$  Hct116 Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale für 4 h. Die Zellen der 4 °C Inkubation wurden 15 Minuten vor der Inkubation auf 4 °C herunter gekühlt. Nach einem Waschschrift wurde der intrazelluläre Flavonoidgehalt mittels HPLC bestimmt und auf den Proteingehalt der Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3, Peakflächen sind signifikant Unterschiedlich).

| Inkubation | ng EGCG/μg Protein |
|------------|--------------------|
| 4 h 4 °C   | 0,04 $\pm$ 0,04    |
| 4 h 37 °C  | 0,412 $\pm$ 0,057  |

Die Inkubation der Zellen bei 4 °C bewirkte eine verlangsamte Aufnahme des Catechingallates, so dass nach einer 4 h Inkubation intrazellulär kein Epigallocatechingallat detektiert werden konnte. Die Inkubation bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Puffer liefert detektierbare Mengen an Epigallocatechingallat. Diese liegen mit 0,4 ng/μg Protein bei ca. 50 % der Aufnahme unter Standardbedingungen.

#### 4.9 Aufnahme und Verteilung von EGCG im Rattenmodell

Extrakte des grünen Tees werden häufig als Nahrungsergänzungsmittel bzw. Lebensmittelzusatz verwendet. Der Hauptbestandteil dieser Extrakte ist das Epigallocatechingallat. Um die *in vitro* Ergebnisse mit der Situation *in vivo* vergleichen zu können wurde die Aufnahme des EGCGs im Rattenmodell unter chronischer Exposition untersucht. Die Proben wurden um anlagebedingte Unterschiede zu vermeiden alle in der HPLC-Anlage mit Dioden-Array-Detektor vermessen. Das Detektionslimit lag bei 87 nM Epigallocatechingallat entsprechend 40 ng/ml (Geradengleichung:  $y = 0,0219x - 0,0557$ ;  $R^2 = 0,9988$ ; siehe 4.8.2, Rohdaten im Anhang).

Im methanolischen Extrakt des Futterpellets (3 g) konnte kein Epigallocatechinderivat detektiert werden.

##### 4.9.1 Gewichte der Tiere und Organe, Allgemeine Beobachtungen

Es wurden randomisiert drei trächtige Tiere in die Kontrollgruppe und fünf Tiere in die Behandlungsgruppe eingeteilt. Von den fünf behandelten Tieren war eines nicht trächtig. Die Gewichtszunahme der Tiere ist im Anhang dargestellt. In Tabelle 20 ist das durchschnittliche Gewicht der Neugeborenen zusammengefasst. Alle Kontrolltiere sowie die Tiere E3 und E5 der Behandlungsgruppe konnten über den gesamten Zeitraum behandelt werden. Das Tier E1 ist am Tag nach der ersten Exposition tot aufgefunden worden. Die Autopsie des Tieres erbrachte den Befund einer kollabierten Lunge. Das Tier E2 wurde am Tag nach der intraperitonealen BrdU-Gabe ebenfalls tot aufgefunden. Die Biopsie erbrachte starke innere Blutungen im Bereich des Uterus. Das Tier E3 sollte zur Beruhigung des Tieres vor der letzten Verabreichung von EGCG mit CO<sub>2</sub> betäubt werden. Aufgrund einer Überexposition verstarb es ca. 5 min nach der Gabe des Epigallocatechingallates. Das Tier E4 war nicht trächtig und wies eine langsame Gewichtszunahme und später Gewichtsverlust (ab Tag 13) auf. Dieser Gewichtsverlust setzte sich im Laufe der Behandlung fort, so dass das Tier das Abbruchkriterium erreichte und mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert wurde. Das Tier wurde eine Stunde vor dem Einschlafen mit 1000 mg EGCG/kg KG behandelt. Neben dem Gewichtsverlust zeigte sich das Tier mit struppigem Fell, verklebten Augen und Störungen der Motorik. Die Autopsie erbrachte stark geschwollenes Lymphgewebe im Halsbereich. Die Gewichtsentwicklung der Tiere ist im Anhang dargestellt.

Die Tiere welche den Behandlungszeitraum überlebten warfen zwischen 11 und 14 Neugeborene. Die Neugeborenen 12 und 13 der Behandlung E5 waren Totgeburten von denen das Neugeborene 13 eine deutlich retardiertes Gewicht aufwies. Die Gewichte dieser Tiere wurden bei der Ermittlung des mittleren Gewichtes nicht berücksichtigt. Die ermittelten Gewichte der Neugeborenen waren bei den Kontrolltieren und den Behandlungen vergleichbar.

**Tabelle 20: Mittlere Gewichte der Neugeborenen.**

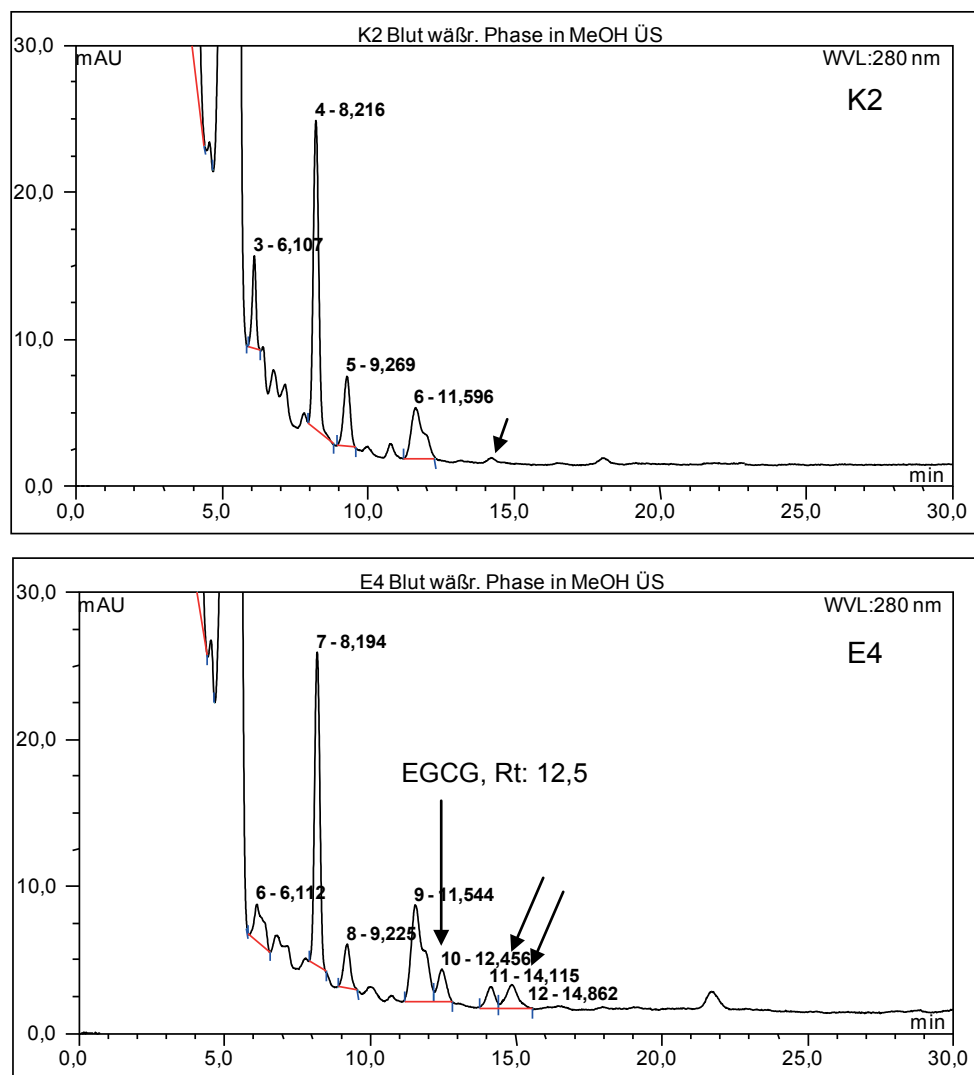
Dargestellt sind die ermittelten mittleren Gewichte der Neugeborenen  $\pm$  SD in Gramm. Die Totgeburten bei der Behandlung E 5 wurden bei der Ermittlung des mittleren Gewichtes nicht erfasst.

|              | K 1            | K 2            | K 3            | E 3            | E 5            |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Männlich [g] | 6,25 $\pm$ 0,5 | 6,72 $\pm$ 0,2 | 7,23 $\pm$ 0,3 | 6,44 $\pm$ 0,4 | 7,22 $\pm$ 0,4 |
| Weiblich [g] | 5,96 $\pm$ 0,3 | 6,46 $\pm$ 0,2 | 6,76 $\pm$ 0,2 | 6,13 $\pm$ 0,4 | 6,93 $\pm$ 0,5 |

Neben den Gewichten der Tiere wurden zusätzlich die Organgewichte erhoben. Diese unterscheiden sich nur geringfügig und sind im Anhang aufgeführt.

#### 4.9.2 Detektion von Epigallocatechingallat im Blut

Den tot aufgefundenen Tieren wurde kein Blut mehr abgenommen. Daher liegen ausschließlich Daten für drei Kontrolltiere sowie für die behandelten Tiere E3, E4 und E5 vor. Injektion der in Methanol resuspendierten Ethylacetat-Phase in das HPLC-System lieferte in keiner Probe detektierbaren Mengen des Catechins. Erst die Injektion des methanolischen Extraktes der gefriergetrockneten wässrigen Phase ergab für das behandelte Tier E4 ein geändertes Chromatogramm. Die Abbildung 65 gibt das Chromatogramm der am höchsten konzentrierten Kontrolle wieder. Das Chromatogramm des mit EGCG behandelten Tieres mit dem Kürzel E4 zeigt drei zusätzliche Peaks mit einer Retentionszeit von 12,5 min, 14,1 min sowie 14,9 min. Der Vergleich der Retentionszeiten sowie der erhaltenen UV-Spektren der Peaks zwischen einem Standard und dem dargestellten Chromatogramm, weist den Peak mit einer Retentionszeit von 12,5 min als Epigallocatechingallat aus. Aufgrund der geringen Mengen konnte die Identität in der massenspektrometrischen Untersuchung nicht verifiziert werden.



**Abbildung 65: Chromatogramme der wässrigen Phase des Blutes der Kontrolle K2 und des behandelten Tieres E4.**

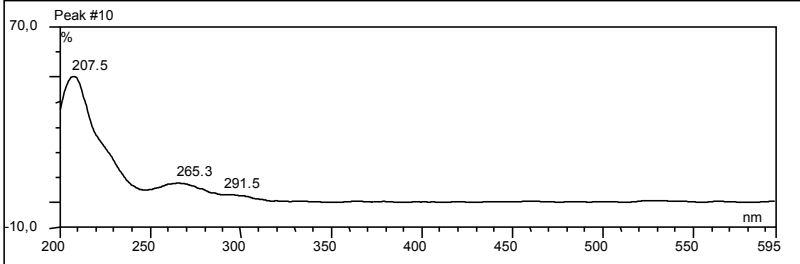
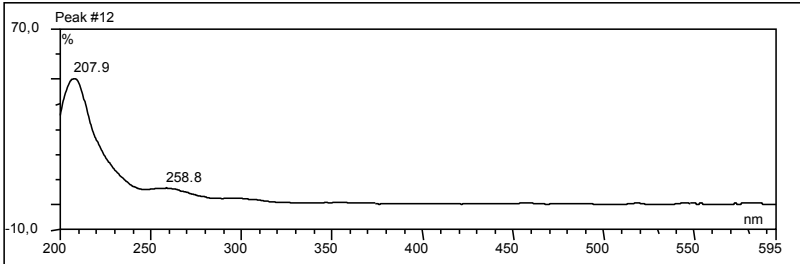
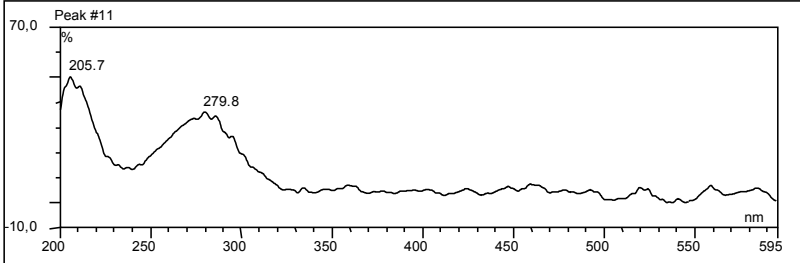
Die wässrige Phase der Extraktion des Blutes mit Ethylacetat wurde gefriergetrocknet, in Methanol aufgenommen und anschließend in die HPLC injiziert. Dargestellt sind die Chromatogramme der am höchsten konzentrierten Kontrolle sowie des behandelten Tieres E4. Die Pfeile weisen auf Besonderheiten der Chromatogramme hin.

Wie für EGCG konnte auch für die beiden weiteren Peaks in der massenspektrometrischen Untersuchung kein Molekulargewicht bestimmt werden. Das Auftreten eines Peaks mit einer Retentionszeit von ca. 14,2 min in der Kontrolle zeigt, dass es sich bei der Verbindung mit ähnlicher Retentionszeit in dem Chromatogramm des behandelten Tieres nicht um ein Derivat des Epigallocatechingallates handeln muss. Der Vergleich des UV-Spektrums mit dem des EGCGs liefert keinen eindeutigen Hinweis. Für den Peak mit der Retentionszeit von 14,9 min ergeben sich aus den UV-Spektren Hinweise, dass es sich bei der Verbindung um ein Catechinderivat handelt. Die UV-Spektren, Retentionszeiten und Flächen unter der Kurve der Peaks sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Aus den Flächen unter der Kurve errechneten sich Epigallocatechingallatmengen von 1,66 µg Epigallocatechingallat/ml Blut, entsprechend 3,6 µM. In den Blutproben der Tiere E3 und E5 konnte kein

Epigallocatechingallat bzw. dessen Metabolit detektiert werden. Die AUC des wahrscheinlichen Metaboliten (Rt: 14,9 min) ergibt mit der für EGCG verwendeten Eichreihe eine Menge von 1,75 µg Metabolit/ml Blut, entsprechend einer Konzentration von 3,8 µM.

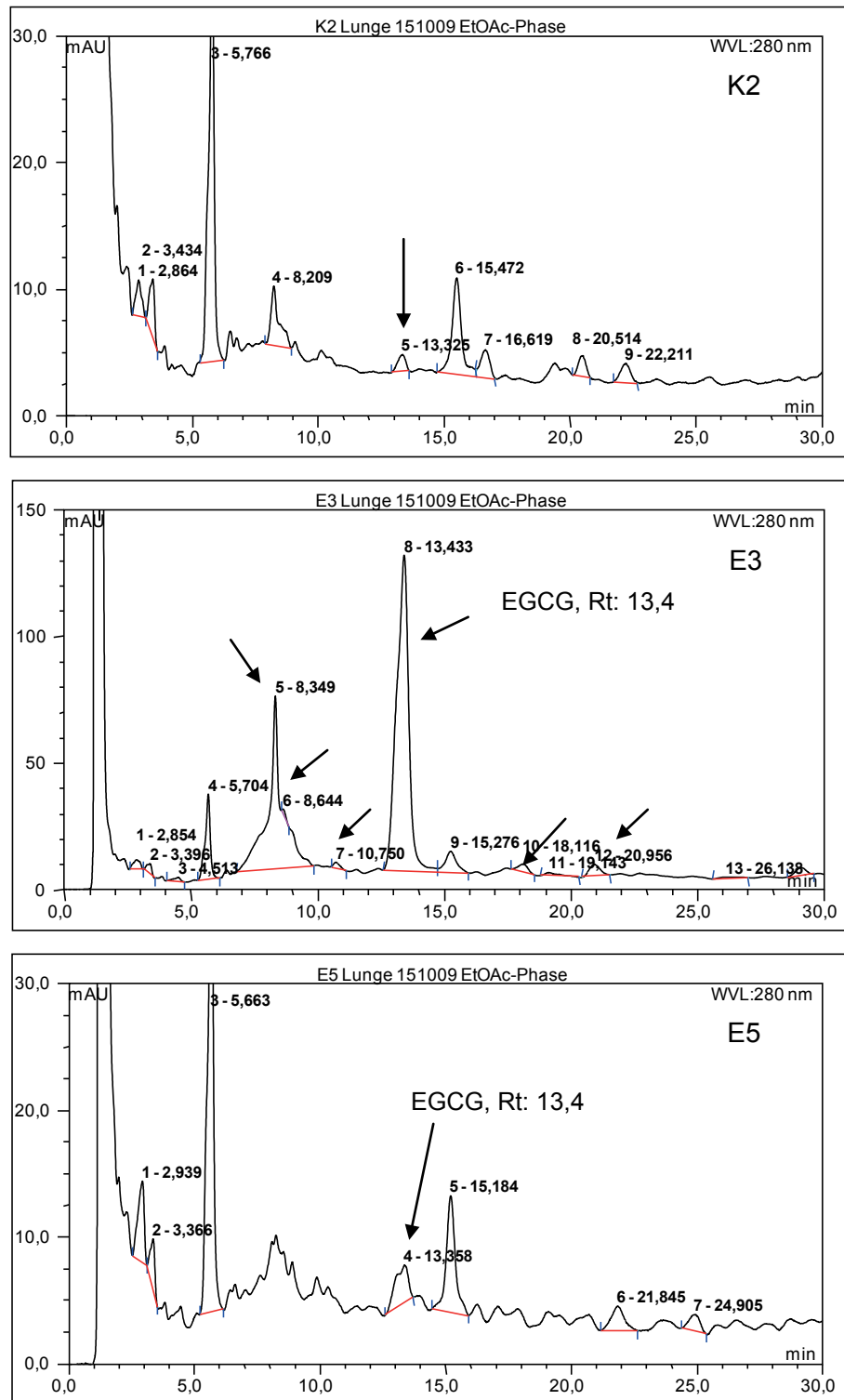
**Tabelle 21: Zusammenfassung relevanter Peak-Daten des Blutextrakte von Tier E4.**

Bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 12,5 min handelt es sich sehr wahrscheinlich um Epigallocatechingallat (siehe Text). Die Substanz mit der Retentionszeit von 14,9 min (Peaknr.12) ist vermutlich ein Metabolit des EGCGs. Die Identität der Verbindung hinter Peak 11 konnte nicht geklärt werden (siehe Text).

| UV-Spektren:                                                                         |  | Peakdaten:               |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------|
|    |  | Peak Nummer: <b>10</b>   |
|                                                                                      |  | <b>EGCG</b>              |
|                                                                                      |  | Retentionszeit: 12,5 min |
|   |  | AUC [mAU*min]: 0,754     |
|                                                                                      |  | Peak Nummer: <b>12</b>   |
|                                                                                      |  | Retentionszeit: 14,9 min |
|  |  | AUC [mAU*min]: 0,794     |
|                                                                                      |  | Peak Nummer: <b>11</b>   |
|                                                                                      |  | Retentionszeit: 14,1 min |
|                                                                                      |  | AUC [mAU*min]: 0,502     |

#### 4.9.3 Detektion von Epigallocatechingallat in der Lunge der Muttertiere

Epigallocatechingallat konnte in den Ethylacetat-Phasen der Lungenhomogenate der behandelten Tiere E2 - E5 allerdings nicht in den Kontrollen K1 – K3 detektiert werden. Zur Verdeutlichung der großen intraspezies Unterschiede in der Epigallocatechinaufnahme werden in der Abbildung 66 die Chromatogramme der Aufarbeitung des Tieres mit der höchsten sowie das Chromatogramm des Tieres mit der niedrigsten Menge an EGCG im Vergleich mit dem Chromatogramm eines Kontrolltieres dargestellt. Zur Auswertung der Menge an Epigallocatechingallat wurde die höchste detektierte AUC des entsprechenden Peaks in der Kontrolle von den Flächen der EGCG-Peaks der behandelten Tiere abgezogen.

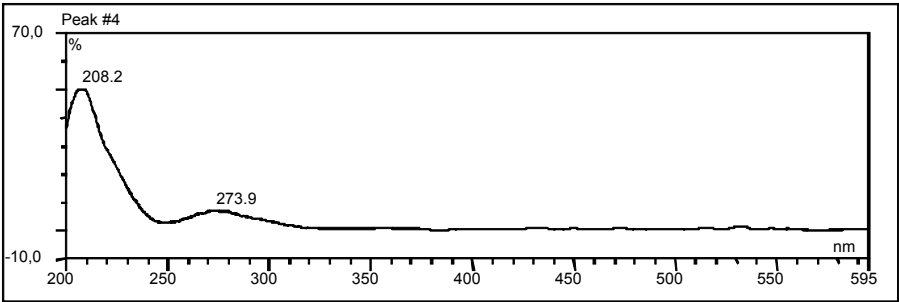
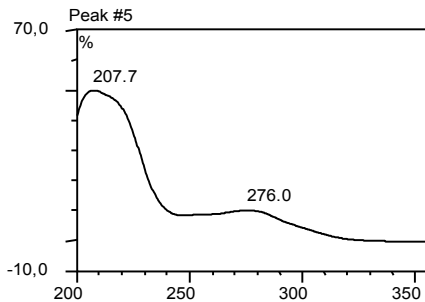
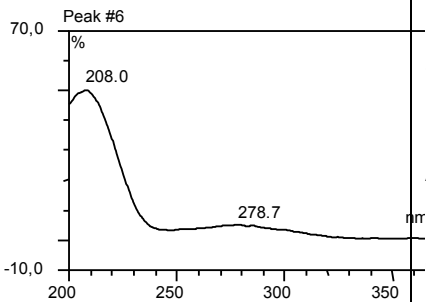
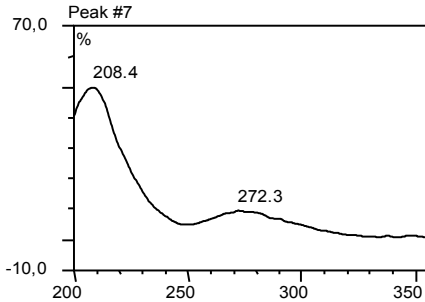
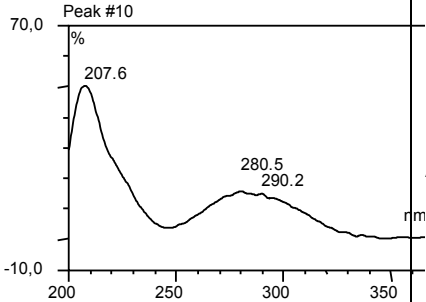


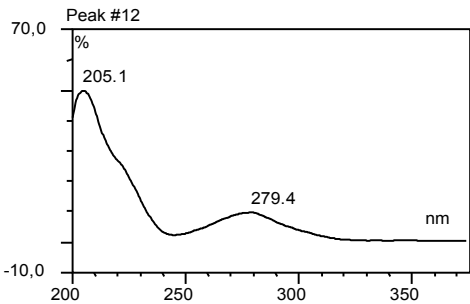
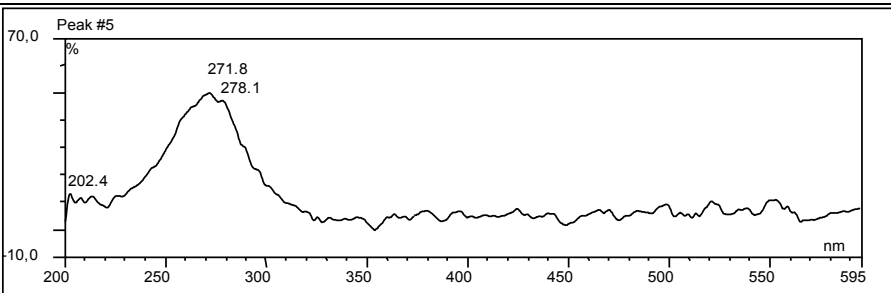
**Abbildung 66: Chromatogramme der Ethylacetat-Phasen der Lungenhomogenate des Kontrolltieres K2 sowie der behandelten Tiere E3 und E5.**

Die methanolischen Lösungen der getrockneten Ethylacetat-Extrakte der Lungen wurden in die HPLC injiziert. Dargestellt sind zwei exemplarische Chromatogramme. Zu beachten ist die unterschiedliche Achsenskalierung des Chromatogrammes vom behandelten Tier E3. Der Shift in der Retentionszeit von 12,5 min auf 13,4 min im Vergleich mit den Blutproben resultiert aus dem Austausch der Pumpeneinheit zwischen den beiden Durchläufen. Dieser Shift war auch bei dem Standard zu detektieren. Die Pfeile weisen auf Besonderheiten der Chromatogramme hin.

Die UV-Spektren der wichtigsten Peaks sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Das UV-Spektrum der Verbindung mit der Retentionszeit von 13,4 Minuten des behandelten Tieres E5 ist nicht aufgeführt, da es mit dem UV-Spektrum der ebenfalls nach 13,4 Minuten eluierenden Verbindung des behandelten Tieres E3 identisch ist. Aufgrund der Retentionszeit und dem UV-Spektrum handelt es sich bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 13,4 Minuten sehr wahrscheinlich um Epigallocatechingallat.

**Tabelle 22: Zusammenfassung relevanter Peak-Daten der Lungenhomogenate von K2 und E3.** Dargestellt sind die UV-Spektren sowie die Retentionszeiten und Peakflächen der Verbindungen. Die Identität der Metabolite konnte nicht geklärt werden (siehe Text).

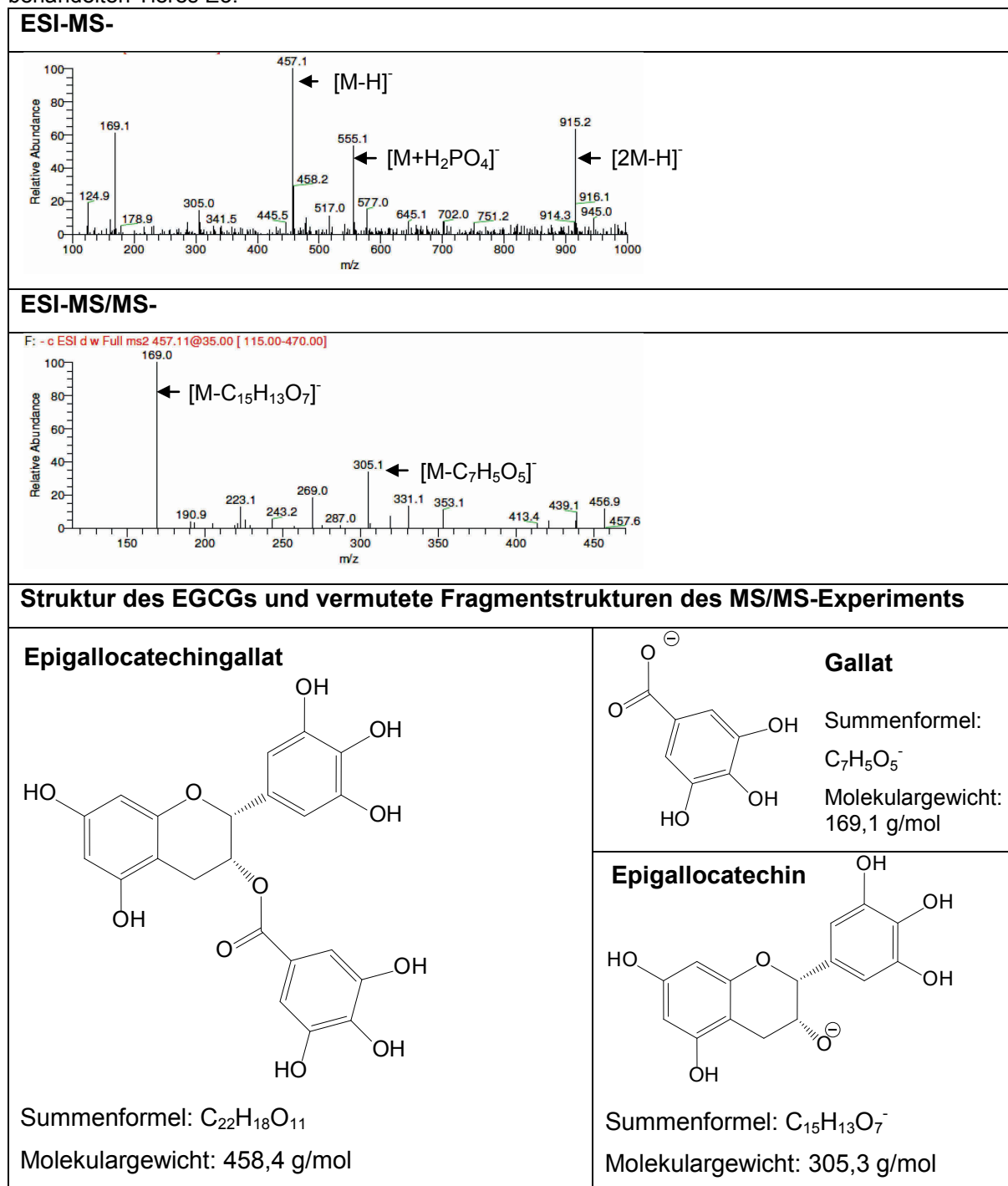
| Lungenhomogenat E3                                                                  |                             |                                                                                      |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| UV-Spektrum                                                                         |                             |                                                                                      | Daten                       |
| <b>EGCG Peak Nummer: 8</b>                                                          |                             |                                                                                      |                             |
|  |                             |                                                                                      | Rt [min]:<br>13,43          |
|                                                                                     |                             |                                                                                      | AUC<br>[mAU*min]:<br>68,98  |
| UV-Spektrum                                                                         | Daten                       | UV-Spektrum                                                                          | Daten                       |
| <b>Peak Nummer: 5</b>                                                               |                             | <b>Peak Nummer: 6</b>                                                                |                             |
|  | Rt [min]:<br>8,35           |  | Rt [min]:<br>8,64           |
|                                                                                     | AUC<br>[mAU*min]:<br>42,22  |                                                                                      | AUC<br>[mAU*min]:<br>10,392 |
| <b>Peak Nummer: 7</b>                                                               |                             | <b>Peaknummer 10</b>                                                                 |                             |
|  | Rt [min]:<br>10,75          |  | Rt [min]:<br>18,12          |
|                                                                                     | AUC<br>[mAU*min]:<br>10,709 |                                                                                      | AUC<br>[mAU*min]:<br>1,39   |

| UV-Spektrum                                                                        | Daten                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Peaknummer 12</b>                                                               |                                                   |
|   | Rt [min]:<br>20,96<br><br>AUC [mAU*min]:<br>2,29  |
| <b>Lungenhomogenat K2</b>                                                          | Peak Nummer: 5                                    |
|  | Rt [min]:<br>13,25<br><br>AUC [mAU*min]:<br>0,511 |

Der Anstieg des Rauschen im Bereich der Retentionszeit von 7 bis 9 Minuten bei der Probe E4, sowie die Tatsache das die dort aufgenommenen UV-Spektren dem des EGCGS ähneln, deutet auf eine Vielzahl verschieden konjugierter Metabolite hin. Da dieses Grundrauschen nicht einem einzelnen Peak zugeordnet werden kann sind für diese AUCs die entsprechenden Mengen an EGCG nicht berechnet worden. Für den Peak mit der Retentionszeit von 13,4 min im Chromatogramm des behandelten Tieres E3 ergab die massenspektrometrische Analyse ein Molekulargewicht von 458 g/mol. Unter Standardbedingungen eluierte der Peak in der LCMS bei 17,2 min. Aufgrund der schlechten Ionisation im positiven Ionisierungsmodus konnten nur die im negativen Modus erhobenen MS/MS-Daten zur weiteren Identifikation beitragen (siehe Tabelle 23). Neben  $[M-H]^- = 457$  und  $[2M-H]^- = 915$  konnte  $[M+H_2PO_4]^- = 555$  detektiert werden. Das MS/MS-Experiment mit  $[M-H]^- = 457$  lieferte die Fragmentierung in  $M/z = 169$  (entspricht  $[M-H]^-$  der Gallussäure) und ein Fragment mit  $M/z = 305$  (entspricht  $[M-H]^-$  des Epigallocatechins). Bei Peak 8 handelt es sich somit mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um Epigallocatechingallat.

**Tabelle 23: MS-Experiment der Verbindung mit Rt: 13,4 Minuten und daraus abgeleitete Strukturen.**

Dargestellt ist das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung sowie des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der Retentionszeit von 13,4 Minuten im Chromatogramm des behandelten Tieres E3.



Die Verbindungen mit einer Retentionszeit von 10,75 min und 20,96 min traten ausschließlich in dem behandelten Tier E3 auf. Der vermutliche Metabolit mit der Retentionszeit von 18,12 min trat zusätzlich in der Behandlung E2 auf. Aufgrund der geringen Mengen lieferte die massenspektrometrische Untersuchung keinen Hinweis auf die genaue Identität dieser Verbindungen. Die aus den detektierten Peakflächen berechneten

Mengen sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Metabolite wurden mit der Geradengleichung der Eichreihe von Epigallocatechingallat berechnet.

**Tabelle 24: Berechnete Menge an Epigallocatechingallat und seinen Metaboliten in den Lungen der behandelten Tiere.**

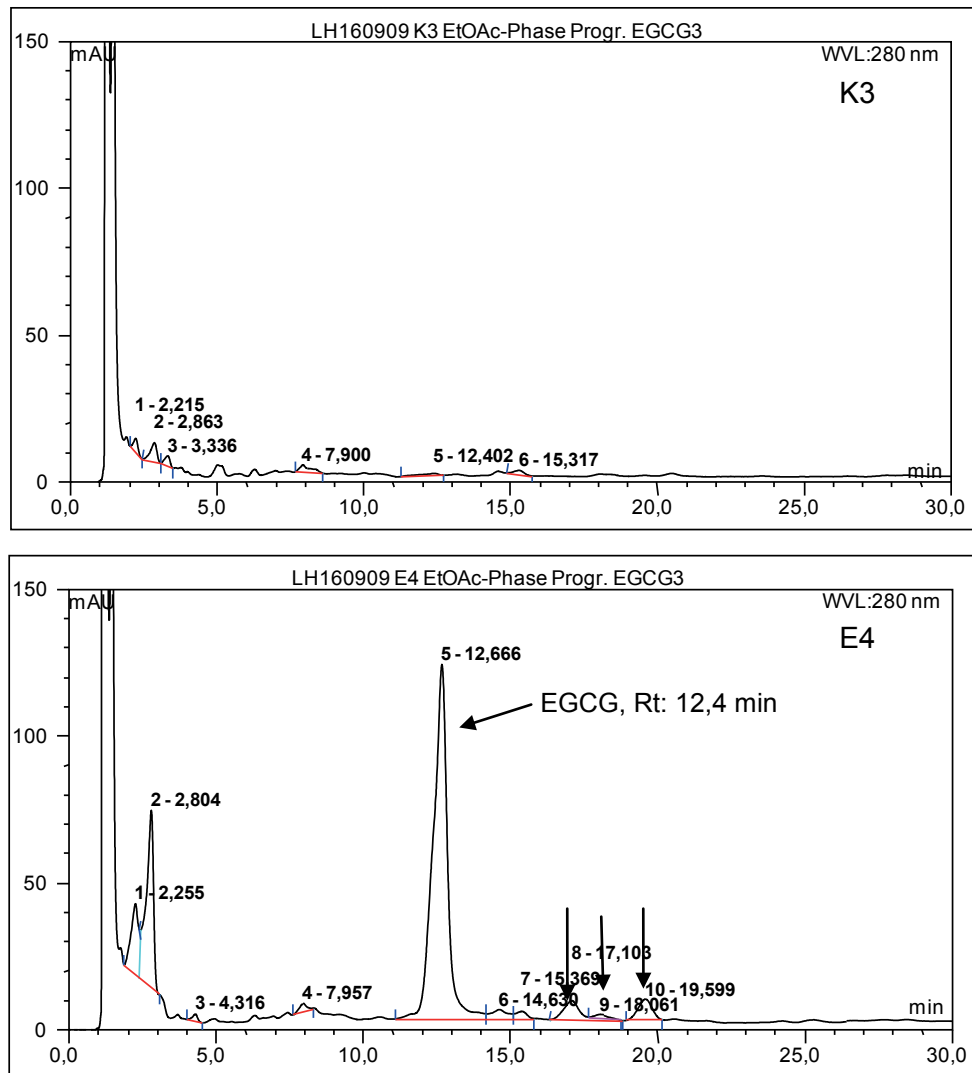
Die Werte wurden mit der Geradengleichung des Epigallocatechingallates berechnet.

| Lunge                  | Rt [min]: | AUC [mAU*min]: | µg EGCG/g Lunge |
|------------------------|-----------|----------------|-----------------|
| Epigallocatechingallat |           |                |                 |
| E2                     | 13,54     | 5,68           | 17,5            |
| E3                     | 13,43     | 68,47          | 208             |
| E4                     | 13,46     | 4,46           | 13,7            |
| E5                     | 13,36     | 1,35           | 4,3             |
| Metabolite             |           |                |                 |
| E2                     | 18,12     | 0,85           | 2,8             |
| E3                     | 10,75     | 0,71           | 4,4             |
| E3                     | 18,12     | 1,39           | 7,1             |
| E3                     | 20,96     | 2,29           | 2,3             |

Wie aus Tabelle 24 ersichtlich wird, sind auch in den Lungen der Tiere hohe Mengen an Epigallocatechingallat zu detektieren. Innerhalb dieses Versuchs ist eine Varianz von Faktor 50 zwischen der höchsten und niedrigsten ermittelten Epigallocatechingallatkonzentration beobachtet worden.

#### 4.9.4 Detektion von Epigallocatechingallat in der Leber der Muttertiere

Die Menge an detektiertem Epigallocatecingallat in der Leber weist zwischen den behandelten Tieren ebenfalls große Unterschiede auf. Wie in der Lunge konnte auch in der Leber jedes behandelten Tieres EGCG nachgewiesen werden. In einer Kontrolle trat ein Peak mit ähnlicher Retentionszeit auf. Das Chromatogramm dieser Kontrolle ist zum Vergleich mit dem Chromatogramm des behandelten Tieres E4 in Abbildung 67 dargestellt. Die Peakfläche des Peaks mit einer Retentionszeit von 12,40 min aus dieser Kontrolle wurde von den Peakflächen der behandelten Tiere vor der Berechnung der Epigallocatechingallatmengen abgezogen.



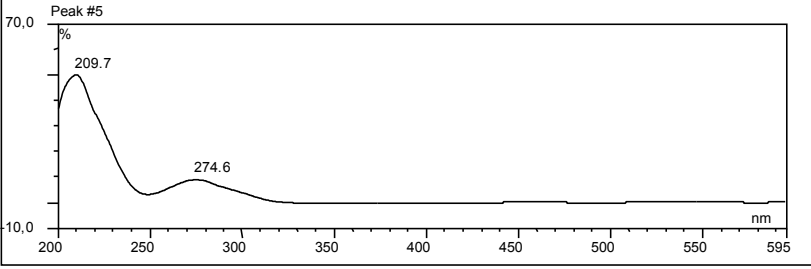
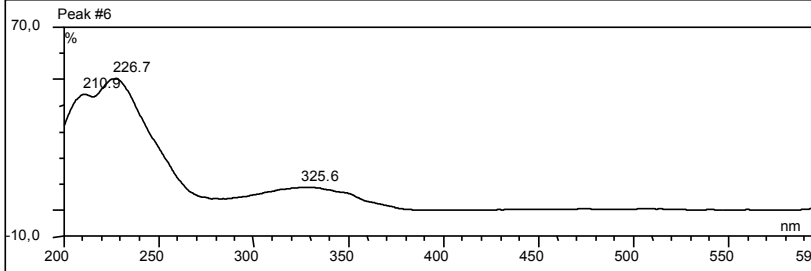
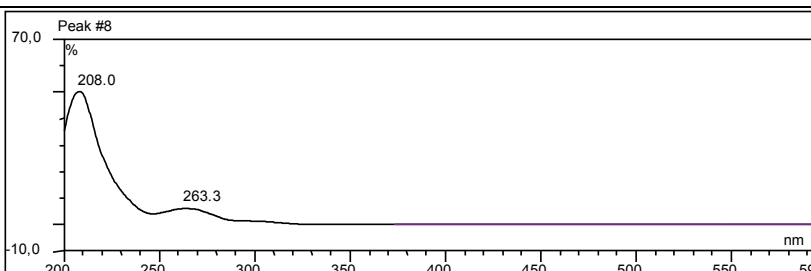
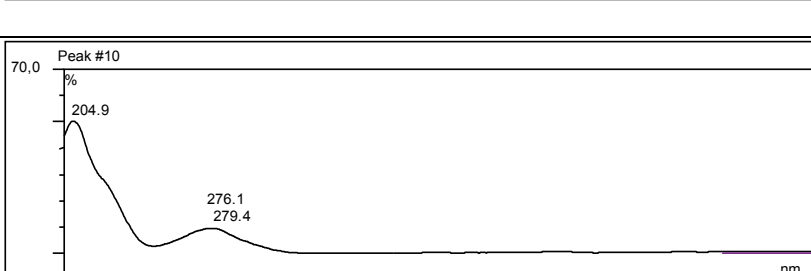
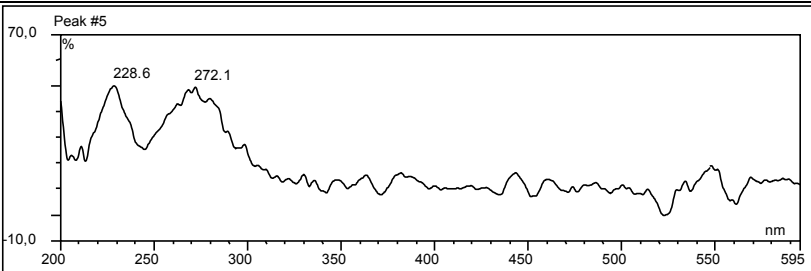
**Abbildung 67: Chromatogramme der Ethylacetat-Phasen der Leberhomogenate des Kontrolltieres K3 und dem behandelten Tier E4.**

Die methanolischen Lösungen der getrockneten Ethylacetat-Extrakte der Leber wurden in die HPLC injiziert. Dargestellt sind zwei exemplarische Chromatogramme. Die Pfeile weisen auf Besonderheiten der Chromatogramme hin.

Neben dem prominenten Anstieg der Peakfläche bei einer Retentionszeit von 12,67 min wurden für das behandelte Tier E4 zwei zusätzliche Peaks detektiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um zwei unpolare Verbindungen des Catechins. Die UV-Spektren der Peaks sind in Tabelle 25 zusammen gefasst.

**Tabelle 25 Zusammenfassung relevanter Peakdaten der Leberhomogenate von K3 und E3.**

Dargestellt sind die UV-Spektren sowie die Retentionszeiten und Peakflächen der Verbindungen. Die Identität der Metabolite konnte nicht geklärt werden (siehe Text).

| UV-Spektrum                                                                          | Daten                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Leberhomogenat E4</b>                                                             |                       |
|    | <b>EGCG</b>           |
|                                                                                      | Peak Nummer: <b>5</b> |
|                                                                                      | Rt [min]:<br>12,67    |
|                                                                                      | AUC [mAU*min]: 68,46  |
|    | Peak Nummer:          |
|                                                                                      | <b>6</b>              |
|                                                                                      | Rt [min]:<br>14,63    |
|                                                                                      | AUC [mAU*min]: 1,96   |
|   | Peak Nummer:          |
|                                                                                      | <b>8</b>              |
|                                                                                      | Rt [min]:<br>17,1     |
|                                                                                      | AUC [mAU*min]: 4,43   |
|  | Peak Nummer:          |
|                                                                                      | <b>10</b>             |
|                                                                                      | Rt [min]:<br>19,6     |
|                                                                                      | AUC [mAU*min]: 3,74   |
| <b>Leberhomogenat K3</b>                                                             |                       |
|  | Peak Nummer: <b>5</b> |
|                                                                                      | Rt [min]: 12,04       |
|                                                                                      | AUC [mAU*min]: 0,608  |

Die Peaks mit der Retentionszeit von 17,0 min und 19,6 min traten mit ähnlichen UV-Spektren zusätzlich in der Behandlung E5 auf. Die massenspektrometrische Untersuchungen lieferten keine weiteren Hinweise auf die Identität der Peaks. Die berechneten Mengen an Epigallocatechingallat der behandelten Tiere sind in Tabelle 26 dargestellt.

**Tabelle 26: Menge an Epigallocatechingallat und Metaboliten in der Leber der behandelten Tiere.**

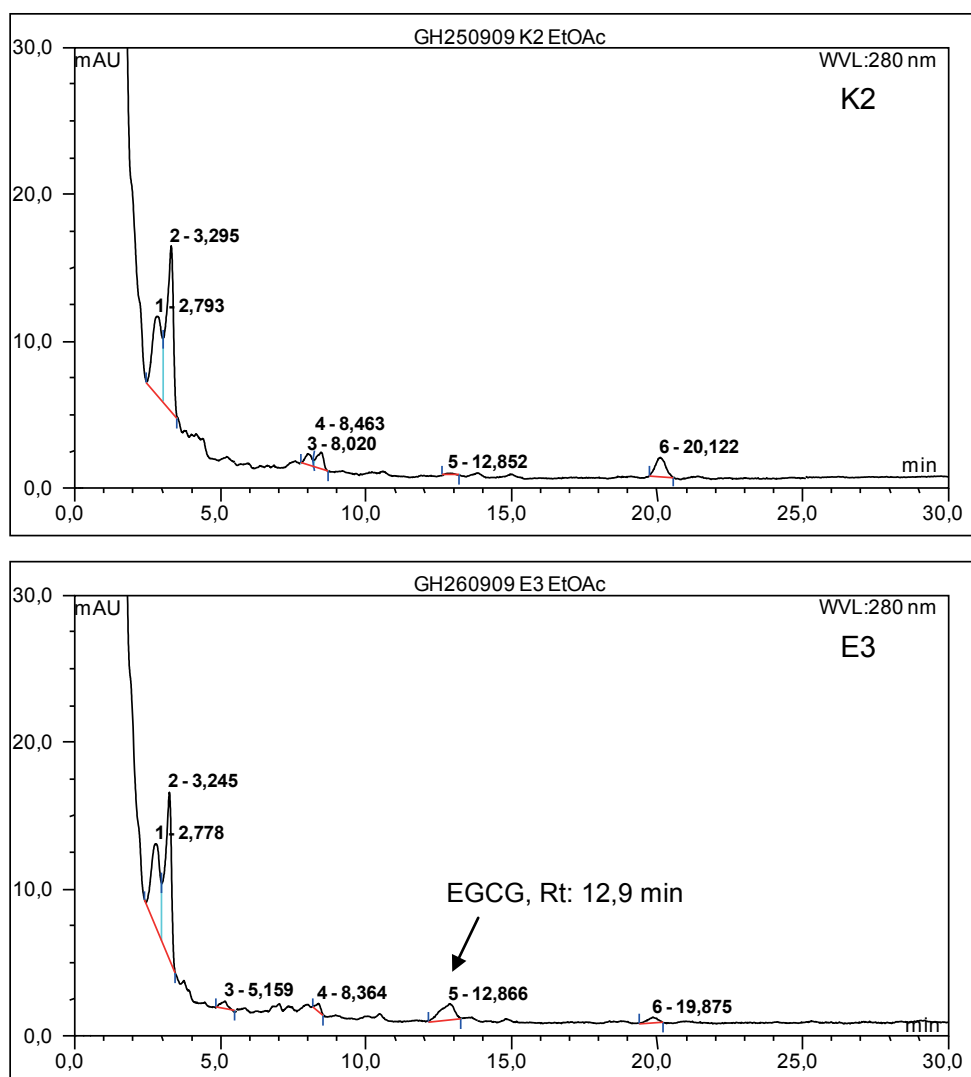
Die Werte wurden mit der Geradengleichung des Epigallocatechingallates berechnet.

| Leber                  | Rt [min]: | AUC [mAU*min]: | µg EGCG/g Leber |
|------------------------|-----------|----------------|-----------------|
| Epigallocatechingallat |           |                |                 |
| E2                     | 12,61     | 28,24          | 65,6            |
| E3                     | 12,68     | 5,39           | 12,4            |
| E4                     | 12,67     | 67,59          | 154,4           |
| E5                     | 12,59     | 0,41           | 1,1             |
| Metabolite             |           |                |                 |
| E2                     | 11,04     | 0,69           | 1,7             |
| E4                     | 17,10     | 4,43           | 10,2            |
| E2                     | 17,00     | 0,88           | 2,1             |
| E4                     | 19,60     | 2,60           | 6,1             |
| E2                     | 19,54     | 1,47           | 3,5             |

In den Leberhomogeaten konnten hohe Mengen an Epigallocatechingallat detektiert werden. Dabei wurden starke Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren ermittelt. Die Menge des Metaboliten korrelierte positiv mit der gefundenen Menge an Epigallocatechingallat in dem Organ.

#### 4.9.5 Detektion von Epigallocatechingallat im Gehirn der Muttertiere

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für die Kontrolltiere K1 - K3 sowie die behandelten Tiere E2, E3 und E5 beschrieben. In den Kontrolltieren konnte erneut ein Peak mit einer Retentionszeit ähnlich der des Epigallocatechingallats ermittelt werden. Die größte Peakfläche der Kontrollen wurde von der jeweiligen Peakfläche der behandelten Tiere abgezogen. Die Peakhöhe der Kontrolltiere lag nah am Detektionslimit. In Abbildung 68 sind die Chromatogramme einer Kontrolle und einer Behandlung beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 68: Chromatogramme der Ethylacetat-Phasen der Gehirnhomogenate des Kontrolltieres K2 und dem behandelten Tier E4.**

Die methanolischen Lösungen der getrockneten Ethylacetat-Extrakte der Gehirne wurden in die HPLC injiziert. Dargestellt sind zwei exemplarische Chromatogramme.

Die Mengen an detektiertem Epigallocatechingallat waren in den Gehirnen der Tiere deutlich niedriger als in den Lungen oder der Leber (siehe Tabelle 27). Die Varianz innerhalb dieser Gruppe war mit einem Faktor von 5,5 niedriger als in den anderen Organen.

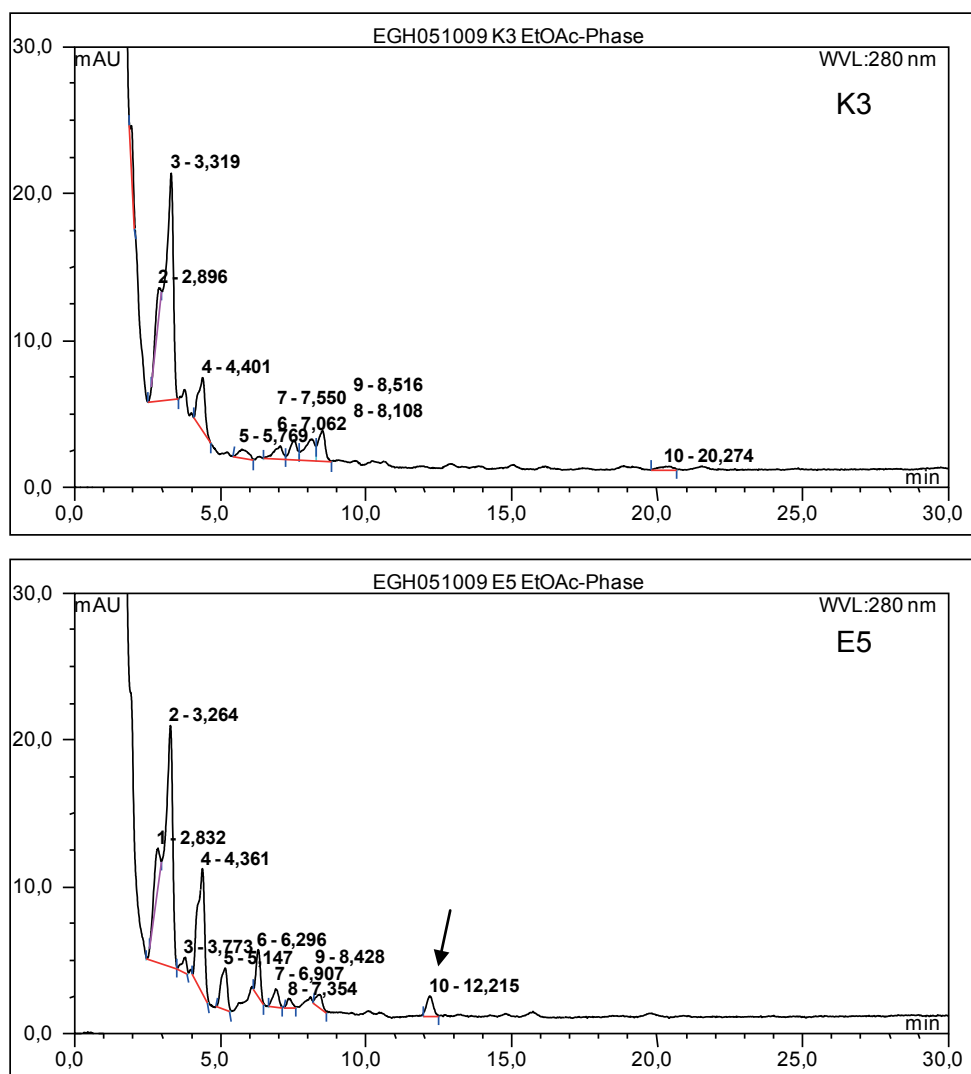
**Tabelle 27: Menge an Epigallocatechingallat in den Gehirnen der behandelten Tiere.**

In keinem Gehirnhomogenat der behandelten Tiere konnte ein Metabolit des Epigallocatechins detektiert werden.

| Gehirn                 | Rt [min]: | AUC [mAU*min]: | µg EGCG/g Gehirn |
|------------------------|-----------|----------------|------------------|
| Epigallocatechingallat |           |                |                  |
| E2                     | 12,85     | 0,394          | 0,8              |
| E4                     | 12,87     | 0,546          | 1,1              |
| E5                     | 12,83     | 0,08           | 0,2              |

#### 4.9.6 Detektion von Epigallocatechingallat im Gehirn der Nachkommen

In den Gehirnenhomogenaten der Nachkommen der Kontrolltiere eluierte keine Substanz mit einer Retentionszeit vergleichbar der des Epigallocatechingallates. In den Nachkommen behandelter Tiere dagegen eluierte eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 12,2 min (Abb.: 69). Das ermittelte Absorptionsspektrum dieser Substanz war in den Nachkommen beider behandelten Tiere vergleichbar entsprach aber nicht dem UV-Spektrum des EGCGs.



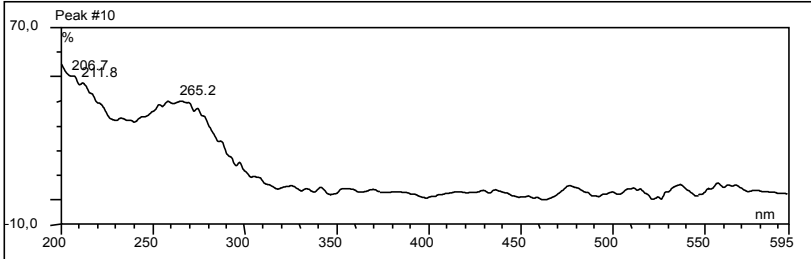
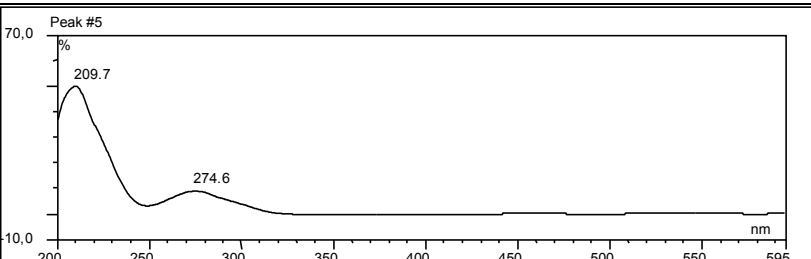
**Abbildung 69: Chromatogramme der Ethylacetat-Phasen der Gehirnhomogenate der Neugeborenen des Kontrolltieres K3 und des behandelten Tieres E5.**

Die methanolischen Lösungen der getrockneten Ethylacetat-Extrakte der Gehirne wurden in die HPLC injiziert. Dargestellt sind zwei exemplarische Chromatogramme. Der Pfeil weist auf den Unterschied zwischen den Chromatogrammen hin.

In der Tabelle 28 ist das UV-Spektrum der Verbindung mit der Retentionszeit von 12,2 min dem UV-Spektrum des Epigallocatechingallates gegenübergestellt. Im Vergleich der Absorptionsmaxima zeigen sich geringfügige Unterschiede. Einzig die Intensitätsverhältnisse zwischen den UV-Maxima unterscheiden sich deutlich.

**Tabelle 28: Vergleich der UV-Spektren von EGCG und der unbekannten Verbindung.**

Dargestellt sind die UV-Spektren sowie die Retentionszeiten und Peakflächen der Verbindungen. Die Identität der Metabolite konnte nicht geklärt werden (siehe Text).

| UV-Spektrum der Verbindung mit Rt: 12,2 min                                        |  | Daten                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------|
|  |  | Rt [min]:<br>12,215<br>UV-Maxima:<br>265,2 nm, 211,8 nm |
| UV-Spektrum des Epigallocatechingallates                                           |  |                                                         |
|  |  | Rt [min]:<br>12,67<br>UV-Maxima:<br>274,6 nm, 209,7 nm  |

Der Abgleich mit der internen UV-Spektren-Datenbank lieferte keinen weiteren Hinweis auf die mögliche Identität der Verbindung. Die massenspektrometrischen Untersuchungen blieben aufgrund der geringen Menge erfolglos. Da die Verbindung nur in den Gehirnen der behandelten Tiere auftrat, das Absorptionsspektrum ähnliche Maxima aufwies und keine Peaks in den Chromatogrammen auftauchen die zu einer Verwechslung führen könnten, wurde die Menge pro Gramm Gehirn der Neugeborenen ebenfalls ermittelt. Die erhaltenen Daten sind in der Tabelle 29 wiedergegeben.

**Tabelle 29: Menge an Epigallocatechingallat bzw. Metabolit in den Gehirnhomogenaten der Neugeborenen behandelter Tiere.**

In keinem Gehirnhomogenat der Neugeborenen behandelter Tiere konnte Epigallocatechingallat detektiert werden.

| Gehirn                 | Rt [min]: | AUC [mAU*min]: | µg EGCG/g Gehirn |
|------------------------|-----------|----------------|------------------|
| Epigallocatechingallat |           |                |                  |
| E3                     | 12,21     | 0,456          | 0,26             |
| E5                     | 12,21     | 0,331          | 0,35             |

In Tabelle 30 sind die ermittelten Mengen an Epigallocatechingallat in den einzelnen Geweben zusammengefasst. Die Leber und die Lunge sind die am höchsten belasteten Organe. Sie weisen in diesen Aufnahmeversuchen drastische Konzentrationen an Epigallocatechingallat auf. Die Körperbelastung der Tiere (in den untersuchten Organen) variiert um den Faktor 40.

**Tabelle 30: Zusammenstellung der ermittelten Epigallocatechingallat-Mengen in den Tieren.**

Dargestellt sind die ermittelten Mengen EGCG in µg pro g Feuchtgewicht des jeweiligen Gewebes sowie die Gesamtmenge pro Tier und die im Mittel detektierte Menge an EGCG in den jeweiligen Organen. 1 ml Blut wurde als 1 g berechnet. N.d.: Nicht in der Probe detektiert, n.e.: Endpunkt nicht ermittelbar.

|            | Leber                          | Lunge | Blut | Gehirn | Gesamt |
|------------|--------------------------------|-------|------|--------|--------|
|            | Epigallocatechingallat in µg/g |       |      |        |        |
| E2         | 65,6                           | 17,5  | n.e  | 0,8    | 84,8   |
| E3         | 12,4                           | 208   | n.d. | n.e.   | 220    |
| E4         | 154,4                          | 13,7  | 1,7  | 1,1    | 171    |
| E5         | 1,1                            | 4,3   | n.d. | 0,2    | 5,6    |
| Mittelwert | 58                             | 61    | 1,7  | 0,7    |        |

Nach diesem Pilotversuch sollte in einem Folgeversuch die Anreicherung der Verbindung bei niedrigeren Konzentrationen und erhöhter Tierzahl untersucht werden.

## 5. Diskussion

---

Ernährung, die stark auf pflanzlichen Produkten basiert wird epidemiologisch mit einer reduzierten Inzidenz von unterschiedlichen degenerativen Krankheiten korreliert. Dieser Effekt wird auf die in den Pflanzen vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere die Polyphenole zurückgeführt. Aufgrund dieser Korrelation entstand in den letzten Jahren ein großes Angebot an polyphenolhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden daher die Aufnahme und der Metabolismus von Flavonoiden in verschiedenen Zelllinien vorgestellt. Die antioxidativen und zytotoxischen Potentiale bestimmter Flavonoide und ihrer Metabolite wurden analysiert und die der Zytotoxizität zugrundeliegenden Prozesse in zwei Zelllinien exemplarisch ermittelt. Eine Interaktion der Flavonoide mit wichtigen intrazellulären Signaltransduktionswegen (den MAPKinasen und NFκB) wurde in HepG2- bzw. H4IIE Zellen untersucht.

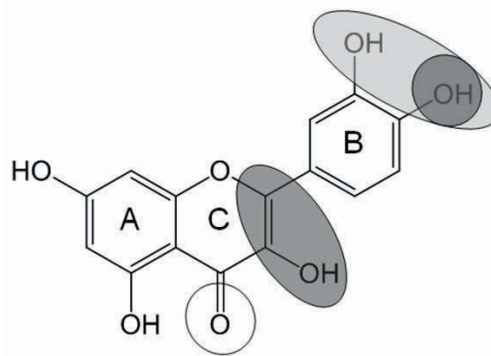
Im zweiten Teil der Arbeit wurden die *in vitro* generierten Ergebnisse der Catechinderivate vorgestellt. Die Aufnahme der mit einem polaren Substituenten konjugierten Catechine konnte *in vitro* und *in vivo* am Beispiel des Epigallocatechingallates nachgewiesen werden.

### 5.1 Antioxidatives Potential

Protektive Effekte der Flavonoide wurden häufig mit ihrem antioxidativem Potential in Zusammenhang gebracht. Voraussetzungen für radikalfangende Eigenschaften sind das Auftreten mindestens einer der folgenden Strukturmerkmale: Eine Catechol-Funktion (vicinale Hydroxygruppen) im B-Ring, eine 2,3-Doppelbindung mit einer 3-Hydroxylgruppe und benachbarter 4-Oxogruppierung und/oder das Auftreten einer 2,3-Doppelbindung bei gleichzeitiger Existenz einer Hydroxylfunktion an Position 3 und 4' (Pannala und Rice-Evans 2001), (Rice-Evans et al. 1996). Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 70 am Beispiel Quercetin dargestellt.

Zur Bestimmung des antioxidativen Potentials wurden zwei Methoden verwendet. Dabei war der Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC)-Assay sensitiver als der Diphenylpicrylhydrazil (DPPH)-Assay so dass das ABTS-Radikal von den Flavonoiden schon bei niedrigeren Konzentrationen entfärbt wurde.

Quercetin



**Abbildung 70: Quercetin und wichtige Strukturmerkmale der antioxidativen Wirkung ((modifiziert nach (Williams et al. 2004)).**

Herauszuheben sind die Catechol-Funktion im B-Ring (hellgrau) und die 4'-Hydroxylfunktion in Kombination mit der Doppelbindung zwischen 2,3 und der 3-Hydroxyfunktion (dunkelgrau). Die Flavonolstruktur (4-Oxoposition (klar) in Kombination mit der 2,3-Doppelbindung und der 3-Hydroxylfunktion) ist ein weiteres Strukturmerkmal welches dem Flavonoid antioxidative Eigenschaften verleihen kann.

In Übereinstimmung mit den postulierten Strukturmerkmalen zeigte Apigenin keine antioxidative Kapazität. Dies wurde unter anderem von Murota et al. (2002) und Okawa et al. (2001) bestätigt. Luteolin mit der Catecholfunktion im B-Ring weist ein antioxidatives Potential ( $EC_{50}$  ca. 17  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) auf. Die Maskierung einer der vicinalen Hydroxylgruppen durch Methylierung reduziert das antioxidative Potential des Luteolins deutlich ( $EC_{50} >> 25 \mu$ M). Demgegenüber wiesen die Methylderivate des Quercetins eine antioxidative Kapazität auf. Das 4'-Methoxyquercetin hatte im DPPH-Assay ein schwächeres antioxidatives Potential als das 3'-Methoxyderivat ( $EC_{50} > 25 \mu$ M bzw.  $EC_{50}$  ca. 15  $\mu$ M). Dies ist auf die verhinderte Delokalisation der Elektronen zu der 3-OH-Gruppe im Falle des Tamarixetin zurückzuführen. Mit beiden Methoden wurden für Quercetin und das 7-Methoxyquercetin äquivalente Kurvenverläufe ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse korrelieren gut mit der von Butkovic aufgestellten Hypothese, dass die Stöchiometrie der Reaktion (durch Titration der Reaktionspartner ermittelt) abhängig von der Anzahl orthoständiger OH-Gruppen im B-Ring mit dem Faktor 1,2 bzw. 3 bei Flavonoiden mit einer, zwei bzw. drei orthoständigen Hydroxylgruppen im B-Ring verläuft (Butkovic et al. 2004). Eine 3-OH-Gruppe wie bei Kämpferol erhöhe den Faktor laut Butkovic um eins, so dass für Kämpferol der Faktor 2 ermittelt wurde. Die Quercetinderivate haben eine OH-Gruppe im B-Ring maskiert und sollten nach Butkovic eine niedrigere antioxidative Eigenschaft aufweisen. Durch ihre 3-OH-Gruppe wird der Verlust der Catecholfunktion teilweise aufgefangen.

Das Flavonol Kämpferol reduziert beide Radikallösungen bei einer Konzentration von ca. 20  $\mu$ M halbmaximal. Dies liegt annähernd auf dem Niveau der Catecholfunktion des Luteolins und ist auf die 3-Hydroxylgruppe zurückzuführen (siehe Butkovic et al. 2004).

Entsprechend den postulierten Strukturmerkmalen weist auch das Kämpferid (4'-Methoxykämpferol) antioxidative Eigenschaften auf.

Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für Catechin und Epicatechin entsprechen sich in den Methoden. Somit hat die sterische Stellung der 3-OH-Gruppe keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität des Moleküls. Ihr antioxidatives Potential im TEAC-Assay rangiert zwischen dem des Quercetins und des Luteolins, was durch die orthoständigen Hydroxylgruppen im B-Ring erklärt werden kann. Der Einfluss der 2,3-Doppelbindung in Kombination mit der 4-Oxogruppe wird erst im DPPH-Assay deutlich. Dort sind beide Verbindungen mit  $EC_{50}$ -Werten von 25  $\mu$ M schwächer gegenüber Quercetin und Luteolin ( $EC_{50}$  beide ca. 10  $\mu$ M). Die Unterschiede zwischen beiden Methoden in den ermittelten antioxidativen Kapazitäten werden im weiteren Verlauf diskutiert.

Das antioxidative Potential wird durch eine dritte orthoständige OH-Gruppe erhöht. In beiden Assays liegt Epigallocatechin auf dem Niveau des Quercetins, welches aus der Gruppe der Flavonoide mit 2,3-Doppelbindung das höchste antioxidative Potential aufwies. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der orthoständigen Hydroxylgruppen im B-Ring für die Stabilisierung der durch Oxidation entstandenen Flavonoidradikale. Die Veresterung der Catechine mit Gallussäure erhöht die Anzahl der aromatischen, orthoständigen Hydroxylgruppen in den Molekülen um drei. Entsprechend weisen das Epicatechingallat und das Epigallocatechingallat die mit Abstand höchsten antioxidativen Kapazitäten auf. Die in dieser Arbeit ermittelte Reihenfolge im antioxidativen Potential: (+)-Catechin = (-)-Epicatechin < (-)-Epigallocatechin < (-)-Epicatechingallat = (-)-Epigallocatechingallat wurde auch von Nanjo et al. (1996) berichtet.

Das Auftreten eines Strukturmerkmals scheint im TEAC-Assay ausschlaggebend für die Detektion eines antioxidativen Potentials zu sein. Eine Korrelation der Anzahl der möglichen Delokalisierungen des Radikals mit der Stärke der radikalfangenden Eigenschaften ist nur schwer mit diesem Assay zu erzielen. Einzig Quercetin, welches alle Strukturmerkmale in sich vereint, weist mit ca. 5  $\mu$ M einen Unterschied zu den restlichen antioxidativ wirksamen Flavonoiden mit 2,3-Doppelbindung auf. Die gefundenen Unterschiede zwischen Quercetin und seinen Methylderivaten, sowie zwischen Kämpferol und Luteolin, deuten auf eine bessere Übertragbarkeit des ABTS-Radikals auf die Catecholfunktion hin. Diese ist allerdings so gering, dass sie in der Kombination mehrerer Strukturmerkmale kaum auffällt. Ausnahme ist das Auftreten mehrerer orthoständiger Hydroxylgruppen, wie am Beispiel der Gallatesther deutlich wurde.

Der DPPH-Assay ermöglicht durch seine geringere Sensitivität die Aufschlüsselung von Strukturmerkmalen im Bereich der 2,3-Doppelbindung. Mit dieser Methode kann die im Tamarixetin fehlende Möglichkeit zur Delokalisation des Radikals über die 4'-Hydroxy-

funktion zur 3-Hydroxyfunktion herausgearbeitet werden, während das Fehlen der Catecholstruktur beim Auftreten weiterer antioxidativer Strukturmerkmale keine deutliche Auswirkung auf das antioxidative Potential hatte (Vergleiche vermindertes antioxidatives Potential von Tamarixetin mit nicht geänderten Potential von Isorhamnetin im Vergleich mit Quercetin). Das verringerte antioxidative Potential des 4'-Methoxykämpferols im DPPH-Assay verglichen mit Kämpferol, sowie die im DPPH-Assay ermittelten Unterschiede zwischen Luteolin und Catechin, welche im TEAC-Assay nicht nachgewiesen werden konnten, deuten ebenfalls auf einen besseren Nachweis dieses Strukturmerkmals im DPPH-Assay hin.

Von den isolierten Flavonoiden zeigte im DPPH-Assay keines eine hohe antioxidative Eigenschaft. Einzig die Substanzen 14 (Patuletin-3-galactosid) und 16 (Patuletin-3-glucosid) konnten bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die Absorption der Radikallösung um 50 % reduzieren. Das Aglyka der Verbindungen Patuletin (3) sowie das Rhamnosidderivat (15) des Patuletin zeigten diese Eigenschaft nicht, obwohl beide ebenfalls über vicinale Hydroxyfunktionen im B-Ring verfügen. Weitere strukturverwandte mit vicinalen Hydroxyfunktionen wie das Eupatolin (10) und das Eupafolin (2) zeigen mit dieser Methode ebenfalls keine antioxidative Eigenschaft. Die Existenz eines Zuckerrestes bei den Substanzen 14 und 16 sollte das antioxidative Potential der Verbindungen nicht erhöhen, da die Zuckerreste zwar über Hydroxylgruppen verfügen, diese aber ein übertragenes Radikal nicht stabilisieren bzw. delokalisieren können. Je nach Position der Glykosylierung ist eher eine Reduktion der antioxidativen Kapazität zu erwarten, wenn diese eine der unter Punkt 5.1 beschriebenen benötigten Positionen maskiert. Patuletin (3) verfügt über dieselben antioxidativ wirksamen Strukturmerkmale wie Quercetin, erreicht aber ebenfalls nicht die Konzentration, welche die Absorption des DPPH halbmaximal reduziert.

Im TEAC-Assay zeigen die Verbindungen Patuletin (3) sowie seine drei Zuckerderivate (Glucosid (16), Galactosid (14) und Rhamnosid (15)), mit  $\text{EC}_{50}$ -Werten zwischen 15  $\mu\text{M}$  und 22  $\mu\text{M}$  das höchste antioxidative Potential. Patuletin zeigte eine antioxidative Kapazität vergleichbar der Positivkontrolle Trolox. Die aktiven Substanzen Eupafolin (2) und Eupatolin (10) weisen ebenfalls eine Catecholstruktur auf, was deren antioxidatives Potential erklärt. Die Substanzen 1, 7, 8 und 9 besitzen keine der notwendigen Strukturmerkmale. Entweder fehlen die notwendigen Hydroxylgruppen oder sie sind von Methylierungen bzw. Glykosylierungen maskiert. Übereinstimmend mit diesem Befund weisen sie im getesteten Konzentrationsbereich kein radikalfangendes Potential auf.

Bei den isolierten Naturstoffen trat eine Unstimmigkeit zwischen den postulierten Strukturmerkmalen und der ermittelten antioxidativen Kapazität auf. Eupalin (6) besitzt Hydroxylgruppen in 3- und 4'-Position kombiniert mit der 2,3-Doppelbindung. Aufgrund der

Konjugation der 3-Hydroxylfunktion mit einer Rhamnose ist der ermittelte  $EC_{50}$  von ca. 30  $\mu M$  unerwartet. Vermutlich ist die antioxidative Wirkung des Eupalin auf Verunreinigungen in der Probe zurückzuführen, da die Substanz keine alleinstellenden Strukturmerkmale trägt.

Die 6-Methoxyfunktion der isolierten Flavonoide wirkt sich im TEAC-Assay nur in geringem Maße auf das antioxidative Potential der Verbindungen aus. Im Vergleich mit den jeweiligen Strukturanaloga ohne diese Funktion (siehe 5.1.1) weisen die isolierten Verbindungen um Faktor 2 erhöhte halbmaximal-effektive Konzentrationen auf. Der einzige signifikante Unterschied konnte für Luteolin und Eupafolin (2) mit einem Faktor von 5 ermittelt werden. Dieser könnte allerdings auch auf Unterschieden in der Reinheit beruhen. Um einen Effekt nachzuweisen müssten weitere Flavonon-Paare untersucht werden.

## 5.2 Zytotoxisches Potential der Flavonoide

Die Konzentrationen an Flavonoid, welche einen antioxidativen Effekt ausübten, lagen zwischen 2,5  $\mu M$  und >50  $\mu M$ . Die Substanzen wurden daher zusätzlich auf ihr zytotoxisches Potential untersucht (MTT-Assay, 48 h) um die Relevanz der ermittelten antioxidativen Potentiale im Kontext mit ihrer Zytotoxizität besser einschätzen zu können.

Die verwendeten Flavonoide zeigten insgesamt eine relativ niedrige Zytotoxizität mit  $LC_{50}$ -Werten im hohen mikromolaren Konzentrationsbereich. Ausnahmen waren die Flavone Apigenin und Luteolin, deren  $LC_{50}$ -Werte zwischen 20  $\mu M$  und 40  $\mu M$  lagen. Csupor-Löffler et al. (2009) wiesen bei einer 72 h Inkubation ebenfalls eine hohe Zytotoxizität des Apigenins und des Luteolins in MCF-7 Zellen nach ( $IC_{50}$ : 14  $\mu M$  bzw. 32  $\mu M$ ), welche in weiteren Zelllinien bestätigt wurde.

Bei einer Inkubation der Zellen mit 25  $\mu M$  bis 50  $\mu M$  erreicht die Quercetintoxizität in allen Zelllinien ein Plateau (50 % bis 60 % Viabilität) welches bis zu einer Konzentration von 100  $\mu M$  nur noch wenig abfällt. Tang et al. (2009) wiesen in ihrer Studie unter vergleichbaren Bedingungen in der HepG2 Zelllinie ebenfalls ein Plateaubildung nach (Viabilität ca. 40 %). Einzig in den Hct116 Zellen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Viabilität und der Konzentration an Quercetin ermittelt. Aufgrund der großen Streuung der Einzelversuche in den Hct116 Zellen ist die Zytotoxizität des Quercetins unter Umständen etwas überschätzt. In einer Studie zur Zytotoxizität von 23 verschiedenen Flavonoiden in fünf Krebszelllinien von Chang et al. (2008) wies Quercetin in vier von fünf Zelllinien eine niedrigere Zytotoxizität als Apigenin oder Luteolin auf.

In der vorliegenden Arbeit reduzierte Kämpferol die Viabilität in keiner der getesteten Zelllinien unter 50 % (bis 100  $\mu M$ ).

Daher scheinen bei ansonsten identischem Substitutionsmuster die Flavonole generell weniger toxisch als die Flavone zu wirken. Zytotoxizität verleihende Strukturmerkmale sind nach Chang et al. (2008) das Auftreten einer 2,3-Doppelbindung, eine Catecholfunktion im

B-Ring sowie eine Gesamtanzahl von mindestens einer und maximal 5 Hydroxylgruppen im Molekül.

Die relativ niedrige Zytotoxizität der Catechinderivate: (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epigallocatechin in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 und der Hepatomzelllinie HepG2 kann demnach durch die fehlende Doppelbindung im Molekül erklärt werden. Auch die Veresterung des Epigallocatechins hatte nur eine moderate Erhöhung der Zytotoxizität zur Folge. In primären Rattenhepatozyten wiesen Schmidt et al. (2005) ebenfalls nur geringe bzw. keine Zytotoxizität im Falle von Epigallocatechingallat bzw. Epicatechin nach. Die Zytotoxizität der Catechine kann daher als moderat eingestuft werden.

Vergleichende Untersuchungen der Zytotoxizität des Quercetins und seiner Methylderivate in der Hepatomzelllinie HepG2 sowie der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 zeigen eine erhöhte Zytotoxizität (48 h) der Methylderivate. In letzterer wies auch das 7-Methoxyderivat Rhamnetin eine erhöhte Zytotoxizität auf. Hibasami et al. (2005) verglichen die proliferationsinhibierende Wirkung verschiedener Flavonoide auf promyelotische Leukämiezellen HL-60. In dieser Studie lag das wachstumshemmende Potential des Isorhamnetins ebenfalls über dem des Quercetins. Um der Möglichkeit einer generellen Toxifizierung der Flavonoide durch eine Methylierung im B-Ring nachzugehen, wurden zusätzlich das 3'-Methoxyluteolin (Chrysin) und das 4'-Methoxyluteolin (Diosmetin) in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Hct116 auf ihr zytotoxisches Potential untersucht. Beide wiesen verglichen mit Luteolin eine erhöhte Zytotoxizität auf. Die Unterschiede in dieser Zelllinie waren aufgrund der hohen Eigentoxizität des Luteolins nicht signifikant, deuten aber ebenfalls auf eine Toxifizierung des Flavons durch die Methylierung im B-Ring hin.

In den HepG2- und Hct116 Zellen weist keine der isolierten Substanzen eine hohe Zytotoxizität auf. Keine der Verbindungen erreichte eine halbmaximale Reduktion der Viabilität (bis 100 µM). Die niedrige Zytotoxizität der Verbindungen konnte von verschiedenen Gruppen ebenfalls gezeigt werden. Plochmann et al. (2007) wies in der humanen Leukämiezelllinie Jurkat E6-1 ebenfalls nur eine niedrige Zytotoxizität des Hispidulins nach. Woerdenbag et al. (1994) konnten eine halbmaximale Inhibition der Viabilität von GLC4 Zellen (kleinzelliges Lungenkarzinomzelllinie) bei einer Inkubation der Zellen mit 160 µM Patuletin für 4 Tage nachweisen. Die ebenfalls untersuchten Patuletinglykoside wiesen unter diesen Bedingungen keine Zytotoxizität auf. Dies ist durch die höhere Polarität und der damit verbundenen schlechteren Aufnahme der Glykoside in die Zellen zu erklären. Die schlechtere Aufnahme der Glykoside wurde in Membranpermeabilitätsstudien mit dem Caco2-Monolayer Model belegt. Tian et al. (2009) konnten für verschiedene

Flavonoidglykoside keinen bis nur sehr geringen Transport durch den Zell-Monolayer nachweisen. Die niedrige Zytotoxizität der in dieser Arbeit verwendeten Zuckerkonjugate scheint daher aus einer geringen intrazellulären Konzentration der Flavonoide und der niedrigen Zytotoxizität der Aglyka zu resultieren.

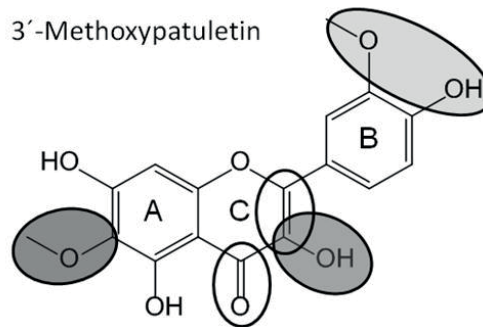
Das zytotoxische Potential der 6-Methoxyderivate ist, verglichen mit den Strukturanaloga ohne diese Funktion, erniedrigt. Während Quercetin, Luteolin und Apigenin in den Hct116 Zellen eine Zytotoxizität ( $IC_{50}$ : 40  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) ausüben, konnte für die entsprechenden 6-Methoxyderivate Patuletin (3), Eupafolin (2) und Hispidulin (1) keine halbmaximale Reduktion der Viabilität der Zellen bis 100  $\mu$ M detektiert werden. Tamarixetin, welches vergleichend mit Isorhamnetin und Quercetin auf seine Zytotoxizität in dieser Zelllinie untersucht wurde (siehe 4.6.1), erreichte mit einer Konzentration von 20  $\mu$ M die halbmaximale Reduktion der Viabilität der Hct116 Zellen. Das 6-Methoxyderivat des Tamarixetins reduzierte die Viabilität bei gleicher Konzentration auf ca. 60 %. Desweiteren konnte das Derivat die Viabilität bis zur höchsten eingesetzten Konzentration (100  $\mu$ M) nicht unter 50 % reduzieren, während bei einer Inkubation mit 50  $\mu$ M Tamarixetin keine viablen Zellen mehr detektiert wurden.

In Hct116 Zellen verleiht die 6-Methoxyfunktion somit Protektion der Zellen vor der zytotoxischen Wirkung der Verbindungen.

Diese Beobachtung konnte in den HepG2 Zellen bestätigt werden. Analog den Ergebnissen in den Hct116 Zellen ergaben sich folgende Toxizitäten: Quercetin >> Patuletin (3), Luteolin >> Eupafolin (2), Apigenin >> Hispidulin (1) und Tamarixetin > Laciniatin (4).

In der Studie von Woerdenbag et al. (1994) konnte dieser Effekt in zwei anderen Zelllinien nicht gezeigt werden. Die verwendeten Bedingungen sind allerdings nicht auf die Bedingungen dieser Arbeit übertragbar.

Anhand der Ergebnisse können folgende Struktur-Aktivitätsbeziehungen abgeleitet werden: Bei gleicher Substitution im B-Ring ist die Zytotoxizität des Flavons dem des Flavonols übergeordnet. Eine Methylierung orthoständiger Hydroxylgruppen im B-Ring bewirkt eine Toxifizierung der Substanz. Demgegenüber führt eine zusätzliche 6-Methoxygruppe zu einer verringerten Zytotoxizität. Ein Verlust der 2,3-Doppelbindung und der 4-Oxofunktion resultiert ebenfalls in einer Reduktion des zytotoxischen Potentials. Eine Übersicht über die Strukturmerkmale ist in Abbildung 71 dargestellt.



**Abbildung 71: Wichtige Strukturmerkmale der zytotoxischen Wirkung am Beispiel einer hypothetischen Substanz.**

Die Methylierung der Catechol-Funktion im B-Ring (hellgrau) erhöht die Zytotoxizität, während eine zusätzliche 6-Methoxyfunktion eine Reduktion der Zytotoxizität bewirkt (dunkelgrau). Bei gleichem Substitutionsmuster im B-Ring ist die 3-OH-Gruppe ebenfalls detoxifizierend (grau). Der komplette Verlust der 4-Oxoposition und der 2.3-Doppelbindung (klar) senkt die Zytotoxizität in den untersuchten Zellsystemen ebenfalls.

### 5.3 Aufnahme und Metabolismus der Flavonoide in verschiedene Zelllinien

Weiterführende Untersuchungen wurden mit den vier Flavonoiden Quercetin, Luteolin und Kämpferol sowie vergleichend mit dem antioxidativ unwirksamen Apigenin durchgeführt. Hierbei wurden die Aufnahme und der Metabolismus der Flavonoide in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 untersucht. Die Akkumulation der Flavonoide in verschiedene Zelllinien wurde exemplarisch mit Quercetin und Apigenin bestimmt. Die zelluläre Verfügbarkeit der Catechine wurde mit Epicatechingallat und Epigallocatechingallat untersucht.

#### 5.3.1 Stabilität von Quercetin und EGCG in DMEM

Aus Vorarbeiten von Boulton et al. (1999) war bekannt, dass Flavonoide in Zellkulturmedium oxidativ degeneriert werden können. Diese oxidativen Spaltprodukte (u.a. Protocatechusäuren) konnten in einem Vorversuch zur Aufnahme des Quercetins im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Um mögliche zellulär vermittelte Oxidationen der Substanz von diesen Artefakten zu unterscheiden, sowie Unterschiede in der Aufnahme der Flavonoide durch unterschiedliche Flavonoidkonzentrationen im Überstand auszuschließen, musste das Quercetin im Medium stabilisiert werden. Eigene Vorversuche, sowie von Mochizuki et al. (2002) publizierte Ergebnisse, deuteten auf eine pH-Abhängigkeit der Flavonoiddegradation hin. Die pH-Abhängigkeit der Quercetinstabilität im Wachstumsmedium wurde photometrisch nachgewiesen (siehe 4.3), wobei durch die Eigenabsorption des Mediums die Menge des noch detektierten Flavonoids deutlich überschätzt wurde.

Die Degradation des Quercetins konnte durch die Inkubation mit Antioxidantien deutlich verringert werden. 1 mM Glutathion als nicht membrangängiges Antioxidans verlängerte die Halbwertszeit des Quercetins von 20 Minuten auf ca. 1 h. 0,5 mM Ascorbinsäure stabilisierte

das Flavonoid über den getesteten Zeitraum hinaus ( $t_{1/2} > 2$  h). Die verbesserte Stabilität des Quercetins durch die Ascorbinsäure könnte auf ihr höheres antioxidatives Potential im Vergleich mit Glutathion zurückzuführen sein.

Die Stabilität des Epigallocatechingallates wurde nach einer Extraktion des Flavonoids aus dem Medium photometrisch bestimmt. Dadurch musste die Eigenabsorption des Mediums nicht berücksichtigt werden. Die initialen Verluste des nicht stabilisierten Catechins sind hoch ( $t_{1/2} < 15$  Minuten). Nach 2 h konnte eine Absorption von ca. 10% des Ausgangswertes ermittelt werden. Dies stimmt mit einem Befund von Sang et al. (2005) überein. Sie untersuchten die Stabilität von EGCG in Medium und konnten nach schnellen initialen Verlusten erst nach 6 h kein Epigallocatechingallat mehr detektieren.

Die Koinkubation des Mediums mit 0,5 mM Ascorbinsäure verlangsamte die Autooxidation des EGCGs deutlich. Die Verwendung von 1 mM Ascorbinsäure führt zu einer Wiederfindungsrate von ca. 75 % bis 80 % nach 2 h. Eine Autooxidation von Flavonoiden wird hauptsächlich auf die vicinalen OH-Gruppen im B-Ring zurückgeführt (u.a. Kessler et al. (2003)). Daher resultiert die höhere Degradationsrate von Epigallocatechingallat, im Vergleich mit Quercetin, bei der Verwendung von 0,5 mM Ascorbinsäure vermutlich aus den strukturellen Unterschieden, wie die um eine erhöhte Anzahl an Hydroxylgruppen im B-Ring und die Konjugation mit der Gallussäure.

Die Anwesenheit von Zellen schützt Flavonoide vor der Degradation im Medium. Dieses Erkenntnis resultiert aus Befunden der Vorversuche in denen Quercetin auch ohne präventive Maßnahmen nach Inkubationszeiten von 1 h im Überstand detektiert wurde. Hong et al. (2002) berichten in Ihrer Studie zur Aufnahme und Degradation von Epigallocatechingallat (Übereinstimmend mit unseren Daten) eine Halbwertszeit des Catechins im Medium von 30 Minuten, welche sich bei Anwesenheit der Zellen auf ca. 130 min erhöhte.

Die Aufnahmeversuche der Flavone und Flavonole wurden daher in Koinkubation der Zellen mit 0,5 mM Ascorbinsäure und die Aufnahmeversuche der Catechine in einer Koinkubation mit 1 mM Ascorbinsäure durchgeführt.

### **5.3.2 Aufnahme und Metabolismus der Flavonoide in verschiedene Zelllinien**

Die Aufnahmeversuche mit Apigenin, Luteolin und Kämpferol wurden in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 mit je 50  $\mu$ M Flavonoid durchgeführt. Zelluläre Unterschiede in dem Aufnahmeverhalten wurden anschließend beispielhaft für Apigenin und Quercetin in Hct116-, HUH-7-, MCF-7-, sowie HepG2- Zellen untersucht. Im Anschluss an die Aufnahme werden der Metabolismus der Flavonoide in den Zelllinien und die Identifikation der jeweiligen Metabolite vorgestellt. Abschließend werden die exemplarisch mit Quercetin

durchgeführten Versuche zu aktiven Transportvorgängen der Flavonoide besprochen, bevor die Aufnahme der Catechingallate in Hct116 und HepG2 Zellen diskutiert wird.

Die intrazellulär detektierte Menge der verschiedenen Flavonoide variierte in den Hct116 Zellen nicht signifikant. Yokomizo und Moriwaki (2006) wiesen in ihrer Studie mit Caco2 Zellen nach einer Inkubationszeit von 2 h ebenfalls äquivalente intrazelluläre Konzentrationen der einzelnen Flavonoide nach. Der Nullminuten-Wert wurde erhoben um initiale Verluste im Überstand der Zellen bei der Zugabe der Flavonoide zum Medium zu ermitteln. Selbst zu diesem Zeitpunkt können geringe Mengen an Flavonoid in den Zellpellets detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich methodisch bedingt, da nach der Zugabe zum Medium eine kurze Zeitspanne verging bis die Zellen erstmals gewaschen wurden. Dieser Zeitraum ist für eine Adsorption der Flavonoide an die Zellmembran offensichtlich ausreichend. Eine schnelle Anlagerung des Flavonoids wurde von Vaidyanathan und Walle (2003) bei der Aufnahme von Epicatechingallat in Caco2 Zellen ebenfalls beschrieben. Die Wiederfindungsrate lag bei den einzelnen Substanzen über den getesteten Zeitraum auf hohem Niveau. Über den gesamten Inkubationszeitraum konnten ca. 80 % der eingesetzten Apigeninmenge in den Hct116 Zellen detektiert werden. Von Luteolin konnten initial ca. 100% nachgewiesen werden. Die zu detektierende Menge an Luteolin fiel im Überstand der Hct116 Zellen über den Inkubationszeitraum kontinuierlich auf ca. 70 % ab, während die Menge an Kämpferol schnell ab fiel, sich aber bei ca. 60 % der ursprünglich eingesetzten Menge stabilisierte.

Da für die verschiedenen Flavonoide keine unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 ermittelt wurden, erfolgten anschließend Aufnahmeversuche mit den Flavonoiden in weitere Zelllinien. Diese wurden exemplarisch mit Apigenin (50 µM) und Quercetin (100 µM) inkubiert.

Die Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit Apigenin ergab keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Apigeninmenge der Hct116-, HepG2- und MCF-7 Zellen. In der humanen Hepatomzelllinie HUH-7 konnte kein Apigenin detektiert werden. Dies ist vermutlich auf die im Verhältnis zu den anderen Zelllinien geringere Menge an Protein und somit die geringere Zellzahl zurückzuführen. Die ermittelten Proteinmengen von HUH-7 Zellen und MCF-7- bzw. HepG2 Zellen stehen im Verhältnis von 1 zu 1,6. In Kombination mit dem relativ hohen Detektionslimit von 900 ng/ml lag die aus den Zellen isolierte Menge an Apigenin vermutlich unter der Detektionsgrenze. Dafür sprechen auch Befunde von Yokomizo und Moriwaki (2006), welche die Aufnahme der Flavonoide in Caco2 Zellen untersucht und keine Unterschiede zwischen den intrazellulären Flavonoidmengen berichtet haben. Gegen eine aktive Aufnahme bzw. einen effektiven Austransport des Apigenins in den HUH-7 Zellen spricht zusätzlich, dass die Aufnahme des Apigenins wahrscheinlich passiv erfolgt. Daher müssten die Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum das

Apigenin extrem effizient ausschleusen, um bei der verwendeten Konzentration eine intrazelluläre Belastung zu verhindern.

Die Wiederfindungsrate des Apigenin in den verschiedenen Zelllinien lag zwischen 80 % und 100 %. Bei der 6 h Inkubation der HUH-7 Zellen wurde eine Abnahme der extrazellulären Apigeninmenge auf unter 60 % detektiert. In dieser Zelllinie können keine Aussagen über intrazelluläre Vorgänge getroffen werden, daher ist nicht zu ermitteln ob es sich bei dem Verlust um Oxidationsprozesse oder Metabolisierung handelt. Die extrazelluläre Menge an Apigenin sinkt im Verlauf der Inkubationsdauer auch bei der zweiten Hepatomzelllinie (HepG2) kontinuierlich auf ca. 60 % ab.

Die Aufnahme des als Leitstruktur verwendeten Quercetins erfolgte mit 100 µM. Daraus resultieren vermutlich die im Vergleich zu Apigenin höheren intrazellulären Mengen an Quercetin. Zwischen den Zelllinien variiert die intrazelluläre Quercetinmenge nicht. Die extrazellulär zu detektierenden Mengen blieben bei Wiederfindungsraten von 80 % bis 100 % bei den Hct116, HUH-7 und MCF-7 Zellen konstant. Im Laufe der Inkubationsdauer nahm die Wiederfindungsrate im Überstand der HepG2 Zellen von 100 % auf ca. 60 % ab.

Nach der Darstellung der intrazellulären und extrazellulären Flavonoidmengen wird im Folgenden die Identifikation und die Lokalisation der verschiedenen Metabolite der Zelllinien diskutiert. Im Rahmen der Aufnahmeversuche zeigten ausschließlich die HepG2 und die Hct116 Zellen eine nennenswerte metabolische Aktivität.

Der Abfall der extrazellulären Quercetinmenge bei der Inkubation der HepG2 Zellen war von dem Auftreten zweier Metaboliten begleitet. Anhand der erhöhten Retentionszeit, dem ermittelten Molekulargewicht und dem Fragmentierungsmuster im MSMS-Experiment wurde der erste Metabolit als Methylderivat des Quercetins identifiziert. Die Koelution des Überstandes mit Tamarixetin bzw. Isorhamnetin ergab eine Zusammensetzung des Peaks aus  $\frac{1}{4}$  Tamarixetin und  $\frac{3}{4}$  Isorhamnetin. Isorhamnetin und ebenfalls in wesentlich geringeren Mengen Tamarixetin wurden von Morand et al. (1998) zum ersten Mal in Plasma von Ratten nachgewiesen. Seitdem wurde in mehreren Humanstudien nach der Verabreichung quercetinhaltiger Nahrungsmittel Isorhamnetin im Plasma gesunder Menschen detektiert (siehe Übersichtsartikel (Manach et al. 2005)). Die Identität des Metaboliten ist demnach Isorhamnetin mit Teilen von Tamarixetin.

Das Methylderivat konnte ebenfalls im Überstand der Hct116 Zellen nachgewiesen werden. Die Metabolisierungsrate war mit 2 % der ursprünglichen Quercetin Menge nach 6 h in den Hct116 Zellen wesentlich niedriger als in den HepG2 Zellen mit ca. 18 % der ursprünglichen Quercetinmenge. Der in den HepG2 Zellen nach 6 h Inkubationszeit detektierte prozentuale Anteil an gebildetem Metabolit entspricht in etwa dem *in vivo* im Plasma detektierten Anteil

an Methylderivat (Manach et al. 2005). Die höhere Konzentration des Methylderivates im Überstand ist vermutlich auf die passive Diffusion des unpolareren Metaboliten mit dem Konzentrationsgefälle bzw. durch erleichterte Diffusion zu erklären.

Die niedrigere Retentionszeit und das Molekulargewicht des zweiten Metaboliten im Überstand der HepG2 Zellen ließen auf ein Sulfatderivat schließen. Die Fluchtgruppe im MSMS-Experiment von 80 M/z erhärtete diesen Verdacht. Day et al. (2001) identifizierten im Plasma von Menschen Quercetin-3'-Sulfat als einen der Metabolite und als prominentestes Sulfatderivat. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem hier gebildeten Derivat ebenfalls um das 3'-Derivat handelt. Dies ist aber nicht mit Sicherheit zu sagen, da die exakte Position der Sulfatierung nicht bestimmt wurde.

Auch das Sulfatderivat des Quercetins wurde zum Großteil im Überstand der HepG2 Zellen detektiert (ca. 4 % der eingesetzten Quercetinmenge). Aufgrund der höheren extrazellulären Menge könnte ein aktiver Transport in den HepG2 Zellen vermutet werden. Das Sulfatderivat ist polarer und sollte schlechter passiv über die Membran diffundieren. Unter physiologischen Bedingungen tritt zusätzlich eine negative Ladung. Dies erniedrigt die Permeabilität des Moleküls weiter. Sulfatderivate werden in der Regel von Transportern der MRP-Familien 1 bis 3 über die Membran transferiert (u.a. Ishikawa et al. (2000) und Jedlitschky et al. (2006)). Im Caco2 Monolayer-Experiment beobachteten Walle et al. (1999) die Sulfatierung von Chrysin und eine anschließende Exkretion des Derivates in das apikale Kompartiment. Der Efflux konnte mit einem MRP-Inhibitor (MK-571) um 25 % reduziert werden.

Eine vom aktiven Transport unabhängige Erklärung für die hauptsächlich extrazelluläre Lokalisation des Sulfatderivates (sowie für die nur 25 %-ige Reduktion des Efflux vom Chrysinderivat nach 3 h Inkubation im Permeabilitätsexperiment von Walle et al.), könnte der Beobachtungszeitraum liefern. Die Sulfatierung erhöht die Polarität des Quercetins. Diese Eigenschaft verhindert den Übertritt des Quercetins nicht gänzlich, sondern verlangsamt diesen Prozess. Unter normalen Bedingungen verläuft der Übertritt des Quercetins über die Membran folglich sehr schnell, während der Übertritt des Sulfatderivates retardiert ist. Das intrazellulär gebildete Sulfatderivat diffundiert dementsprechend langsam aber kontinuierlich mit dem Gradienten über die Membran. Durch die Erhebung der Daten nach 1 h und nach 6 h konnte somit innerhalb der fünf Stunden eine erhebliche Akkumulation des Sulfatderivates im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Da die wenigen existierenden Studien eine niedrigere Bioaktivität von Sulfatderivaten nahelegen (u.a. Jones et al. (2004)), wurde auf eine weitere Untersuchung zur Klärung der Transportvorgänge der Sulfatderivate des Quercetins verzichtet.

Ausschließlich bei der Inkubation der humanen Hepatomzelllinie HepG2 mit 100 µM Quercetin konnten intrazellulär Metabolite detektiert werden. Dabei handelte es sich um die auch im Überstand detektierten Sulfat- und Methylderivate des Quercetins. Die von Walle et

al. (1999) extrazellulär detektierten Metabolite des Chrysin in den Caco2 Zellen hatten eine vergleichbare Konzentration mit den in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen an Metabolit. Die intrazellulären Mengen blieben von den Autoren leider unerwähnt. Dass nur bei der Inkubation mit 100  $\mu$ M Quercetin intrazellulär Metabolite detektiert werden, könnte im Falle eines aktiven Transports auf eine Sättigung der erleichterten Diffusion hinweisen. Eine vom aktiven Transport unabhängige Erklärung ist, dass Vorliegen einer ungesättigten enzymatischen Reaktion der Metabolisierung bei einer Inkubation mit 50  $\mu$ M Flavonoid (wie bei Apigenin der Fall). Die intrazelluläre Konzentration, welche bei einer Inkubation mit 100  $\mu$ M vorlag, würde folglich in einer höheren Metabolitenkonzentration resultieren. Diese höhere Menge ist ausreichend, um das Detektionslimit zu überschreiten und die Metabolite zu detektieren. Hinzu kommt, dass das Detektionslimit von Quercetin mit 450 ng/ml deutlich unter denen der anderen Flavonoide lag (Apigenin und Kämpferol 900 ng/ml, Luteolin 550 ng/ml).

Außer bei einer Inkubation mit Quercetin, konnte auch bei der Inkubation der HepG2 Zellen mit Apigenin ein Metabolit detektiert werden. Der beschriebene Abfall der extrazellulären Apigeninkonzentration auf ca. 80 % der eingesetzten Menge bei der Inkubation der HepG2 Zellen, war von einem Anstieg eines extrazellulär detektierten Sulfatderivats begleitet. Die Identifikation des Apigeninsulfats erfolgte über die Retentionszeit und das Molekulargewicht (Daten im Anhang). Neben der Fluchtgruppe von  $M/z = 80$  welche die Existenz einer Sulfatgruppe belegte, legen auch Ergebnisse von Gradolatto et al. das Auftreten eines Sulfatderivaten nahe. Sie wiesen neben weiteren Derivaten auch sulfatiertes Apigenin in einem Experiment mit perfundierter Rattenleber nach (Gradolatto et al. 2004). Wie für das Sulfatderivat des Quercetins wurde die Position der Sulfatierung nicht bestimmt. Die erhöhte extrazelluläre Konzentration resultiert vermutlich wie bei Quercetin aus dem gewählten Zeitfenster.

Neben den geringen Mengen an methyliertem Quercetin im Überstand der Hct116 Zellen konnte auch bei der Inkubation der Hct116 Zellen mit Luteolin eine Metabolisierung der Substanz beobachtet werden. Die beschriebene Abnahme der Luteolinkonzentration in den Überständen der HCT116 Zellen auf ca. 70 % der eingesetzten Luteolinmenge war von einem Anstieg eines Methylderivaten (ca. 30 % nach 6 h) begleitet. Das Methoxyderivat wurde anhand seiner höheren Retentionszeit, seinem UV-Spektrum sowie seinem Massenspektrum als Methylderivat identifiziert. Eine Methylierung von Luteolin wurde *in vivo* von Shimoi et al. (1998) nach intragastraler Gabe von Luteolin im Plasma von Ratten nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse der von ihnen durchgeführten Koelution wurde die Position der Methylierung auf den B-Ring begrenzt. Aufgrund der von ihnen verwendeten chromatographischen Bedingungen konnten sie die exakte Position der Methylierung nicht bestimmen. Da eine Methylierung in der vorliegenden Arbeit nur bei den Flavonoiden mit

orthoständigen Hydroxylgruppen auftrat und Shimoi et al. die Methylierung des Luteolins ebenfalls auf den B-Ring begrenzten, handelt es sich bei dem Methylderivat des Luteolins vermutlich um das 3'- oder das 4'-Methoxyluteolin. Für weitere Studien wurden beide Derivate verwendet. Daher wurde auf eine weitere Strukturaufklärung verzichtet. Bei den in dieser Arbeit detektierten Metaboliten handelt es sich somit um die auch *in vivo* nachgewiesenen Methylderivate und Sulfatderivate der Flavonoide.

Da die Metabolite im Überstand der Zellen detektiert wurden, ist auf eine passive Diffusion der Verbindungen zurückzuführen. Der passive Transport der verwendeten Flavonoide konnte in Caco-2 Monolayer-Experimenten nachgewiesen werden (Tian et al. 2009). Aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles zwischen dem Zellinneren und dem Überstand reichert sich der Metabolit nicht in detektierbaren Mengen in den Zellen an, sondern tritt direkt ins Medium über. Eine erleichterte Diffusion kann aber nicht ausgeschlossen werden, da dies nicht untersucht wurde.

In keiner der Zelllinien konnte die Bildung von Glucuroniden detektiert werden, obwohl das Auftreten von Glucuronidderivaten *in vivo* mehrfach gezeigt worden ist (Übersichtsartikel: Manach et al. (2005)). Um Fehler in der Detektion des Glucuronids auszuschließen wurde ein Kontrollansatz mit H4IIE Zellen durchgeführt. Die Zelllinie wurde gewählt, da in unserer Arbeitsgruppe eine Glucuronidierung von Flavonoiden in H4IIE Zellen nachgewiesen werden konnte (Niering et al. 2005). Nach der Behandlung der Zellen mit Quercetin konnte in der LCMS ein Peak mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden. Somit scheinen die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Hct116, HepG2, HUH-7, MCF-7) nur über geringes Glucuronidierungspotential zu verfügen.

Die bisherigen Ergebnisse legen eine passive Aufnahme der Flavonoide in die Zellen nahe. Die Möglichkeit des aktiven Transports wurde durch die Effekte pharmakologischer Inhibitoren auf die intrazelluläre Quercetin- und Isorhamnetinmenge, sowie auf die Zytotoxizität des Quercetins, untersucht. Weder in den HepG2 Zellen noch in den Hct116 Zellen konnte durch die Koinkubation der Zellen mit Quercetin und verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren (Verapamil und DIDS) eine Veränderung der intrazellulären Mengen erzielt werden (siehe 4.7.2). Zusätzlich wurde die Zytotoxizität von Quercetin durch eine Koinkubation mit dem MDR1-Inhibitor Verapamil nicht erhöht, während die Zytotoxizität von Doxorubicin, einem zytotoxischen und zytostatischen MDR1 Substrat, durch die Koinkubation mit Verapamil erhöht werden konnte (4.7.1). Die Funktionalität dieses indirekten Nachweises ist somit gegeben.

Um eine generelle Beteiligung von aktiven Transportprozessen zu untersuchen, wurden Hct116 Zellen mit Quercetin bei 4 °C inkubiert. Dies ergab keine unterschiedlichen

intrazellulären Quercetinmengen und deutete somit zusätzlich auf eine transporterunabhängige Regulation der intrazellulären Flavonoidkonzentration hin.

Die dargelegten Ergebnisse lassen auf keinen aktiven Transport der Substanzen unter dem gegebenen experimentellen Design schließen. Die Interaktion von Flavonoiden mit diversen Transportern ist allerdings gut belegt. Wang et al. (2005) konnten eine niedrigere intrazelluläre Konzentration an Quercetin und Isorhamnetin in MDR1 transfizierten Bcap37 Zellen im Vergleich mit nicht transfizierten Bcap37 Zellen nachweisen. Die Inkubation mit Verapamil als MDR1 Inhibitor erhöhte die Aufnahme der Flavonoide in den transfizierten Zellen. Ein möglicher Transport über die Transporter der MDR-Familie muss somit in Betracht gezogen werden. Die biologische Relevanz eines aktiven Austransports ist aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten schnellen passiven Diffusion der Flavonoide zu klären. Eine Beteiligung der MDR-Transporter an dem Flavonoidgleichgewicht in Zellen, welche diese Transporter stark exprimieren (in vivo z.B. im Dünndarm) erscheint wahrscheinlich. In Zellen, welche diese Transporter generell in geringerem Ausmaß exprimieren ist die Beteiligung der Transporter an der Flavonoidhomöostase unklar. Das ein Nachweis des MDR-abhängigen Flavonoidtransports nur in Transporter-überexprimierenden Zellen dargestellt werden kann, deutet auf eine untergeordnete Rolle dieses Exkretionsweges in den Zellen hin. Ein alleiniger Transport über Aufnahme- bzw. Effluxtransporter ist somit unwahrscheinlich. Die Beteiligung des aktiven Transports bei physiologischen Konzentrationen konnte aufgrund des Detektionslimits nicht genauer betrachtet werden. Dies könnte unter Umständen durch die Verwendung von radioaktiv markierten Flavonoiden erfolgen. Studien, welche diesen Ansatz verfolgen sind allerdings selten. Bisher wurde mit dieser Methode die Aufnahme von glykosiliertem Quercetin nach Hydrolyse in Ratten nachgewiesen (Graf et al. 2005).

Die Aufnahme und der Austransport der unkonjugierten Flavonoide ist in den verwendeten Zelllinien nicht Transporter abhängig. Daher wurde die Aufnahme der relativ polaren Gallatester Epicatechingallat und Epigallocatechingallat in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 untersucht (siehe 4.12). Die Befunde wurden anschließend in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 mit Epigallocatechingallat bestätigt. Bei einer nur geringfügigen Abnahme der extrazellulär detektierten Catechinkonzentration konnte für beide Verbindungen eine zeitabhängige Aufnahme in die Hct116 Zellen detektiert werden. Die intrazelluläre Menge war bei beiden Catechinderivaten vergleichbar und eine Aufnahme konnte erst nach einer Stunde nachgewiesen werden. Bis zu einer Inkubationszeit von sechs Stunden stieg die Menge von ungefähr 0,4 ng Catechin/ $\mu\text{g}$  Protein (1 h) auf annähernd 1,2 ng/ $\mu\text{g}$  Protein. Dabei flachte die Aufnahmerate zu späteren Zeitpunkten ab. Die intrazellulär detektierten Mengen an Epicatechingallat zu Beginn des Aufnahmeversuches resultieren vermutlich aus

dem Begleitpeak bei ähnlicher Retentionszeit. Aus diesem Grund wurde die Peakfläche der Kontrolle von den Peakflächen der Inkubationen abgezogen. Daraus resultierten allerdings noch geringe Flächen unter der Kurve, welche auf den Ansatz extrapoliert den angegebenen Werten entsprachen.

Ein ähnliches Bild ergaben die Aufnahmeversuche des Epigallocatechingallates mit den HepG2 Zellen. Hier zeigte sich, dass die Aufnahme rate des EGCGs zu späteren Zeitpunkten deutlich weniger stark abflachte. Sie lag aber insgesamt signifikant niedriger als in den Hct116 Zellen. Die intrazelluläre Menge an Epigallocatechingallat erreichte nach 6 h nur 0,35 ng EGCG/ $\mu$ g Protein. Die Wiederfindungsrate war mit ca. 55 % wie schon in der Hct116 Zelllinie niedrig. Der Verlust muss auf initiale Prozesse zurückzuführen sein, da während der verschiedenen Zeiträume nur eine geringe Abnahme der extrazellulären EGCG-Menge detektiert wurde. Die niedrige Wiederfindungsrate ist wahrscheinlich methodisch begründet. Um lokale Konzentrationsspitzen zu vermeiden, wurde die Ascorbinsäure in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt und vor der Zugabe des Epigallocatechingallates mit ca. 1 ml Medium vermischt. Dieses Homogenat aus Ascorbinsäure, Medium und Epigallocatechingallat wurde anschließend in den Versuchsansatz rücküberführt. Somit war der Großteil des Mediums (7 ml) noch nicht durch die Ascorbinsäure konditioniert, was zu einer schnellen Degradation des EGCGs geführt haben könnte.

Für keines der bisher vorgestellten Flavonoide konnten Unterschiede in der Zellakkumulation nachgewiesen werden. Daher ist der für EGCG nachgewiesene signifikante Unterschied ein erster Hinweis auf aktive Aufnahmeprozesse in die Zellen. Die Theorie einer aktiven Aufnahme wurde durch die Inkubation bei 4 °C untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte nach einer Inkubationszeit von 4 h intrazellulär annähernd kein Epigallocatechingallat nachgewiesen werden. Der pH-Wert des Mediums driftet ohne  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Puffersystem (5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank) vom neutralen in leicht basische pH-Werte. Unter alkalischen Bedingungen ist die Degradation der Flavonoide erhöht, daher wurde die Referenz bei 37°C ebenfalls ohne  $\text{CO}_2$ -angereicherte Atmosphäre inkubiert. Dadurch kann auch die im Vergleich zu der Standardmethode geringere Menge an intrazellulärem EGCG bei diesen Versuchsansätzen erklärt werden. Der Befund einer aktiven Aufnahme wird durch Ergebnisse von Vaidyanathan und Walle gestützt. Sie koinkubierten Caco2 Zellen mit verschiedenen Phloretinkonzentrationen, einem Monocarboxylat Transporter (MCT) Inhibitor, und Epicatechingallat. Nach einer einstündigen Inkubationsphase konnten sie eine konzentrationsabhängige Abnahme der intrazellulären Epicatechingallatmenge nachweisen (Vaidyanathan und Walle 2003). Die Zeitabhängigkeit der Flavonoidakkumulation wurde von den Autoren nur in der ersten Stunde erfasst.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine aktive Regulation der intrazellulären Konzentration an Flavonoid im Einzelfall untersucht werden sollte. Nach den

Ergebnissen der Arbeit ist eine aktive Aufnahme von Flavonoiden hauptsächlich bei polaren Konjugationen beobachtbar. Neben der erhöhten Polarität, vergrößern die Konjugate zeitgleich das Molekül was eine Diffusion über die Membran verringert. Somit treten intrazelluläre Mengen erst zu späteren Zeitpunkten auf. Neben den hier dargelegten Ergebnissen, sowie der von Vaidyanathan und Walle berichteten Beteiligung des MCTs an der Aufnahme des Epigallocatechins, weist auch die von Day et al. (2003) postulierte Aufnahme von glykosiliertem Quercetin unter Beteiligung des Natriumabhängigen Glucose Transporters (SGLT), auf eine generelle Beteiligung von Transportern bei der Aufnahme von (mit polaren Verbindungen) konjugierten Flavonoiden hin. Eine aktive Aufnahme der nicht konjugierten Flavonoide kann nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund der höheren Lipophilie verglichen mit konjugierten Flavonoiden unwahrscheinlich. Die transporterunabhängige Aufnahme der nicht-konjugierten Flavonoide wird auch durch mehrere Permeabilitätsstudien mit Caco2 Zellen im Monolayer-Experiment verdeutlicht (z.B. Tian et al. 2009).

### **5.3.3 Aufnahme des Quercetin in den multizellulären Organismus *C. elegans***

Für eine systemische Wirkung ist die Aufnahme der Flavonoide in den Organismus essentiell. Nachdem in der Zellkultur die Aufnahme der Flavonoide in die Zellen gezeigt werden konnte, sollte die Aufnahme der Flavonoide in einen multizellulären Organismus ebenfalls nachgewiesen werden. Dazu wurde der Nematode *C. elegans* für 20 h in quercetinhaltigem Medium kultiviert. Aufgrund der berichteten Autooxidation des Quercetins im Medium wurde zuvor die Stabilität des Flavonols im Wachstumsmedium in Vorversuchen bestätigt. Die Kultivierung des Nematoden führte zu einer detektierbaren Menge an Quercetin in den Fadenwürmern. Die Identität des Peaks wurde durch seine Retentionszeit und das UV-Spektrum als Quercetin bestätigt. Dies legt eine Aufnahme des Quercetins in den Fadenwurm nahe. Die niedrige Menge an detektiertem Quercetin (ca. 0,1 nmol/1000 Individuen) ist in Übereinstimmung mit Befunden der Literatur, dass die Bioverfügbarkeit von verabreichten Pharmaka in *C. elegans* generell gering ist (Gruber et al. 2009). Eine rein äußerliche Anlagerung des Quercetins durch hydrophobe Wechselwirkung mit der Cuticula des Fadenwurms erscheint, aufgrund weiterer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bei denen nach einer Inkubationszeit von 1,5 h und 3 h kein Quercetin in den Fadenwürmern detektiert werden konnte, unwahrscheinlich (Kampkotter et al. 2007). Die intrazelluläre Lokalisation des Quercetins wurde durch die Fluoreszenzlöschung des Alterspigments Lipofuszin nachgewiesen. Dieses akkumuliert in dem Nematoden nur in den Darmzellen und resultiert aus oxidativer Degeneration und Autophagie zellulärer Bestandteile (Kampkötter et al. 2007). Bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm emittiert Lipofuszin blaues Licht. In den Darmzellen der Kontrolltiere wurde die Emission des blauen Lichtes des Alterspigments

Lipofuszin (Optimum: 340 nm<sub>ex</sub>:430nm<sub>em</sub>) nachgewiesen, während bei den mit Quercetin inkubierten Nematoden die Emission von grünem Licht detektiert wurde. Fluoreszenzlöschungen benötigen räumliche Nähe (u.a. FörsterResonanceEnergyTransfer), daher ist diese Verschiebung der Emission vermutlich auf eine direkte Interaktion des Quercetins mit dem Lipofuszin zurückzuführen. Eine mögliche Überlagerung der Fluoreszenz des Lipofusins durch die Eigenfluoreszenz des Quercetins erscheint aufgrund der Intensität der Lipofuszinfluoreszenz und der gesetzten Filter unwahrscheinlich. Nifli et al. (2007) beschrieben in ihrer Studie eine schwache Fluoreszenz des Quercetins mit 335 nm<sub>ex</sub>/390 nm<sub>em</sub>. Optimale Bedingungen lägen bei  $\lambda_{ex}$ : 430 nm und  $\lambda_{em}$ : 500 nm. Bei der Akkumulation im Zellinneren sei ein Shift zu  $\lambda_{ex}$ : 488 und  $\lambda_{em}$ : 530 nm zu detektieren. Die beobachtete Grünverschiebung ist somit auf die Fluoreszenzlöschung durch Quercetin zurückzuführen. Die erstmals gezeigte Aufnahme von Flavonoiden in den Nematoden könnte (durch eine Optimierung der Flavonoiddetektion mit Hilfe der Fluoreszenztechnik) die Untersuchung der Aufnahmekinetik von Flavonoiden in dem Modellorganismus deutlich vereinfachen.

#### 5.4 Untersuchungen zu zellulären Wirkungen der Flavonoidmetabolite

In den vorangegangenen Unterpunkten konnte für Flavonoide mit vicinalen Hydroxylgruppen im aromatischen B-Ring eine Methylierung nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 6 h betrugen die Mengen 18 % (Quercetin in HepG2 Zellen) bzw. 30 % (Luteolin in Hct116 Zellen) des ursprünglich verabreichten Flavonoids. Der Metabolismus trat dabei in Zellen auf, welche auch *in vivo* Flavonoide metabolisieren können (Kolon und Leber). Aufgrund der hohen Menge an gebildetem Metabolit wurde deren pharmakologische Wirkung, verglichen mit der jeweiligen Muttersubstanz, in den HepG2 und Hct116 Zellen untersucht.

##### 5.4.1 Untersuchungen zur Art des Zelltodes

Neben den schon dargelegten Veränderungen im antioxidativen Potential und der teilweise deutlich erhöhten Zytotoxizität der Metabolite, wird in diesem Abschnitt auf die Art des Zelltodes bei einer Inkubation mit Quercetin und seinen Derivaten bzw. bei einer Inkubation mit Luteolin und seinen Derivaten eingegangen. Obwohl seit langem bekannt ist, dass Isorhamnetin-Konjugate *in vivo* neben den Quercetin-Konjugaten die Hauptmetabolite darstellen, sind nur wenige vergleichende Studien zwischen den beiden Aglyka durchgeführt worden. Eine Konjugation mit Phase-II-Substituenten wird im Allgemeinen als Signal für die nahende Exkretion gewertet. Neuere Erkenntnisse belegen, dass die Konjugate wie z.B. Quercetin-3- $\beta$ -Glucuronid *in vitro* ebenfalls regulierend auf Signalwege der Zellen einwirken können (Yoshizumi et al. 2002). Zusätzlich konnte in einer weiteren Studie eine Akkumulation der Konjugate in Zielzellen nachgewiesen werden, welche dort intrazellulär

wieder zum Aglyka hydrolysiert wurden (Kawai et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde Quercetin zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse parallel zum Isorhamnetin untersucht.

Die Inkubation der HepG2 Zellen mit Isorhamnetin führte nach 24 h zu einem dosisabhängigen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität in den Zellen, während die Inkubation mit Quercetin keine Auswirkung auf die Caspase-3/7-Aktivität hatte. Tang et al. (2009) konnten bei einer Inkubation von HepG2 Zellen mit Quercetin eine signifikante Verdoppelung der Caspase-3/7-Aktivität detektieren. Im nächsten Schritt wurde daher die Zeitabhängigkeit der Caspase-Aktivierung untersucht. Hier stieg die Caspase-Aktivität über den Inkubationszeitraum bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin kontinuierlich an. Sie erreichte nach 48 h eine ca. 5-fache Aktivitätssteigerung welche in der statistischen Analyse nicht signifikant gegenüber der Kontrolle war. Aufgrund der unterschiedlich langen Ruhephasen der für 24 h inkubierten Zellen, sind die in diesem Versuch erhobenen Daten nicht direkt mit denen der Dosisabhängigkeit zu vergleichen. Die Aktivität der Caspase-3/7 erreichte bei der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin zwischen 24 h und 48 h ein Maximum, wobei die Aktivität nach 40 h den höchsten ermittelten Wert erreichte. Dieser Wert zeigte eine um den Faktor 15 erhöhte Aktivität der Caspase-3/7. Der Abfall der Caspaseaktivität bei dem 48 h Wert ist vermutlich auf die zytotoxische Wirkung des Isorhamnetins in der getesteten Konzentration zurückzuführen. Im MTT-Assay lag die Überlebensrate unter vergleichbaren Bedingungen bei ca. 20 %.

Eine Aktivierung der Caspase-3 nach einer Inkubation mit Flavonoiden konnte von Lee et al. (2009) in Lungenkrebszellen durch eine zeitabhängige Spaltung der Procaspase-3 nachgewiesen werden. Gleichzeitig führte die Inkubation der Zellen zu einer Abnahme der Procaspase-9, wobei die Spaltprodukte nicht dargestellt wurden. Neben der Spaltung der Procaspase-3 konnte Lee nach einer Inkubation der Zellen mit 40  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin für 24 h die oligonukleosomale DNA-Fragmentation nachweisen. Im selben Zeitfenster konnte in der vorliegenden Arbeit mit HepG2 Zellen bei einer Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin keine distinkten Banden im Agarosegel nachgewiesen werden. Erst bei der Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin war in den HepG2 Zellen die oligonukleosomale Fragmentierung der DNA deutlich zu erkennen. Quercetin konnte in beiden Konzentrationen keine oligonukleosomale DNA-Fragmentation induzieren. Das niedrigere proapoptotische Potential des Quercetins verglichen mit Isorhamnetin konnte somit in zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen werden. Die dazu benötigten Konzentrationen differieren in den Methoden. Ursache hierfür sind vermutlich die unterschiedlichen Zellzahlen. Eine höhere Konfluenz der Zellen vermittelt meist eine höhere Resistenz gegen Stress. Um eine ausreichende Menge DNA für den Kern-Fragmentations-Assay zu erhalten, mussten diese vor der Inkubation

annähernd konfluent vorliegen. Daher war hier auch eine höhere Konzentration zur Induktion von Apoptose notwendig.

Die simultane Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate erfolgte mittels Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung. Die dort erhobenen Daten unterliegen einer starken Streuung und dienen daher nur als unterstützende Methode. Vor allem apoptotische Zellen, welche sich durch die Schrumpfung der Zellen aus dem Zellverband lösen, werden in dieser Methode nicht gut erfasst. Dies resultiert aus dem Aufschwimmen der Zellen, wodurch eine Zentrifugation des Überstandes nötig ist, um diese Zellen zu erfassen. Bei der Rücküberführung der Zellen können daher lokale Unterschiede in der Menge an apoptotischen Zellen nicht vermieden werden. Vermutlich ist dies der Grund für den höheren apoptotischen Index des Quercetins gegenüber dem des Isorhamnetins. Aufgrund des geringeren apoptotischen Potentials wurde bei der Quercetininkubation die gerade beginnende Apoptose mancher Zellen gut detektiert, während die Apoptose in den mit Isorhamnetin behandelten Zellen schon weiter fortgeschritten war. Aus diesem Grund waren mehr Zellen aufgeschwommen, was die Fehlerrate steigerte.

Der mit dieser Methode detektierte Anstieg der Nekroserate bei einer Inkubation der HepG2 Zellen mit Isorhamnetin, wurde durch die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Überstand der Zellen verifiziert. Im Medium der Zellen stieg nach einer 24 h Inkubation mit Isorhamnetin die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität konzentrationsabhängig auf über 30 % der maximal detektierten Aktivität an. Gleiche Inkubationsbedingungen veränderten die LDH-Aktivität im Überstand der mit Quercetin behandelten Zellen nicht. Somit konnte der mit der Propidiumiodid-Färbung vermutete Anstieg der Nekroserate bei einer Inkubation mit Isorhamnetin mit einer zweiten Methode erhärtet werden. Quercetin induzierte auch in dieser Methode die Nekrose nicht. Der Anstieg der Nekroserate bei einer Inkubation mit Isorhamnetin könnte auch auf eine Sekundärnekrose zurückzuführen sein. *In vivo* werden apoptotische Zellen im Allgemeinen von Makrophagen phagozytiert. In der Zellkultur, wo diese Makrophagen fehlen, nimmt die Membranintegrität der Zellen im Verlauf der Apoptose ab, so dass spätapoptotische Zellen in den Nekrosenachweisen ebenfalls positiv gewertet werden können. Isorhamnetin induzierte die Caspase-3/7-Aktivität deutlich früher als Quercetin, so dass nach 24 h (Zeitpunkt der Nekrosedetektion) die Membranintegrität der apoptotischen Zellen schon gestört gewesen sein könnte. Die höhere Zytotoxizität des Isorhamnetins wird somit wahrscheinlich über eine Induktion von Apoptose vermittelt.

#### **5.4.2 Einfluss von Quercetin und Isorhamnetin auf MAPKinasen**

Um molekulare Mechanismen des apoptotischen Zelltodes zu untersuchen, wurde die Modulation der MAPKinasen durch eine Inkubation der Zellen mit den Flavonoiden untersucht.

Die JNK wird als proapoptotische Kinase oder Stresskinase bezeichnet. Sie wird unter anderem durch eine Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  phosphoryliert (Yoshizumi et al. 2000). Eine Behandlung der HepG2 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin oder 50  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin resultierte im Inkubationszeitraum (1 h bis 4 h) in keiner erhöhten Phosphorylierung der JNK. Analog hierzu konnten Spencer et al. (2003) ebenfalls keine differentielle Phosphorylierung der JNK in primären Neurozyten durch eine Inkubation mit Quercetin nachweisen. In Einklang mit Befunden von Yoshizumi et al. (2000) wurde die JNK durch eine Inkubation der Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  phosphoryliert. Eine Aktivierung dieses proapoptotischen Signalweges durch die Inkubation der Zellen mit den Flavonoiden ist somit unter den gegebenen Bedingungen unwahrscheinlich. Es gibt in der Literatur wenige Befunde einer direkten Aktivierung des Signalweges durch die Inkubation mit Flavonoiden. Die Fähigkeit des Quercetin die Phosphorylierung der JNK nach vorheriger Induktion zu erniedrigen scheint dagegen allgemeiner Konsens, da dies schon von mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen Stressoren nachgewiesen wurde (Übersichtsartikel: Williams et al. 2004).

Eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPKinase durch eine Inkubation der Zellen für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen an Flavonoid konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht detektiert werden. Eine Inhibition der p38 Phosphorylierung durch Flavonoide bei vorangegangener Induktion des Signalweges wird in der Literatur häufiger beschrieben. Berichte über eine Induktion der basalen Phosphorylierung der p38 Kinase sind in der Literatur gegenläufig. Die Effekte variieren je nach Zeitpunkt, Konzentration und verwendeter Zelllinie. Die Kinetik der p38 Phosphorylierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da in dem getesteten Zeitraum eine Interaktion mit der JNK (durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  Inkubation) und der ERK bei gleichzeitigen morphologischen Veränderungen der Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die ERK1/2 ist unter den verwendeten Versuchsbedingungen (10 % FCS im Medium) konstitutiv aktiv. Eine Inkubation (2 h) der Zellen führte schon ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids zu einer Abnahme dieser ERK-Phosphorylierung. Die ERK-Phosphorylierung war bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  innerhalb einer Stunde auf 25 % bis 45 % reduziert (Quercetin bzw. Isorhamnetin). Dieser Unterschied war nicht signifikant und die Phosphorylierung der ERK blieb bei einer Inkubation mit Quercetin auf dem Niveau von ca. 20 %. Für Isorhamnetin deutete dieser Versuch eher auf eine Zeitabhängigkeit hin, da die ERK-Phosphorylierung bis zu 4 h konstant abnahm. Aufgrund dieses sehr frühen Effekts wurde die Morphologie der Zellen in dem getesteten Zeitraum dokumentiert. Die Morphologie der Zellen weist bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Isorhamnetin nach 2 h erste Veränderungen auf. Entgegen der normalen, flächig ausgefüllten Struktur bilden sich im Laufe der Inkubation in den Zellen Bereiche welche „leer“ erscheinen (ähnlich Vakuolen). Diese Veränderungen werden im zeitlichen Verlauf immer ausgeprägter und nach 6 h sind die Effekte des

Isorhamnetins deutlich. Mit Quercetin inkubierte Zellen deuten diese Veränderung ebenfalls an, erreichen aber nicht die Deutlichkeit der entsprechenden Isorhamnetininkubation.

Die detektierten Unterschiede im apoptotischen und nekrotischen Potential der Flavonoide spiegeln sich in dem deutlicheren Einfluss des Isorhamnetins auf die Morphologie der Zellen wieder. Da keine differentielle Regulierung der MAPKinasen ermittelt werden konnte sind die Unterschiede im zytotoxischen Potential vermutlich auf andere Signalwege zurückzuführen. In diesem Kontext erscheint eine Prolifationsinhibition der HepG2 Zellen durch die Dephosphorylierung der ERK sehr wahrscheinlich. Diese könnte die niedrigere Absorption im MTT-Assay der HepG2 Zellen nach einer 48 h Inkubation mit Quercetin erklären. Die Kontrolle proliferiert während der 48 h Inkubation kontinuierlich und erhöht dadurch die Anzahl der zur Reduktion des MTT befähigten Zellen. Eine auch in der Literatur beschriebene Hemmung der Proliferation durch die Inkubation mit Quercetin reduziert die Menge an Zellen zum Zeitpunkt der Farbreaktion und wird somit als „Reduktion der Viabilität“ erfasst. Isorhamnetin inhibiert die Proliferation der Zellen ebenfalls, setzt aber anscheinend einen weiteren zytotoxischen Stimulus und führt dadurch zusätzlich zum Zelltod der zum Zeitpunkt der Inkubation vorhandenen Zellen.

#### **5.4.3 Einfluss von Quercetin und Isorhamnetin auf NFκB**

Neben der Beeinflussung von MAPKinasen wurde als weiterer Signalweg NFκB untersucht. Die Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie vermitteln häufig proinflammatorische Signale von extrazellulären Stressoren, wie z.B. Zytokinen (TNF-α, IL-1), Lipopolysacchariden oder UV- und ionisierender Strahlung. Zusätzlich nehmen sie eine zentrale Rolle in der Regulation anti- und pro-apoptotischer Signale ein. Daher wurde der Effekt einer Flavonoidinkubation auf die NFκB-Aktivierung durch TNF-α untersucht. Die Vorinkubation der Zellen mit Quercetin führte zu einer nicht signifikanten Erniedrigung der TNF-α induzierten SEAP-Aktivität. Eine Vorinkubation mit mindestens 50 μM Isorhamnetin (1 h) reduzierte die induzierte Aktivität der sekretierten alkalischen Phosphatase im Überstand der Zellen signifikant. Die Reduktion der NFκB-abhängigen SEAP-Aktivität ist vermutlich zum Teil auf antioxidative Eigenschaften der beiden Flavonoide zurückzuführen. Die Familie der NFκB - Transkriptionsfaktoren wird auch durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert (Gwinn und Vallyathan 2006). In TNF-α stimulierten Zellen konnten z.B. Lee et al. (2009) zeigen, dass die intrazelluläre Menge an reaktiven Sauerstoffspezies zunimmt. Somit wurde durch die Gabe der antioxidativ wirksamen Flavonoide Quercetin und Isorhamnetin (siehe 4.1.1.2) wahrscheinlich das intrazelluläre ROS-Niveau reduziert, was zu einer niedrigeren NFκB-Aktivität in den Zellen führte. Diese erniedrigte NFκB -Aktivität spiegelt sich in der Abnahme der Aktivität der sekretierten alkalischen Phosphatase wieder. Diese These wird durch Befunde von Lee et al. 2009 gestützt, welche neben dem Nachweis des erhöhten ROS-

Niveaus in TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen eine Reduktion des TNF- $\alpha$  induzierten ROS-Status durch die Vorbehandlung der Zellen mit Quercetin nachwiesen.

Neben diesen rein antioxidativ vermittelten Effekten scheint es weitere Mechanismen der NF $\kappa$ B-Regulation zu geben. Ein Indiz dafür ist die tendenzielle Reduktion der basalen NF $\kappa$ B-Aktivität durch die Behandlung mit Isorhamnetin, während die Behandlung mit Quercetin keinen Einfluss auf die basale NF $\kappa$ B-abhängige SEAP-Aktivität hatte. Diese These wird durch Beobachtungen von Pang et al. (2006) gestützt. Sie wiesen, in TNF- $\alpha$  stimulierten Makrophagen, durch die Vorinkubation mit Kämpferol eine deutliche Reduktion des nukleären NF $\kappa$ Bs nach, ohne im DCF -Assay antioxidative Effekte von Kämpferol zu detektieren. Aufgrund der zentralen Rolle des Transkriptionsfaktors in proliferativen Prozessen der Zelle wird er durch eine Vielzahl von Signalwegen beeinflusst. Neben dem PI3K/Akt-Weg können auch die MAPKinasen JNK und p38 sowie die Proteinkinase C regulierend auf NF $\kappa$ B wirken. In dieser Arbeit wurden keine Effekte der Flavonoide auf die Phosphorylierung der MAPKinasen p38 und JNK in HepG2 Zellen festgestellt. Da Isorhamnetin die basale Aktivität der sekretierten Phosphatase tendenziell reduzierte, erscheint eine Beeinflussung der NF $\kappa$ B-Aktivität durch diese beiden Kinasen unwahrscheinlich. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen (mit bzw. ohne TNF- $\alpha$  Stimulus, andere Inkubationszeiten) kann eine Beteiligung allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Wechselwirkungen von Flavonoiden mit der Lipidkinase PI3K sind beschrieben worden (u.a. Lin et al. (2008)). Die Interaktion der Kinase mit dem NF $\kappa$ B-Signalweg ist ebenfalls bekannt und die Fähigkeit des Quercetin die Phosphorylierung verschiedener Kinasen nach vorheriger Induktion zu erniedrigen scheint Konsens zu sein. Dies wurde von mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen Stressoren nachgewiesen (Review Williams et al. 2004). Die Interaktion mit den Signalwegen, ohne eine vorherige Stimulation wird dagegen kontrovers diskutiert und scheint von den Inkubationsbedingungen, den verwendeten Flavonoiden und der Zelllinie abzuhängen. Eine Wechselwirkung der Flavonoide mit der PI3K ist in den HepG2 Zellen somit nicht unwahrscheinlich. Die Interaktion der Flavonoide mit diesem Signalweg wurde allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## **5.5 Aufnahme und Verteilung von Epigallocatechingallat im Rattenmodell**

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine regulierte Aufnahme des Epigallocatechingallats in verschiedenen Zellkultursystemen hin. Aufgrund von berichteten hepatotoxischen Wirkungen bei der Einnahme des stark Epigallocatechingallathaltigen Grünteeextraktes Exolise® im Menschen, welche zu einem Verbot des Produkts auf dem französischen und spanischen Markt führte, ist die Kenntnis einer möglichen Akkumulation der Verbindung *in vivo* von hoher Bedeutung (Übersichtsartikel zur hepatotoxischen Wirkung

des EGCG: Mazzanti et al. (2009)). Zusätzlich wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Fritsche unter physiologischen Konzentrationen Hinweise auf entwicklungsneurotoxikologische Effekte von EGCG in *in vitro*-Testsystemen gefunden (Daten: Dissertation Gassmann K.). Im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für Umweltmedizinische Forschung wurde daher die Aufnahme und Verteilung des Epigallocatechingallates in trächtigen Ratten und deren Nachkommen untersucht.

Die Plasmakonzentration der kontinuierlich behandelten Ratten lag unter dem Detektionslevel von 87 nM (entsprechend 40 ng/ml). Einzig im Plasma eines vorzeitig getöteten Tieres wurde Epigallocatechingallat detektiert (1,7 µg EGCG/ml Blut, entsprechend 3,6 µM). Zusätzlich konnte ein Metabolit mit einer erhöhten Retentionszeit detektiert werden (1,75 µg/ml mit der Eichreihe des Epigallocatechingallates). Aufgrund der Übereinstimmung der UV-Spektren von EGCG und der Verbindung handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Metaboliten des Epigallocatechingallates. Ein Literaturvergleich legt den Verdacht nahe, dass es sich bei dem Metaboliten um ein methyliertes Epigallocatechingallatderivat handelt. Meng et al. wiesen in Menschen-, Ratten- und Mäuseplasma das 4',4''-Dimethoxyepigallocatechingallat als Hauptmetaboliten im Plasma nach (Meng et al. 2002), wobei die Konzentration im Rattenplasma am höchsten war. Aufgrund der höheren Retentionszeit bei unverändertem UV-Spektrum handelt es sich vermutlich auch bei dem in dieser Arbeit detektierten Metaboliten um ein Methylderivat des EGCGs. In einer weiteren Arbeit wiesen Lu et al. (2003) an zytosolischen Leberfraktionen von Ratten und Menschen eine um Faktor 2,5 schnellere Methylierung des Epigallocatechingallates in der zytosolischen Leberfraktion der Ratte nach. Dies bestätigt die Befunde von Meng et al. und deutet auf eine geringere Relevanz des Metaboliten in Humanstudien hin. Da der Metabolit auch im humanen Plasma detektiert wurde, muss eine mögliche pharmakologische Wirkung des Metaboliten berücksichtigt werden.

Die Tatsache, dass nur im Plasma einer Ratte Epigallocatechingallat detektiert wurde, liegt vermutlich am Studiendesign dieser Arbeit. Um die Aufnahme des EGCGs in Form eines Nahrungsergänzungsmittels zu simulieren hatten alle Tiere jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Das vorzeitig getötete Tier litt unter einem Infekt und verlor in Folge dessen Gewicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass gehungerte Tiere höhere Plasmakonzentration an Epigallocatechingallat aufweisen, was auch in Humanstudien (u.a. Chow et al. (2005)) gezeigt werden konnte. Dieser Effekt erklärt die im Vergleich zu anderen Rattenexperimenten niedrigen Plasmakonzentrationen des EGCGs. In den meisten Fütterungsstudien wurden die Tiere vor der Behandlung mit den Teeextrakten über Nacht gefastet. Die Zusammenstellung mehrerer Arbeiten zeigt einen exponentiellen Anstieg der Plasmakonzentration bei steigender Dosierung. Daher wurde für die verwendete Dosis von 1000 mg/kg Körpergewicht eine Plasmakonzentration von ca. 10 µg/ml erwartet (siehe

Tabelle 31). Der freie Zugang zur Nahrung in unserem Versuchsdesign bewirkte somit, dass in keinem der gesunden Tiere Epigallocatechingallat im Plasma nachgewiesen werden konnte.

**Tabelle 31: Übersicht der in der Literatur ermittelten Plasmakonzentrationen an Epigallocatechingallat in SD-Ratten nach oraler Verabreichung.**

Die Tabelle fasst die in SD-Ratten ermittelten Plasmakonzentrationen an EGCG verschiedener Studien nach oraler Gabe zusammen. 1=(Chen et al. 1997), 2=(Chu et al. 2006), 3=(Chu et al. 2007), 4=(Unno und Takeo 1995), 5=(Xu et al. 2004), 6=(Zhu et al. 2000).

| Studie                         | 1    | 2    | 3    | 4   | 5    | 6    |
|--------------------------------|------|------|------|-----|------|------|
| Dosis [mg EGCG/kg KG]          | 75   | 150  | 155  | 300 | 1120 | 2500 |
| Plasmakonzentration<br>[µg/ml] | 0,02 | 0,29 | 0,27 | 0,2 | 17   | 112  |

Unerwarteter weise wurde das Epigallocatechingallat nach der Extraktion des Blutes nicht in der Ethylacetatphase sondern in der wässrigen Phase detektiert. Die getrocknete und in Methanol aufgenommene Ethylacetatphase musste 1:1 verdünnt werden, um eine Überladung der Trennsäule zu vermeiden. Eine Separierung der Ethylacetatphase mit Hilfe der Festphasenextraktion könnte dazu beitragen die Begleitsubstanzen zu entfernen und dadurch höher konzentrierte Proben zu injizieren. Der Verdünnungseffekt kann, aufgrund der zu erwartenden Anreicherung des EGCG in der Ethylacetatphase, nicht die einzige Erklärung für das Ausbleiben des Epigallocatechingallat-Peaks im Chromatogramm der Ethylacetatphase der behandelten Tiere sein. Eine weitere Erklärung könnte die Koagulation der Blutproteine liefern. Normalerweise wird Epigallocatechingallat im Blut an Plasmaproteine gebunden transportiert (Lin et al. 2007). Im Falle der Agulation der Proteine bildet sich eine Vernetzung, welche zu einer im Vergleich mit den einzelnen Proteinen verringerten Oberfläche führt, und zusätzlich als „molekulares Sieb“ fungieren könnte. Vielleicht führte dies zu einer erschwerten Extraktion des Epigallocatechingallates mit Ethylacetat.

In der erwähnten Literatur wurden die Blutproben vor dem Einfrieren zentrifugiert um das Plasma zu gewinnen. Dies war aufgrund der Menge an Blutproben in dieser Arbeit nicht in einer adäquaten Zeit zu gewährleisten. Daher wurde das Vollblut mit Ascorbinsäure und EDTA versetzt und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Dadurch wurde in dieser Arbeit immer Vollblut verwendet. Somit sind die relativ niedrigen Plasmakonzentrationen auf Unterschiede in den Fütterungsbedingungen und den unterschiedlichen Aufarbeitungen zurückzuführen.

Da Nahrungsergänzungsmittel vermutlich nicht komplett Nüchtern eingenommen werden, ist die Gabe der Substanzen nach einer 12 h Fastenzeit (während der eigentlich aktiven Zeit der Nager) artifiziell. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Epigallocatechingallat täglich

verabreicht, während in den zitierten Studien nur eine Einzeldosis appliziert wurde. Ein an diese Studien angepasstes Studiendesign hätte die Belastung der Tiere durch die tägliche Futterrestriktion stark erhöht. Dies ist zum einen nicht mit dem Tierschutzgedanken zu vereinbaren und andererseits führt dieser Stress zu Artefakten in der Entwicklung der Muttertiere und der Nachkommen.

Als Zielorgan konnte in dieser Arbeit neben der Leber auch die Lunge identifiziert werden. Die detektierten Mengen an Epigallocatechingallat sind in Tabelle 32 noch einmal zusammengefasst worden. Der Mittelwert aller behandelten Tiere ergibt eine deutliche Anreicherung des Epigallocatechingallates in der Leber und der Lunge. Hohe Konzentrationen an EGCG wurden in der Leber als erstem Kontaktorgan nach dem Eintritt in den Blutkreislauf erwartet. Allerdings sind die dort detektierten Mengen extrem hoch. Das gehungerte Tier E4 hat auch hier die höchste Belastung mit Epigallocatechingallat. Dies wird vermutlich aus der verbesserten Resorption resultieren (siehe Diskussion über die Plasmakonzentrationen). Die hohe Konzentration an EGCG in der Lunge des Tieres E3 ist nicht notwendigerweise auf eine Akkumulation des Epigallocatechingallates in der Lunge zurückzuführen, sondern könnte auch durch experimentelle Probleme bedingt sein. Da in der Leber ein Faktor 40 zwischen der höchsten und der niedrigsten detektierten EGCG-Konzentration ermittelt wurde, können die unterschiedlichen Mengen in den Lungen der Tiere (Faktor 48) auch aus individuellen Unterschieden bei der Aufnahme und Verteilung der Catechine resultieren. Eine hohe intraspezies Varianz wurde auch für die Plasmakonzentrationen im Menschen berichtet (Übersichtsartikel: Manach et al. 2005). Eine Anreicherung des Catechins in der Lunge ist auch ohne die Berücksichtigung des Tieres E3 zu beobachten.

**Tabelle 32: Zusammenstellung der ermittelten Epigallocatechingallat-Mengen in den Tieren.**

Dargestellt sind die ermittelten Mengen EGCG in µg pro g des jeweiligen Gewebes, sowie die Gesamtmenge pro Tier und die im Mittel detektierte Menge an EGCG in den jeweiligen Organen. In Klammern sind die internen Kürzel der Tiere angegeben. 1 ml Blut wurde als 1 g berechnet. n.d.: Nicht in der Probe detektiert, n.e.: Endpunkt nicht ermittelbar.

|             | Leber                                        | Lunge | Blut | Gehirn | Gesamt |
|-------------|----------------------------------------------|-------|------|--------|--------|
|             | Epigallocatechingallat in µg/g Feuchtgewicht |       |      |        |        |
| Tier 1 (E2) | 65,6                                         | 17,5  | n.e  | 0,8    | 84,8   |
| Tier 2 (E3) | 12,4                                         | 208   | n.d. | n.e.   | 220    |
| Tier 3 (E4) | 154,4                                        | 13,7  | 1,7  | 1,1    | 171    |
| Tier 4 (E5) | 1,1                                          | 4,3   | n.d. | 0,2    | 5,6    |
| Mittelwert  | 58                                           | 61    | 1,7  | 0,7    |        |

Neben der hohen Konzentration an Epigallocatechingallat konnten in Lunge und Leber Metabolite des Epigallocatechingallates detektiert werden. Die in den Geweben detektierten Metabolite entsprechen dabei nicht dem im Blutplasma detektierten Metaboliten. Die Metabolite der Lunge bzw. der Leber weisen verglichen mit dem Metaboliten des Blutplasmas eine stärkere Retardierung an der Säule auf.

Lu et al. (2000) wiesen an zytosolischen Leberfraktionen von Ratten eine von der verwendeten Konzentration abhängige Methylierung des Epigallocatechingallates nach. Bei Konzentrationen  $< 1 \mu\text{M}$  detektierten sie nach 20 Minuten Inkubationszeit hauptsächlich das dimethylierte 4',4''-Dimethoxyepigallocatechingallat. Bei höheren Konzentrationen ( $> 4 \mu\text{M}$ ) detektierten sie, unter ansonsten unveränderten Bedingungen, ausschließlich das monomethylierte 4'-Methoxyepigallocatechingallat. Daraus folgt, dass die Methylierung des Epigallocatechingallates bevorzugt an der 4'-Hydroxylfunktion erfolgt. Bei der Verwendung hoher Konzentrationen läuft dadurch erst die Methylierung zum 4'-Monomethylderivat ab, bevor dieses Derivat erneut methyliert werden kann. Demnach könnte es sich im Blut um das Monomethylderivat handeln, welches bei der hohen vorliegenden Konzentration nach der oralen Bolusgabe bevorzugt gebildet wird. Die Metabolisierung nach erneuter Aufnahme in verschiedene Gewebe resultiert dann in der Bildung weiterer Methylderivate. Des Weiteren konnten im Blut nur sehr geringe Mengen an Epigallocatechingallat detektiert werden. Aus dem Blutplasma aufgenommenes EGCG wird in den Geweben daher schnell in das 4',4''-Dimethoxyepigallocatechingallat metabolisiert, so dass in den Geweben kein monomethyliertes Epigallocatechingallat detektiert werden kann. Neben den wahrscheinlichen Methylderivaten konnten in der Leber und der Lunge weitere Substanzen mit einem dem EGCG vergleichbaren UV-Spektrum detektiert werden. Diese wurden weniger stark an der Säule retardiert und entsprechen daher vermutlich weiteren Phase-II-Konjugationen des Epigallocatechingallats und seiner Methylderivate. Glucuronidkonjugate des Epigallocatechingallates wurden unter anderem von Meng et al. (2002) in der Leber, der Niere und dem Dünndarm von Mäusen nach einmaliger oraler Gabe von Tee detektiert. Kida et al. (2000) wiesen nach der oralen Gabe von Epigallocatechingallat verschiedene Sulfat- und Glucuronidderivate des EGCGs und seiner Methylderivate in der Galle von Ratten nach. Die Existenz weiterer Phase-II-Konjugate in den Geweben der Ratte liegt somit nahe. Diese Konjugate traten außer in dem Lungenhomogenat des Tieres E3 (bei dem ein methodischer Fehler nicht ausgeschlossen werden kann und eine Bestimmung der Peakflächen nicht möglich war) nur in niedrigen Konzentrationen auf. Im Allgemeinen lag das Verhältnis zwischen Metaboliten (gesamt) und EGCG bei ca. 1 zu 10.

Aufgrund der Detektion des Epigallocatechingallates in den Gehirnen der Ratten scheint die Substanz über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn zu gelangen. Suganuma et al. (1998) wiesen nach der Gabe von tritiummarkiertem Epigallocatechingallat (p.o.) schon nach einer

Stunde im Gehirn von Mäusen Radioaktivität nach, welche von 6 h über 12 h bis zu 24 h anstieg. Spätere Zeitpunkte wurden nicht erfasst. Bei einer wiederholten Gabe 6 h nach der ersten wurden 6,8-fach höhere Werte in den Mäusegehirnen detektiert. Da Suganuma nur den Anstieg der Radioaktivität nachwies, ist nicht klar, ob diese von der Ursprungssubstanz oder eventuellen Metaboliten ausgeht. Eine Aufnahme des Catechins in seiner unkonjugierten Form in das Gehirn von Ratten konnten Nakagawa und Miyazawa nach einer einmaligen oralen EGCG-Applikation von 500 mg/kg KG (nach einer 24 h Fastenperiode) nachweisen (Nakagawa und Miyazawa 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte bei wiederholter Applikation von 1000 mg/kg KG durchschnittlich 1,5 nmol Epigallocatechingallat pro g Gehirn (entsprechend 0,7 µg/g) in den Ratten nachgewiesen werden.

In Gehirnen der potentiell mit EGCG exponierten Nachkommen wurde, vergleichend mit den Gehirnhomogenaten der Nachkommen der Kontrolltiere, ein geändertes Chromatogramm detektiert. Die Substanz eluierte mit 12,2 Minuten ca. 0,5 Minuten vor dem Epigallocatechingallat-Standard. Zusätzlich wies die Substanz ein gegenüber dem EGCG verändertes UV-Spektrum auf. In keinem Organhomogenat wurde ein Peak mit vergleichbarer Retentionszeit und UV-Spektrum detektiert. Da die Peaks nur in den Gehirnen der Nachkommen der behandelten Tiere auftraten und ein Übertritt von Epigallocatechingallat bei maternaler Exposition auf die Föten in einer früheren Studie gezeigt werden konnte (Chu et al. 2007), handelt es sich vermutlich um einen Metaboliten des Epigallocatechingallates. Aufgrund des geringen Unterschiedes in der Retentionszeit muss der Metabolit eine vergleichbare Hydrophilie aufweisen. Da die Plazenta für unpolare Verbindungen durchlässiger ist, könnte es sich bei dem Metaboliten um ein Methylderivat handeln, welches in den Föten weiter konjugiert und dadurch wieder polarer wurde. Vergleiche mit der Literatur geben keinen Rückschluss auf den Metaboliten. Chu et al. (2007) verwendeten bei ihren Versuchen zum Übertritt von Catechinen auf den Fötus bei maternaler Exposition eine Mischung verschiedener Catechinderivate. Dabei wäre die in der vorliegenden Arbeit detektierte Verbindung in den Chromatogrammen von Chu et al. von dem Epicatechinpeak überlagert gewesen. Während die Peakhöhe des EGCGs in allen fötalen Organen größer oder gleich der des Epicatechins war (außer im Plasma der Mutter), ist der Epicatechinpeak im Gehirn der Embryonen deutlich höher als der des Epigallocatechingallates. Dies könnte unter Umständen auf eine Koelution des Epicatechins mit der in dieser Arbeit detektierten Verbindung zurückzuführen sein.

In der Literatur gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Akkumulation von Epigallocatechingallat in Geweben. Zwei der publizierten Studien zur Akkumulation erfassten die Konzentrationen nach einer einmaligen intravenösen EGCG-Gabe. Tabelle 33 stellt eine

Zusammenfassung der Studien, welche EGCG in Organen von Nagern nachgewiesen haben, dar. Die Gabe der Reinsubstanz bzw. des Catechingemisches (Chen et al.) erfolgte jeweils nach vorheriger Futterrestriktion.

**Tabelle 33: EGCG-Mengen in verschiedenen Organen nach einmaliger Gabe.**

Die Tabelle fasst die in verschiedenen Organen detektierten Mengen an EGCG verschiedener Studien nach einmaliger Applikation zusammen. Chen et al. applizierten ein Catechingemisch, während Lambert et al. gereinigtes EGCG verabreichten. n.e.: Datenpunkt nicht angegeben, i.v.= intravenös, i.g.= intragastrisch. 1=(Chen et al. 1997), 2=(Lambert et al. 2003), 3=(Lambert et al. 2006).

| Studie | Spezies | Dosis | Applikation | Organgehalte [ $\mu\text{g}$ EGCG/g Feuchtgewicht] |       |       |      |          |
|--------|---------|-------|-------------|----------------------------------------------------|-------|-------|------|----------|
|        |         |       |             | Leber                                              | Niere | Lunge | Darm | Prostata |
|        |         | mg/kg |             |                                                    |       |       |      |          |
| 1      | Ratte   | 1,8   | i.v.        | 0,5                                                | 0,5   | 4     | 7    | n.e.     |
| 2      | Maus    | 10    | i.v.        | 1,6                                                | 1,0   | 1,2   | 1,6  | n.e.     |
| 3      | Maus    | 50    | i.g.        | 0,1                                                | n.e.  | n.e.  | 10   | 0,01     |
| 3      | Maus    | 200   | i.g.        | 0,5                                                | n.e.  | n.e.  | 42   | 0,02     |
| 3      | Maus    | 500   | i.g.        | 1,5                                                | n.e.  | n.e.  | 100  | 0,2      |
| 3      | Maus    | 2000  | i.g.        | 17                                                 | n.e.  | n.e.  | 130  | 0,9      |

Anhand der Tabelle wird ersichtlich das Epigallocatechingallat auch nach einer intravenösen Applikation in hohen Mengen im Darmgewebe zu detektieren ist. In der Maus konnten dort bis zu 7  $\mu\text{g}$  EGCG/g Gewebe nachgewiesen werden. Die Mengen an Epigallocatechingallat sind in den Geweben der Maus höher als in der Ratte. Chen et al. und Lambert et al. berichten von hohen EGCG-Mengen in der Lunge und der Leber der Tiere. Die orale Gabe verschiedener EGCG-Dosen in der Studie von Lambert et al. (2006) zeigt eine konzentrationsabhängige EGCG-Akkumulation. Diese scheint im Darmgewebe bei hohen Konzentrationen allerdings gesättigt zu werden, während sie in der Leber annähernd linear verläuft.

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung der Ratten von Gestationstag 13 bis 23 zu einer hohen Epigallocatechingallatmenge in den Organen der Tiere. Dies ist unter Umständen auf die verwendete hohe Dosis zurückzuführen, da auch das Tier E2, welches nur drei Behandlungen durchlief, vergleichbare Mengen an Epigallocatechingallat in den Organen aufwies. Da dieses Tier mit inneren Blutungen tot aufgefunden wurde, ist die Elimination des Epigallocatechingallates wahrscheinlich nicht vollständig abgelaufen und die ermittelten EGCG-Mengen sind hier überschätzt. Somit kann die in den anderen Tieren ermittelte hohe EGCG-Konzentration durchaus mit einer Akkumulation der Substanz in den Geweben erklärt werden. Ullmann et al. (2004) konnten in einer Repeated-Dose Humanstudie mit Epigallocatechingallat-Kapseln einen Anstieg der maximalen Plasmakonzentration und der  $\text{AUC}_{\infty}$  im mittleren und höchsten Dosierungsbereich (400 mg bzw. 800 mg, entsprechend 5,5 mg/kg bzw. 11 mg/kg KG) am Tag 10 verglichen mit Tag 1

nachweisen. Bei der höchsten Dosierung fiel die Plasmakonzentration innerhalb von 24 h nicht auf das basale Niveau zurück. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (ca. 2 h) variierte in den Gruppen nicht, allerdings war in dem mittleren und Hochdosis Bereich die Eliminationshalbwertszeit erhöht. Die erhöhte Bioverfügbarkeit (aufgrund der höheren  $AUC_{\infty}$ ) in dem hoch- und mittel Dosisbereich führten die Autoren auf die verlangsamte Elimination und die höhere Menge an im enterohepatischen Kreislauf zirkulierendem EGCG zurück.

Bei wiederholter Applikation des Epigallocatechingallates wurde eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Isbrucker et al. (2006) in gehungerten Hunden bestätigt. In einer 13 Wochen Studie wies er in allen Dosisbereichen (50 mg/kg/d, 150 mg/kg/d und 500 mg/kg/d) eine erhöhte maximale Plasmakonzentration und  $AUC_{\infty}$  im Blut, nach wiederholter Gabe von EGCG, nach. Bei Hunden mit freiem Zugang zu Nahrung waren diese Effekte nicht zu beobachten.

Die sehr hohen Gewebebelastungen mit EGCG welche in dieser Arbeit ermittelt wurden, zusammen mit der von Ullmann und Isbrucker gezeigten höheren Bioverfügbarkeit von EGCG in Ratten und Hunden, lassen eine Akkumulation von Epigallocatechingallat im Körper sehr wahrscheinlich erscheinen.

## **5.6 Abschlussbetrachtung – Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufnahme der verwendeten unpolaren und unkonjugierten Flavonoide in verschiedenen Zellkultursystemen keinem aktiven Transport unterliegt. Die Metabolisierungsrate in den Zellen variierte stark und lieferte nur in Hct116- und HepG2 Zellen nennenswerte Metabolitmengen. Bei den Metaboliten handelte es sich jeweils um die auch *in vivo* detektierten Methylderivate. Für die Methoxyderivate wurde eine verstärkte Zytotoxizität nachgewiesen, welche im Falle des Isorhamnetins (3'-Methoxyquercetin) durch die Induktion von Apoptose und Nekrose, und im Falle der Luteolinderivate durch die Induktion von Apoptose vermittelt wurde. Die Vermittlung der Effekte des Isorhamnetins in den HepG2 Zellen ist zumindest zum Teil auf die Dephosphorylierung der MAPKinase ERK zurückzuführen. Eine differentielle Regulation der ERK konnte schon nach kurzen Zeitpunkten (0,5 h, 50  $\mu$ M) und bei niedrigen Konzentrationen (5  $\mu$ M, 2 h) ermittelt werden.

*In vivo* werden nur die glucuronidierten und sulfatierten Formen des Quercetins und des Isorhamnetins im Plasma detektiert (Übersichtsartikel: Williamson und Manach (2005)). In zwei Humanstudien konnte die Quercetinplasmakonzentration durch eine wiederholte Gabe von Quercetin erhöht werden. Die Applikation von 1000 mg Quercetin/d über einen Zeitraum von 28 Tagen führte zu einer Plasmakonzentration von 1,5  $\mu$ mol/L 10 h nach der Einnahme

des Flavonoids (Conquer et al. 1998). Bei dieser Dosierung wurden keine adversen Effekte berichtet.

Es ist davon auszugehen, dass Nahrungsergänzungsmittel (Einzelsubstanzen oder Extraktkonzentrate) zum Teil in hohen Dosen eingenommen werden. Bei der Einnahme jeweils einer Kapsel pro Mahlzeit (je 500 mg) werden bei drei Mahlzeiten am Tag 1,5 g/d zusätzlich aufgenommen. Somit können auch *in vivo* Plasmakonzentrationen erreicht werden welche *in vitro* verschiedenste Effekte ausüben. Da eine biologische Aktivität der Konjugate wie z.B. Quercetin-3- $\beta$ -Glucuronid (Yoshizumi et al. 2002) sowie eine Akkumulation der Konjugate in Zielzellen und dortige Hydrolyse zum Aglyka *in vitro* nachgewiesen wurde (Kawai et al. 2008), ist eine Beeinflussung physiologischer Vorgänge bei einer Supplementierung der Nahrung mit Flavonoiden (insbesondere Quercetin) sehr wahrscheinlich.

Dieselbe Einschätzung muss für die Verwendung des Epigallocatechingallates bzw. den Grünteeextrakt als Nahrungsergänzungsmittel getroffen werden. Das Epigallocatechingallat liegt zu einem großen Teil nicht konjugiert im Blutplasma vor. Dort werden im Allgemeinen nur geringe EGCG-Konzentrationen (ca. 0,5  $\mu$ M nach einer einmaligen Gabe von 100-300 mg EGCG/kg bzw. 3,6  $\mu$ M in der vorliegenden Arbeit bei wiederholter Applikation von 1000 mg/kg) detektiert. Die systemische Verfügbarkeit stieg bei wiederholter Gabe des Epigallocatechingallates im Plasma von Hunden und Menschen an (Isbrucker et al. 2006 und Ullmann et al. 2004). Legt man die hohen Gewebekonzentrationen, welche in dieser Arbeit detektiert wurden, sowie die wenigen verfügbaren Literaturdaten zugrunde, scheint die niedrige Plasmakonzentration nach einer einzelnen Gabe auf einer schnellen Verteilung im Gewebe zu beruhen, da dort hohe Mengen an EGCG detektiert werden. Aufgrund der hohen Gewebebelastung bei gleichzeitig niedriger Blutkonzentration scheint Epigallocatechingallat in den Geweben zu akkumulieren. Dabei werden hohe interindividuelle Unterschiede beobachtet, so dass die Konzentrationen in einem Organ bei verschiedenen Tieren stark schwanken (z.B. Leber von 1,1  $\mu$ g/g bis 154  $\mu$ g/g).

Im Falle des EGCG kommt hinzu, dass Epigallocatechingallat auch als Mittel gegen Fettleibigkeit vermarktet wird (unter anderem Exolise®, welches auf dem spanischen und französischen Markt verboten wurde). Die Einnahme der Verbindung nach einer mehrstündigen Fastenperiode erhöht die Plasmaspiegel des Epigallocatechingallates deutlich. Eine der Studien, welche unterschiedliche Plasmakonzentrationen bei der oralen Gabe des EGCG an gefütterte bzw. nüchterne Tiere detektierte (Isbrucker et al. 2006), berichtet zeitgleich von schweren Nebenwirkungen der EGCG-Behandlung gehungerter Tiere. Bei allen Tieren der höchsten Behandlungsgruppe (500 mg/kg/d) und einigen der mittleren Dosis (150 mg/kg/d) wurde Erbrechen berichtet. Es kam in der höchsten Dosierung zu 3 und in der mittleren Dosierung zu 2 Todesfällen. Die Pathologie erbrachte den Befund

eines Falles einer Nekrose in den Tubuli der Niere, zwei Fälle von Lebernekrose und einen Fall von myokardialer Nekrose. Anhand der Gesamtstudie welche nach OECD Guideline 409 unter GLP-Konditionen durchgeführt wurde, leiteten die Autoren einen NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) von 500 mg/kg/d in den vor der Verabreichung des EGCG gefütterten Hunden und von 40 mg/kg/d in den gefasteten Tieren ab. Eine ähnliche Studie von Morita et al. (2009) über 6 Monate ergab in Ratten einen NOAEL von 400 mg/kg/d für männliche und 1200 mg/kg/d für weibliche Ratten (aufgrund von Gewichtsverlust und niedrigerem totalem Bewegungsratenscore höher). Befunde von Morita zeigen ebenfalls, dass die Embryoentwicklung bei maternaler Exposition bis zu 2000 mg/kg/d trotz maternaler Toxizität nicht gestört ist. Der NOAEL der Mütter liegt in dieser Studie bei 200 mg/kg/d (Morita et al. 2009). Aus den oben beschriebenen Studien lässt sich ein ADI (Acceptable Daily Intake) von 2 bis 5 mg/kg/d bei der Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 ableiten. Ullmann et al. (2004) verabreichten gesunden Freiwilligen über einen Zeitraum von 10 Tagen 800 mg/d EGCG ohne offensichtlich adverse Effekte (ein leichter aber reversibler Anstieg von ALT im Plasma eines Probanden).

Die Einnahme von Flavonoiden in Form von Nahrungsergänzungsmitteln sollte kritisch bewertet werden. Für das Epigallocatechingallat liegen mehrere Berichte über eine hepatotoxische Wirkung vor. Zusätzlich liegt die abgeleitete akzeptable tägliche Aufnahme mit ca. 5 mg/kg/d in einem Bereich, welcher durch die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln sehr schnell überschritten wird. Die Einnahme der in dieser Arbeit analysierten Flavonoide und anderer hochdosierter Nahrungsergänzungsmittel ist aufgrund berichteter Nebenwirkung solcher Präparate nicht empfehlenswert. Eine der bekanntesten Studien, welche adverse Effekte einer erhöhten Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln belegte ist die CARET-Studie (Omenn et al. 1996). In dieser Studie wurde ein erhöhtes Sterblichkeitsrisiko für Raucher bei der Einnahme von  $\beta$ -Carotin (30 mg/d) beobachtet.

Eine Verabreichung der Flavonoide im Rahmen einer Therapie bzw. als begleitende Maßnahme einer Therapie könnte nach vorherigen klinischen Studien aufgrund einer Vielzahl berichteter biologischer Wirkungen der Flavonoide durchaus sinnvoll sein. So erwies sich Quercetin in der Chemotherapie als gutes Adjuvans und verbesserte die Wirkung der verwendeten Therapeutika (Übersichtsartikel: Scalbert et al. (2005)).

Zusammenfassend erscheint die Einnahme von Flavonoiden als Monopräparat oder in Form hochkonzentrierter Extrakte ungeeignet für eine Krankheitsprävention oder um eine einseitige Ernährung „auszugleichen“. Das Verhältnis von Nutzen zu Risiko ist für die meisten Substanzen nicht eindeutig geklärt und muss daher für jede Substanz bzw. für jedes

Substanzgemisch einzeln in klinischen Studien erhoben werden, bevor eine Empfehlung ausgesprochen werden könnte.

### 5.7 Ausblick der Arbeit

Die transporterabhängige Aufnahme der Gallatester, welche in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, bedarf einer weiteren Charakterisierung. Dazu könnten neben pharmakologischen Transportinhibitoren verschiedene transporterdefiziente bzw. Transporter überexprimierende Zellen verwendet werden. Die Verwendung der Caco2-Monolayer-Methode stellt eine erwägbare Alternative zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsdesign dar. Allerdings bildet bisher nur diese Zelllinie eine effiziente Monolayerstruktur in den Einätzen aus, wodurch ein direkter Vergleich mit anderen Zelllinien nicht möglich ist.

Nach einer weiteren Optimierung der Detektions- und Aufarbeitungsmethoden (siehe Blut) mit dem noch vorliegenden Organmaterial, müsste die Akkumulation des Epigallocatechingallates im Gewebe bei einer längeren Gabe niedriger Dosen untersucht werden. Im Folgeversuch sollte eine konzentrationsabhängige Akkumulation in Zielgeweben bei Dosen von 10 mg/kg/d bis 50 mg/kg/d bei deutlich erhöhter Tierzahl (15 bis 20 Tiere pro Gruppe) analysiert werden. Der angegebene Konzentrationsbereich entspricht einer Dosis, welche eine 55 kg schwere Frau bei der Einnahme von 1 bis 6 Einheiten eines Präparates (0,5 g je) pro Tag aufnimmt. Dieses Einnahmeszenario deckt vermutlich neben dem Hochdosisbereich auch die normale Einnahme der Nahrungsergänzungsmittel weitgehend ab.

Neben der Erfassung der Zielgewebe sollten die in den Geweben exprimierten Transporter identifiziert werden. In einem weiteren Versuch mit transporterdefizienten Tieren kann dann die Beteiligung der (im besten Fall schon *in vitro* charakterisierten) Transporter an der Flavonoidhomöostase untersucht werden. Neben der Aufnahme und Verteilung der verabreichten Substanz kann mit beiden Versuchsansätzen die Verteilung der Metabolite erfasst werden. Nach der Identifikation der Metabolite kann deren pharmakologische Wirkung wie in dieser Arbeit für das Methoxyderivat des Quercetins geschehen *in vitro* untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Folgestudien sind für eine verlässliche Risikoabschätzung nicht nur im Verbraucherschutz sondern auch in der klinischen Anwendung von großer Bedeutung.

## 6. Zusammenfassung

---

### 6.1 Zusammenfassung

Ernährung, die stark auf pflanzlichen Produkten basiert, wird epidemiologisch mit einer reduzierten Inzidenz von unterschiedlichen degenerativen Krankheiten und Krebs korreliert. In den letzten Jahren entstand daher ein großes Angebot an polyphenolhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln und sogenanntem „Funktionale Food“. Wissen über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Flavonoiden sowie die pharmakologischen Wirkungen der Metabolite sind essentiell um die tatsächlich bioaktiven Substanzen zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Aufnahme strukturverwandter Flavonoide sowie deren Metabolitenprofile in verschiedenen Zellkultursystemen charakterisiert. Die maximale intrazelluläre Konzentration von 2 ng Flavonoid/ $\mu$ g Protein wurde schon nach kurzer Inkubationszeit (15 min) erreicht.

Die Verwendung pharmakologischer Transportinhibitoren bzw. die Inkubation bei 4°C führte zu keiner Veränderung der intrazellulären Flavonoidkonzentrationen. Dadurch konnte exemplarisch für Quercetin eine Beteiligung des aktiven Transports an der Flavonoidhomöostase in den verwendeten Zellkultursystemen ausgeschlossen werden. Quercetin und Luteolin, welche orthoständige Hydroxylgruppen im B-Ring aufweisen, wurden von der Hepatomzelllinie HepG2 und der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 in die Methoxyderivate Isorhamnetin bzw. Chrysoeriol oder Diosmetin umgesetzt. Die Methylierung im B-Ring bewirkte eine Abnahme des antioxidativen Potentials bei zeitgleich erhöhter Toxizität der Verbindungen. Die Induktion der Apoptose war bei beiden 3'-Methoxyderivaten, im Vergleich mit den Ausgangssubstanzen, in der HepG2- bzw. Hct116 Zelllinie stärker (DNA-Fragmentations-Assay, Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität). Eine Behandlung der HepG2 Zellen mit Isorhamnetin erhöhte zusätzlich die Anzahl nekrotischer Zellen (Laktat-Dehydrogenase-Aktivität, Propidiumiodid-Färbung). Die Luteolinderivate zeigten mit diesen Methoden keine Erhöhung der Nekroserate der Hct116 Zellen. Eine differentielle Phosphorylierung der MAPKinasen JNK und p38 in HepG2 Zellen durch eine Inkubation mit Quercetin bzw. Isorhamnetin konnte, mit Hilfe der Immunoblot-Methode, ausgeschlossen werden. Eine Reduktion der ERK-Phosphorylierung konnte für beide Substanzen, ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M (2 h Inkubation) und ab einer Inkubationsdauer von 30 Minuten (50  $\mu$ M), nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen (> 50  $\mu$ M) reduzierte Isorhamnetin die TNF- $\alpha$  induzierte NF $\kappa$ B-Aktivität stärker als Quercetin. In Aufnahmeversuchen mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte erstmals eine Aufnahme des Flavonoids Quercetin in den Fadenwurm nachgewiesen werden. Neben der Detektion des Quercetins im

Lysat der Fadenwürmer (HPLC) konnte auch eine selektive Aufnahme des Quercetins in die Darmzellen des Nematoden gezeigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zelluläre Effekte von Catechinderivaten untersucht. Aufnahmestudien mit Epigallocatechingallat (EGCG) in Hct116 und HepG2 Zellen ergaben eine zeitabhängige Aufnahme des Catechinderivates in beide Zelllinien. Es konnten in den Hct116 Zellen zwischen 0,5 µg EGCG/mg Protein (1 h) und 1,1 µg EGCG/mg Protein (6 h) detektiert werden. Die intrazellulären Konzentrationen in den HepG2 Zellen waren signifikant niedriger. Dies könnte als Hinweis auf spezielle Zielgewebe im Organismus gedeutet werden. Eine Inkubation der Hct116 Zellen bei 4°C führte zu einer deutlich niedrigeren Catechinakkumulation in den Zellen (0,04 ng/µg Protein vs. 0,4 ng/µg Protein nach 4 h), was eine aktive Aufnahme des Flavanols durch einen Transporter nahelegt.

Eine wiederholte Exposition von trächtigen Ratten mit EGCG (1000 mg/kg) führte zu großen individuellen Unterschieden in der detektierten Flavonoidmenge. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Leber (bis 154 µg EGCG/g Feuchtgewicht) und den Lungen (bis 208 µg EGCG/g Feuchtgewicht) nachgewiesen. In den Gehirnen akkumulierte deutlich weniger EGCG (maximal 1,1 µg EGCG/g Feuchtgewicht). Nur im Blut eines Tieres konnte EGCG nachgewiesen werden. Somit liegt eine gewebespezifische Akkumulation des EGCGs in den Tieren nahe. Die Gehirnhomogenate der potentiell exponierten Neugeborenen zeigten, im Vergleich zu nicht exponierten Tieren, ein verändertes Chromatogramm. Die Identität des zusätzlichen Peaks konnte jedoch nicht geklärt werden. Das veränderte Chromatogramm legt den Übergang des Catechinderivates bzw. eines seiner Metabolite in das Gehirn der Föten bzw. Neugeborenen nahe.

Die Interaktion von Flavonoiden mit intrazellulären Signalwegen bei niedrigen Konzentrationen (5 µM) und kurzen Inkubationszeiten (0,5 h) sind ein Hinweis für eine potentielle Wirkung der Flavonoide unter physiologischen Bedingungen auf den Menschen. Des Weiteren ist zu beachten, dass durch Metabolismus entstandene Derivate zum Teil eine erhöhte Zytotoxizität besitzen. Die Verwendung der Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel sollte daher, und aufgrund der gefundenen, teilweise hohen Gewebekonzentrationen sowie dem Übertritt des Epigallocatechingallats bzw. eines Metaboliten auf das Ungeborene, kritisch bewertet werden.

## 6.2 Summary

There is an increasing supply of dietary supplements rich in polyphenols. This is due to a correlation of a nutrition based on fruits and vegetables containing high amounts of these substances with a lower incidence of degenerative diseases and cancer in some epidemiological studies. However, the bioavailability and metabolism of polyphenols and

knowledge on pharmacological effects of those metabolites are essential to identify biological active compounds.

Therefore, we first examined the uptake and metabolism of related flavonoids in different cell-culture systems. Our results showed that the maximum concentration (2 ng flavonoid/ $\mu$ g Protein), which was detected intracellular, occurred within 15 minutes. Neither coincubation with different pharmacological transportinhibitors nor incubation at 4 °C altered the intracellular concentrations of flavonoids. Hence, involvement of transporters regulating the intracellular concentrations of flavonoids seems to be unlikely as shown for quercetin. Flavonoids possessing ortho-hydroxylgroups in the aromatic ring B (quercetin and luteolin) were methylated into the respective methylderivatives isorhamnetin and chrysoeriol or diosmetin. In HepG2 and Hct116 cells both 3'-methoxyderivatives exerted a higher toxicity than the parent compounds. This was accompanied by an induction of apoptosis (DNA-fragmentation-assay, caspase-3/7-activity). Isorhamnetin also increased necrotic cell death (lactate-dehydrogenase-assay, propidiumiodide-staining) in HepG2 cells while both methylderivatives of luteolin were not able to induce necrosis in Hct116 cells. Using immunoblotting-methods no alteration in phosphorylation of the MAPkinases JNK and p38 were observed. Incubation with 5  $\mu$ M quercetin and isorhamnetin (2 h), respectively, as well as incubation with both substances for 0,5 h (50  $\mu$ M) decreased the phosphorylation of the MAPkinase ERK. Isorhamnetin reduced TNF- $\alpha$  mediated NF $\kappa$ B-activity in higher concentrations (> 50  $\mu$ M). This effect was slightly superior compared to quercetin. An uptake of the flavonoid quercetin into the model organism *Caenorhabditis elegans* was shown for the first time. Beside the detection of quercetin in lysates of the nematode by means of HPLC-methods the accumulation in intestinal cells was proofed additionally.

The second part of the thesis dealt with cellular effects of catechinderivatives. Epigallocatechin gallate (EGCG) was taken up in a time-dependent manner into Hct116 and HepG2 cells. In Hct116 cells 0,5 ng EGCG/ $\mu$ g protein (1 h) up to 1,1 ng EGCG/ $\mu$ g protein (6 h) were detected, while HepG2 cells accumulated significant lower amounts of the catechinderivative (0,4 ng EGCG/ $\mu$ g protein after 6 h). This could imply specific target tissues in the body accumulating high amounts of this compound. Incubation of Hct116 cells with EGCG at 4°C significantly lowered the intracellular catechin concentrations (0,04 vs. 0,4 ng EGCG/ $\mu$ g Protein), indicative for an active absorption into the cells.

Exposing pregnant rats to EGCG (1000 mg/kg) led to high interindividual differences in catechin concentrations. Liver and lung (up to 154 and 208  $\mu$ g EGCG/g wet weight, respectively) showed the highest concentrations of EGCG. The concentrations found in brain were far lower (maximum 1,1  $\mu$ g/g wet weight) and only one blood sample showed detectable amounts of EGCG. Thus, an accumulation of EGCG in specific tissues seems to be likely. Newbornes of treated rats showed a different pattern in the HPLC-chromatogram

compared to newborns of non-treated rats. Identity of this peak could not be proven. However, appearance of this additional peak in chromatograms of potentially exposed newborns suggests a transfer of EGCG or a metabolite from the mother to the embryonic system.

Interactions of flavonoids with intracellular signaling pathways in low concentrations (5  $\mu\text{M}$ ) and after short incubation times (0,5 h) implicate potential effects of flavonoids on human health even under physiological conditions. The higher toxicity of some metabolites needs further attention with respect to a dietary supplementation with polyphenols. Additionally, the high concentrations found in different tissues as well as the transfer into the embryonic system should lead to a critical examination of a dietary supplementation with polyphenols.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Abbas, S. and M. Wink (2009). "Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*." *Planta Med* **75**(3): 216-21.
- Afaq, F., N. Ahmad, et al. (2003). "Suppression of UVB-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B by green tea polyphenol in SKH-1 hairless mice." *Oncogene* **22**(58): 9254-64.
- Bernard, D., B. Quatannens, et al. (2001). "Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase." *Cancer Res* **61**(6): 2656-64.
- Bieza, K. and R. Lois (2001). "An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics." *Plant Physiol* **126**(3): 1105-15.
- Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* **286**(5443): 1358-62.
- Boulton, D. W., U. K. Walle, et al. (1998). "Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins." *J Pharm Pharmacol* **50**(2): 243-9.
- Boulton, D. W., U. K. Walle, et al. (1999). "Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism." *J Pharm Pharmacol* **51**(3): 353-9.
- Butkovic, V., L. Klasinc, et al. (2004). "Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals." *J Agric Food Chem* **52**(10): 2816-20.
- Chang, H., M. Mi, et al. (2008). "Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro." *Arch Pharm Res* **31**(9): 1137-44.
- Chen, L., M. J. Lee, et al. (1997). "Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats." *Drug Metab Dispos* **25**(9): 1045-50.
- Chow, H. H., I. A. Hakim, et al. (2005). "Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals." *Clin Cancer Res* **11**(12): 4627-33.
- Chu, K. O., C. C. Wang, et al. (2006). "Pharmacokinetic studies of green tea catechins in maternal plasma and fetuses in rats." *J Pharm Sci* **95**(6): 1372-81.
- Chu, K. O., C. C. Wang, et al. (2007). "Uptake and distribution of catechins in fetal organs following in utero exposure in rats." *Hum Reprod* **22**(1): 280-7.
- Cipollini, D., R. Stevenson, et al. (2008). "Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects." *J Chem Ecol* **34**(2): 144-52.
- Conquer, J. A., G. Maiani, et al. (1998). "Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects." *J Nutr* **128**(3): 593-7.
- Conseil, G., H. Baubichon-Cortay, et al. (1998). "Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 9831-6.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Nat Prod Rep* **26**(8): 1001-43.
- Csupor-Löffler, B., Z. Hajdu, et al. (2009). "Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines." *Phytother Res* **23**(5): 672-6.
- Day, A. J., F. J. Canada, et al. (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." *FEBS Lett* **468**(2-3): 166-70.
- Day, A. J., J. M. Gee, et al. (2003). "Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter." *Biochem Pharmacol* **65**(7): 1199-206.
- Day, A. J., F. Mellon, et al. (2001). "Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin." *Free Radic Res* **35**(6): 941-52.
- de Bruin, E. C. and J. P. Medema (2008). "Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response." *Cancer Treat Rev* **34**(8): 737-49.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-67.
- Di Pietro, A., C. Godinot, et al. (1975). "Pig heart mitochondrial ATPase : properties of purified and membrane-bound enzyme. Effects of flavonoids." *Biochimie* **57**(8): 959-67.
- Dominik, A. and Steinhilber, D. (1996). *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten*, Jungjohann Verlag/Gustav Fischer Verlag.
- Egert, S., A. Bosy-Westphal, et al. (2009). "Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-

- cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study." *Br J Nutr* **102**(7): 1065-74.
- Egert, S., S. Wolfram, et al. (2008). "Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans." *J Nutr* **138**(9): 1615-21.
- Fogh, J., W. C. Wright, et al. (1977). "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors." *J Natl Cancer Inst* **58**(2): 209-14.
- Foo, R. S., K. Mani, et al. (2005). "Death begets failure in the heart." *J Clin Invest* **115**(3): 565-71.
- Gerstbrein, B., G. Stamatatos, et al. (2005). "In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Aging Cell* **4**(3): 127-37.
- Goodman, G. E., M. D. Thornquist, et al. (2004). "The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements." *J Natl Cancer Inst* **96**(23): 1743-50.
- Gradolatto, A., M. C. Canivenc-Lavier, et al. (2004). "Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver." *Drug Metab Dispos* **32**(1): 58-65.
- Graf, B. A., W. Mullen, et al. (2005). "Disposition and metabolism of [2-<sup>14</sup>C]quercetin-4'-glucoside in rats." *Drug Metab Dispos* **33**(7): 1036-43.
- Granado-Serrano, A. B., M. A. Martin, et al. (2006). "Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2)." *J Nutr* **136**(11): 2715-21.
- Grimm, T., S. Schneider, et al. (2005). "EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX." *Blood* **105**(8): 3263-9.
- Gruber, J., L. F. Ng, et al. (2009). "Deceptively simple but simply deceptive--*Caenorhabditis elegans* lifespan studies: considerations for aging and antioxidant effects." *FEBS Lett* **583**(21): 3377-87.
- Gupta, S., K. Hastak, et al. (2004). "Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis." *Oncogene* **23**(14): 2507-22.
- Gwinn, M. R. and V. Vallyathan (2006). "Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **9**(1): 27-39.
- Hall, D. H., R. Lints, et al. (2006). "Nematode neurons: anatomy and anatomical methods in *Caenorhabditis elegans*." *Int Rev Neurobiol* **69**: 1-35.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- Hertog, M. G., D. Kromhout, et al. (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study." *Arch Intern Med* **155**(4): 381-6.
- Hibasami, H., A. Mitani, et al. (2005). "Isolation of five types of flavonol from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) and induction of apoptosis by some of the flavonols in human promyelotic leukemia HL-60 cells." *Int J Mol Med* **15**(5): 805-9.
- Hong, J., H. Lu, et al. (2002). "Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells." *Cancer Res* **62**(24): 7241-6.
- Hwang, M. K., N. R. Song, et al. (2009). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: its direct inhibition by quercetin." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(7): 1592-600.
- Isbrucker, R. A., J. A. Edwards, et al. (2006). "Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies." *Food Chem Toxicol* **44**(5): 636-50.
- Ishikawa, T., M. T. Kuo, et al. (2000). "The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design." *Clin Chem Lab Med* **38**(9): 893-7.
- Jedlitschky, G., U. Hoffmann, et al. (2006). "Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**(3): 351-66.
- Jones, D. J., J. H. Lamb, et al. (2004). "Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity." *Br J Cancer* **91**(6): 1213-9.
- Kampkotter, A., C. G. Nkwonkam, et al. (2007). "Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*." *Toxicology* **234**(1-2): 113-23.
- Kampkotter, A., C. Timpel, et al. (2008). "Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**(2): 314-23.

- Kang, H. E., Y. K. Cho, et al. (2009). "Pharmacokinetics and first-pass effects of liquiritigenin in rats: low bioavailability is primarily due to extensive gastrointestinal first-pass effect." *Xenobiotica* **39**(6): 465-75.
- Kawai, Y., T. Nishikawa, et al. (2008). "Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids." *J Biol Chem* **283**(14): 9424-34.
- Kessler, M., G. Ubeaud, et al. (2003). "Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives." *J Pharm Pharmacol* **55**(1): 131-42.
- Kida, K., M. Suzuki, et al. (2000). "Identification of biliary metabolites of (-)-epigallocatechin gallate in rats." *J Agric Food Chem* **48**(9): 4151-5.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *EMBO J* **14**(22): 5579-88.
- Knekt, P., R. Jarvinen, et al. (1997). "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms." *Am J Epidemiol* **146**(3): 223-30.
- Knekt, P., J. Kumpulainen, et al. (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases." *Am J Clin Nutr* **76**(3): 560-8.
- Knowles, B. B., C. C. Howe, et al. (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen." *Science* **209**(4455): 497-9.
- Kuhnle, G., J. P. Spencer, et al. (2000). "Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(2): 507-12.
- Lambert, J. D., M. J. Lee, et al. (2006). "Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues." *Drug Metab Dispos* **34**(1): 8-11.
- Lambert, J. D., M. J. Lee, et al. (2003). "Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice." *J Nutr* **133**(12): 4172-7.
- Lee, S., Y. J. Kim, et al. (2009). "Inhibitory effects of flavonoids on TNF-alpha-induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells." *BMB Rep* **42**(5): 265-70.
- Lewis, J. A. and J. T. Fleming (1995). "Basic culture methods." *Methods Cell Biol* **48**: 3-29.
- Lin, C. W., W. C. Hou, et al. (2008). "Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells." *Carcinogenesis* **29**(9): 1807-15.
- Lin, L. C., M. N. Wang, et al. (2007). "Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution." *J Agric Food Chem* **55**(4): 1517-24.
- Lin, Y. L. and J. K. Lin (1997). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB." *Mol Pharmacol* **52**(3): 465-72.
- Liston, P., W. G. Fong, et al. (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." *Oncogene* **22**(53): 8568-80.
- Lu, H., X. Meng, et al. (2003). "Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate." *Drug Metab Dispos* **31**(5): 572-9.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* **79**(5): 727-47.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 230S-242S.
- Mazzanti, G., F. Menniti-Ippolito, et al. (2009). "Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases." *Eur J Clin Pharmacol* **65**(4): 331-41.
- Meisterernst, A., F. Loeck, et al. (2008). *Praxishandbuch Nahrungsergänzungsmittel & ergänzende bilanzierte Diäten*, Behrs Verlag.
- Meng, X., S. Sang, et al. (2002). "Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats." *Chem Res Toxicol* **15**(8): 1042-50.
- Meyers, K. J., J. L. Rudolf, et al. (2008). "Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice." *J Agric Food Chem* **56**(3): 830-6.
- Mielke, K. and T. Herdegen (2000). "JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system." *Prog Neurobiol* **61**(1): 45-60.
- Mochizuki, M., S. Yamazaki, et al. (2002). "Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins." *Biochim Biophys Acta* **1569**(1-3): 35-44.
- Morand, C., V. Crespy, et al. (1998). "Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 2): R212-9.
- Morita, O., J. B. Kirkpatrick, et al. (2009). "Safety assessment of heat-sterilized green tea catechin preparation: a 6-month repeat-dose study in rats." *Food Chem Toxicol* **47**(8): 1760-70.

- Morita, O., J. F. Knapp, et al. (2009). "Effects of green tea catechin on embryo/fetal development in rats." *Food Chem Toxicol* **47**(6): 1296-303.
- Murota, K., S. Shimizu, et al. (2002). "Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids." *J Nutr* **132**(7): 1956-61.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, et al. (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." *Cancer Res* **42**(9): 3858-63.
- Nakagawa, K. and T. Miyazawa (1997). "Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **43**(6): 679-84.
- Nam, T. W., C. I. Yoo, et al. (2008). "The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits migration through a MAPK-dependent mechanism in osteoblasts." *J Bone Miner Metab* **26**(6): 551-60.
- Nanjo, F., K. Goto, et al. (1996). "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." *Free Radic Biol Med* **21**(6): 895-902.
- Nemeth, K., G. W. Plumb, et al. (2003). "Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans." *Eur J Nutr* **42**(1): 29-42.
- Niering, P., G. Michels, et al. (2005). "Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: implication of oxidative stress and apoptosis." *Toxicol Appl Pharmacol* **209**(2): 114-22.
- Nifli, A. P., P. A. Theodoropoulos, et al. (2007). "Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution." *J Agric Food Chem* **55**(8): 2873-8.
- Okawa, M., J. Kinjo, et al. (2001). "DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants." *Biol Pharm Bull* **24**(10): 1202-5.
- Olsen, A., M. C. Vantipalli, et al. (2006). "Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases." *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 120-8.
- Olson, E. R., T. Melton, et al. (2008). "Stabilization of quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes." *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **1**(5): 362-8.
- Omenn, G.S., G.E. Goodman et al. (1996). "Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular diseases." *N Engl J Med* **334**(18):1150-5.
- Omenn, G. S., G.E. Goodman et al. (1996). "Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial." *J Natl Cancer Inst* **88**(21):1550-9.
- Orhan, D. D., B. Ozcelik, et al. (2009). "Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids." *Microbiol Res*.
- Pang, J. L., D. A. Ricupero, et al. (2006). "Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells." *Biochem Pharmacol* **71**(6): 818-26.
- Pannala, A. S. and C. Rice-Evans (2001). "Rapid screening method for relative antioxidant activities of flavonoids and phenolics." *Methods Enzymol* **335**: 266-72.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Plochmann, K., G. Korte, et al. (2007). "Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells." *Arch Biochem Biophys* **460**(1): 1-9.
- Reuber, M. D. (1961). "A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat." *J Natl Cancer Inst* **26**: 891-9.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, et al. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radic Biol Med* **20**(7): 933-56.
- Rozema, J., L. O. Bjorn, et al. (2002). "The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds." *J Photochem Photobiol B* **66**(1): 2-12.
- Rust, C. and G. J. Gores (2000). "Apoptosis and liver disease." *Am J Med* **108**(7): 567-74.
- Sang, S., M. J. Lee, et al. (2005). "Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions." *J Agric Food Chem* **53**(24): 9478-84.
- Saul, N., K. Pietsch, et al. (2008). "Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved?" *Mech Ageing Dev* **129**(10): 611-3.
- Scalbert, A., C. Manach, et al. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**(4): 287-306.
- Schmidt, M., H. J. Schmitz, et al. (2005). "Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture." *Food Chem Toxicol* **43**(2): 307-14.
- Schoonbroodt, S. and J. Piette (2000). "Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways." *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1075-83.

- Schroeter, H., J. P. Spencer, et al. (2001). "Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3." *Biochem J* **358**(Pt 3): 547-57.
- Shimoi, K., H. Okada, et al. (1998). "Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans." *FEBS Lett* **438**(3): 220-4.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* **215**(2): 213-9.
- Smith, J. V. and Y. Luo (2003). "Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761." *J Alzheimers Dis* **5**(4): 287-300.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-16.
- Southern, E. M. (1979). "Measurement of DNA length by gel electrophoresis." *Anal Biochem* **100**(2): 319-23.
- Spencer, J. P., C. Rice-Evans, et al. (2003). "Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability." *J Biol Chem* **278**(37): 34783-93.
- Stalmach, A., S. Troufflard, et al. (2009). "Absorption, metabolism and excretion of Choladi green tea flavan-3-ols by humans." *Mol Nutr Food Res* **53** Suppl 1: S44-53.
- Steinberg, D. and J. L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" *Circulation* **105**(17): 2107-11.
- Suganuma, M., S. Okabe, et al. (1998). "Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue." *Carcinogenesis* **19**(10): 1771-6.
- Tang, C., Y. H. Lu, et al. (2009). "Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis." *Anticancer Drugs* **20**(4): 249-58.
- Tian, X. J., X. W. Yang, et al. (2009). "Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model." *Int J Pharm* **367**(1-2): 58-64.
- Ullmann, U., J. Haller, et al. (2004). "Plasma-kinetic characteristics of purified and isolated green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) after 10 days repeated dosing in healthy volunteers." *Int J Vitam Nutr Res* **74**(4): 269-78.
- Unno, T. and T. Takeo (1995). "Absorption of (-)-epigallocatechin gallate into the circulation system of rats." *Biosci Biotechnol Biochem* **59**(8): 1558-9.
- Vaidyanathan, J. B. and T. Walle (2003). "Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2." *J Pharmacol Exp Ther* **307**(2): 745-52.
- Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." *Anat Histol Embryol* **31**(4): 214-23.
- van Zanden, J. J., H. van der Woude, et al. (2007). "The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential." *Biochem Pharmacol* **74**(2): 345-51.
- Walle, U. K., A. Galijatovic, et al. (1999). "Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2." *Biochem Pharmacol* **58**(3): 431-8.
- Wang, Y., J. Cao, et al. (2005). "Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin." *J Pharm Pharmacol* **57**(6): 751-8.
- Watjen, W., G. Michels, et al. (2005). "Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis." *J Nutr* **135**(3): 525-31.
- Wilkinson, A. P., J. M. Gee, et al. (2003). "Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro." *Xenobiotica* **33**(3): 255-64.
- Williamson, G. and C. Manach (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies." *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 243S-255S.
- Woerdenbag, H. J., I. Merfort, et al. (1994). "Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines." *Planta Med* **60**(5): 434-7.
- Wright, C. W. and C. S. Duckett (2005). "Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function." *J Clin Invest* **115**(10): 2673-8.
- Xu, J. Z., S. Y. Yeung, et al. (2004). "Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers." *Br J Nutr* **91**(6): 873-81.
- Yokomizo, A. and M. Moriwaki (2006). "Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(6): 1317-24.
- Yoshizumi, M., J. Abe, et al. (2000). "Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species." *J Biol Chem* **275**(16): 11706-12.
- Yoshizumi, M., K. Tsuchiya, et al. (2002). "Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(5): 1458-65.

- Youdim, K. A., J. P. Spencer, et al. (2002). "Dietary flavonoids as potential neuroprotectants." Biol Chem **383**(3-4): 503-19.
- Zhu, M., Y. Chen, et al. (2000). "Oral absorption and bioavailability of tea catechins." Planta Med **66**(5): 444-7.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                               |                                                   |                  |                                                                |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------|
| Abb                           | Abbildung                                         | M                | Marker                                                         |
| ABTS                          | 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure | M                | Molar                                                          |
| ACN                           | Acetonitril                                       | m                | Milli                                                          |
| ADI                           | Acceptable Daily Intake                           | m/z              | Masse pro Ladung                                               |
| Ak                            | Antikörper                                        | mA               | Milliampere                                                    |
| ANOVA                         | <i>analyses of variance</i>                       | MeOH             | Methanol                                                       |
| APS                           | Ammoniumperoxodisulfat                            | Min              | Minute                                                         |
| AUC                           | Area under the curve                              | min              | Minute                                                         |
| AUC <sub>∞</sub>              | AUC till infinity                                 | MS               | Massenspektrometrie                                            |
| bp                            | Basenpaar                                         |                  | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid     |
| BSA                           | Rinderserumalbumin                                | MTT              |                                                                |
| C <sub>max</sub>              | Maximale Plasmakonzentration                      | n                | Nano / Anzahl der Versuche                                     |
| d                             | Tag                                               | NG               | Nematode Growthmedia                                           |
| Da                            | <i>Dalton</i>                                     |                  | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| DCF                           | 2',7'-Dichlorofluorescein                         | NFκB             |                                                                |
| DMEM                          | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>         | NOAEL            | No Observed Adverse Effect Level                               |
|                               |                                                   | NR               | Neutralrot                                                     |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid                                  | p                | Wahrscheinlichkeit                                             |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure                            |                  | Mitogen-activated protein kinase p38                           |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure                            | p38              | alpha                                                          |
| DPPH                          | Diphenylpicrylhydrazil                            | PAGE             | Polyacrylamidgelelektrophorese                                 |
| EC                            | Epicatechin                                       | PBS              | phosphate buffered saline                                      |
| EC <sub>50</sub>              | <i>effective concentration (50%)</i>              | pERK             | Phosphorilierte ERK                                            |
| ECG                           | Epicatechingallat                                 | PI3K             | Phosphatidylinositol-3-Kinase                                  |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraacetat                          | pJNK             | phosphorilierte JNK                                            |
| EGC                           | Epigallocatechin                                  | pp38             | Phosphorilierte p38                                            |
| EGCG                          | (-)-Epigallocatechingallat                        | PVDF             | polyvinylidene difluoride                                      |
|                               | Extracellular signal regulated kinase             | rcf              | Relative centrifugal force                                     |
| ERK                           |                                                   | RFU              | relative fluorescent units                                     |
| ESI                           | <i>Electrospray ionisation</i>                    | ROS              | reactive oxygen species                                        |
| Et al.                        | <i>Et altera (und andere)</i>                     | RP               | Reversed Phase                                                 |
| EtBr                          | Ethidiumbromid                                    | rpm              | rotations per minute                                           |
| EtOH                          | Ethanol                                           | rrTNFα           | Rattenrekombinantes TNFα                                       |
| FCS                           | <i>fetal calf serum</i>                           | RT               | Raumtemperatur                                                 |
| g                             | Gramm, Erdbeschleunigung                          | s                | Sekunden                                                       |
| h                             | Stunde                                            | SDS              | Natriumdodecylsulfat                                           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                |                  | Sekretierte embryonale alkalische Phosphatase                  |
|                               | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie          | SEAP             |                                                                |
| HPLC                          |                                                   | SEM              | standard error of the mean                                     |
| HPLC-DAD                      | HPLC mit DiodenArrayDetektor                      | SPE              | Solid Phase Extraktion                                         |
| HPLC-ESI-MS                   | <i>HPLC mit Massendetektor</i>                    | stabw            | Standardabweichung                                             |
| HPLC-UV                       | HPLC mit UV-Detektor                              | Tab              | Tabelle                                                        |
| HRP                           | <i>horseradish peroxidase</i>                     | TBE              | Tris-Borat-EDTA                                                |
| JNK                           | <i>c-Jun N-terminal kinase</i>                    | TE               | Tris-EDTA                                                      |
| kb                            | Kilobasen                                         | TEAC             | Trolox equivalent antioxidant capacity                         |
| kDa                           | Kilodalton                                        | TEMED            | N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin                        |
| KG                            | Körpergewicht                                     | T <sub>max</sub> | Zeitspanne bis C <sub>max</sub> erreicht ist                   |
| LDH                           | <i>Laktat-Dehydrogenase</i>                       | TNFα             | Tumor necrosis Factor alpha                                    |
| LOD                           | Detektionslimit                                   | U                | Units                                                          |
| Lsg                           | Lösung                                            | UV               | Ultraviolett                                                   |
|                               |                                                   | V                | Volt                                                           |
|                               |                                                   | W                | Watt                                                           |
|                               |                                                   | x                | Arithmetisches Mittel                                          |
|                               |                                                   | μ                | Mikro                                                          |

## 9. Anhang

### Tabellen der Originaldaten:

**Tabelle 34: Rohdaten zu Abb. 4: Antioxidatives Potential ausgewählter Flavonoide im TEAC-Assay.**

| TEAC         | Quercetin |      |       |       | Kämpferol |      |       |       | Luteolin |      |       |       | Apigenin |      |       |       | Trolox |      |       |       |
|--------------|-----------|------|-------|-------|-----------|------|-------|-------|----------|------|-------|-------|----------|------|-------|-------|--------|------|-------|-------|
|              | 0 µM      | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM      | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM     | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM     | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM   | 5 µM | 10 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,75      | 0,27 | 0,11  | 0,06  | 0,80      | 0,72 | 0,54  | 0,35  | 0,79     | 0,66 | 0,58  | 0,26  | 0,77     | 0,78 | 0,84  | 0,80  | 0,77   | 0,49 | 0,34  | 0,28  |
| Versuch 2 OD | 0,74      | 0,40 | 0,18  | 0,06  | 0,73      | 0,58 | 0,52  | 0,26  | 0,75     | 0,56 | 0,48  | 0,23  | 0,77     | 0,75 | 0,80  | 0,79  | 0,75   | 0,56 | 0,32  | 0,21  |
| Versuch 3 OD | 0,76      | 0,46 | 0,14  | 0,09  | 0,71      | 0,55 | 0,53  | 0,23  | 0,78     | 0,61 | 0,41  | 0,16  | 0,70     | 0,69 | 0,69  | 0,69  | 0,74   | 0,53 | 0,32  | 0,25  |
| MW OD        | 0,75      | 0,37 | 0,14  | 0,07  | 0,75      | 0,62 | 0,53  | 0,28  | 0,77     | 0,61 | 0,49  | 0,22  | 0,75     | 0,74 | 0,78  | 0,76  | 0,75   | 0,53 | 0,33  | 0,25  |
| SD OD        | 0,01      | 0,10 | 0,04  | 0,02  | 0,05      | 0,09 | 0,01  | 0,06  | 0,02     | 0,05 | 0,08  | 0,05  | 0,04     | 0,05 | 0,08  | 0,06  | 0,01   | 0,04 | 0,01  | 0,03  |
| SEM OD       | 0,00      | 0,06 | 0,02  | 0,01  | 0,03      | 0,05 | 0,00  | 0,03  | 0,01     | 0,03 | 0,05  | 0,03  | 0,02     | 0,03 | 0,04  | 0,04  | 0,01   | 0,02 | 0,01  | 0,02  |
| MW [%]       | 100       | 50   | 19    | 9     | 100       | 82   | 71    | 37    | 100      | 79   | 63    | 28    | 100      | 99   | 104   | 102   | 100    | 70   | 43    | 33    |
| SD [%]       | 1         | 13   | 5     | 2     | 6         | 12   | 1     | 8     | 3        | 6    | 11    | 6     | 5        | 6    | 10    | 8     | 2      | 5    | 2     | 5     |
| SEM [%]      | 1         | 7    | 3     | 1     | 4         | 7    | 1     | 5     | 2        | 4    | 6     | 4     | 3        | 4    | 6     | 5     | 1      | 3    | 1     | 3     |

**Tabelle 35: Rohdaten zu Abb. 5: Antioxidatives Potential ausgewählter Flavonoide im DPPH-Assay.**

| DPPH I       | Quercetin |        |      |         |       | Kämpferol |        |      |         |       | Luteolin |        |      |         |       |
|--------------|-----------|--------|------|---------|-------|-----------|--------|------|---------|-------|----------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,72      | 0,68   | 0,49 | 0,30    | 0,27  | 0,75      | 0,68   | 0,56 | 0,44    | 0,28  | 0,71     | 0,65   | 0,54 | 0,30    | 0,17  |
| Versuch 2 OD | 0,75      | 0,63   | 0,51 | 0,31    | 0,21  | 0,75      | 0,70   | 0,53 | 0,49    | 0,20  | 0,75     | 0,64   | 0,46 | 0,22    | 0,17  |
| Versuch 3 OD | 0,79      | 0,69   | 0,49 | 0,28    | 0,19  | 0,70      | 0,68   | 0,56 | 0,45    | 0,28  | 0,72     | 0,65   | 0,54 | 0,29    | 0,16  |
| MW OD        | 0,75      | 0,67   | 0,50 | 0,30    | 0,22  | 0,73      | 0,69   | 0,55 | 0,46    | 0,25  | 0,73     | 0,65   | 0,51 | 0,27    | 0,16  |
| SD OD        | 0,03      | 0,03   | 0,01 | 0,01    | 0,04  | 0,02      | 0,01   | 0,02 | 0,03    | 0,04  | 0,02     | 0,01   | 0,05 | 0,04    | 0,01  |
| SEM OD       | 0,02      | 0,02   | 0,00 | 0,01    | 0,03  | 0,01      | 0,01   | 0,01 | 0,02    | 0,03  | 0,01     | 0,00   | 0,03 | 0,03    | 0,01  |
| MW [%]       | 100       | 89     | 66   | 39      | 30    | 100       | 94     | 75   | 63      | 34    | 100      | 89     | 71   | 37      | 23    |
| SD [%]       | 4         | 4      | 1    | 2       | 6     | 3         | 1      | 3    | 4       | 6     | 3        | 1      | 6    | 6       | 1     |
| SEM [%]      | 3         | 2      | 1    | 1       | 3     | 2         | 1      | 2    | 2       | 4     | 2        | 1      | 4    | 3       | 1     |

| DPPH II      | Apigenin |        |      |         |       | Trolox |        |      |         |       |
|--------------|----------|--------|------|---------|-------|--------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,73     | 0,72   | 0,74 | 0,75    | 0,75  | 0,75   | 0,45   | 0,37 | 0,32    | 0,14  |
| Versuch 2 OD | 0,76     | 0,76   | 0,72 | 0,73    | 0,73  | 0,73   | 0,55   | 0,35 | 0,20    | 0,12  |
| Versuch 3 OD | 0,74     | 0,72   | 0,74 | 0,72    | 0,74  | 0,74   | 0,56   | 0,33 | 0,25    | 0,16  |
| MW OD        | 0,74     | 0,73   | 0,73 | 0,73    | 0,74  | 0,74   | 0,52   | 0,35 | 0,26    | 0,14  |
| SD OD        | 0,02     | 0,02   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01   | 0,06   | 0,02 | 0,06    | 0,02  |
| SEM OD       | 0,01     | 0,01   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01   | 0,03   | 0,01 | 0,03    | 0,01  |
| MW [%]       | 100      | 99     | 99   | 99      | 100   | 100    | 70     | 47   | 35      | 19    |
| SD [%]       | 2        | 3      | 2    | 2       | 1     | 1      | 8      | 2    | 8       | 3     |
| SEM [%]      | 1        | 2      | 1    | 1       | 1     | 1      | 5      | 1    | 5       | 2     |

**Tabelle 36: Rohdaten zu Abb. 6: Antioxidatives Potential methylierter Quercetinderivate im TEAC-Assay.**

| TEAC I       | Quercetin |        |      |       |       | Tamarixetin |        |      |       |       | Rhamnetin |        |      |       |       |
|--------------|-----------|--------|------|-------|-------|-------------|--------|------|-------|-------|-----------|--------|------|-------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,70      | 0,32   | 0,21 | 0,11  | 0,00  | 0,70        | 0,50   | 0,37 | 0,25  | 0,00  | 0,68      | 0,33   | 0,23 | 0,07  | 0,01  |
| Versuch 2 OD | 0,67      | 0,38   | 0,27 | 0,11  | 0,00  | 0,65        | 0,54   | 0,46 | 0,31  | 0,00  | 0,67      | 0,38   | 0,26 | 0,08  | 0,00  |
| Versuch 3 OD | 0,68      | 0,21   | 0,17 | 0,06  | 0,00  | 0,66        | 0,44   | 0,39 | 0,24  | 0,00  | 0,64      | 0,18   | 0,15 | 0,03  | 0,01  |
| Versuch 4 OD | 0,71      | 0,42   | 0,28 | 0,12  | 0,02  | 0,70        | 0,55   | 0,49 | 0,33  | 0,02  | 0,67      | 0,42   | 0,28 | 0,12  | 0,03  |
| MW OD        | 0,69      | 0,33   | 0,23 | 0,10  | 0,01  | 0,68        | 0,51   | 0,43 | 0,28  | 0,01  | 0,66      | 0,33   | 0,23 | 0,07  | 0,01  |
| SD OD        | 0,02      | 0,09   | 0,05 | 0,03  | 0,01  | 0,03        | 0,05   | 0,06 | 0,04  | 0,01  | 0,02      | 0,10   | 0,06 | 0,04  | 0,01  |
| SEM OD       | 0,01      | 0,04   | 0,03 | 0,01  | 0,01  | 0,01        | 0,02   | 0,03 | 0,02  | 0,01  | 0,01      | 0,05   | 0,03 | 0,02  | 0,01  |
| MW [%]       | 100       | 48     | 34   | 14    | 1     | 100         | 75     | 64   | 42    | 1     | 100       | 50     | 35   | 11    | 2     |
| SD [%]       | 2         | 13     | 7    | 4     | 1     | 4           | 7      | 8    | 6     | 2     | 2         | 16     | 8    | 6     | 2     |
| SEM [%]      | 1         | 6      | 4    | 2     | 1     | 2           | 4      | 4    | 3     | 1     | 1         | 8      | 4    | 3     | 1     |

| TEAC II      | Isorhamnetin |        |      |       |       | Trolox |      |       |       |
|--------------|--------------|--------|------|-------|-------|--------|------|-------|-------|
|              | 0 µM         | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM   | 5 µM | 10 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,70         | 0,59   | 0,35 | 0,26  | 0,00  | 0,71   | 0,56 | 0,39  | -0,01 |
| Versuch 2 OD | 0,65         | 0,52   | 0,45 | 0,28  | 0,00  | 0,68   | 0,60 | 0,44  | 0,00  |
| Versuch 3 OD | 0,67         | 0,39   | 0,33 | 0,14  | 0,00  | 0,73   | 0,63 | 0,42  | 0,00  |
| Versuch 4 OD | 0,69         | 0,54   | 0,49 | 0,33  | 0,02  |        |      |       |       |
| MW OD        | 0,68         | 0,51   | 0,40 | 0,25  | 0,01  | 0,71   | 0,60 | 0,42  | 0,00  |
| SD OD        | 0,02         | 0,08   | 0,08 | 0,08  | 0,01  | 0,03   | 0,03 | 0,02  | 0,00  |
| SEM OD       | 0,01         | 0,04   | 0,04 | 0,04  | 0,01  | 0,02   | 0,02 | 0,01  | 0,00  |
| MW [%]       | 100          | 75     | 59   | 37    | 1     | 100    | 85   | 59    | 0     |
| SD [%]       | 3            | 12     | 11   | 12    | 2     | 4      | 4    | 3     | 1     |
| SEM [%]      | 2            | 6      | 6    | 6     | 1     | 2      | 3    | 2     | 0     |

**Tabelle 37: Rohdaten zu Abb. 7: Antioxidatives Potential methylierter Quercetinderivate im DPPH-Assay.**

| DPPH I       | Quercetin |        |      |       |       | Tamarixetin |        |      |       |       | Rhamnetin |        |      |       |       |
|--------------|-----------|--------|------|-------|-------|-------------|--------|------|-------|-------|-----------|--------|------|-------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,64      | 0,54   | 0,45 | 0,41  | 0,08  | 0,68        | 0,65   | 0,63 | 0,56  | 0,42  | 0,71      | 0,55   | 0,51 | 0,39  | 0,08  |
| Versuch 2 OD | 0,71      | 0,59   | 0,56 | 0,39  | 0,14  | 0,71        | 0,67   | 0,66 | 0,60  | 0,46  | 0,72      | 0,60   | 0,52 | 0,39  | 0,10  |
| Versuch 3 OD | 0,68      | 0,44   | 0,37 | 0,24  | 0,14  | 0,69        | 0,63   | 0,62 | 0,57  | 0,31  | 0,67      | 0,52   | 0,43 | 0,33  | 0,10  |
| MW OD        | 0,68      | 0,52   | 0,46 | 0,35  | 0,12  | 0,69        | 0,65   | 0,63 | 0,58  | 0,40  | 0,70      | 0,56   | 0,49 | 0,37  | 0,09  |
| SD OD        | 0,04      | 0,08   | 0,09 | 0,09  | 0,04  | 0,01        | 0,02   | 0,02 | 0,02  | 0,08  | 0,03      | 0,04   | 0,05 | 0,04  | 0,01  |
| SEM OD       | 0,02      | 0,04   | 0,05 | 0,05  | 0,02  | 0,01        | 0,01   | 0,01 | 0,01  | 0,04  | 0,01      | 0,02   | 0,03 | 0,02  | 0,01  |
| MW %         | 100       | 77     | 68   | 51    | 18    | 100         | 94     | 92   | 84    | 58    | 100       | 79     | 69   | 52    | 13    |
| SD %         | 6         | 11     | 14   | 14    | 6     | 2           | 3      | 3    | 3     | 11    | 4         | 6      | 7    | 5     | 2     |
| SEM %        | 3         | 7      | 8    | 8     | 3     | 1           | 2      | 2    | 2     | 6     | 2         | 3      | 4    | 3     | 1     |

| DPPH II      | Isorhamnetin |        |      |       |       | Trolox |      |       |       |
|--------------|--------------|--------|------|-------|-------|--------|------|-------|-------|
|              | 0 µM         | 2,5 µM | 5 µM | 10 µM | 25 µM | 0 µM   | 5 µM | 10 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,66         | 0,57   | 0,51 | 0,37  | 0,03  | 0,71   | 0,59 | 0,46  | 0,14  |
| Versuch 2 OD | 0,71         | 0,63   | 0,56 | 0,44  | 0,10  | 0,80   | 0,68 | 0,53  | 0,35  |
| Versuch 3 OD | 0,64         | 0,54   | 0,47 | 0,36  | 0,12  | 0,76   | 0,68 | 0,56  | 0,18  |
| MW OD        | 0,67         | 0,58   | 0,51 | 0,39  | 0,09  | 0,76   | 0,65 | 0,52  | 0,22  |
| SD OD        | 0,04         | 0,04   | 0,04 | 0,04  | 0,05  | 0,05   | 0,05 | 0,05  | 0,11  |
| SEM OD       | 0,02         | 0,02   | 0,03 | 0,02  | 0,03  | 0,03   | 0,03 | 0,03  | 0,06  |
| MW %         | 100          | 87     | 77   | 58    | 13    | 100    | 86   | 69    | 29    |
| SD %         | 6            | 6      | 6    | 6     | 7     | 6      | 7    | 7     | 15    |
| SEM %        | 3            | 4      | 4    | 3     | 4     | 3      | 4    | 4     | 8     |

**Tabelle 38: Rohdaten zu Abb. 8: Antioxidatives Potential methylierter Luteolin- und Kämpferolderivate im TEAC-Assay.**

| TEAC I       | Kämpferit |        |      |         |       | Kämpferol |        |      |         |       | Luteolin |        |      |         |       |
|--------------|-----------|--------|------|---------|-------|-----------|--------|------|---------|-------|----------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,75      | 0,58   | 0,52 | 0,30    | 0,00  | 0,80      | 0,72   | 0,54 | 0,35    | 0,06  | 0,79     | 0,66   | 0,58 | 0,26    | 0,07  |
| Versuch 2 OD | 0,71      | 0,48   | 0,52 | 0,25    | 0,01  | 0,73      | 0,58   | 0,52 | 0,26    | 0,06  | 0,75     | 0,56   | 0,48 | 0,23    | 0,08  |
| Versuch 3 OD | 0,70      | 0,42   | 0,55 | 0,36    | 0,01  | 0,71      | 0,55   | 0,53 | 0,23    | 0,06  | 0,78     | 0,61   | 0,41 | 0,16    | 0,08  |
| MW OD        | 0,72      | 0,49   | 0,53 | 0,30    | 0,01  | 0,75      | 0,62   | 0,53 | 0,28    | 0,06  | 0,77     | 0,61   | 0,49 | 0,22    | 0,08  |
| SD OD        | 0,02      | 0,08   | 0,02 | 0,06    | 0,00  | 0,05      | 0,09   | 0,01 | 0,06    | 0,00  | 0,02     | 0,05   | 0,08 | 0,05    | 0,00  |
| SEM OD       | 0,01      | 0,05   | 0,01 | 0,03    | 0,00  | 0,03      | 0,05   | 0,00 | 0,03    | 0,00  | 0,01     | 0,03   | 0,05 | 0,03    | 0,00  |
| MW [%]       | 100       | 68     | 73   | 42      | 1     | 100       | 82     | 71   | 37      | 8     | 100      | 79     | 63   | 28      | 10    |
| SD [%]       | 3         | 11     | 2    | 8       | 1     | 6         | 12     | 1    | 8       | 0     | 3        | 6      | 11   | 6       | 0     |
| SEM [%]      | 2         | 7      | 1    | 5       | 0     | 4         | 7      | 1    | 5       | 0     | 2        | 4      | 6    | 4       | 0     |

| TEAC II      | Trolox |        |      |         |       | Chrysoeriol |        |      |         |       | Diosmetin |        |      |         |       |
|--------------|--------|--------|------|---------|-------|-------------|--------|------|---------|-------|-----------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,71   | 0,58   | 0,49 | 0,10    | 0,04  | 0,71        |        |      | 0,69    |       | 0,70      | 0,70   | 0,71 | 0,73    | 0,69  |
| Versuch 2 OD | 0,71   | 0,62   | 0,51 | 0,28    | 0,00  | 0,72        | 0,72   | 0,66 | 0,60    | 0,55  | 0,72      | 0,72   | 0,69 | 0,68    | 0,67  |
| Versuch 3 OD | 0,69   | 0,54   | 0,50 | 0,26    | 0,00  | 0,71        | 0,67   | 0,64 | 0,64    | 0,58  | 0,72      | 0,66   | 0,67 | 0,67    | 0,66  |
| MW OD        | 0,70   | 0,58   | 0,50 | 0,21    | 0,01  | 0,71        | 0,69   | 0,65 | 0,64    | 0,57  | 0,71      | 0,69   | 0,69 | 0,69    | 0,67  |
| SD OD        | 0,01   | 0,04   | 0,01 | 0,10    | 0,02  | 0,01        | 0,04   | 0,01 | 0,05    | 0,02  | 0,01      | 0,03   | 0,02 | 0,03    | 0,02  |
| SEM OD       | 0,01   | 0,02   | 0,01 | 0,06    | 0,01  | 0,00        | 0,02   | 0,01 | 0,03    | 0,01  | 0,01      | 0,02   | 0,01 | 0,02    | 0,01  |
| MW [%]       | 100    | 82     | 71   | 30      | 2     | 100         | 97     | 91   | 90      | 79    | 100       | 98     | 97   | 98      | 95    |
| SD [%]       | 2      | 5      | 2    | 14      | 3     | 1           | 5      | 2    | 7       | 3     | 1         | 5      | 3    | 5       | 3     |
| SEM [%]      | 1      | 3      | 1    | 8       | 2     | 0           | 3      | 1    | 4       | 2     | 1         | 3      | 2    | 3       | 2     |

**Tabelle 39: Rohdaten zu Abb. 9: Antioxidatives Potential methylierter Luteolin- und Kämpferolderivate im DPPH-Assay.**

| DPPH         | Kämpferit |        |      |         |       | Kämpferol |        |      |         |       | Luteolin |        |      |         |       |
|--------------|-----------|--------|------|---------|-------|-----------|--------|------|---------|-------|----------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,70      | 0,65   | 0,63 | 0,54    | 0,46  | 0,75      | 0,68   | 0,56 | 0,44    | 0,28  | 0,71     | 0,65   | 0,54 | 0,30    | 0,17  |
| Versuch 2 OD | 0,70      | 0,63   | 0,62 | 0,53    | 0,46  | 0,75      | 0,70   | 0,53 | 0,49    | 0,20  | 0,75     | 0,64   | 0,46 | 0,22    | 0,17  |
| Versuch 3 OD | 0,71      | 0,64   | 0,69 | 0,64    | 0,57  | 0,70      | 0,68   | 0,56 | 0,45    | 0,28  | 0,72     | 0,65   | 0,54 | 0,29    | 0,16  |
| MW OD        | 0,71      | 0,64   | 0,64 | 0,57    | 0,50  | 0,73      | 0,69   | 0,55 | 0,46    | 0,25  | 0,73     | 0,65   | 0,51 | 0,27    | 0,16  |
| SD OD        | 0,01      | 0,01   | 0,04 | 0,06    | 0,06  | 0,02      | 0,01   | 0,02 | 0,03    | 0,04  | 0,02     | 0,01   | 0,05 | 0,04    | 0,01  |
| SEM OD       | 0,00      | 0,01   | 0,02 | 0,03    | 0,04  | 0,01      | 0,01   | 0,01 | 0,02    | 0,03  | 0,01     | 0,00   | 0,03 | 0,03    | 0,01  |
| MW [%]       | 100       | 91     | 91   | 80      | 70    | 100       | 94     | 75   | 63      | 34    | 100      | 89     | 71   | 37      | 23    |
| SD [%]       | 1         | 1      | 5    | 8       | 9     | 3         | 1      | 3    | 4       | 6     | 3        | 1      | 6    | 6       | 1     |
| SEM [%]      | 1         | 1      | 3    | 5       | 5     | 2         | 1      | 2    | 2       | 4     | 2        | 1      | 4    | 3       | 1     |

| DPPH         | Diosmetin |        |      |         |       | Chrysoeriol |        |      |         |       | Trolox |        |      |         |       |
|--------------|-----------|--------|------|---------|-------|-------------|--------|------|---------|-------|--------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM      | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,70      | 0,70   | 0,69 | 0,69    | 0,69  | 0,68        | 0,70   | 0,69 | 0,70    | 0,68  | 0,70   | 0,56   | 0,54 | 0,25    | 0,12  |
| Versuch 2 OD | 0,71      | 0,72   | 0,73 | 0,73    | 0,70  | 0,68        | 0,67   | 0,69 | 0,69    | 0,68  | 0,69   | 0,62   | 0,58 | 0,42    | 0,13  |
| Versuch 3 OD | 0,72      | 0,73   | 0,74 | 0,72    | 0,73  | 0,72        | 0,72   | 0,72 | 0,72    | 0,71  | 0,72   | 0,65   | 0,65 | 0,44    | 0,10  |
| MW OD        | 0,71      | 0,72   | 0,72 | 0,71    | 0,71  | 0,69        | 0,70   | 0,70 | 0,70    | 0,69  | 0,70   | 0,61   | 0,59 | 0,37    | 0,12  |
| SD OD        | 0,01      | 0,02   | 0,02 | 0,02    | 0,02  | 0,02        | 0,02   | 0,02 | 0,02    | 0,02  | 0,02   | 0,04   | 0,06 | 0,11    | 0,02  |
| SEM OD       | 0,01      | 0,01   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01        | 0,01   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01   | 0,03   | 0,03 | 0,06    | 0,01  |
| MW [%]       | 100       | 101    | 101  | 101     | 100   | 100         | 101    | 101  | 102     | 100   | 100    | 87     | 84   | 52      | 17    |
| SD [%]       | 1         | 3      | 3    | 3       | 2     | 3           | 3      | 3    | 2       | 3     | 2      | 6      | 8    | 15      | 3     |
| SEM [%]      | 1         | 2      | 2    | 2       | 1     | 2           | 2      | 2    | 1       | 2     | 1      | 4      | 5    | 9       | 2     |

**Tabelle 40: Kalkulation zu Tabelle 11: Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden aus *Eupatorium semialatum* im TEAC-Assay.** n.e.: Datenpunkt nicht erfasst, -: Datenpunkt nur einmal erfasst, Berechnung daher nicht möglich.

| Substanzkürzel |        | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |  | Substanzkürzel |         | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |
|----------------|--------|------|--------|------|---------|-------|-------|--|----------------|---------|------|--------|------|---------|-------|-------|
| 1              | MW OD  | 0,71 | 0,68   | 0,79 | 0,63    | 0,61  | 0,54  |  | 1              | MW [%]  | 100  | 96     | 112  | 89      | 86    | 76    |
| 2              | MW OD  | 0,70 | 0,66   | 0,64 | 0,56    | 0,45  | 0,26  |  | 2              | MW [%]  | 100  | 94     | 92   | 80      | 64    | 38    |
| 3              | MW OD  | 0,72 | 0,60   | 0,55 | 0,39    | 0,19  | 0,06  |  | 3              | MW [%]  | 100  | 84     | 77   | 55      | 27    | 8     |
| 4              | MW OD  | 0,71 | 0,59   | 0,55 | 0,40    | 0,23  | 0,08  |  | 4              | MW [%]  | 100  | 83     | 77   | 57      | 33    | 11    |
| 6              | MW OD  | 0,73 | 0,67   | 0,62 | 0,54    | 0,42  | 0,22  |  | 6              | MW [%]  | 100  | 92     | 86   | 74      | 57    | 30    |
| 7              | MW OD  | 0,71 | 0,73   | 0,73 | 0,75    | 0,71  | 0,67  |  | 7              | MW [%]  | 100  | 103    | 104  | 107     | 100   | 94    |
| 8              | MW OD  | 0,71 | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 0,69  |  | 8              | MW [%]  | 100  | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 97    |
| 9              | MW OD  | 0,71 | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 0,68  |  | 9              | MW [%]  | 100  | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 95    |
| 10             | MW OD  | 0,72 | 0,69   | 0,69 | 0,62    | 0,50  | 0,25  |  | 10             | MW [%]  | 100  | 97     | 96   | 87      | 70    | 35    |
| 11             | MW OD  | 0,72 | n.e    | n.e  | 0,62    | 0,54  | 0,44  |  | 11             | MW [%]  | 100  | n.e    | n.e  | 85      | 75    | 61    |
| 12             | MW OD  | 0,72 | n.e    | n.e  | 0,67    | 0,54  | 0,42  |  | 12             | MW [%]  | 100  | n.e    | n.e  | 93      | 75    | 58    |
| 13             | MW OD  | 0,73 | n.e    | n.e  | 0,68    | 0,65  | 0,59  |  | 13             | MW [%]  | 100  | n.e    | n.e  | 92      | 88    | 80    |
| 14             | MW OD  | 0,73 | 0,62   | 0,55 | 0,40    | 0,19  | 0,03  |  | 14             | MW [%]  | 100  | 85     | 76   | 55      | 26    | 4     |
| 15             | MW OD  | 0,71 | 0,60   | 0,55 | 0,43    | 0,25  | 0,02  |  | 15             | MW [%]  | 100  | 85     | 78   | 60      | 35    | 3     |
| 16             | MW OD  | 0,72 | 0,63   | 0,56 | 0,47    | 0,28  | 0,03  |  | 16             | MW [%]  | 100  | 87     | 78   | 65      | 39    | 4     |
| Trolox         | MW OD  | 0,70 | 0,58   | 0,50 | 0,21    | 0,01  | 0,00  |  | Trolox         | MW [%]  | 100  | 82     | 71   | 30      | 2     | 0     |
|                |        | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |  |                |         | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |
| 1              | SEM OD | 0,01 | -      | -    | -       | -     | 0,03  |  | 1              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 5     |
| 2              | SEM OD | 0,01 | 0,01   | 0,01 | 0,02    | 0,01  | 0,03  |  | 2              | SEM [%] | 1    | 2      | 1    | 2       | 2     | 4     |
| 3              | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,04  |  | 3              | SEM [%] | 2    | 3      | 2    | 1       | 2     | 5     |
| 4              | SEM OD | 0,01 | 0,03   | 0,01 | 0,02    | 0,02  | 0,07  |  | 4              | SEM [%] | 1    | 4      | 2    | 2       | 3     | 9     |
| 6              | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,00 | 0,02    | 0,02  | 0,03  |  | 6              | SEM [%] | 1    | 3      | 1    | 2       | 3     | 3     |
| 7              | SEM OD | 0,01 | -      | -    | -       | -     | 0,03  |  | 7              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 5     |
| 8              | SEM OD | 0,01 | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 0,01  |  | 8              | SEM [%] | 1    | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 2     |
| 9              | SEM OD | 0,01 | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 0,02  |  | 9              | SEM [%] | 1    | n.e    | n.e  | n.e     | n.e   | 2     |
| 10             | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,02 | 0,02    | 0,02  | 0,02  |  | 10             | SEM [%] | 2    | 3      | 3    | 3       | 3     | 3     |
| 11             | SEM OD | 0,01 | n.e    | n.e  | 0,02    | 0,01  | 0,01  |  | 11             | SEM [%] | 2    | n.e    | n.e  | 3       | 2     | 1     |
| 12             | SEM OD | 0,01 | n.e    | n.e  | 0,05    | 0,02  | 0,01  |  | 12             | SEM [%] | 2    | n.e    | n.e  | 7       | 3     | 2     |
| 13             | SEM OD | 0,00 | n.e    | n.e  | 0,01    | 0,02  | 0,04  |  | 13             | SEM [%] | 0    | n.e    | n.e  | 2       | 2     | 5     |
| 14             | SEM OD | 0,02 | 0,02   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01  |  | 14             | SEM [%] | 3    | 2      | 1    | 1       | 1     | 2     |
| 15             | SEM OD | 0,02 | 0,02   | 0,01 | 0,01    | 0,01  | 0,01  |  | 15             | SEM [%] | 2    | 2      | 1    | 2       | 2     | 1     |
| 16             | SEM OD | 0,02 | 0,00   | 0,01 | 0,02    | 0,00  | 0,01  |  | 16             | SEM [%] | 2    | 0      | 1    | 2       | 0     | 1     |
| Trolox         | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,01 | 0,06    | 0,01  | 0,00  |  | Trolox         | SEM [%] | 1    | 3      | 1    | 8       | 2     | 0     |

**Tabelle 41: Kalkulation zu Tabelle 11: Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden aus *Eupatorium semialatum* im DPPH-Assay.** -: Datenpunkt nur einmal erfasst, Berechnung daher nicht möglich.

| Substanzkürzel |        | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |  | Substanzkürzel |         | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |
|----------------|--------|------|--------|------|---------|-------|-------|--|----------------|---------|------|--------|------|---------|-------|-------|
| 1              | MW OD  | 0,69 | 0,67   | 0,67 | 0,68    | 0,69  | 0,71  |  | 1              | MW [%]  | 100  | 97     | 97   | 98      | 99    | 102   |
| 2              | MW OD  | 0,69 | 0,68   | 0,64 | 0,59    | 0,51  | 0,38  |  | 2              | MW [%]  | 100  | 98     | 92   | 85      | 74    | 54    |
| 3              | MW OD  | 0,69 | 0,64   | 0,62 | 0,55    | 0,49  | 0,42  |  | 3              | MW [%]  | 100  | 93     | 90   | 80      | 71    | 61    |
| 4              | MW OD  | 0,69 | 0,66   | 0,65 | 0,61    | 0,56  | 0,49  |  | 4              | MW [%]  | 100  | 95     | 94   | 88      | 81    | 71    |
| 6              | MW OD  | 0,70 | 0,67   | 0,69 | 0,61    | 0,55  | 0,43  |  | 6              | MW [%]  | 100  | 97     | 99   | 87      | 79    | 62    |
| 7              | MW OD  | 0,69 | 0,67   | 0,68 | 0,68    | 0,66  | 0,72  |  | 7              | MW [%]  | 100  | 97     | 98   | 98      | 96    | 105   |
| 8              | MW OD  | 0,69 | 0,68   | 0,67 | 0,69    | 0,68  | 0,70  |  | 8              | MW [%]  | 100  | 98     | 97   | 100     | 99    | 101   |
| 9              | MW OD  | 0,69 | 0,66   | 0,67 | 0,68    | 0,68  | 0,71  |  | 9              | MW [%]  | 100  | 96     | 97   | 97      | 98    | 102   |
| 10             | MW OD  | 0,69 | 0,67   | 0,65 | 0,60    | 0,51  | 0,37  |  | 10             | MW [%]  | 100  | 98     | 93   | 86      | 74    | 54    |
| 11             | MW OD  | 0,69 | 0,66   | 0,68 | 0,64    | 0,64  | 0,56  |  | 11             | MW [%]  | 100  | 95     | 98   | 92      | 92    | 81    |
| 12             | MW OD  | 0,70 | 0,67   | 0,66 | 0,67    | 0,65  | 0,60  |  | 12             | MW [%]  | 100  | 96     | 95   | 96      | 93    | 86    |
| 13             | MW OD  | 0,69 | 0,66   | 0,65 | 0,67    | 0,69  | 0,67  |  | 13             | MW [%]  | 100  | 95     | 93   | 96      | 99    | 96    |
| 14             | MW OD  | 0,69 | 0,64   | 0,60 | 0,50    | 0,42  | 0,33  |  | 14             | MW [%]  | 100  | 92     | 86   | 72      | 61    | 47    |
| 15             | MW OD  | 0,70 | 0,65   | 0,63 | 0,55    | 0,45  | 0,36  |  | 15             | MW [%]  | 100  | 94     | 89   | 78      | 65    | 51    |
| 16             | MW OD  | 0,70 | 0,65   | 0,63 | 0,55    | 0,44  | 0,20  |  | 16             | MW [%]  | 100  | 94     | 90   | 79      | 63    | 28    |
| Trolox         | MW OD  | 0,70 | 0,61   | 0,59 | 0,37    | 0,12  | 0,04  |  | Trolox         | MW [%]  | 100  | 87     | 84   | 52      | 17    | 6     |
|                |        | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |  |                |         | 0 µM | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |
| 1              | SEM OD | 0,01 | -      | -    | -       | -     | 0,01  |  | 1              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 2     |
| 2              | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,02 | 0,02    | 0,03  | 0,06  |  | 2              | SEM [%] | 1    | 2      | 3    | 3       | 4     | 9     |
| 3              | SEM OD | 0,01 | 0,01   | 0,03 | 0,03    | 0,06  | 0,11  |  | 3              | SEM [%] | 2    | 2      | 4    | 4       | 9     | 17    |
| 4              | SEM OD | 0,01 | 0,01   | 0,02 | 0,02    | 0,04  | 0,05  |  | 4              | SEM [%] | 2    | 2      | 2    | 3       | 5     | 7     |
| 6              | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,03 | 0,01    | 0,02  | 0,02  |  | 6              | SEM [%] | 2    | 3      | 5    | 2       | 3     | 2     |
| 7              | SEM OD | 0,00 | -      | -    | -       | -     | 0,03  |  | 7              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 4     |
| 8              | SEM OD | 0,01 | -      | -    | -       | -     | 0,02  |  | 8              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 2     |
| 9              | SEM OD | 0,01 | -      | -    | -       | -     | 0,02  |  | 9              | SEM [%] | 1    | -      | -    | -       | -     | 2     |
| 10             | SEM OD | 0,01 | 0,01   | 0,00 | 0,01    | 0,02  | 0,03  |  | 10             | SEM [%] | 2    | 2      | 1    | 2       | 4     | 4     |
| 11             | SEM OD | 0,01 | -      | -    | 0,00    | -     | 0,01  |  | 11             | SEM [%] | 1    | -      | -    | 1       | -     | 1     |
| 12             | SEM OD | 0,01 | -      | -    | 0,02    | 0,02  | 0,01  |  | 12             | SEM [%] | 1    | -      | -    | 3       | 3     | 1     |
| 13             | SEM OD | 0,01 | -      | -    | 0,01    | 0,02  | 0,01  |  | 13             | SEM [%] | 1    | -      | -    | 2       | 2     | 2     |
| 14             | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,03 | 0,03    | 0,04  | 0,04  |  | 14             | SEM [%] | 2    | 3      | 4    | 4       | 6     | 5     |
| 15             | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,01 | 0,03    | 0,03  | 0,03  |  | 15             | SEM [%] | 2    | 4      | 2    | 4       | 4     | 5     |
| 16             | SEM OD | 0,01 | 0,02   | 0,01 | 0,02    | 0,04  | 0,00  |  | 16             | SEM [%] | 1    | 3      | 2    | 3       | 6     | 1     |
| Trolox         | SEM OD | 0,01 | 0,03   | 0,03 | 0,06    | 0,01  | 0,00  |  | Trolox         | SEM [%] | 1    | 4      | 5    | 9       | 2     | 1     |

**Tabelle 42: Rohdaten zu Abb. 10: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Quercetin |       |       |        | Luteolin |       |       |        | Kämpferol |        |        |        | Apigenin |       |       |        |
|---------------|-----------|-------|-------|--------|----------|-------|-------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|-------|-------|--------|
|               | 0 µM      | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM     | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM      | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM     | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,57      | 0,30  | 0,14  | 0,26   | 0,59     | 0,30  | 0,19  | 0,01   | 0,75      | 0,85   | 0,71   | 0,58   | 0,77     | 0,26  | 0,11  | 0,05   |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 52,23 | 25,28 | 45,22  | 100,00   | 51,60 | 32,62 | 2,53   | 100,00    | 112,39 | 94,71  | 76,89  | 100,00   | 33,21 | 14,79 | 6,01   |
| Versuch 2 OD  | 0,87      | 0,72  | 0,38  | 0,09   | 0,77     | 0,22  | 0,19  | 0,01   | 0,61      | 0,70   | 0,63   | 0,41   | 0,63     | 0,38  | 0,34  | 0,23   |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 83,64 | 44,08 | 10,19  | 100,00   | 28,28 | 24,77 | 0,92   | 100,00    | 114,36 | 103,13 | 67,71  | 100,00   | 60,76 | 53,37 | 35,99  |
| Versuch 3 OD  | 0,85      | 0,83  | 0,43  | 0,12   | 0,68     | 0,30  | 0,37  | 0,30   | 0,69      | 0,68   | 0,71   | 0,32   | 0,55     | 0,23  | 0,18  | 0,09   |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 97,92 | 50,58 | 13,71  | 100,00   | 44,01 | 54,40 | 43,95  | 100,00    | 98,20  | 102,50 | 46,41  | 100,00   | 42,46 | 32,46 | 16,53  |
| MW OD         | 0,76      | 0,62  | 0,32  | 0,15   | 0,68     | 0,27  | 0,25  | 0,11   | 0,69      | 0,74   | 0,68   | 0,44   | 0,65     | 0,29  | 0,21  | 0,12   |
| MW [%]        | 100,00    | 77,93 | 39,98 | 23,04  | 100,00   | 41,30 | 37,26 | 15,80  | 100,00    | 108,32 | 100,11 | 63,67  | 100,00   | 45,48 | 33,54 | 19,51  |

**Tabelle 43: Rohdaten zu Abb. 11: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in MCF-7 Zellen.**

| MCF-7         | Quercetin |        |       |       | Luteolin |        |        |       | Kämpferol |        |        |        | Apigenin |       |        |        |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|----------|--------|--------|-------|-----------|--------|--------|--------|----------|-------|--------|--------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 100 µM   | 0 µM   | 10 µM  | 25 µM | 50 µM     | 100 µM | 0 µM   | 10 µM  | 25 µM    | 50 µM | 100 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,64      | 0,59   | 0,34  | 0,28  | 0,27     | 0,64   | 0,47   | 0,56  | 0,09      | 0,54   | 0,64   | 0,68   | 0,64     | 0,58  | 0,40   | 0,64   |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 92,65  | 53,04 | 43,61 | 41,93    | 100,00 | 73,69  | 87,44 | 14,56     | 84,28  | 100,00 | 106,18 | 100,45   | 90,42 | 63,01  | 100,00 |
| Versuch 2 OD  | 1,14      | 1,17   | 0,63  | 0,67  | 0,66     | 1,14   | 1,16   | 1,00  | 0,63      | 1,13   | 1,14   | 1,17   | 1,02     | 0,95  | 0,72   | 1,14   |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 102,83 | 55,20 | 59,02 | 58,40    | 100,00 | 101,50 | 88,20 | 54,99     | 98,91  | 100,00 | 103,07 | 89,25    | 83,76 | 63,21  | 100,00 |
| Versuch 3 OD  | 1,08      | 1,11   | 0,85  | 0,50  | 0,47     | 1,08   | 0,86   | 0,91  | 0,28      | 0,96   | 1,08   | 1,04   | 1,00     | 0,67  | 0,60   | 1,08   |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 102,59 | 78,64 | 46,54 | 43,21    | 100,00 | 79,50  | 83,85 | 25,97     | 89,26  | 100,00 | 96,52  | 92,84    | 62,32 | 55,95  | 100,00 |
| MW OD         | 0,95      | 0,96   | 0,61  | 0,48  | 0,47     | 0,95   | 0,83   | 0,82  | 0,33      | 0,88   | 0,95   | 0,96   | 0,89     | 0,73  | 0,57   | 0,95   |
| MW [%]        | 100,00    | 99,36  | 62,29 | 49,72 | 47,85    | 100,00 | 84,89  | 86,50 | 31,84     | 90,81  | 100,00 | 101,93 | 94,18    | 78,84 | 60,72  | 100,00 |

**Tabelle 44: Rohdaten zu Abb. 12: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in HUH-7 Zellen.**

| HUH-7         | Quercetin |        |       |       | Luteolin |        |       |       | Kämpferol |        |        |        | Apigenin |       |        |        |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|----------|--------|-------|-------|-----------|--------|--------|--------|----------|-------|--------|--------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 100 µM   | 0 µM   | 10 µM | 25 µM | 50 µM     | 100 µM | 0 µM   | 10 µM  | 25 µM    | 50 µM | 100 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,5       | 0,5    | 0,5   | 0,4   | 0,4      | 0,5    | 0,4   | 0,3   | 0,2       | 0,3    | 0,5    | 0,5    | 0,4      | 0,4   | 0,3    | 0,5    |
| Versuch 1 [%] | 100,0     | 101,8  | 98,1  | 84,7  | 74,5     | 100,0  | 88,2  | 53,7  | 49,9      | 55,6   | 100,0  | 98,4   | 89,5     | 80,6  | 62,8   | 100,0  |
| Versuch 2 OD  | 0,5       | 0,6    | 0,5   | 0,5   | 0,4      | 0,5    | 0,5   | 0,2   | 0,2       | 0,2    | 0,5    | 0,5    | 0,5      | 0,4   | 0,3    | 0,5    |
| Versuch 2 [%] | 100,0     | 112,3  | 90,5  | 88,6  | 72,1     | 100,0  | 91,1  | 40,4  | 35,0      | 46,1   | 100,0  | 102,7  | 97,4     | 75,8  | 51,0   | 100,0  |
| Versuch 3 OD  | 0,2       | 0,2    | 0,2   | 0,2   | 0,2      | 0,2    | 0,2   | 0,1   | 0,1       | 0,1    | 0,2    | 0,3    | 0,3      | 0,2   | 0,2    | 0,2    |
| Versuch 3 [%] | 100,0     | 104,9  | 104,8 | 96,5  | 93,1     | 100,0  | 101,4 | 56,2  | 34,2      | 39,1   | 100,0  | 123,7  | 118,3    | 89,2  | 70,7   | 100,0  |
| Versuch 4 OD  | 0,4       | 0,5    | 0,4   | 0,3   | 0,2      | 0,4    | 0,4   | 0,2   | 0,2       | 0,1    | 0,4    | 0,5    | 0,4      | 0,4   | 0,2    | 0,4    |
| Versuch 4 [%] | 100,0     | 110,3  | 83,5  | 77,3  | 59,2     | 100,0  | 106,9 | 54,6  | 36,3      | 20,8   | 100,0  | 129,8  | 106,5    | 94,7  | 55,6   | 100,0  |
| Versuch 5 OD  | 0,7       | 0,7    | 0,6   | 0,5   | 0,4      | 0,7    | 0,7   | 0,4   | 0,2       | 0,2    | 0,7    | 0,7    | 0,7      | 0,6   | 0,4    | 0,7    |
| Versuch 5 [%] | 100,0     | 100,7  | 95,2  | 76,7  | 61,4     | 100,0  | 96,6  | 52,5  | 35,3      | 26,8   | 100,0  | 109,6  | 101,6    | 82,2  | 52,7   | 100,0  |
| Versuch 6 OD  | 0,4       | 0,3    | 0,4   | 0,3   | 0,2      | 0,4    | 0,4   | 0,1   | 0,1       | 0,2    | 0,4    | 0,4    | 0,4      | 0,3   | 0,2    | 0,4    |
| Versuch 6 [%] | 100,0     | 97,2   | 103,1 | 91,5  | 57,9     | 100,0  | 100,8 | 41,7  | 35,0      | 51,7   | 100,0  | 109,7  | 107,6    | 89,9  | 62,9   | 100,0  |
| MW OD         | 0,44      | 0,46   | 0,42  | 0,37  | 0,30     | 0,44   | 0,43  | 0,22  | 0,17      | 0,17   | 0,44   | 0,49   | 0,45     | 0,37  | 0,26   | 0,44   |
| MW [%]        | 100,00    | 104,52 | 95,87 | 85,88 | 69,70    | 100,00 | 97,50 | 49,85 | 37,60     | 40,04  | 100,00 | 112,34 | 103,48   | 85,41 | 59,31  | 100,00 |

**Tabelle 45: Rohdaten zu Abb. 13: 48 h Zytotoxizität ausgewählter Flavonoide in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Quercetin |        |        |       | Luteolin |        |       |       | Kämpferol |        |        |        | Apigenin |        |        |        |
|---------------|-----------|--------|--------|-------|----------|--------|-------|-------|-----------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM | 100 µM   | 0 µM   | 10 µM | 25 µM | 50 µM     | 100 µM | 0 µM   | 10 µM  | 25 µM    | 50 µM  | 100 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,63      | 1,46   | 1,10   | 0,82  | 0,80     | 1,63   | 1,19  | 1,10  | 0,13      | 0,25   | 1,63   | 1,48   | 1,57     | 1,75   | 1,66   | 1,63   |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 90,00  | 67,36  | 50,57 | 49,06    | 100,00 | 73,40 | 67,77 | 7,85      | 15,29  | 100,00 | 90,93  | 96,37    | 107,50 | 101,73 | 100,00 |
| Versuch 2 OD  | 1,22      | 1,40   | 1,23   | 0,81  | 0,74     | 1,22   | 1,13  | 0,95  | 0,08      | 0,23   | 1,22   | 1,37   | 1,47     | 1,43   | 1,21   | 1,22   |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 114,79 | 100,69 | 65,97 | 60,73    | 100,00 | 92,28 | 77,44 | 6,63      | 18,98  | 100,00 | 111,91 | 120,58   | 117,12 | 98,74  | 100,00 |
| Versuch 3 OD  | 2,15      | 2,10   | 1,91   | 1,52  | 1,60     | 2,15   | 1,96  | 1,72  | 0,53      | 1,14   | 2,15   | 2,09   | 2,11     | 2,15   | 2,08   | 2,15   |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 97,46  | 88,55  | 70,65 | 74,38    | 100,00 | 90,79 | 79,95 | 24,69     | 52,68  | 100,00 | 97,19  | 97,89    | 99,92  | 96,39  | 100,00 |
| MW OD         | 1,67      | 1,66   | 1,41   | 1,05  | 1,05     | 1,67   | 1,43  | 1,26  | 0,25      | 0,54   | 1,67   | 1,65   | 1,72     | 1,78   | 1,65   | 1,67   |
| MW [%]        | 100,00    | 100,75 | 85,53  | 62,40 | 61,39    | 100,00 | 85,49 | 75,05 | 13,06     | 28,98  | 100,00 | 100,01 | 104,95   | 108,18 | 98,95  | 100,00 |

**Tabelle 46: Rohdaten zu Abb. 14: 48 h Zytotoxizität aus *Eupatorium semialatum* isolierter Flavonoide in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Substanz 1  |         |        |        |        | Substanz 2  |         |        |        |        | Substanz 3  |         |        |        |        | Substanz 4  |         |        |        |        |
|---------------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,53        | 1,54    | 1,60   | 1,50   | 0,88   | 1,53        | 1,51    | 1,52   | 1,46   | 1,25   | 1,53        | 1,55    | 1,59   | 1,47   | 1,49   | 1,53        | 1,56    | 1,35   | 1,25   | 1,10   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 100,36  | 104,73 | 97,70  | 57,64  | 100,00      | 98,59   | 99,45  | 95,17  | 81,58  | 100,00      | 100,99  | 104,14 | 96,22  | 97,29  | 100,00      | 101,92  | 87,89  | 81,88  | 71,56  |
| Versuch 2 OD  | 1,16        | 1,04    | 1,25   | 1,13   | 0,80   | 1,16        | 1,09    | 1,06   | 1,02   | 0,81   | 1,16        | 1,18    | 1,07   | 1,19   | 1,14   | 1,16        | 1,13    | 1,00   | 0,91   | 0,78   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 89,58   | 107,97 | 97,86  | 69,32  | 100,00      | 94,06   | 91,29  | 88,05  | 70,04  | 100,00      | 101,69  | 92,50  | 102,81 | 98,82  | 100,00      | 97,96   | 86,56  | 78,27  | 67,22  |
| Versuch 3 OD  | 1,20        | 1,33    | 1,22   | 1,11   | 0,69   | 1,20        | 1,31    | 1,28   | 1,21   | 1,06   | 1,20        | 1,23    | 1,20   | 1,24   | 1,17   | 1,20        | 1,29    | 1,19   | 1,15   | 1,04   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 110,53  | 101,19 | 92,42  | 56,96  | 100,00      | 108,43  | 106,05 | 100,74 | 87,89  | 100,00      | 102,32  | 99,52  | 102,92 | 97,07  | 100,00      | 107,40  | 98,82  | 95,77  | 86,22  |
| MW OD         | 1,30        | 1,30    | 1,36   | 1,25   | 0,79   | 1,30        | 1,30    | 1,29   | 1,23   | 1,04   | 1,30        | 1,32    | 1,29   | 1,30   | 1,27   | 1,30        | 1,33    | 1,18   | 1,10   | 0,97   |
| MW [%]        | 0,00        | 10,47   | 3,39   | 3,09   | 6,95   | 0,00        | 7,35    | 7,39   | 6,36   | 9,05   | 0,00        | 0,66    | 5,86   | 3,84   | 0,95   | 0,00        | 4,74    | 6,73   | 9,24   | 9,95   |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| HepG2         | Substanz 5  |         |        |        |        | Substanz 6  |         |        |        |        | Substanz 7  |         |        |        |        | Substanz 8  |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,53        | 1,45    | 1,46   | 1,11   | 0,90   | 1,22        | 1,17    | 1,12   | 1,01   | 0,86   | 1,22        | 1,19    | 1,21   | 1,22   | 1,17   | 1,22        | 1,20    | 1,19   | 1,17   | 1,17   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 94,85   | 95,55  | 72,72  | 58,53  | 100,00      | 95,79   | 92,03  | 83,15  | 70,74  | 100,00      | 97,66   | 99,09  | 99,84  | 96,23  | 100,00      | 97,99   | 97,48  | 95,91  | 95,74  |
| Versuch 2 OD  | 1,16        | 1,14    | 1,09   | 0,90   | 0,70   | 1,51        | 1,46    | 1,58   | 1,28   | 1,18   | 1,51        | 1,47    | 1,54   | 1,46   | 1,43   | 1,51        | 1,51    | 1,57   | 1,51   | 1,48   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 98,50   | 94,09  | 77,36  | 60,53  | 100,00      | 96,37   | 104,30 | 84,56  | 77,96  | 100,00      | 97,18   | 101,82 | 96,26  | 94,14  | 100,00      | 99,99   | 103,97 | 99,42  | 97,94  |
| Versuch 3 OD  | 1,20        | 1,20    | 1,13   | 0,91   | 0,58   | 1,28        | 1,33    | 1,25   | 1,17   | 1,05   | 1,28        | 1,32    | 1,33   | 1,33   | 1,23   | 1,28        | 1,33    | 1,24   | 1,32   | 1,41   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 99,41   | 93,78  | 75,26  | 47,94  | 100,00      | 103,35  | 97,15  | 90,86  | 81,85  | 100,00      | 102,75  | 104,00 | 104,02 | 95,97  | 100,00      | 103,29  | 96,91  | 102,74 | 109,96 |
| MW OD         | 1,30        | 1,26    | 1,23   | 0,97   | 0,72   | 1,34        | 1,32    | 1,32   | 1,15   | 1,03   | 1,34        | 1,33    | 1,36   | 1,34   | 1,28   | 1,34        | 1,35    | 1,34   | 1,33   | 1,35   |
| MW [%]        | 0,00        | 2,41    | 0,94   | 2,32   | 6,77   | 0,00        | 4,21    | 6,16   | 4,10   | 5,64   | 0,00        | 3,09    | 2,46   | 3,88   | 1,14   | 0,00        | 2,68    | 3,92   | 3,42   | 7,66   |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| HepG2         | Substanz 9  |         |        |        |        | Substanz 10 |         |        |        |        | Substanz 11 |         |        |        |        | Substanz 12 |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,22        | 1,19    | 1,21   | 1,23   | 1,22   | 1,22        | 1,12    | 1,13   | 1,14   | 1,17   | 1,22        | 1,24    | 1,28   | 1,24   | 1,21   | 1,33        | 1,37    | 1,39   | 1,30   | 1,22   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 97,68   | 99,59  | 101,17 | 99,74  | 100,00      | 92,05   | 93,03  | 93,59  | 96,05  | 100,00      | 101,46  | 104,57 | 101,42 | 99,49  | 100,00      | 103,05  | 104,54 | 97,22  | 91,50  |
| Versuch 2 OD  | 1,51        | 1,44    | 1,45   | 1,47   | 1,35   | 1,51        | 1,48    | 1,45   | 1,45   | 1,51   | 1,51        | 1,47    | 1,55   | 1,49   | 1,51   | 1,31        | 1,32    | 1,30   | 1,22   | 1,25   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 95,18   | 95,75  | 97,16  | 89,15  | 100,00      | 97,79   | 96,05  | 95,95  | 99,59  | 100,00      | 97,31   | 102,13 | 98,07  | 99,53  | 100,00      | 100,63  | 99,24  | 92,98  | 94,95  |
| Versuch 3 OD  | 1,28        | 1,37    | 1,35   | 1,37   | 1,29   | 1,28        | 1,21    | 1,27   | 1,27   | 1,32   | 1,28        | 1,38    | 1,37   | 1,34   | 1,27   | 1,57        | 1,60    | 1,51   | 1,43   | 1,50   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 106,44  | 105,47 | 107,04 | 100,76 | 100,00      | 94,59   | 98,66  | 99,22  | 102,67 | 100,00      | 107,45  | 106,97 | 104,08 | 99,14  | 100,00      | 102,36  | 96,45  | 91,58  | 95,66  |
| MW OD         | 1,34        | 1,33    | 1,34   | 1,36   | 1,29   | 1,34        | 1,27    | 1,29   | 1,29   | 1,33   | 1,34        | 1,36    | 1,40   | 1,35   | 1,33   | 1,40        | 1,43    | 1,40   | 1,32   | 1,32   |
| MW [%]        | 100,00      | 99,77   | 100,27 | 101,79 | 96,55  | 100,00      | 94,81   | 95,91  | 96,25  | 99,44  | 100,00      | 102,07  | 104,55 | 101,19 | 99,39  | 100,00      | 102,01  | 100,08 | 93,93  | 94,04  |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| HepG2         | Substanz 13 |         |        |        |        | Substanz 14 |         |        |        |        | Substanz 15 |         |        |        |        | Substanz 16 |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,33        | 1,28    | 1,27   | 1,28   | 1,20   | 1,33        | 1,33    | 1,35   | 1,33   | 1,09   | 1,33        | 1,26    | 1,33   | 1,29   | 1,18   | 1,33        | 1,58    | 1,29   | 1,23   | 1,29   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 96,16   | 95,09  | 96,30  | 89,71  | 100,00      | 99,71   | 101,35 | 99,57  | 81,77  | 100,00      | 94,35   | 99,97  | 96,99  | 88,13  | 100,00      | 118,28  | 96,84  | 92,51  | 96,57  |
| Versuch 2 OD  | 1,31        | 1,27    | 1,31   | 1,25   | 1,22   | 1,31        | 1,31    | 1,29   | 1,24   | 1,18   | 1,31        | 1,16    | 1,25   | 1,06   | 1,08   | 1,31        | 1,33    | 1,27   | 1,26   | 1,18   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 96,81   | 99,57  | 95,38  | 93,18  | 100,00      | 99,91   | 97,98  | 94,19  | 90,20  | 100,00      | 88,51   | 95,24  | 80,78  | 82,08  | 100,00      | 101,25  | 96,89  | 95,86  | 89,95  |
| Versuch 3 OD  | 1,57        | 1,53    | 1,48   | 1,49   | 1,45   | 1,57        | 1,57    | 1,51   | 1,53   | 1,42   | 1,57        | 1,54    | 1,37   | 1,46   | 1,44   | 1,57        | 1,53    | 1,49   | 1,50   | 1,50   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 97,97   | 94,32  | 94,94  | 92,47  | 100,00      | 100,07  | 96,65  | 97,94  | 90,89  | 100,00      | 98,46   | 87,21  | 93,19  | 91,77  | 100,00      | 97,63   | 95,37  | 96,02  | 95,65  |
| MW OD         | 1,40        | 1,36    | 1,35   | 1,34   | 1,29   | 1,40        | 1,40    | 1,38   | 1,37   | 1,23   | 1,40        | 1,32    | 1,32   | 1,27   | 1,23   | 1,40        | 1,48    | 1,35   | 1,33   | 1,32   |
| MW [%]        | 100,00      | 96,98   | 96,33  | 95,54  | 91,79  | 100,00      | 99,90   | 98,66  | 97,23  | 87,62  | 100,00      | 93,77   | 94,14  | 90,32  | 87,33  | 100,00      | 105,72  | 96,37  | 94,79  | 94,06  |

**Tabelle 47: Rohdaten zu Abb. 15: 48 h Zytotoxizität aus *Eupatorium semialatum* isolierter Flavonoide in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Substanz 1  |         |        |        |        | Substanz 2  |         |        |        |        | Substanz 3  |         |        |        |        | Substanz 4  |         |        |        |        |
|---------------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,71        | 1,57    | 1,60   | 1,59   | 1,37   | 1,71        | 1,57    | 1,53   | 1,41   | 1,10   | 1,71        | 1,62    | 1,47   | 1,41   | 1,19   | 1,71        | 1,09    | 0,48   | 0,61   | 1,06   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 91,51   | 93,43  | 92,98  | 79,86  | 100,00      | 91,85   | 89,48  | 82,18  | 64,33  | 100,00      | 94,24   | 85,61  | 82,06  | 69,15  | 100,00      | 63,69   | 27,72  | 35,85  | 61,81  |
| Versuch 2 OD  | 0,97        | 0,77    | 1,06   | 1,09   | 0,85   | 0,97        | 0,93    | 0,95   | 0,81   | 0,75   | 0,97        | 0,95    | 0,92   | 0,83   | 0,96   | 0,97        | 0,64    | 0,46   | 0,51   | 0,91   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 79,14   | 109,18 | 112,69 | 87,39  | 100,00      | 95,62   | 98,30  | 83,70  | 76,78  | 100,00      | 97,35   | 94,77  | 85,14  | 98,45  | 100,00      | 65,63   | 47,52  | 52,14  | 94,00  |
| Versuch 3 OD  | 2,01        | 2,04    | 2,01   | 1,88   | 1,25   | 2,01        | 1,98    | 1,99   | 1,96   | 1,69   | 2,01        | 2,04    | 2,04   | 2,05   | 1,94   | 2,01        | 1,29    | 0,42   | 0,79   | 1,11   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 101,48  | 99,85  | 93,61  | 62,19  | 100,00      | 98,49   | 98,98  | 97,30  | 83,83  | 100,00      | 101,40  | 101,17 | 101,94 | 96,21  | 100,00      | 64,34   | 20,81  | 39,15  | 55,05  |
| MW OD         | 1,57        | 1,46    | 1,56   | 1,52   | 1,16   | 1,57        | 1,49    | 1,49   | 1,39   | 1,18   | 1,57        | 1,53    | 1,47   | 1,43   | 1,36   | 1,57        | 1,01    | 0,45   | 0,64   | 1,03   |
| MW [%]        | 100,00      | 90,71   | 100,82 | 99,76  | 76,48  | 100,00      | 95,32   | 95,59  | 87,73  | 74,98  | 100,00      | 97,66   | 93,85  | 89,71  | 87,94  | 100,00      | 64,55   | 32,02  | 42,38  | 70,29  |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| Hct116        | Substanz 5  |         |        |        |        | Substanz 6  |         |        |        |        | Substanz 7  |         |        |        |        | Substanz 8  |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,71        | 1,43    | 1,46   | 1,21   | 0,96   | 1,61        | 1,50    | 1,49   | 1,29   | 0,98   | 1,61        | 1,41    | 1,46   | 1,34   | 1,20   | 1,61        | 1,50    | 1,44   | 1,29   | 1,24   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 83,18   | 84,93  | 70,42  | 55,81  | 100,00      | 93,19   | 92,53  | 79,99  | 60,79  | 100,00      | 87,44   | 90,56  | 83,10  | 74,40  | 100,00      | 93,34   | 89,13  | 80,09  | 77,07  |
| Versuch 2 OD  | 0,97        | 0,97    | 0,65   | 0,64   | 0,66   | 1,10        | 1,18    | 1,16   | 1,17   | 1,24   | 1,10        | 1,16    | 1,20   | 1,19   | 1,30   | 1,10        | 1,06    | 1,07   | 1,16   | 1,28   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 99,55   | 66,99  | 65,93  | 67,95  | 100,00      | 107,25  | 105,41 | 106,26 | 112,98 | 100,00      | 105,28  | 108,93 | 107,83 | 117,74 | 100,00      | 96,20   | 97,23  | 104,96 | 116,37 |
| Versuch 3 OD  | 2,01        | 1,94    | 1,84   | 1,61   | 1,40   | 1,70        | 1,54    | 1,70   | 1,75   | 1,39   | 1,70        | 1,90    | 1,61   | 1,39   | 1,21   | 1,70        | 1,71    | 1,82   | 1,81   | 1,92   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 96,52   | 91,62  | 80,07  | 69,70  | 100,00      | 90,60   | 100,43 | 102,88 | 82,18  | 100,00      | 111,83  | 95,03  | 81,75  | 71,61  | 100,00      | 101,01  | 107,24 | 106,52 | 113,40 |
| MW OD         | 1,57        | 1,44    | 1,32   | 1,15   | 1,01   | 1,47        | 1,41    | 1,45   | 1,40   | 1,21   | 1,47        | 1,49    | 1,42   | 1,30   | 1,24   | 1,47        | 1,43    | 1,44   | 1,42   | 1,48   |
| MW [%]        | 100,00      | 93,08   | 81,18  | 72,14  | 64,49  | 100,00      | 97,01   | 99,46  | 96,38  | 85,31  | 100,00      | 101,52  | 98,17  | 90,89  | 87,91  | 100,00      | 96,85   | 97,87  | 97,19  | 102,28 |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| Hct116        | Substanz 9  |         |        |        |        | Substanz 10 |         |        |        |        | Substanz 11 |         |        |        |        | Substanz 12 |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,61        | 1,49    | 1,51   | 1,31   | 1,19   | 1,61        | 1,61    | 1,52   | 1,50   | 1,39   | 1,61        | 1,48    | 1,35   | 1,43   | 1,67   | 1,76        | 1,62    | 1,62   | 1,56   | 1,46   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 92,47   | 93,87  | 81,13  | 74,08  | 100,00      | 99,94   | 94,17  | 93,36  | 86,55  | 100,00      | 91,58   | 83,82  | 88,74  | 103,39 | 100,00      | 91,98   | 92,44  | 88,94  | 82,95  |
| Versuch 2 OD  | 1,10        | 1,23    | 1,14   | 1,08   | 1,11   | 1,10        | 1,21    | 1,16   | 1,17   | 1,15   | 1,10        | 1,19    | 1,16   | 1,26   | 1,24   | 1,62        | 1,66    | 1,67   | 1,79   | 1,55   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 111,64  | 103,27 | 98,01  | 100,97 | 100,00      | 109,65  | 105,45 | 106,19 | 104,34 | 100,00      | 108,31  | 104,94 | 114,22 | 112,31 | 100,00      | 102,58  | 103,39 | 110,76 | 95,86  |
| Versuch 3 OD  | 1,70        | 1,93    | 1,81   | 1,69   | 1,52   | 1,70        | 1,79    | 1,89   | 1,88   | 1,97   | 1,70        | 1,92    | 1,75   | 1,66   | 1,71   | 2,06        | 2,10    | 2,12   | 2,08   | 2,08   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 113,63  | 106,58 | 99,85  | 89,86  | 100,00      | 105,77  | 111,60 | 111,07 | 116,12 | 100,00      | 113,06  | 103,23 | 97,71  | 100,54 | 100,00      | 101,94  | 102,99 | 100,88 | 101,06 |
| MW OD         | 1,47        | 1,55    | 1,49   | 1,36   | 1,28   | 1,47        | 1,54    | 1,52   | 1,52   | 1,50   | 1,47        | 1,53    | 1,42   | 1,45   | 1,54   | 1,81        | 1,79    | 1,81   | 1,81   | 1,70   |
| MW [%]        | 100,00      | 105,91  | 101,24 | 93,00  | 88,30  | 100,00      | 105,12  | 103,74 | 103,54 | 102,34 | 100,00      | 104,32  | 97,33  | 100,22 | 105,41 | 100,00      | 98,84   | 99,61  | 100,19 | 93,29  |
|               |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |             |         |        |        |        |
| Hct116        | Substanz 13 |         |        |        |        | Substanz 14 |         |        |        |        | Substanz 15 |         |        |        |        | Substanz 16 |         |        |        |        |
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,76        | 1,75    | 1,72   | 1,76   | 1,80   | 1,76        | 1,69    | 1,70   | 1,62   | 1,43   | 1,76        | 1,59    | 1,57   | 1,45   | 1,43   | 1,76        | 1,59    | 1,62   | 1,36   | 1,32   |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 99,75   | 98,16  | 100,27 | 102,69 | 100,00      | 96,33   | 96,67  | 92,18  | 81,15  | 100,00      | 90,20   | 89,52  | 82,58  | 81,52  | 100,00      | 90,66   | 91,94  | 77,44  | 75,13  |
| Versuch 2 OD  | 1,62        | 1,93    | 1,89   | 1,91   | 1,80   | 1,62        | 1,94    | 1,72   | 1,66   | 1,46   | 1,62        | 1,58    | 1,61   | 1,58   | 1,40   | 1,62        | 1,58    | 1,37   | 1,64   | 1,71   |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 119,78  | 117,16 | 118,40 | 111,37 | 100,00      | 120,22  | 106,21 | 102,55 | 90,58  | 100,00      | 97,70   | 99,78  | 97,92  | 86,79  | 100,00      | 97,93   | 84,64  | 101,65 | 105,59 |
| Versuch 3 OD  | 2,06        | 2,07    | 2,04   | 1,96   | 1,97   | 2,06        | 2,07    | 2,07   | 2,02   | 2,03   | 2,06        | 2,04    | 2,00   | 1,73   | 1,98   | 2,06        | 2,04    | 1,73   | 2,03   | 2,05   |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 100,50  | 99,21  | 95,13  | 95,49  | 100,00      | 100,38  | 100,31 | 97,96  | 98,67  | 100,00      | 98,97   | 96,91  | 84,12  | 96,07  | 100,00      | 98,97   | 84,16  | 98,56  | 99,51  |
| MW OD         | 1,81        | 1,92    | 1,89   | 1,88   | 1,86   | 1,81        | 1,90    | 1,83   | 1,76   | 1,64   | 1,81        | 1,73    | 1,73   | 1,59   | 1,60   | 1,81        | 1,74    | 1,57   | 1,68   | 1,69   |
| MW [%]        | 100,00      | 106,67  | 104,84 | 104,60 | 103,19 | 100,00      | 105,64  | 101,06 | 97,56  | 90,13  | 100,00      | 95,62   | 95,40  | 88,21  | 88,13  | 100,00      | 95,86   | 86,91  | 92,55  | 93,41  |

**Tabelle 48: Rohdaten zu Abb. 16: Quercetinstabilität in DMEM bei verschiedenen pH-Werten.**

| pH=7,6        | 0 min  | 16 min | 27 min | 43 min | 58 min | 73 min |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Versuch 1 OD  | 0,43   | 0,40   | 0,42   | 0,38   | 0,38   | 0,35   |
| Versuch 1 [%] | 100,00 | 93,94  | 98,18  | 89,46  | 88,76  | 80,59  |
| pH7,2         | 0 min  | 20 min | 36 min | 52 min | 83 min |        |
| Versuch 2 OD  | 0,42   | 0,40   | 0,36   | 0,37   | 0,32   |        |
| Versuch 2 [%] | 100,00 | 93,24  | 85,30  | 86,92  | 76,61  |        |
| pH=8,1        | 0 min  | 16 min | 27 min | 43 min | 58 min | 73 min |
| Versuch 1 OD  | 0,45   | 0,31   | 0,25   | 0,22   | 0,19   | 0,17   |
| Versuch 1 [%] | 100,00 | 69,17  | 57,13  | 49,00  | 41,93  | 37,21  |
| pH 8          | 0 min  | 20 min | 36 min | 52 min | 83 min |        |
| Versuch 2 OD  | 0,43   | 0,23   | 0,20   | 0,15   | 0,14   |        |
| Versuch 2 [%] | 100,00 | 52,77  | 46,71  | 35,79  | 31,75  |        |

**Tabelle 49: zu Abb. 17: Quercetinstabilität in DMEM bei einer Koinkubation mit verschiedenen Antioxidantien. Dargestellt ist die Peakfläche der jeweiligen Proben.**

| Quercetin                 |       |        |        |         |
|---------------------------|-------|--------|--------|---------|
| t[min]                    | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Versuch 1 [mAU*min]       | 9,9   | 3,9    | 1,1    | 0,0     |
| Versuch 2 [mAU*min]       | 10,2  | 0,9    | 0,0    | 0,0     |
| MW                        | 10,1  | 2,4    | 0,6    | 0,0     |
| Quercetin + Ascorbinsäure |       |        |        |         |
| t[min]                    | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Versuch 1 [mAU*min]       | 12,1  | 11,4   | 11,0   | 10,5    |
| Versuch 2 [mAU*min]       | 10,9  | 11,5   | 11,8   | 5,1     |
| MW                        | 11,5  | 11,4   | 11,4   | 7,8     |
| Quercetin + Glutathion    |       |        |        |         |
| t[min]                    | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Versuch 1 [mAU*min]       | 10,0  | k.A.   | 6,3    | 0,0     |
| Versuch 2 [mAU*min]       | 9,3   | 7,9    | 4,8    | 0,2     |
| MW                        | 9,7   | 7,9    | 5,5    | 0,1     |

**Tabelle 50: Rohdaten zur Ermittlung der Eichgeraden.** Die Eichreihen wurden mit den Werten von 12,5 µM bis 100 µM berechnet. Die Konzentrationen von 3,13 µM bis 6,25 µM dienten der Ermittlung des Detektionslimits. Eichgerade Quercetin:  $y=0,0478x-0,2168$ ;  $R^2 = 0,997$ ; Eichgerade Kämpferol:  $y=0,0199x-0,4299$ ;  $R^2 = 0,9906$ ; Eichgerade Luteolin:  $y=0,0431x-0,0178$ ;  $R^2 = 0,9999$ ; Eichgerade Apigenin:  $y=0,0311x-0,142$ ;  $R^2 = 0,9992$

| Quercetin           | 0 µM | 3,125 µM | 6,25 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
|---------------------|------|----------|---------|---------|-------|-------|--------|
| ng / Injektion      | 0    |          |         | 75,5    | 151   | 302   | 604    |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0    |          |         | 3,44    | 6,79  | 13,62 | 28,17  |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0    |          |         | 3,24    | 6,45  | 13,54 | 28,02  |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0    |          |         | 4,09    | 6,94  | 13,74 | 27,44  |
| Versuch 4 [mAU*min] | 0    |          |         | 3,17    | 6,47  | 13,43 | 27,51  |
| Versuch 5 [mAU*min] | 0    | 0,45     | 1,35    | 3,27    | 7,23  | 15,97 | 32,93  |
| MW [mAU*min]        | 0    | 0,45     | 1,35    | 3,44    | 6,78  | 14,06 | 28,81  |
|                     |      |          |         |         |       |       |        |
| Kämpferol           | 0 µM | 3,125 µM | 6,25 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| ng / Injektion      | 0    | 17,875   | 35,75   | 71,5    | 143   | 286   | 572    |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0    |          |         | 1,18    | 2,31  | 4,63  | 9,24   |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0    | 0,06     | 0,31    | 0,84    | 1,67  | 4,01  | 8,28   |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0    | 0,43     | 0,71    | 1,55    | 2,13  | 5,70  | 14,30  |
| MW [mAU*min]        | 0    | 0,25     | 0,51    | 1,20    | 1,90  | 4,86  | 11,29  |
|                     |      |          |         |         |       |       |        |
| Luteolin            | 0 µM | 3,125 µM | 6,25 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| ng / Injektion      | 0    | 17,875   | 35,75   | 71,5    | 143   | 286   | 572    |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0    |          |         | 4,32    | 7,76  | 13,47 | 25,63  |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0    |          |         | 3,57    | 6,63  | 12,95 | 25,85  |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0    |          |         | 1,93    | 4,98  | 10,68 | 22,64  |
| Versuch 4 [mAU*min] | 0    | 0,46     | 0,80    | 2,03    | 5,69  | 12,10 | 24,51  |
| MW [mAU*min]        | 0    | 0,46     | 0,80    | 2,96    | 6,27  | 12,30 | 24,66  |
|                     |      |          |         |         |       |       |        |
| Apigenin            | 0 µM | 3,125 µM | 6,25 µM | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| ng / Injektion      | 0    | 16,875   | 33,75   | 67,5    | 135   | 270   | 540    |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0    |          |         | 2,71    | 5,16  | 9,79  | 18,62  |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0    |          |         | 1,32    | 4,08  | 8,14  | 16,06  |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0    | 0,22     | 0,69    | 1,7     | 3,74  | 7,89  | 15,35  |
| Versuch 4 [mAU*min] | 0    | 0,56     | 0,97    | 0,89    | 4,02  | 7,09  | 13,83  |
| MW [mAU*min]        | 0    | 0,39     | 0,83    | 1,66    | 4,25  | 8,23  | 16,68  |

**Tabelle 51: Rohdaten zu Abb.18: Intrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Apigenin.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| Hct116 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein     | ng Apigenin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]        |                        |
| 0 h             | 0        |              |             |             | 1737,25     |                        |
| 1/4 h           | 1,13     | 40,90        | 613,50      | 0,61        | 1505,90     | 0,41                   |
| 1 h             | 0,79     | 29,97        | 449,52      | 0,45        | 1556,95     | 0,29                   |
| 2 h             | 1,07     | 38,97        | 584,57      | 0,58        | 1465,51     | 0,40                   |
| 4 h             | 0,68     | 26,43        | 396,46      | 0,40        | 1685,42     | 0,24                   |
| 6 h             | 0,77     | 29,32        | 439,87      | 0,44        | 1424,04     | 0,31                   |
| Versuch 2       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,23     | 11,96        | 179,42      | 0,18        | 1184,42     | 0,15                   |
| 1/4 h           | 1,96     | 67,59        | 1013,83     | 1,01        | 653,81      | 1,55                   |
| 1 h             | 1,61     | 56,33        | 845,02      | 0,85        | 795,24      | 1,06                   |
| 2 h             | 1,37     | 48,62        | 729,26      | 0,73        | 1087,27     | 0,67                   |
| 4 h             | 1,10     | 39,94        | 599,04      | 0,60        | 909,99      | 0,66                   |
| 6 h             | 1,20     | 43,15        | 647,27      | 0,65        | 1280,14     | 0,51                   |
| Versuch 3       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,17     | 10,03        | 150,48      | 0,15        | 1571,89     | 0,10                   |
| 1/4 h           | 1,71     | 59,55        | 893,25      | 0,89        | 1240,48     | 0,72                   |
| 1 h             | 1,47     | 51,83        | 777,49      | 0,78        | 1560,61     | 0,50                   |
| 2 h             | 0,80     | 30,29        | 454,34      | 0,45        | 1544,10     | 0,29                   |
| 4 h             | 0,95     | 35,11        | 526,69      | 0,53        | 1283,99     | 0,41                   |
| 6 h             | 0,59     | 23,54        | 353,05      | 0,35        | 1172,59     | 0,30                   |
| Versuch 4       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,10     | 7,78         | 116,72      | 0,12        | 1029,15     | 0,11                   |
| 1/4 h           | 1,66     | 57,94        | 869,13      | 0,87        | 1089,95     | 0,80                   |
| 1 h             | 1,20     | 43,15        | 647,27      | 0,65        | 1008,08     | 0,64                   |
| 2 h             | 1,31     | 46,69        | 700,32      | 0,70        | 1106,12     | 0,63                   |
| 4 h             | 0,70     | 27,07        | 406,11      | 0,41        | 1006,17     | 0,40                   |
| 6 h             | 0,62     | 24,50        | 367,52      | 0,37        | 1371,68     | 0,27                   |
| Versuch 5       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,34     | 15,50        | 232,48      | 0,23        | 1602,32     | 0,15                   |
| 1/4 h           | 1,77     | 61,48        | 922,19      | 0,92        | 1755,11     | 0,53                   |
| 1 h             | 1,89     | 65,34        | 980,06      | 0,98        | 1494,98     | 0,66                   |
| 6 h             | 1,86     | 64,37299035  | 965,5948553 | 0,965594855 | 2208,787712 | 0,437160552            |

**Tabelle 52: Rohdaten zu Abb.18: Intrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Kämpferol.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| Hct116 Kämpferol | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Kämpferol/µg Protein |
|------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1        | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 0 h              | 0,00     | 21,51        | 322,69      | 0,32        | 1622,00 | 0,20                    |
| 1/4 h            | 0,59     | 51,16        | 767,41      | 0,77        | 1995,00 | 0,38                    |
| 1 h              | 0,43     | 43,12        | 646,81      | 0,65        | 1545,00 | 0,42                    |
| 2 h              | 0,45     | 44,13        | 661,88      | 0,66        | 1983,79 | 0,33                    |
| 4 h              | 0,46     | 44,63        | 669,42      | 0,67        | 2146,00 | 0,31                    |
| 6 h              | 0,48     | 45,63        | 684,50      | 0,68        | 1480,00 | 0,46                    |
| Versuch 2        |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h              | 0,11     | 27,04        | 405,60      | 0,41        | 1441,00 | 0,28                    |
| 1/4 h            | 0,74     | 58,70        | 880,48      | 0,88        | 1707,00 | 0,52                    |
| 1 h              | 0,70     | 56,69        | 850,33      | 0,85        | 1140,00 | 0,75                    |
| 2 h              | 0,81     | 62,22        | 933,24      | 0,93        | 1007,00 | 0,93                    |
| 4 h              | 0,73     | 58,20        | 872,94      | 0,87        | 1170,00 | 0,75                    |
| 6 h              | 0,47     | 45,13        | 676,96      | 0,68        | 1647,00 | 0,41                    |
| Versuch 3        |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h              | 0,00     | 21,51        | 322,69      | 0,32        | 2295,50 | 0,14                    |
| 1/4 h            | 0,47     | 45,13        | 676,96      | 0,68        | 2264,35 | 0,30                    |
| 1 h              | 0,43     | 43,12        | 646,81      | 0,65        | 1623,39 | 0,40                    |
| 2 h              | 0,75     | 59,20        | 888,02      | 0,89        | 2409,62 | 0,37                    |
| 4 h              | 0,43     | 43,12        | 646,81      | 0,65        | 2332,53 | 0,28                    |
| 6 h              | 0,49     | 46,14        | 692,04      | 0,69        | 1955,66 | 0,35                    |
| Versuch 4        |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h              | 0,09     | 26,04        | 390,53      | 0,39        | 1809,35 | 0,22                    |
| 1/4 h            | 0,63     | 53,17        | 797,56      | 0,80        | 2040,34 | 0,39                    |
| 1 h              | 0,51     | 47,14        | 707,11      | 0,71        | 1938,23 | 0,36                    |
| 2 h              | 0,26     | 34,58        | 518,67      | 0,52        | 1491,92 | 0,35                    |
| 4 h              | 0,55     | 49,15        | 737,26      | 0,74        | 1529,00 | 0,48                    |
| 6 h              | 0,55     | 49,15        | 737,26      | 0,74        | 1764,08 | 0,42                    |

**Tabelle 53: Rohdaten zu Abb.18: Intrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Luteolin.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| Hct116 Luteolin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Luteolin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                        |
| 0 h             | 0,62     | 14,80        | 221,97      | 0,22        | 2050,43 | 0,11                   |
| 1/4 h           | 5,40     | 125,70       | 1885,55     | 1,89        | 2373,98 | 0,79                   |
| 1 h             | 5,61     | 130,58       | 1958,63     | 1,96        | 2657,37 | 0,74                   |
| 2 h             | 5,24     | 121,99       | 1829,86     | 1,83        | 2293,65 | 0,80                   |
| 4 h             | 4,41     | 102,73       | 1541,00     | 1,54        | 2109,24 | 0,73                   |
| 6 h             | 4,57     | 106,45       | 1596,68     | 1,60        | 1937,19 | 0,82                   |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h             | 0,67     | 15,96        | 239,37      | 0,24        | 1992,36 | 0,01                   |
| 1/4 h           | 6,41     | 149,14       | 2237,05     | 2,24        | 1972,00 | 0,08                   |
| 1 h             | 6,59     | 153,31       | 2299,70     | 2,30        | 2135,00 | 0,07                   |
| 2 h             | 6,39     | 148,67       | 2230,09     | 2,23        | 1692,39 | 0,09                   |
| 4 h             | 5,36     | 124,77       | 1871,62     | 1,87        | 2111,00 | 0,06                   |
| 6 h             | 4,46     | 103,89       | 1558,40     | 1,56        | 1828,13 | 0,06                   |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h             | 0,88     | 20,83        | 312,46      | 0,31        | 1453,00 | 0,22                   |
| 1/4 h           | 6,82     | 158,65       | 2379,74     | 2,38        | 1858,47 | 1,28                   |
| 1 h             | 7,50     | 174,43       | 2616,40     | 2,62        | 1576,00 | 1,66                   |
| 2 h             | 6,62     | 154,01       | 2310,14     | 2,31        | 1631,00 | 1,42                   |
| 4 h             | 6,16     | 143,34       | 2150,05     | 2,15        | 1901,00 | 1,13                   |
| 6 h             | 5,74     | 133,59       | 2003,87     | 2,00        | 1467,00 | 1,37                   |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h             | 0,70     | 16,65        | 249,81      | 0,25        | 1533,00 | 0,16                   |
| 1/4 h           | 5,57     | 129,65       | 1944,71     | 1,94        | 1768,00 | 1,10                   |
| 1 h             | 5,83     | 135,68       | 2035,20     | 2,04        | 1514,00 | 1,34                   |
| 2 h             | 4,22     | 98,32        | 1474,87     | 1,47        | 1371,00 | 1,08                   |
| 4 h             | 4,05     | 94,38        | 1415,71     | 1,42        | 1511,00 | 0,94                   |
| 6 h             | 3,91     | 91,13        | 1366,98     | 1,37        | 1396,00 | 0,98                   |

**Tabelle 54: Rohdaten zu Abb.19: Extrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Apigenin.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h             | 5,09     | 168,23       | 42066,29    | 42,07       | 1737,25 |
| 1/4 h           | 4,73     | 156,66       | 39171,82    | 39,17       | 1505,90 |
| 1 h             | 4,81     | 159,23       | 39815,04    | 39,82       | 1556,95 |
| 2 h             | 5        | 165,34       | 41342,67    | 41,34       | 1465,51 |
| 4 h             | 4,7      | 155,69       | 38930,61    | 38,93       | 1685,42 |
| 6 h             | 4,82     | 159,55       | 39895,44    | 39,90       | 1424,04 |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 4,8      | 158,91       | 39734,63    | 39,73       | 1184,42 |
| 1/4 h           | 4,08     | 135,76       | 33945,69    | 33,95       | 653,81  |
| 1 h             | 4,45     | 147,65       | 36920,57    | 36,92       | 795,24  |
| 2 h             | 4,65     | 154,08       | 38528,60    | 38,53       | 1087,27 |
| 4 h             | 4,29     | 142,51       | 35634,14    | 35,63       | 909,99  |
| 6 h             | 4,45     | 147,65       | 36920,57    | 36,92       | 1280,14 |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 5,24     | 173,05       | 43272,32    | 43,27       | 1571,89 |
| 1/4 h           | 4,89     | 161,80       | 40458,25    | 40,46       | 1240,48 |
| 1 h             | 4,87     | 161,16       | 40297,45    | 40,30       | 1560,61 |
| 2 h             | 4,76     | 157,62       | 39413,03    | 39,41       | 1544,10 |
| 4 h             | 4,71     | 156,01       | 39011,02    | 39,01       | 1283,99 |
| 6 h             | 4,56     | 151,19       | 37804,99    | 37,80       | 1172,59 |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 4,05     | 134,79       | 33704,49    | 33,70       | 1029,15 |
| 1/4 h           | 4,97     | 164,37       | 41101,47    | 41,10       | 1089,95 |
| 1 h             | 4,8      | 158,91       | 39734,63    | 39,73       | 1008,08 |
| 2 h             | 4,9      | 162,12       | 40538,65    | 40,54       | 1106,12 |
| 4 h             | 4,28     | 142,19       | 35553,73    | 35,55       | 1006,17 |
| 6 h             | 4,9528   | 163,82       | 40963,17    | 40,96       | 1371,68 |
| Versuch 5       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 6,11     | 201,03       | 50267,29    | 50,27       | 1602,32 |
| 1/4 h           | 6,23     | 204,89       | 51232,11    | 51,23       | 1755,11 |
| 1 h             | 6,23     | 204,89       | 51232,11    | 51,23       | 1494,98 |
| 6 h             | 6,25     | 205,53       | 51392,91    | 51,39       | 2208,79 |

**Tabelle 55: Rohdaten zu Abb.19: Extrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Kämpferol.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Kämpferol | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1        | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h              | 2,74     | 159,20       | 39808,21    | 39,81       | 1622,00 |
| 1/4 h            | 2,77     | 160,71       | 40185,17    | 40,19       | 1995,00 |
| 1 h              | 2,29     | 136,59       | 34153,81    | 34,15       | 1545,00 |
| 2 h              | 2,15     | 129,55       | 32394,67    | 32,39       | 1983,79 |
| 4 h              | 1,94     | 119,00       | 29755,95    | 29,76       | 2146,00 |
| 6 h              | 2,7      | 157,19       | 39305,60    | 39,31       | 1480,00 |
| Versuch 2        |          |              |             |             |         |
| 0 h              | 3,46     | 195,38       | 48855,25    | 48,86       | 1441,00 |
| 1/4 h            | 2,46     | 145,13       | 36289,92    | 36,29       | 1707,00 |
| 1 h              | 2,96     | 170,26       | 42572,58    | 42,57       | 1140,00 |
| 2 h              | 2,63     | 153,67       | 38426,03    | 38,43       | 1007,00 |
| 4 h              | 2,5      | 147,14       | 36792,53    | 36,79       | 1170,00 |
| 6 h              | 2,71     | 157,69       | 39431,25    | 39,43       | 1647,00 |
| Versuch 3        |          |              |             |             |         |
| 0 h              | 3,28     | 186,34       | 46593,49    | 46,59       | 2295,50 |
| 1/4 h            | 2,05     | 124,53       | 31138,14    | 31,14       | 2264,35 |
| 1 h              | 2,05     | 124,53       | 31138,14    | 31,14       | 1623,39 |
| 2 h              | 2,58     | 151,16       | 37797,76    | 37,80       | 2409,62 |
| 4 h              | 2,15     | 129,55       | 32394,67    | 32,39       | 2332,53 |
| 6 h              | 1,9      | 116,99       | 29253,34    | 29,25       | 1955,66 |
| Versuch 4        |          |              |             |             |         |
| 0 h              | 2,49     | 146,64       | 36666,88    | 36,67       | 1809,35 |
| 1/4 h            | 1,97     | 120,51       | 30132,91    | 30,13       | 2040,34 |
| 1 h              | 2,08     | 126,04       | 31515,10    | 31,52       | 1938,23 |
| 2 h              | 2,41     | 142,62       | 35661,65    | 35,66       | 1491,92 |
| 4 h              | 2,23     | 133,57       | 33399,89    | 33,40       | 1529,00 |
| 6 h              | 1,97     | 120,51       | 30132,91    | 30,13       | 1764,08 |

**Tabelle 56: Rohdaten zu Abb.19: Extrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen -Luteolin.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Luteolin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 min           | 9,88     | 229,65       | 57423,32    | 57,42       | 2050    |
| 15 min          | 7,99     | 185,80       | 46458,25    | 46,46       | 2374    |
| 1 h             | 7,95     | 184,87       | 46226,18    | 46,23       | 2657    |
| 2 h             | 7,97     | 185,33       | 46342,21    | 46,34       | 2294    |
| 4 h             | 7,52     | 174,89       | 43731,48    | 43,73       | 2109    |
| 6 h             | 6,43     | 149,60       | 37407,71    | 37,41       | 1937    |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |
| 0 min           | 9,72     | 225,9        | 56495,1     | 56,5        | 1992    |
| 15 min          | 8,27     | 192,3        | 48082,7     | 48,1        | 1972    |
| 1 h             | 8,05     | 187,2        | 46806,3     | 46,8        | 2135    |
| 2 h             | 7,58     | 176,3        | 44079,6     | 44,1        | 1692    |
| 4 h             | 6,53     | 151,9        | 37987,9     | 38,0        | 2111    |
| 6 h             | 6,33     | 147,3        | 36827,5     | 36,8        | 1828    |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |
| 0 min           | 10,57    | 245,66       | 61426,44    | 61,43       | 1453    |
| 15 min          | 9,18     | 213,41       | 53362,18    | 53,36       | 1858    |
| 1 h             | 8,91     | 207,14       | 51795,74    | 51,80       | 1576    |
| 2 h             | 8,76     | 203,66       | 50925,50    | 50,93       | 1631    |
| 4 h             | 8,31     | 193,22       | 48314,77    | 48,31       | 1901    |
| 6 h             | 8,17     | 189,97       | 47502,54    | 47,50       | 1467    |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |
| 0 min           | 8,27     | 192,29       | 48082,70    | 48,08       | 1533    |
| 15 min          | 7,74     | 180,00       | 45007,84    | 45,01       | 1768    |
| 1 h             | 7,25     | 168,63       | 42165,04    | 42,17       | 1514    |
| 2 h             | 6,02     | 140,09       | 35029,05    | 35,03       | 1371    |
| 4 h             | 6,59     | 153,31       | 38335,97    | 38,34       | 1511    |
| 6 h             | 7,52     | 174,89       | 43731,48    | 43,73       | 1396    |

**Tabelle 57: Rohdaten zu Abb.19: Extrazelluläre Flavonoidmengen in Hct116 Zellen - Methylluteolin.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Methylluteolin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Gesamtmenge - K | Protein |
|-----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|-----------------|---------|
| Versuch 1             | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]            | [µg]    |
| K                     | 0,32     | 7,84         | 1959,79     | 1,96        | 0,00            | 1765,67 |
| 0 h                   | 0,25     | 6,21         | 1553,67     | 1,55        | -1,62           | 2050,43 |
| 1/4 h                 | 0,29     | 7,14         | 1785,74     | 1,79        | -0,70           | 2373,98 |
| 1 h                   | 0,34     | 8,30         | 2075,82     | 2,08        | 0,46            | 2657,37 |
| 2 h                   | 0,62     | 14,80        | 3700,28     | 3,70        | 6,96            | 2293,65 |
| 4 h                   | 0,94     | 22,22        | 5556,80     | 5,56        | 14,39           | 2109,24 |
| 6 h                   | 1,10     | 25,94        | 6485,06     | 6,49        | 18,10           | 1937,19 |
| Versuch 2             |          |              |             |             |                 |         |
| K                     | 0,46     | 11,09        | 2772,02     | 2,77        | 0,00            | 2044,81 |
| 0 h                   | 0,47     | 11,32        | 2830,03     | 2,83        | 0,23            | 1992,36 |
| 1/4 h                 | 0,46     | 11,09        | 2772,02     | 2,77        | 0,00            | 1972,00 |
| 1 h                   | 0,62     | 14,80        | 3700,28     | 3,70        | 3,71            | 2135,00 |
| 2 h                   | 0,85     | 20,13        | 5034,65     | 5,03        | 9,05            | 1692,39 |
| 4 h                   | 1,26     | 29,65        | 7413,32     | 7,41        | 18,56           | 2111,00 |
| 6 h                   | 1,36     | 31,97        | 7993,48     | 7,99        | 20,88           | 1828,13 |
| Versuch 3             |          |              |             |             |                 |         |
| K                     | 0,48     | 11,55        | 2888,05     | 2,89        | 0,00            | 1453,00 |
| 0 h                   | 0,28     | 6,91         | 1727,72     | 1,73        | -4,64           | 1858,47 |
| 1/4 h                 | 0,49     | 11,78        | 2946,06     | 2,95        | 0,23            | 1576,00 |
| 1 h                   | 0,70     | 16,65        | 4164,41     | 4,16        | 5,10            | 1631,00 |
| 2 h                   | 0,85     | 20,13        | 5034,65     | 5,03        | 8,58            | 1901,00 |
| 4 h                   | 1,12     | 26,40        | 6601,09     | 6,60        | 14,85           | 1467,00 |
| 6 h                   | 1,28     | 30,11        | 7529,35     | 7,53        | 18,56           | 1774,03 |
| Versuch 4             |          |              |             |             |                 |         |
| K                     | 0,49     | 11,78        | 2946,06     | 2,95        | 0,00            | 1258,00 |
| 0 h                   | 0,37     | 9,00         | 2249,87     | 2,25        | -2,78           | 1533,00 |
| 1/4 h                 | 0,38     | 9,23         | 2307,89     | 2,31        | -2,55           | 1768,00 |
| 1 h                   | 0,41     | 9,93         | 2481,93     | 2,48        | -1,86           | 1514,00 |
| 2 h                   | 0,53     | 12,71        | 3178,13     | 3,18        | 0,93            | 1371,00 |
| 4 h                   | 0,89     | 21,06        | 5266,71     | 5,27        | 9,28            | 1511,00 |
| 6 h                   | 0,95     | 22,45        | 5614,81     | 5,61        | 10,67           | 1396,00 |

**Tabelle 58: Rohdaten zu Abb. 20: Intrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - MCF-7.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| MCF-7 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Apigenin/µg Protein |
|----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|------------------------|
| Versuch 1      | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                        |
| 0 h            | 0,15     | 9,39         | 140,84      | 0,14        | 1702,27 | 0,08                   |
| 1/4 h          | 0,45     | 19,04        | 285,53      | 0,29        | 1889,27 | 0,15                   |
| 1 h            | 0,44     | 18,71        | 280,71      | 0,28        | 1699,01 | 0,17                   |
| 6 h            | 0,57     | 22,89        | 343,41      | 0,34        | 1742,33 | 0,20                   |
| Versuch 2      |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h            | 0,02     | 5,21         | 78,14       | 0,08        | 1357,28 | 0,06                   |
| 1/4 h          | 0,26     | 12,93        | 193,89      | 0,19        | 1237,05 | 0,16                   |
| 1 h            | 0,25     | 12,60        | 189,07      | 0,19        | 987,55  | 0,19                   |
| 6 h            | -0,06    | 2,64         | 39,55       | 0,04        | 1541,38 | 0,03                   |
| Versuch 3      |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h            | -0,45    | -9,90        | -148,55     | -0,15       | 1679,20 | -0,09                  |
| 1/4 h          | 0,17     | 10,03        | 150,48      | 0,15        | 1384,26 | 0,11                   |
| 1 h            | 0,23     | 11,96        | 179,42      | 0,18        | 1197,27 | 0,15                   |
| 6 h            | 0,63     | 24,82        | 372,35      | 0,37        | 1341,08 | 0,28                   |

**Tabelle 59: Rohdaten zu Abb. 20: Intrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - HepG2.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HepG2 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Apigenin/µg Protein |
|----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|------------------------|
| Versuch 1      | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                        |
| 0 h            | 0,00     | 4,57         | 68,49       | 0,07        | 1893,15 | 0,04                   |
| 1/4 h          | 0,96     | 35,43        | 531,51      | 0,53        | 2401,10 | 0,22                   |
| 1 h            | 1,30     | 46,37        | 695,50      | 0,70        | 1524,68 | 0,46                   |
| 6 h            | 0,57     | 22,89        | 343,41      | 0,34        | 1012,43 | 0,34                   |
| Versuch 2      |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h            | 0,23     | 11,96        | 179,42      | 0,18        | 1628,98 | 0,11                   |
| 1 h            | 1,08     | 39,29        | 589,39      | 0,59        | 1913,41 | 0,31                   |
| 6 h            | 0,48     | 20,00        | 300,00      | 0,30        | 1334,46 | 0,22                   |
| Versuch 3      |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h            | 0,16     | 9,71         | 145,66      | 0,15        | 1594,62 | 0,09                   |
| 1/4 h          | 0,77     | 29,32        | 439,87      | 0,44        | 1132,74 | 0,39                   |
| 1 h            | 0,87     | 32,54        | 488,10      | 0,49        | 2139,21 | 0,23                   |
| 6 h            | 0,43     | 18,39        | 275,88      | 0,28        | 1179,37 | 0,23                   |
| Versuch 4      |          |              |             |             |         |                        |
| 0 h            | 0,00     | 4,57         | 68,49       | 0,07        | 1788,33 | 0,04                   |
| 1/4 h          | 0,42     | 18,07        | 271,06      | 0,27        | 1296,10 | 0,21                   |
| 1 h            | 0,20     | 11,00        | 164,95      | 0,16        | 1603,66 | 0,10                   |
| 6 h            | 0,34     | 15,50        | 232,48      | 0,23        | 822,04  | 0,28                   |

**Tabelle 60: Rohdaten zu Abb. 20: Intrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - Hct116.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| Hct116 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein     | ng Apigenin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]        |                        |
| 0 h             | n.d.     |              |             |             | 1737,250169 |                        |
| 1/4 h           | 1,13     | 40,90        | 613,50      | 0,61        | 1505,90     | 0,41                   |
| 1 h             | 0,79     | 29,97        | 449,52      | 0,45        | 1556,95     | 0,29                   |
| 2 h             | 1,07     | 38,97        | 584,57      | 0,58        | 1465,51     | 0,40                   |
| 4 h             | 0,68     | 26,43        | 396,46      | 0,40        | 1685,42     | 0,24                   |
| 6 h             | 0,77     | 29,32        | 439,87      | 0,44        | 1424,04     | 0,31                   |
| Versuch 2       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,23     | 11,96        | 179,42      | 0,18        | 1184,42     | 0,15                   |
| 1/4 h           | 1,96     | 67,59        | 1013,83     | 1,01        | 653,81      | 1,55                   |
| 1 h             | 1,61     | 56,33        | 845,02      | 0,85        | 795,24      | 1,06                   |
| 2 h             | 1,37     | 48,62        | 729,26      | 0,73        | 1087,27     | 0,67                   |
| 4 h             | 1,10     | 39,94        | 599,04      | 0,60        | 909,99      | 0,66                   |
| 6 h             | 1,20     | 43,15        | 647,27      | 0,65        | 1280,14     | 0,51                   |
| Versuch 3       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,17     | 10,03        | 150,48      | 0,15        | 1571,89     | 0,10                   |
| 1/4 h           | 1,71     | 59,55        | 893,25      | 0,89        | 1240,48     | 0,72                   |
| 1 h             | 1,47     | 51,83        | 777,49      | 0,78        | 1560,61     | 0,50                   |
| 2 h             | 0,80     | 30,29        | 454,34      | 0,45        | 1544,10     | 0,29                   |
| 4 h             | 0,95     | 35,11        | 526,69      | 0,53        | 1283,99     | 0,41                   |
| 6 h             | 0,59     | 23,54        | 353,05      | 0,35        | 1172,59     | 0,30                   |
| Versuch 4       |          |              |             |             |             |                        |
| 0 h             | 0,10     | 7,78         | 116,72      | 0,12        | 1029,15     | 0,11                   |
| 1/4 h           | 1,66     | 57,94        | 869,13      | 0,87        | 1089,95     | 0,80                   |
| 1 h             | 1,20     | 43,15        | 647,27      | 0,65        | 1008,08     | 0,64                   |
| 2 h             | 1,31     | 46,69        | 700,32      | 0,70        | 1106,12     | 0,63                   |
| 4 h             | 0,70     | 27,07        | 406,11      | 0,41        | 1006,17     | 0,40                   |
| 6 h             | 0,62     | 24,50        | 367,52      | 0,37        | 1371,68     | 0,27                   |
| Versuch 5       |          |              |             |             |             |                        |
| K               | 0        | 4,57         | 68,49       | 0,07        | 2231,56     | 0,03                   |
| 0 h             | 0,34     | 15,50        | 232,48      | 0,23        | 1602,32     | 0,15                   |
| 1/4 h           | 1,77     | 61,48        | 922,19      | 0,92        | 1755,11     | 0,53                   |
| 1 h             | 1,89     | 65,34        | 980,06      | 0,98        | 1494,98     | 0,66                   |
| 6 h             | 1,86     | 64,37        | 965,59      | 0,97        | 2208,79     | 0,44                   |

**Tabelle 61: Rohdaten zu Abb. 21: Extrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - MCF-7.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| MCF-7 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1      | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h            | 5,41     | 178,52       | 44639,15    | 44,64       | 1702,27 |
| 1/4 h          | 4,74     | 156,98       | 39252,22    | 39,25       | 1889,27 |
| 1 h            | 4,80     | 158,91       | 39734,63    | 39,73       | 1699,01 |
| 6 h            | 3,87     | 129,00       | 32257,25    | 32,26       | 1742,33 |
| Versuch 2      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 9,57     | 312,28       | 78086,35    | 78,09       | 1679,20 |
| 1/4 h          | 8,61     | 281,41       | 70367,77    | 70,37       | 1384,26 |
| 1 h            | 8,98     | 293,31       | 73342,64    | 73,34       | 1197,27 |
| 6 h            | 9,66     | 315,18       | 78809,97    | 78,81       | 1341,08 |
| Versuch 3      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 5,27     | 174,02       | 43513,52    | 43,51       | 1357,28 |
| 1/4 h          | 5,33     | 175,95       | 43995,94    | 44,00       | 1237,05 |
| 1 h            | 5,45     | 179,81       | 44960,76    | 44,96       | 987,55  |
| 6 h            | 5,07     | 167,59       | 41905,49    | 41,91       | 1541,38 |

**Tabelle 62: Rohdaten zu Abb. 21: Extrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - HepG2.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

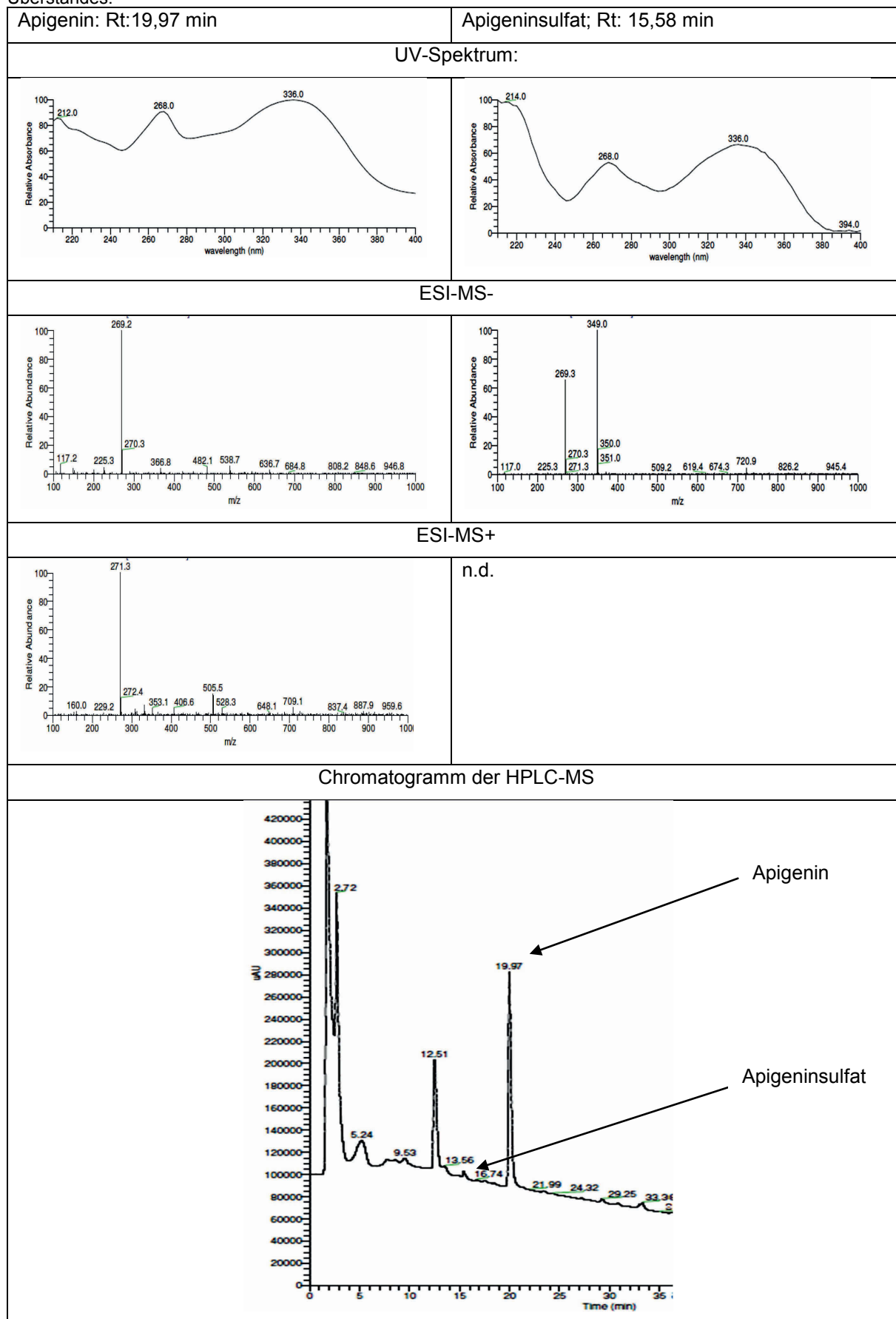
| HepG2 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1      | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h            | 4,82     | 159,55       | 39895,44    | 39,90       | 1893,15 |
| 1/4 h          | 4,86     | 160,84       | 40217,05    | 40,22       | 2401,10 |
| 1 h            | 4,33     | 143,79       | 35955,74    | 35,96       | 1524,68 |
| 6 h            | 2,68     | 90,74        | 22689,42    | 22,69       | 1012,43 |
| Versuch 2      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 5,28     | 174,34       | 43593,93    | 43,59       | 1351,06 |
| 1/4 h          | 5,42     | 178,84       | 44719,55    | 44,72       | 1628,98 |
| 1 h            | 5,44     | 179,49       | 44880,36    | 44,88       | 1913,41 |
| 6 h            | 4,21     | 139,94       | 34990,92    | 34,99       | 1334,46 |
| Versuch 3      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 4,94     | 163,41       | 40860,26    | 40,86       | 1594,62 |
| 1/4 h          | 4,23     | 140,58       | 35151,72    | 35,15       | 1132,74 |
| 1 h            | 3,98     | 132,54       | 33141,68    | 33,14       | 2139,21 |
| 6 h            | 2,70     | 91,38        | 22850,23    | 22,85       | 1179,37 |
| Versuch 4      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 10,77    | 350,87       | 87734,59    | 87,73       | 1788,33 |
| 1/4 h          | 9,53     | 311,00       | 77764,75    | 77,76       | 1296,10 |
| 1 h            | 8,77     | 286,56       | 71654,20    | 71,65       | 1603,66 |
| 6 h            | 6,27     | 206,17       | 51553,72    | 51,55       | 822,04  |

**Tabelle 63: zu Abb. 21: Extrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - HepG2 / Sulfatderivat.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HepG2 Apigeninsulfat | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1            | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 6 h                  | 0,94     | 34,79        | 8699,49     | 8,70        | 1013,43 |
| Versuch 2            |          |              |             |             |         |
| 6 h                  | 0,70     | 27,07        | 6769,84     | 6,77        | 1335,46 |
| Versuch 3            |          |              |             |             |         |
| 6 h                  | 0,53     | 21,61        | 5403,01     | 5,40        | 1180,37 |
| Versuch 4            |          |              |             |             |         |
| 6 h                  | 2,37     | 80,77        | 20196,96    | 20,20       | 823,04  |

**Tabelle 64: Bestimmung des Apigeninsulfat im Überstand der HepG2 Zellen.** Dargestellt sind die UV-Spektren und Massenspektren des Apigenins und seines Derivaten, sowie das Chromatogramm des Überstandes.



**Tabelle 65: Rohdaten zu Abb. 21: Extrazelluläre Apigeninmengen in verschiedenen Zelllinien - HUH-7.**  
Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HUH-7 Apigenin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1      | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h            | 10,07    | 328,36       | 82106,45    | 82,11       | 1026,87 |
| 1/4 h          | 9,98     | 325,47       | 81382,83    | 81,38       | 1318,50 |
| 1 h            | 9,72     | 317,11       | 79292,38    | 79,29       | 796,30  |
| 6 h            | 9,02     | 294,60       | 73664,25    | 73,66       | 785,81  |
| Versuch 2      |          |              |             |             |         |
| 0 h            | 4,86     | 160,84       | 40217,05    | 40,22       | 1036,93 |
| 1/4 h          | 5,08     | 167,91       | 41985,89    | 41,99       | 765,47  |
| 1 h            | 5,32     | 175,63       | 43915,53    | 43,92       | 1021,18 |
| 6 h            | 5,18     | 171,13       | 42789,91    | 42,79       | 961,12  |

**Tabelle 66: Rohdaten zu Abb. 22: Intrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - Hct116.**  
Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| Hct116 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1        | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 0 h              | 2,47     | 56,21        | 843,14      | 0,84        | 1962,82 | 0,43                    |
| 1/4 h            | 13,62    | 289,47       | 4342,09     | 4,34        | 1904,35 | 2,28                    |
| 1 h              | 13,23    | 281,31       | 4219,71     | 4,22        | 1991,46 | 2,12                    |
| 2 h              | 14,21    | 301,82       | 4527,24     | 4,53        | 1816,81 | 2,49                    |
| 4 h              | 10,38    | 221,69       | 3325,36     | 3,33        | 1810,48 | 1,84                    |
| 6 h              | 15,54    | 329,64       | 4944,60     | 4,94        | 1820,11 | 2,72                    |
| Versuch 2        |          |              |             |             |         |                         |
| 0 min            | 0,85     | 22,32        | 334,77      | 0,33        | 1942,29 | 0,17                    |
| 15 min           | 16,26    | 344,70       | 5170,54     | 5,17        | 2227,04 | 2,32                    |
| 1 h              | 17,57    | 372,11       | 5581,63     | 5,58        | 2275,20 | 2,45                    |
| 2 h              | 19,43    | 411,02       | 6165,31     | 6,17        | 2125,03 | 2,90                    |
| 4 h              | 14,59    | 309,77       | 4646,49     | 4,65        | 2069,15 | 2,25                    |
| 6 h              | 14,01    | 297,63       | 4464,48     | 4,46        | 1965,48 | 2,27                    |
| Versuch 3        |          |              |             |             |         |                         |
| 0 min            | 0,21     | 8,93         | 133,93      | 0,13        | 2085,01 | 0,06                    |
| 15 min           | 9,69     | 207,26       | 3108,83     | 3,11        | 2033,19 | 1,53                    |
| 1 h              | 14,99    | 318,13       | 4772,01     | 4,77        | 2117,42 | 2,25                    |
| 2 h              | 14,27    | 303,07       | 4546,07     | 4,55        | 1804,53 | 2,52                    |
| 4 h              | 14,19    | 301,40       | 4520,96     | 4,52        | 1939,93 | 2,33                    |
| 6 h              | 17,13    | 362,90       | 5443,56     | 5,44        | 1664,22 | 3,27                    |

**Tabelle 67: Rohdaten zu Abb. 22: Intrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - HUH-7.**  
Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HUH-7 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 0 h             | 0,52     | 15,41        | 231,21      | 0,23        | 1084,74 | 0,21                    |
| 1/4 h           | 9,67     | 206,84       | 3102,55     | 3,10        | 1511,81 | 2,05                    |
| 1 h             | 9,81     | 209,77       | 3146,49     | 3,15        | 1300,27 | 2,42                    |
| 6 h             | 7,63     | 164,16       | 2462,38     | 2,46        | 1102,07 | 2,23                    |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 1,92     | 44,70        | 670,54      | 0,67        | 1688,33 | 0,40                    |
| 1/4 h           | 12,12    | 258,09       | 3871,38     | 3,87        | 2014,94 | 1,92                    |
| 1 h             | 14,70    | 312,07       | 4681,00     | 4,68        | 1378,10 | 3,40                    |
| 6 h             | 11,61    | 247,42       | 3711,34     | 3,71        | 1470,21 | 2,52                    |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 1,12     | 27,97        | 419,50      | 0,42        | 1724,87 | 0,24                    |
| 1/4 h           | 9,03     | 193,45       | 2901,72     | 2,90        | 1539,70 | 1,88                    |
| 1 h             | 8,36     | 179,43       | 2691,46     | 2,69        | 1594,02 | 1,69                    |
| 6 h             | 10,82    | 230,90       | 3463,43     | 3,46        | 1431,82 | 2,42                    |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 0,77     | 20,64        | 309,67      | 0,31        | 1572,86 | 0,20                    |
| 1/4 h           | 7,56     | 162,69       | 2440,42     | 2,44        | 1907,46 | 1,28                    |
| 1 h             | 9,83     | 210,18       | 3152,76     | 3,15        | 2000,44 | 1,58                    |
| 6 h             | 8,29     | 177,97       | 2669,50     | 2,67        | 1682,93 | 1,59                    |

**Tabelle 68: Rohdaten zu Abb. 22: Intrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - MCF-7.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| MCF-7 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| K               | 0,57     | 16,46        | 246,90      | 0,25        | 1536,18 | 0,16                    |
| 0 h             | 2,11     | 48,68        | 730,17      | 0,73        | 1477,98 | 0,49                    |
| 1/4 h           | 13,81    | 293,45       | 4401,72     | 4,40        | 1578,13 | 2,79                    |
| 1 h             | 14,23    | 302,23       | 4533,51     | 4,53        | 1795,56 | 2,52                    |
| 6 h             | 13,18    | 280,27       | 4204,02     | 4,20        | 1691,79 | 2,48                    |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 2,63     | 59,56        | 893,35      | 0,89        | 1935,32 | 0,46                    |
| 1/4 h           | 13,62    | 289,47       | 4342,09     | 4,34        | 1745,13 | 2,49                    |
| 1 h             | 15,73    | 333,62       | 5004,23     | 5,00        | 1217,63 | 4,11                    |
| 6 h             | 14,59    | 309,77       | 4646,49     | 4,65        | 1569,38 | 2,96                    |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 2,40     | 54,74        | 821,17      | 0,82        | 1999,68 | 0,41                    |
| 1/4 h           | 19,80    | 418,76       | 6281,42     | 6,28        | 1992,70 | 3,15                    |
| 1 h             | 14,47    | 307,26       | 4608,83     | 4,61        | 1342,67 | 3,43                    |
| 6 h             | 14,15    | 300,56       | 4508,41     | 4,51        | 1400,04 | 3,22                    |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 2,83     | 63,74        | 956,11      | 0,96        | 2202,64 | 0,43                    |
| 1/4 h           | 19,15    | 405,16       | 6077,45     | 6,08        | 2136,63 | 2,84                    |
| 1 h             | 20,10    | 425,04       | 6375,56     | 6,38        | 1796,97 | 3,55                    |
| 6 h             | 18,42    | 389,89       | 5848,37     | 5,85        | 1857,98 | 3,15                    |

**Tabelle 69: Rohdaten zu Abb. 23: Extrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - HUH-7.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HUH-7 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h             | 17,26    | 365,62       | 91424,14    | 91,42       | 1572,86 |
| 1/4 h           | 20,09    | 424,83       | 106228,35   | 106,23      | 1907,46 |
| 1 h             | 19,88    | 420,44       | 105129,81   | 105,13      | 2000,44 |
| 6 h             | 20,23    | 427,76       | 106960,72   | 106,96      | 1682,93 |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 28,04    | 591,15       | 147816,17   | 147,82      | 1724,87 |
| 1/4 h           | 24,34    | 513,74       | 128460,83   | 128,46      | 1539,70 |
| 1 h             | 24,25    | 511,86       | 127990,03   | 127,99      | 1594,02 |
| 6 h             | 21,11    | 446,17       | 111564,15   | 111,56      | 1431,82 |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 24,87    | 524,83       | 131233,35   | 131,23      | 1688,33 |
| 1/4 h           | 25,65    | 541,15       | 135313,67   | 135,31      | 2014,94 |
| 1 h             | 27,07    | 570,85       | 142741,93   | 142,74      | 1378,10 |
| 6 h             | 23,36    | 493,24       | 123334,29   | 123,33      | 1470,21 |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 18,51    | 391,77       | 97963,10    | 97,96       | 1084,74 |
| 1/4 h           | 17,82    | 377,34       | 94353,59    | 94,35       | 1511,81 |
| 1 h             | 18,70    | 395,75       | 98957,03    | 98,96       | 1300,27 |
| 6 h             | 19,80    | 418,76       | 104711,31   | 104,71      | 1102,07 |

**Tabelle 70: Rohdaten zu Abb. 23: Extrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - MCF-7.**  
Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| MCF-7 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h             | 22,20    | 468,97       | 117266,13   | 117,27      | 2142,27 |
| 1/4 h           | 19,01    | 402,23       | 100578,69   | 100,58      | 2667,19 |
| 1 h             | 18,69    | 395,54       | 98904,71    | 98,90       | 1435,81 |
| 6 h             | 19,36    | 409,56       | 102409,60   | 102,41      | 1273,61 |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 27,91    | 588,43       | 147136,12   | 147,14      | 1999,68 |
| 1/4 h           | 29,37    | 618,97       | 154773,63   | 154,77      | 1992,70 |
| 1 h             | 24,98    | 527,13       | 131808,78   | 131,81      | 1342,67 |
| 6 h             | 18,63    | 394,28       | 98590,84    | 98,59       | 1400,04 |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 27,71    | 584,24       | 146089,88   | 146,09      | 1935,32 |
| 1/4 h           | 24,62    | 519,60       | 129925,56   | 129,93      | 1745,13 |
| 1 h             | 24,17    | 510,18       | 127571,53   | 127,57      | 1217,63 |
| 6 h             | 22,82    | 481,94       | 120509,45   | 120,51      | 1569,38 |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 20,47    | 432,78       | 108216,20   | 108,22      | 1477,98 |
| 1/4 h           | 18,93    | 400,56       | 100160,20   | 100,16      | 1578,13 |
| 1 h             | 18,23    | 385,92       | 96498,38    | 96,50       | 1795,56 |
| 6 h             | 17,60    | 372,74       | 93202,74    | 93,20       | 1691,79 |

**Tabelle 71: Rohdaten zu Abb. 23: Extrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - Hct116.**  
Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1        | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h              | 17,77    | 376,29       | 94092,04    | 94,09       | 1962,82 |
| 1/4 h            | 16,73    | 354,54       | 88651,62    | 88,65       | 1904,35 |
| 1 h              | 16,16    | 342,61       | 85669,85    | 85,67       | 1991,46 |
| 6 h              | 16,94    | 358,93       | 89750,16    | 89,75       | 1820,11 |
| Versuch 2        |          |              |             |             |         |
| 0 h              | 17,76    | 376,08       | 94039,72    | 94,04       | 1942,29 |
| 1/4 h            | 16,51    | 349,93       | 87500,76    | 87,50       | 2227,04 |
| 1 h              | 16,69    | 353,70       | 88442,37    | 88,44       | 2275,20 |
| 6 h              | 14,57    | 309,35       | 77352,29    | 77,35       | 1965,48 |
| Versuch 3        |          |              |             |             |         |
| 0 h              | 19,48    | 412,07       | 103037,34   | 103,04      | 2085,01 |
| 1/4 h            | 17,55    | 371,69       | 92941,18    | 92,94       | 2033,19 |
| 1 h              | 16,47    | 349,10       | 87291,51    | 87,29       | 2117,42 |
| 6 h              | 16,92    | 358,51       | 89645,54    | 89,65       | 1664,22 |

**Tabelle 72: Rohdaten zu Abb. 23: Extrazelluläre Quercetinmengen in verschiedenen Zelllinien - Hct116 / Methylquercetin.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 Methylquercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|------------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1              | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 6 h                    | 0,34     | 11,65        | 2912,72     | 2,91        | 1820,11 |
| Versuch 2              |          |              |             |             |         |
| 6 h                    | 0,19     | 8,51         | 2128,04     | 2,13        | 1965,48 |
| Versuch 3              |          |              |             |             |         |
| 6 h                    | 0,28     | 10,39        | 2598,85     | 2,60        | 1664,22 |

**Tabelle 73: Rohdaten zu Abb. 24: Intrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HepG2 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 0 h             | 1,45     | 34,87        | 523,05      | 0,52        | 1037,84 | 0,50                    |
| 1/4 h           | 9,99     | 213,53       | 3202,97     | 3,20        | 1581,93 | 2,02                    |
| 1 h             | 11,06    | 235,92       | 3538,74     | 3,54        | 1522,86 | 2,32                    |
| 6 h             | 8,46     | 181,52       | 2722,85     | 2,72        | 1371,00 | 1,99                    |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 0,87     | 22,74        | 341,05      | 0,34        | 1536,86 | 0,22                    |
| 1/4 h           | 11,77    | 250,77       | 3761,55     | 3,76        | 1338,35 | 2,81                    |
| 1 h             | 11,89    | 253,28       | 3799,21     | 3,80        | 1439,77 | 2,64                    |
| 6 h             | 9,50     | 203,28       | 3049,21     | 3,05        | 947,99  | 3,22                    |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 0,87     | 22,74        | 341,05      | 0,34        | 1481,04 | 0,23                    |
| 1/4 h           | 8,92     | 191,15       | 2867,20     | 2,87        | 1863,51 | 1,54                    |
| 1 h             | 15,54    | 329,64       | 4944,60     | 4,94        | 2465,22 | 2,01                    |
| 6 h             | 11,37    | 242,40       | 3636,03     | 3,64        | 1483,47 | 2,45                    |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |                         |
| 0 h             | 2,12     | 48,89        | 733,31      | 0,73        | 2142,27 | 0,34                    |
| 1/4 h           | 17,57    | 372,11       | 5581,63     | 5,58        | 2667,19 | 2,09                    |
| 1 h             | 20,15    | 426,08       | 6391,26     | 6,39        | 1435,81 | 4,45                    |
| 6 h             | 15,63    | 331,52       | 4972,85     | 4,97        | 1273,61 | 3,90                    |

**Tabelle 74: Rohdaten zu Abb. 24: Intrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen - Sulfatderivat.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HepG2 Quercetinsulfat | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|-----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1             | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 6 h                   | 0,17     | 8,09         | 121,38      | 0,12        | 1371,00 | 0,09                    |
| Versuch 2             |          |              |             |             |         |                         |
| 1/4 h                 | 0,54     | 15,83        | 237,49      | 0,24        | 2014,94 | 0,12                    |
| 1 h                   | 0,59     | 16,88        | 253,18      | 0,25        | 1378,10 | 0,18                    |
| 6 h                   | 0,73     | 19,81        | 297,11      | 0,30        | 1470,21 | 0,20                    |
| Versuch 3             |          |              |             |             | 1804,00 |                         |
| 1 h                   | 0,29     | 10,60        | 159,04      | 0,16        | 2465,22 | 0,06                    |
| 6 h                   | 0,29     | 10,60        | 159,04      | 0,16        | 1483,47 | 0,11                    |
| Versuch 4             |          |              |             |             |         |                         |
| 1/4 h                 | 0,23     | 9,35         | 140,21      | 0,14        | 2667,19 | 0,05                    |
| 1 h                   | 0,27     | 10,18        | 152,76      | 0,15        | 1435,81 | 0,11                    |
| 6 h                   | 0,19     | 8,51         | 127,66      | 0,13        | 1273,61 | 0,10                    |

**Tabelle 75: Rohdaten zu Abb. 24: Intrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen - Methylderivat.**

Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HepG2 Methylquercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng Quercetin/µg Protein |
|-----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|-------------------------|
| Versuch 1             | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                         |
| 6 h                   | 0,66     | 18,26        | 273,89      | 0,27        | 1371,00 | 0,20                    |
| Versuch 2             |          |              |             |             |         |                         |
| 1 h                   | 0,31     | 10,95        | 164,27      | 0,16        | 1378,10 | 0,12                    |
| 6 h                   | 0,77     | 20,57        | 308,62      | 0,31        | 1470,21 | 0,21                    |
| Versuch 3             |          |              |             |             |         |                         |
| 1 h                   | 0,40     | 12,90        | 193,56      | 0,19        | 2465,22 | 0,08                    |
| 6 h                   | 1,49     | 35,71        | 535,61      | 0,54        | 1483,47 | 0,36                    |
| Versuch 4             |          |              |             |             |         |                         |
| 1/4 h                 | 1,05     | 26,50        | 397,53      | 0,40        | 2667,19 | 0,15                    |
| 1 h                   | 0,84     | 22,11        | 331,63      | 0,33        | 1435,81 | 0,23                    |
| 6 h                   | 1,48     | 35,50        | 532,47      | 0,53        | 1273,61 | 0,42                    |

**Tabelle 76: Rohdaten zu Abb. 25: Extrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HepG2 Quercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1       | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h             | 21,70    | 458,51       | 114650,54   | 114,65      | 2202,64 |
| 1/4 h           | 19,64    | 415,41       | 103874,33   | 103,87      | 2136,63 |
| 1 h             | 17,32    | 366,88       | 91738,01    | 91,74       | 1796,97 |
| 6 h             | 13,30    | 282,78       | 70708,70    | 70,71       | 1857,98 |
| Versuch 2       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 25,21    | 531,94       | 133011,95   | 133,01      | 1481,04 |
| 1/4 h           | 24,37    | 514,37       | 128617,77   | 128,62      | 1863,51 |
| 1 h             | 20,55    | 434,45       | 108634,69   | 108,63      | 2465,22 |
| 6 h             | 15,47    | 328,18       | 82060,34    | 82,06       | 1483,47 |
| Versuch 3       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 32,76    | 689,89       | 172507,30   | 172,51      | 1536,86 |
| 1/4 h           | 31,02    | 653,49       | 163405,06   | 163,41      | 1338,35 |
| 1 h             | 23,42    | 494,49       | 123648,16   | 123,65      | 1439,77 |
| 6 h             | 18,16    | 384,45       | 96132,19    | 96,13       | 947,99  |
| Versuch 4       |          |              |             |             |         |
| 0 h             | 17,64    | 373,57       | 93411,98    | 93,41       | 1037,84 |
| 1/4 h           | 18,51    | 391,77       | 97963,10    | 97,96       | 1581,93 |
| 1 h             | 18,01    | 381,31       | 95347,52    | 95,35       | 1522,86 |
| 6 h             | 10,32    | 220,44       | 55119,81    | 55,12       | 1371,00 |

**Tabelle 77: Rohdaten zu Abb. 25: Extrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen - Sulfatderivat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HepG2 Quercetinsulfat | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1             | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 1 h                   | 0,32     | 11,23        | 2808,09     | 2,81        | 1522,86 |
| 6 h                   | 0,49     | 14,79        | 3697,39     | 3,70        | 1371,00 |
| Versuch 2             |          |              |             |             |         |
| 1 h                   | 0,04     | 5,37         | 1343,36     | 1,34        | 1439,77 |
| 6 h                   | 1,22     | 30,06        | 7516,15     | 7,52        | 947,99  |
| Versuch 3             |          |              |             |             |         |
| 1 h                   | n.d.     |              |             |             |         |
| 6 h                   | 0,88     | 22,95        | 5737,55     | 5,74        | 1483,47 |
| Versuch 4             |          |              |             |             |         |
| 1 h                   | 0,07     | 6,00         | 1500,30     | 1,50        | 1796,97 |
| 6 h                   | 0,59     | 16,88        | 4220,51     | 4,22        | 1857,98 |

**Tabelle 78: Rohdaten zu Abb. 25: Extrazelluläre Quercetinmengen in HepG2 Zellen - Methylderivat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| HepG2 Methylquercetin | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-----------------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1             | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 1 h                   | 0,39     | 12,69        | 3174,27     | 3,17        | 1522,86 |
| 6 h                   | 2,80     | 63,11        | 15781,40    | 15,78       | 1371,00 |
| Versuch 2             | 0,00     |              |             |             |         |
| 1 h                   | 0,83     | 21,90        | 5475,99     | 5,48        | 1439,77 |
| 6 h                   | 4,03     | 88,85        | 22215,74    | 22,22       | 947,99  |
| Versuch 3             | 0,68     |              |             |             | 1863,51 |
| 1 h                   | 0,61     | 17,30        | 4325,13     | 4,33        | 2465,22 |
| 6 h                   | 4,15     | 91,36        | 22843,48    | 22,84       | 1483,47 |
| Versuch 4             | 0,18     |              |             |             | 1439,77 |
| 1 h                   | 0,48     | 14,58        | 3645,08     | 3,65        | 1439,77 |
| 6 h                   | 2,70     | 61,02        | 15258,28    | 15,26       | 947,99  |

**Tabelle 79: Rohdaten zu Abb. 29: 48 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Quercetin |        |       |       | Isorhamnetin |        |       |       | Rhamnetin |       |       |       | Tamarixetin |        |       |       |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|--------------|--------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------------|--------|-------|-------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM         | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM        | 10 µM  | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 2,06      | 1,89   | 1,40  | 1,17  | 2,06         | 1,94   | 1,40  | 0,64  | 2,06      | 1,96  | 1,69  | 1,05  | 2,06        | 2,02   | 1,40  | 1,05  |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 91,40  | 67,90 | 56,51 | 54,37        | 94,07  | 67,71 | 31,22 | 17,83     | 94,77 | 81,96 | 51,09 | 58,23       | 97,76  | 67,69 | 50,97 |
| Versuch 2 OD  | 1,43      | 1,37   | 0,94  | 0,81  | 0,67         | 1,33   | 0,89  | 0,18  | 0,11      | 1,34  | 0,92  | 0,49  | 0,39        | 1,50   | 1,09  | 0,77  |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 96,24  | 65,95 | 57,08 | 47,19        | 93,51  | 62,70 | 12,88 | 7,82      | 93,73 | 64,82 | 34,63 | 27,68       | 105,51 | 76,45 | 53,74 |
| Versuch 3 OD  | 1,47      | 1,64   | 1,20  | 0,94  | 0,94         | 1,48   | 1,05  | 0,57  | 0,22      | 1,41  | 1,35  | 0,85  | 1,04        | 1,53   | 1,17  | 0,96  |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 111,05 | 81,46 | 63,56 | 63,51        | 100,09 | 71,45 | 38,81 | 15,09     | 95,81 | 91,46 | 57,51 | 70,26       | 103,70 | 79,08 | 65,37 |
| Versuch 4 OD  | 1,29      | 1,32   | 0,93  | 0,81  | 0,74         | 1,19   | 0,83  | 0,20  | 0,22      | 1,22  | 0,95  | 0,53  | 0,80        | 1,27   | 0,87  | 0,79  |
| Versuch 4 [%] | 100,00    | 102,53 | 72,03 | 63,13 | 57,59        | 92,58  | 64,10 | 15,75 | 17,08     | 94,68 | 73,76 | 41,35 | 61,85       | 98,77  | 67,54 | 61,69 |
| MW OD         | 1,56      | 1,55   | 1,12  | 0,93  | 1,10         | 1,49   | 1,04  | 0,40  | 0,65      | 1,48  | 1,23  | 0,73  | 1,07        | 1,58   | 1,13  | 0,89  |
| MW [%]        | 100,00    | 100,31 | 71,83 | 60,07 | 55,66        | 95,06  | 66,49 | 24,66 | 14,45     | 94,75 | 78,00 | 46,15 | 54,51       | 101,44 | 72,69 | 57,94 |

**Tabelle 80: Rohdaten zu Abb. 30: 24 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Quercetin |        |       |       | Isorhamnetin |        |       |       | Rhamnetin |        |       |       | Tamarixetin |        |       |       |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|--------------|--------|-------|-------|-----------|--------|-------|-------|-------------|--------|-------|-------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM         | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM        | 10 µM  | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,96      | 0,95   | 0,91  | 0,72  | 0,96         | 0,92   | 0,87  | 0,56  | 0,96      | 0,94   | 0,60  | 0,40  | 0,96        | 0,95   | 0,87  | 0,83  |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 99,25  | 94,37 | 74,87 | 100,00       | 95,38  | 90,99 | 57,92 | 100,00    | 98,44  | 62,55 | 41,48 | 100,00      | 98,56  | 90,83 | 86,06 |
| Versuch 2 OD  | 1,15      | 1,12   | 1,02  | 0,73  | 1,15         | 1,10   | 0,81  | 0,46  | 1,15      | 1,09   | 0,74  | 0,44  | 1,15        | 1,06   | 0,95  | 0,87  |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 97,61  | 88,72 | 63,88 | 100,00       | 95,81  | 70,88 | 39,87 | 100,00    | 95,24  | 64,28 | 38,12 | 100,00      | 92,81  | 82,66 | 75,84 |
| Versuch 3 OD  | 1,38      | 1,29   | 1,29  | 1,19  | 1,38         | 1,26   | 1,17  | 0,94  | 1,38      | 1,65   | 1,19  | 0,96  | 1,38        | 1,39   | 1,10  | 1,00  |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 93,82  | 93,29 | 85,95 | 100,00       | 90,98  | 85,03 | 68,22 | 100,00    | 119,69 | 86,55 | 69,77 | 100,00      | 100,76 | 79,90 | 72,57 |
| Versuch 4 OD  | 1,54      | 1,57   | 1,27  | 1,18  | 1,54         | 1,35   | 1,27  | 1,01  | 1,54      | 1,55   | 1,40  | 0,98  | 1,54        | 1,46   | 1,12  | 1,20  |
| Versuch 4 [%] | 100,00    | 101,46 | 82,07 | 76,49 | 100,00       | 87,76  | 81,98 | 65,35 | 100,00    | 100,60 | 90,58 | 63,78 | 100,00      | 94,64  | 72,24 | 77,66 |
| Versuch 5 OD  | 0,70      | 0,64   | 0,48  | 0,43  | 0,70         | 0,74   | 0,39  | 0,18  | 0,70      | 0,66   | 0,56  | 0,38  | 0,70        | 0,77   | 0,51  | 0,39  |
| Versuch 5 [%] | 100,00    | 91,32  | 68,57 | 61,70 | 100,00       | 105,16 | 55,32 | 24,99 | 100,00    | 94,53  | 79,83 | 53,90 | 100,00      | 108,97 | 72,06 | 55,02 |
| Versuch 6 OD  | 0,54      | 0,52   | 0,43  | 0,35  | 0,54         | 0,46   | 0,40  | 0,38  | 0,54      | 0,53   | 0,35  | 0,33  | 0,54        | 0,51   | 0,49  | 0,50  |
| Versuch 6 [%] | 100,00    | 97,07  | 80,37 | 65,76 | 100,00       | 84,86  | 75,22 | 70,40 | 100,00    | 98,64  | 64,59 | 60,77 | 100,00      | 95,00  | 91,46 | 93,12 |
| Versuch 7 OD  | 0,69      | 0,68   | 0,58  | 0,48  | 0,69         | 0,70   | 0,51  | 0,43  | 0,69      | 0,66   | 0,52  | 0,34  | 0,69        | 0,67   | 0,57  | 0,43  |
| Versuch 7 [%] | 100,00    | 98,36  | 83,46 | 69,54 | 100,00       | 100,90 | 73,07 | 62,69 | 100,00    | 94,91  | 74,43 | 49,15 | 100,00      | 96,51  | 82,13 | 62,72 |
| Versuch 8 OD  | 1,03      | 1,06   | 0,94  | 0,82  | 1,03         | 0,97   | 0,78  | 0,46  | 1,03      | 0,99   | 0,85  | 0,76  | 1,03        | 1,12   | 0,92  | 0,81  |
| Versuch 8 [%] | 100,00    | 103,34 | 90,97 | 79,75 | 100,00       | 94,16  | 75,89 | 45,00 | 100,00    | 96,54  | 82,69 | 73,75 | 100,00      | 109,01 | 89,38 | 78,62 |
| MW OD         | 1,00      | 0,98   | 0,86  | 0,74  | 1,00         | 0,94   | 0,78  | 0,55  | 1,00      | 1,01   | 0,78  | 0,57  | 1,00        | 0,99   | 0,82  | 0,75  |
| MW [%]        | 100,00    | 97,78  | 85,23 | 72,24 | 100,00       | 94,38  | 76,05 | 54,30 | 100,00    | 99,82  | 75,69 | 56,34 | 100,00      | 99,53  | 82,58 | 75,20 |

**Tabelle 81: Rohdaten zu Abb. 31: 48 h Zytotoxizität von Quercetin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Quercetin |        |       |       | Isorhamnetin |       |       |       | Rhamnetin |       |       |       | Tamarixetin |       |       |       |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|               | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM         | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM        | 10 µM | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 2,09      | 1,98   | 1,98  | 1,66  | 2,09         | 2,03  | 1,55  | 0,74  | 2,09      | 1,74  | 1,16  | 0,31  | 2,09        | 1,95  | 1,13  | 0,29  |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 94,78  | 94,43 | 79,39 | 100,00       | 97,07 | 74,26 | 35,18 | 100,00    | 83,13 | 55,48 | 14,96 | 100,00      | 93,29 | 53,88 | 13,73 |
| Versuch 2 OD  | 1,54      | 1,24   | 0,85  | 0,78  | 1,54         | 1,26  | 0,83  | 0,25  | 1,54      | 1,01  | 0,49  | 0,05  | 1,54        | 1,05  | 0,47  | 0,10  |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 80,69  | 55,20 | 50,70 | 100,00       | 81,74 | 53,57 | 16,55 | 100,00    | 65,30 | 31,53 | 3,22  | 100,00      | 68,24 | 30,72 | 6,51  |
| Versuch 3 OD  | 1,47      | 1,06   | 0,94  | 0,58  | 1,47         | 1,03  | 0,58  | 0,24  | 1,47      | 0,98  | 0,50  | 0,16  | 1,47        | 1,09  | 0,50  | 0,12  |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 71,67  | 63,65 | 39,51 | 100,00       | 70,13 | 39,36 | 16,03 | 100,00    | 66,26 | 33,75 | 11,20 | 100,00      | 74,31 | 33,85 | 8,17  |
| Versuch 4 OD  | 1,93      | 2,18   | 1,92  | 1,69  | 1,93         | 1,84  | 1,32  | 0,71  | 1,93      | 1,86  | 0,85  | 0,17  | 1,93        | 1,74  | 1,10  | 0,24  |
| Versuch 4 [%] | 100,00    | 112,63 | 99,56 | 87,37 | 100,00       | 95,05 | 68,50 | 36,65 | 100,00    | 96,26 | 44,02 | 8,57  | 100,00      | 90,21 | 57,18 | 12,17 |
| MW OD         | 1,76      | 1,61   | 1,42  | 1,18  | 1,76         | 1,54  | 1,07  | 0,48  | 1,76      | 1,40  | 0,75  | 0,17  | 1,76        | 1,46  | 0,80  | 0,19  |
| MW [%]        | 100,00    | 89,94  | 78,21 | 64,24 | 100,00       | 86,00 | 58,92 | 26,10 | 100,00    | 77,74 | 41,20 | 9,49  | 100,00      | 81,51 | 43,90 | 10,15 |

**Tabelle 82: Rohdaten zu Abb. 32: Konzentrationsabhängige Caspase-3/7-Aktivität nach 24 h Inkubation in HepG2 Zellen.**

| HepG2          | Quercetin |       |        | Isorhamnetin |        |       | Tamarixetin |       |        |
|----------------|-----------|-------|--------|--------------|--------|-------|-------------|-------|--------|
|                | Kontrolle | 50 µM | 100 µM | 50 µM        | 100 µM | 50 µM | 100 µM      | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 ΔRFU | 5242      | 15251 | 11963  | 32227        | 117161 | 15809 | 41738       |       |        |
| Versuch 2 ΔRFU | 10133     | 27050 | 21187  | 166947       | 263350 | 25441 | 24395       |       |        |
| Versuch 3 ΔRFU | 8284      | 16655 | 14632  | 128951       | 184385 | 14971 | 34240       |       |        |
| MW             | 7886      | 19652 | 15927  | 109375       | 188298 | 18740 | 33457       |       |        |

**Tabelle 83: Rohdaten zu Abb. 33: Zeitabhängige Caspase-3/7-Aktivität nach 24 h Inkubation in HepG2 Zellen.**

| HepG2          | 16 h      |           |              | 24 h      |           |              | 40 h      |           |              | 48 h      |           |              |
|----------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
|                | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin |
| Versuch 1 ΔRFU | 70376     | 66115     | 128341       | 13699     | 103402    | 223157       | 16003     | 71061     | 112450       | 15025     | 67892     | 62877        |
| Versuch 2 ΔRFU | -9818     | 14542     | 30023        | -1450     | 95454     | 89622        | 8118      | 141143    | 433869       | 15377     | 132987    | 121347       |
| Versuch 3 ΔRFU | 16476     | 62527     | 30694        | 21564     | 152659    | 313671       | 18286     | 130616    | 322808       | 29807     | 168697    | 164401       |
| Versuch 4 ΔRFU | 5813      | 19749     | 95402        | 6295      | 30083     | 190529       | 10223     | 67491     | 294518       | 7858      | 62859     | 145404       |
| MW             | 20712     | 40733     | 71115        | 10027     | 95400     | 204245       | 13158     | 102578    | 290911       | 17017     | 108109    | 123507       |

**Tabelle 84: Rohdaten zu Abb. 36: Statistische Auswertung der Hoechst 33342- und Propidiumiodid-Färbung der HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Apoptose  |           |              | Nekrose   |           |              | Mitose    |           |              |
|---------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
|               | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin | Kontrolle | Quercetin | Isorhamnetin |
| Versuch 1 [%] | 0,4       | 4,1       | 0,3          | 0,5       | 3,1       | 3,7          |           |           |              |
| Versuch 2 [%] | 0,3       | 3,6       | 1,3          | 0,7       | 1,5       | 5,0          |           |           |              |
| Versuch 3 [%] | 0,3       | 6,4       | 7,7          | 0,3       | 5,2       | 9,3          | 1,4       | 1,0       | 1,2          |
| Versuch 4 [%] | 0,0       | 23,1      | 1,8          | 0,6       | 2,8       | 6,6          | 3,3       | 4,0       | 0,6          |
| Versuch 5 [%] | 1,1       | 10,6      | 3,8          | 1,4       | 0,1       | 6,3          | 1,4       | 1,6       | 1,5          |
| Versuch 6 [%] | 0,8       | 8,2       | 2,2          | 0,6       | 0,4       | 15,3         | 0,5       | 3,9       | 0,5          |
| MW            | 0,5       | 9,3       | 2,9          | 0,7       | 2,2       | 7,7          | 1,7       | 2,6       | 1,0          |

**Tabelle 85: Rohdaten zu Abb. 37: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Überstand der HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Quercetin |       | Isorhamnetin |       | Kontrollen |        |
|---------------|-----------|-------|--------------|-------|------------|--------|
|               | 25 µM     | 50 µM | 25 µM        | 50 µM | Low        | High   |
| Versuch 1 OD  | 0,07      | 0,08  | 0,07         | 0,27  | 0,06       | 0,93   |
| Versuch 1 [%] | 7,33      | 8,34  | 7,81         | 29,58 | 6,94       | 100,00 |
| Versuch 2 OD  | 0,08      | 0,09  | 0,32         | 0,35  | 0,04       | 1,30   |
| Versuch 2 [%] | 6,34      | 6,98  | 24,84        | 26,88 | 2,97       | 100,00 |
| Versuch 3 OD  | 0,06      | 0,07  | 0,41         | 0,29  | 0,05       | 1,25   |
| Versuch 3 [%] | 4,58      | 5,72  | 32,67        | 23,33 | 3,80       | 100,00 |
| MW OD         | 0,07      | 0,08  | 0,27         | 0,31  | 0,05       | 1,16   |
| MW [%]        | 6,09      | 7,01  | 21,78        | 26,60 | 4,57       | 100,00 |

**Tabelle 86: Rohdaten zu Abb. 41: Densitometrische Auswertung der Konzentrations- und zeitabhängigen ERK-Dephosphorylierung - Konzentrationsabhängigkeit.**

| Quercetin    | Versuch 1 |        |        |        |       | Versuch 2 |       |       |       |       | Versuch 3 |       |       |       |       |
|--------------|-----------|--------|--------|--------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|
|              | 0 µM      | 5 µM   | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM | 0 µM      | 5 µM  | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 5 µM  | 10 µM | 25 µM | 50 µM |
| pERK OD      | 17460     | 20799  | 19253  | 18625  | 15869 | 16137     | 17893 | 17175 | 16870 | 17901 | 13323     | 15642 | 17618 | 18299 | 17017 |
| ERK OD       | 231577    | 177528 | 6097   | 105812 | 66725 | 75073     | 65185 | 39186 | 59842 | 42396 | 4346      | 3550  | 1867  | 1180  | 795   |
| pERK/ERK OD  | 13,3      | 8,5    | 0,3    | 5,7    | 4,2   | 4,7       | 3,6   | 2,3   | 3,5   | 2,4   | 0,3       | 0,2   | 0,1   | 0,1   | 0,0   |
| pERK/ERK [%] | 100       | 64     | 2      | 43     | 32    | 100       | 78    | 49    | 76    | 51    | 100       | 70    | 32    | 20    | 14    |
|              |           |        |        |        |       |           |       |       |       |       |           |       |       |       |       |
| Isorhamnetin | Versuch 1 |        |        |        |       | Versuch 2 |       |       |       |       | Versuch 3 |       |       |       |       |
|              | 0 µM      | 5 µM   | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM | 0 µM      | 5 µM  | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 5 µM  | 10 µM | 25 µM | 50 µM |
| pERK OD      | 235801    | 204762 | 135137 | 127112 | 49984 | 66736     | 40991 | 38864 | 36393 | 30731 | 4774      | 3824  | 1882  | 268   | 96    |
| ERK OD       | 14495     | 17384  | 17409  | 17167  | 15694 | 12084     | 14907 | 12382 | 11922 | 11744 | 14671     | 17866 | 18101 | 18131 | 15712 |
| pERK/ERK OD  | 16,3      | 11,8   | 7,8    | 7,4    | 3,2   | 5,5       | 2,7   | 3,1   | 3,1   | 2,6   | 0,3       | 0,2   | 0,1   | 0,0   | 0,0   |
| pERK/ERK [%] | 100       | 72     | 48     | 46     | 20    | 100       | 50    | 57    | 55    | 47    | 100       | 66    | 32    | 5     | 2     |

**Tabelle 87: Rohdaten zu Abb. 41: Densitometrische Auswertung der Konzentrations- und zeitabhängigen ERK-Dephosphorylierung - Zeitabhängigkeit.** n.e.: Datenpunkt nicht erhoben.

| Quercetin    | Versuch 1 |       |       |       |       | Versuch 2 |       |       |       |       | Versuch 3 |       |       |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|
|              | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   |
| pERK OD      | 4328      | n.e.  | 1682  | 909   | 887   | 4655      | 1908  | 783   | 537   | 1470  | 5134      | 648   | 1685  | 3116  | 603   |
| ERK OD       | 11929     | n.e.  | 14210 | 12605 | 14103 | 16128     | 16788 | 18027 | 18149 | 18198 | 16128     | 18198 | 17593 | 18149 | 16788 |
| pERK/ERK OD  | 0,36      |       | 0,12  | 0,07  | 0,06  | 0,29      | 0,11  | 0,04  | 0,03  | 0,08  | 0,32      | 0,04  | 0,10  | 0,17  | 0,04  |
| pERK/ERK [%] | 100       |       | 33    | 20    | 17    | 100       | 39    | 15    | 10    | 28    | 100       | 11    | 30    | 54    | 11    |

| Isorhamnetin | Versuch 1 |       |       |       |       | Versuch 2 |       |       |       |       | Versuch 3 |       |       |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|
|              | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   | 0 h       | 0,5 h | 1 h   | 2 h   | 4 h   |
| pERK OD      | 6441      | 5176  | 1220  | 1579  | 3546  | 5776      | 1921  | 2672  | 2456  | 2995  | 5825      | 2344  | 2893  | 612   | 2900  |
| ERK OD       | 9156      | 10180 | 12423 | 13504 | 13035 | 11096     | 15569 | 15810 | 15886 | 16741 | 14453     | 14779 | 17261 | 18034 | 15100 |
| pERK/ERK OD  | 0,70      | 0,51  | 0,10  | 0,12  | 0,27  | 0,52      | 0,12  | 0,17  | 0,15  | 0,18  | 0,40      | 0,16  | 0,17  | 0,03  | 0,19  |
| pERK/ERK [%] | 100       | 72    | 14    | 17    | 39    | 100       | 24    | 32    | 30    | 34    | 100       | 39    | 42    | 8     | 48    |

**Tabelle 88: Rohdaten zu Abb. 43: Einfluß von Quercetin und Isorhamnetin auf die NFκB-abhängige SEAP-Aktivität - Quercetin.** Dargestellt sind die Messwerte der SEAP-Aktivität, sowie die jeweils ermittelte Viabilität.

| Rohdaten-SEAP |           |      |       | Quercetin |       |       |       |        |  | + TNF-α |       |       |       |        |  |
|---------------|-----------|------|-------|-----------|-------|-------|-------|--------|--|---------|-------|-------|-------|--------|--|
| Versuch       | Kontrolle | DMSO | TNF-α | 10 μM     | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  | 10 μM   | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  |
| Versuch 1 OD  | 972       | 1096 | 5648  |           |       |       |       |        |  |         | 4321  | 3802  |       |        |  |
| Versuch 2 OD  | 1845      | 1895 | 7643  |           |       |       |       |        |  |         | 7349  | 6075  |       |        |  |
| Versuch 3 OD  | 1756      | 1683 | 7065  |           |       |       |       |        |  |         | 6833  | 6252  |       |        |  |
| Versuch 4 OD  | 796       | 1025 | 4123  |           |       |       |       |        |  |         | 3679  | 3044  |       |        |  |
| Versuch 5 OD  | 1661      | 1641 | 6855  | 2037      | 1484  | 1436  | 1529  | 2199   |  | 4765    | 4272  | 3624  | 3036  | 3010   |  |
| Versuch 6 OD  | 3132      | 3864 | 8319  | 3218      | 2678  | 2865  | 2523  | 3763   |  | 6641    | 6359  | 5240  | 4464  | 5055   |  |
| Versuch 7 OD  | 1433      | 1814 | 4941  | 1399      | 1302  | 1280  | 1228  | 1300   |  | 4788    | 3817  | 3337  | 2892  | 2915   |  |
| Versuch 8 OD  | 1005      | 971  | 4817  | 1119      | 1027  | 959   | 888   | 893    |  | 4764    | 4501  | 3941  | 3410  | 3238   |  |

| Rohdaten-MTT |           |      |       | Quercetin |       |       |       |        |  | + TNF-α |       |       |       |        |  |
|--------------|-----------|------|-------|-----------|-------|-------|-------|--------|--|---------|-------|-------|-------|--------|--|
| Versuch      | Kontrolle | DMSO | TNF-α | 10 μM     | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  | 10 μM   | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  |
| Versuch 1 OD | 0,34      | 0,44 | 0,27  |           |       |       |       |        |  |         | 0,28  | 0,28  |       |        |  |
| Versuch 2 OD | 0,78      | 0,72 | 0,68  |           |       |       |       |        |  |         | 0,32  | 0,62  |       |        |  |
| Versuch 3 OD | 0,24      | 0,29 | 0,24  |           |       |       |       |        |  |         | 0,25  | 0,24  |       |        |  |
| Versuch 4 OD | 0,53      | 0,63 | 0,60  |           |       |       |       |        |  |         | 0,67  | 0,40  |       |        |  |
| Versuch 5 OD | 1,10      | 0,94 | 0,98  | 1,12      | 1,11  | 1,08  | 1,11  | 0,91   |  | 1,10    | 1,09  | 1,05  | 1,10  | 0,98   |  |
| Versuch 6 OD | 1,39      | 1,19 | 1,16  | 1,41      | 1,36  | 1,28  | 1,33  | 1,11   |  | 1,31    | 1,31  | 1,24  | 1,24  | 1,18   |  |
| Versuch 7 OD | 2,44      | 1,97 | 2,03  | 2,46      | 2,26  | 2,14  | 2,14  | 2,19   |  | 2,21    | 2,13  | 1,90  | 2,01  | 2,08   |  |
| Versuch 8 OD | 2,60      | 2,25 | 2,36  | 2,29      | 2,35  | 2,06  | 1,92  | 2,23   |  | 2,31    | 2,34  | 2,20  | 1,90  | 2,04   |  |

**Tabelle 89: Rohdaten zu Abb. 43: Einfluß von Quercetin und Isorhamnetin auf die NFκB-abhängige SEAP-Aktivität - Isorhamnetin.** Dargestellt sind die Messwerte der SEAP-Aktivität, sowie die jeweils ermittelte Viabilität. n.e.: Datenpunkt nicht erhoben.

| Rohdaten-SEAP |           |      |       | Isorhamnetin |       |       |       |        |  | + TNF-α |       |       |       |        |  |
|---------------|-----------|------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|--|---------|-------|-------|-------|--------|--|
| Versuch       | Kontrolle | DMSO | TNF-α | 10 μM        | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  | 10 μM   | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  |
| Versuch 1 OD  | 972       | 1096 | 5648  |              |       | 831   |       |        |  |         | 4668  | 3810  |       |        |  |
| Versuch 2 OD  | 1845      | 1895 | 7643  |              |       | 1349  |       |        |  |         | 6532  | 5677  |       |        |  |
| Versuch 3 OD  | 1756      | 1683 | 7065  |              |       | 1422  |       |        |  |         | 6540  | 5056  |       |        |  |
| Versuch 4 OD  | 796       | 1025 | 4123  |              |       | 804   |       |        |  |         | 3255  | 3302  |       |        |  |
| Versuch 5 OD  | 1661      | 1641 | 6462  | 1391         | 1400  | 1517  | 1378  | 1308   |  | 6303    | 4920  | 3453  | 2912  | 3230   |  |
| Versuch 6 OD  | 3132      | 3864 | 8319  | 2475         | 2601  | 2681  | n.e.  | n.e.   |  | 7210    | 6209  | 5287  | 4316  | 4326   |  |
| Versuch 7 OD  | 1468      | 1847 | 5047  | 1466         | 1471  | 1394  | 1167  | 1058   |  | 4573    | 3945  | 3009  | 2536  | 2456   |  |
| Versuch 8 OD  | 1005      | 971  | 4817  | 1167         | 1120  | 1023  | 954   | 996    |  | 4147    | 4240  | 4065  | 3839  | 3540   |  |

| Rohdaten-MTT |           |      |       | Isorhamnetin |       |       |       |        |  | + TNF-α |       |       |       |        |  |
|--------------|-----------|------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|--|---------|-------|-------|-------|--------|--|
| Versuch      | Kontrolle | DMSO | TNF-α | 10 μM        | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  | 10 μM   | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |  |
| Versuch 1 OD | 0,34      | 0,44 | 0,27  |              |       | 0,36  |       |        |  |         | 0,30  | 0,29  |       |        |  |
| Versuch 2 OD | 0,78      | 0,72 | 0,68  |              |       | 0,60  |       |        |  |         | 0,70  | 0,75  |       |        |  |
| Versuch 3 OD | 0,24      | 0,29 | 0,24  |              |       | 0,24  |       |        |  |         | 0,22  | 0,30  |       |        |  |
| Versuch 4 OD | 0,53      | 0,63 | 0,60  |              |       | 0,68  |       |        |  |         | 0,67  | 0,60  |       |        |  |
| Versuch 5 OD | 1,10      | 0,94 | 0,98  | 1,14         | 1,19  | 1,04  | 1,06  | 1,10   |  | 1,14    | 1,11  | 1,07  | 1,09  | 1,08   |  |
| Versuch 6 OD | 1,39      | 1,19 | 1,16  | 1,38         | 1,34  | 1,27  | 1,28  | 1,32   |  | 1,31    | 1,33  | 1,34  | 1,29  | 1,07   |  |
| Versuch 7 OD | 2,44      | 1,97 | 2,03  | 2,35         | 2,23  | 1,92  | 2,03  | 2,16   |  | 2,23    | 2,15  | 2,16  | 2,28  | 1,96   |  |
| Versuch 8 OD | 2,72      | 2,72 | 2,74  | 2,74         | 2,71  | 2,71  | 2,70  | 2,70   |  | 2,73    | 2,72  | 2,71  | 2,71  | 2,69   |  |

**Tabelle 90: Rohdaten zu Abb. 44: 48 h Zytotoxizität von Luteolin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Luteolin |        |       |       | Kämpferol |        |        |       | Chrysoeriol |        |       |       | Diosmetin |       |       |       |
|---------------|----------|--------|-------|-------|-----------|--------|--------|-------|-------------|--------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|
|               | 0 µM     | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM | 0 µM        | 10 µM  | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,97     | 1,42   | 0,89  | 0,16  | 0,97      | 1,45   | 1,39   | 0,96  | 0,97        | 0,10   | 0,25  | 0,06  | 0,97      | 0,07  | 0,51  | 0,07  |
| Versuch 1 [%] | 100,00   | 146,66 | 91,44 | 16,81 | 100,00    | 149,27 | 143,07 | 98,80 | 100,00      | 9,98   | 26,20 | 6,30  | 100,00    | 6,79  | 52,85 | 7,32  |
| Versuch 2 OD  | 1,10     | 1,05   | 0,75  | 0,13  | 1,10      | 1,23   | 1,02   | 0,72  | 1,10        | 0,06   | 0,32  | 0,09  | 1,10      | 0,06  | 0,12  | 0,05  |
| Versuch 2 [%] | 100,00   | 95,92  | 68,25 | 11,77 | 100,00    | 112,61 | 92,84  | 65,72 | 100,00      | 5,52   | 29,61 | 7,99  | 100,00    | 5,90  | 10,89 | 4,79  |
| Versuch 3 OD  | 0,76     | 0,87   | 0,29  | 0,06  | 0,76      | 0,80   | 0,64   | 0,56  | 0,76        | 0,78   | 0,29  | 0,05  | 0,76      | 0,54  | 0,14  | 0,07  |
| Versuch 3 [%] | 100,00   | 114,61 | 37,82 | 7,90  | 100,00    | 104,96 | 83,45  | 73,42 | 100,00      | 101,96 | 38,17 | 7,17  | 100,00    | 71,15 | 18,09 | 9,77  |
| Versuch 4 OD  | 1,50     | 1,13   | 1,09  | 0,42  | 1,50      | 1,42   | 1,52   | 1,42  | 1,50        | 1,44   | 0,83  | 0,24  | 1,50      | 1,49  | 0,74  | 0,15  |
| Versuch 4 [%] | 100,00   | 75,70  | 72,66 | 28,33 | 100,00    | 94,59  | 101,38 | 94,65 | 100,00      | 96,29  | 55,69 | 15,79 | 100,00    | 99,55 | 49,35 | 10,10 |
| Versuch 5 OD  | 1,64     | 1,20   | 0,59  | 0,30  | 1,64      | 1,61   | 1,37   | 1,62  | 1,64        | 1,82   | 0,71  | 0,09  | 1,64      | 1,13  | 0,34  | 0,15  |
| Versuch 5 [%] | 100,00   | 73,47  | 36,17 | 18,21 | 100,00    | 98,47  | 83,33  | 98,90 | 100,00      | 111,06 | 43,16 | 5,28  | 100,00    | 69,24 | 20,55 | 9,24  |
| Versuch 6 OD  | 0,85     | 0,84   | 0,36  | 0,07  | 0,85      | 0,36   | 0,07   | 0,10  | 0,85        | 0,63   | 0,36  | 0,05  | 0,85      | 0,77  | 0,15  | 0,04  |
| Versuch 6 [%] | 100,00   | 98,41  | 42,58 | 8,21  | 100,00    | 42,58  | 8,21   | 11,55 | 100,00      | 73,93  | 41,95 | 5,90  | 100,00    | 90,39 | 17,24 | 4,15  |
| MW OD         | 1,14     | 1,09   | 0,66  | 0,19  | 1,14      | 1,15   | 1,00   | 0,90  | 1,14        | 0,80   | 0,46  | 0,10  | 1,14      | 0,68  | 0,33  | 0,09  |
| MW [%]        | 100,00   | 100,79 | 58,15 | 15,20 | 100,00    | 100,41 | 85,38  | 73,84 | 100,00      | 66,46  | 39,13 | 8,07  | 100,00    | 57,17 | 28,16 | 7,56  |

**Tabelle 91: Rohdaten zu Abb. 45: 24 h Zytotoxizität von Luteolin und seinen Methylderivaten in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Luteolin |        |        |       | Kämpferol |        |        |        | Chrysoeriol |       |       |       | Diosmetin |       |       |       |
|---------------|----------|--------|--------|-------|-----------|--------|--------|--------|-------------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|
|               | 0 µM     | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM | 0 µM      | 10 µM  | 25 µM  | 50 µM  | 0 µM        | 10 µM | 25 µM | 50 µM | 0 µM      | 10 µM | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 0,58     | 0,54   | 0,41   | 0,11  | 0,58      | 0,46   | 0,41   | 0,33   | 0,58        | 0,45  | 0,30  | 0,16  | 0,58      | 0,33  | 0,13  | 0,07  |
| Versuch 1 [%] | 100,00   | 94,05  | 71,13  | 19,35 | 100,00    | 79,01  | 70,76  | 56,57  | 100,00      | 77,76 | 51,27 | 27,28 | 100,00    | 58,03 | 22,78 | 11,89 |
| Versuch 2 OD  | 0,35     | 0,43   | 0,27   | 0,12  | 0,35      | 0,44   | 0,41   | 0,36   | 0,35        | 0,06  | 0,11  | 0,08  | 0,35      | 0,09  | 0,14  | 0,10  |
| Versuch 2 [%] | 100,00   | 124,58 | 77,58  | 34,36 | 100,00    | 126,91 | 119,02 | 104,60 | 100,00      | 17,19 | 33,10 | 23,94 | 100,00    | 26,95 | 41,09 | 28,37 |
| Versuch 3 OD  | 0,38     | 0,52   | 0,38   | 0,09  | 0,38      | 0,44   | 0,52   | 0,37   | 0,38        | 0,08  | 0,12  | 0,06  | 0,38      | 0,08  | 0,14  | 0,07  |
| Versuch 3 [%] | 100,00   | 138,64 | 100,67 | 22,77 | 100,00    | 115,15 | 137,41 | 97,43  | 100,00      | 20,41 | 31,57 | 15,88 | 100,00    | 20,08 | 37,33 | 19,07 |
| Versuch 4 OD  | 0,55     | 0,57   | 0,41   | 0,18  | 0,55      | 0,56   | 0,51   | 0,41   | 0,55        | 0,06  | 0,16  | 0,10  | 0,55      | 0,10  | 0,14  | 0,11  |
| Versuch 4 [%] | 100,00   | 104,08 | 74,58  | 32,87 | 100,00    | 101,26 | 92,21  | 75,17  | 100,00      | 11,09 | 29,34 | 18,27 | 100,00    | 18,12 | 26,12 | 19,23 |
| Versuch 5 OD  | 0,74     | 0,59   | 0,44   | 0,17  | 0,74      | 0,69   | 0,71   | 0,53   | 0,74        | 0,65  | 0,46  | 0,17  | 0,74      | 0,49  | 0,37  | 0,15  |
| Versuch 5 [%] | 100,00   | 79,68  | 59,28  | 23,11 | 100,00    | 92,74  | 96,52  | 71,54  | 100,00      | 87,86 | 62,90 | 23,51 | 100,00    | 66,70 | 49,77 | 20,55 |
| Versuch 6 OD  | 0,57     | 0,47   | 0,42   | 0,29  | 0,57      | 0,45   | 0,57   | 0,52   | 0,57        | 0,55  | 0,37  | 0,18  | 0,57      | 0,50  | 0,30  | 0,22  |
| Versuch 6 [%] | 100,00   | 81,18  | 73,15  | 50,75 | 100,00    | 78,65  | 99,52  | 90,56  | 100,00      | 96,42 | 64,59 | 31,76 | 100,00    | 86,88 | 51,64 | 38,60 |
| MW OD         | 0,53     | 0,52   | 0,39   | 0,16  | 0,53      | 0,50   | 0,52   | 0,42   | 0,53        | 0,31  | 0,25  | 0,13  | 0,53      | 0,27  | 0,20  | 0,12  |
| MW [%]        | 100,00   | 103,70 | 76,07  | 30,54 | 100,00    | 98,95  | 102,57 | 82,64  | 100,00      | 51,79 | 45,46 | 23,44 | 100,00    | 46,12 | 38,12 | 22,95 |

**Tabelle 92: Rohdaten zu Abb. 46: Konzentrationsabhängige Caspase-3/7-Aktivität in Hct116 Zellen.**

| Hct116         |           | Chrysoeriol |        | Diosmetin |        | Luteolin |        | Kämpferol |        |
|----------------|-----------|-------------|--------|-----------|--------|----------|--------|-----------|--------|
|                | Kontrolle | 25 µM       | 50 µM  | 25 µM     | 50 µM  | 25 µM    | 50 µM  | 25 µM     | 50 µM  |
| Versuch 1 ΔRFU | 80543     | 229027      | 273603 | 113899    | 243359 | 102545   | 136335 | 107742    | 164233 |
| Versuch 2 ΔRFU | 91177     | 208903      | 316187 | 94972     | 208043 | 96783    | 142024 | 99613     | 105326 |
| Versuch 3 ΔRFU | 238740    | 271529      | 444924 | 184850    | 483527 | 354567   | 397837 | 257975    | 290746 |
| Versuch 4 ΔRFU | 90086     | 211887      | 337564 | 151273    | 279714 | 210191   | 137398 | 127425    | 129508 |
| Versuch 5 ΔRFU | 178935    | 501394      | 450260 | 141780    | 676802 | 165446   | 432969 | 166672    | 201472 |
| MW             | 135896    | 284548      | 364508 | 137355    | 378289 | 185906   | 249313 | 151885    | 178257 |

**Tabelle 93: Rohdaten zu Abb. 47: Zeitabhängige Caspase-3/7-Aktivität in Hct116 Zellen.**

| Hct116         | 24 h      |          |           | 40 h      |          |           | 48 h      |          |           |
|----------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                | Kontrolle | Luteolin | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Diosmetin |
| Versuch 1 ΔRFU | 19211     | 12964    | 215456    | 19816     | 21044    | 139314    | 21064     | 49405    | 304182    |
| Versuch 2 ΔRFU | 32910     | 47529    | 246592    | 42435     | 93103    | 328010    | 41459     | 380532   | 316231    |
| Versuch 3 ΔRFU | 41341     | 53092    | 594940    | 99803     | 300091   | 544334    | 274236    | 260734   | 432845    |
| MW             | 31154     | 37862    | 352329    | 54018     | 138079   | 337219    | 112253    | 230224   | 351086    |

**Tabelle 94: Rohdaten zu Abb. 49 und 50: Statistische Auswertung der Hoechst 33342- und PI-Färbung in Hct116 Zellen.** Oben: Inkubation mit 25 µM Flavonoid, Unten: Inkubation mit 50 µM Flavonoid.

| Hct116<br>25 µM | Apoptose  |          |             |           | Nekrose   |          |             |           | Mitose    |          |             |           |
|-----------------|-----------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|-------------|-----------|
|                 | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin |
| Versuch 1 [%]   | 0,60      | 2,28     | 1,71        | 5,36      | 0,57      | 0,82     | 1,71        | 2,31      | 5,73      | 8,14     | 1,43        | 2,95      |
| Versuch 2 [%]   | 0,87      | 3,66     | 1,34        | 6,83      | 0,76      | 1,18     | 0,76        | 2,53      | 5,64      | 4,33     | 0,92        | 3,92      |
| Versuch 3 [%]   | 1,30      |          | 1,66        | 13,54     | 0,43      |          | 0,44        | 5,51      | 7,72      |          | 5,03        | 4,52      |
| MW              | 0,9       | 3,0      | 1,6         | 8,6       | 0,6       | 1,0      | 1,0         | 3,5       | 6,4       | 6,2      | 2,5         | 3,8       |

| Hct116<br>50 µM | Apoptose  |          |             |           | Nekrose   |          |             |           | Mitose    |          |             |           |
|-----------------|-----------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|-------------|-----------|
|                 | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin | Kontrolle | Luteolin | Chrysoeriol | Diosmetin |
| Versuch 1 [%]   | 0,60      | 7,65     | 10,67       | 16,08     | 0,57      | 3,89     | 2,05        | 4,53      | 5,73      | 3,59     | 2,14        | 1,32      |
| Versuch 2 [%]   | 0,87      | 4,56     | 13,40       | 19,45     | 0,76      | 1,75     | 2,01        | 4,31      | 5,64      | 2,85     | 0,53        | 2,67      |
| Versuch 3 [%]   | 1,30      |          | 24,27       | 34,40     | 0,43      |          | 9,79        | 12,02     | 7,72      |          | 1,77        | 2,62      |
| MW              | 0,9       | 6,1      | 16,1        | 23,3      | 0,6       | 2,8      | 4,6         | 7,0       | 6,4       | 3,2      | 1,5         | 2,2       |

**Tabelle 95: Rohdaten der LDH-Aktivität im Überstand der Hct116 Zellen nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen.**

| Hct116        | Luteolin |       | Chrysoeriol |       | Diosmetin |       | Kontrollen |        |
|---------------|----------|-------|-------------|-------|-----------|-------|------------|--------|
|               | 25 µM    | 50 µM | 25 µM       | 50 µM | 25 µM     | 50 µM | Low        | High   |
| Versuch 1 OD  | 0,27     | 0,31  | 0,30        | 0,70  | 0,59      | 0,69  | 0,26       | 1,88   |
| Versuch 1 [%] | 14,18    | 16,69 | 15,89       | 37,38 | 31,31     | 36,70 | 14,04      | 100,00 |
| Versuch 2 OD  | 0,58     | 0,65  | 0,60        | 0,30  | 0,29      | 0,36  | 0,60       | 2,47   |
| Versuch 2 [%] | 23,66    | 26,18 | 24,24       | 11,97 | 11,68     | 14,53 | 24,45      | 100,00 |
| Versuch 3 OD  | 0,59     | 0,65  | 0,60        | 0,61  | 0,62      | 0,77  | 0,63       | 2,58   |
| Versuch 3 [%] | 22,86    | 25,21 | 23,35       | 23,62 | 23,92     | 29,67 | 24,37      | 100,00 |
| MW OD         | 0,48     | 0,54  | 0,50        | 0,54  | 0,50      | 0,60  | 0,50       | 2,31   |
| MW [%]        | 20,23    | 22,69 | 21,16       | 24,32 | 22,31     | 26,97 | 20,95      | 100,00 |

**Tabelle 96: Rohdaten zu Tab. 14: 48 h Zytotoxizität von Verapamil in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Verapamil |         |       |       |
|---------------|-----------|---------|-------|-------|
|               | 0 µM      | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,24      | 1,04    | 0,87  |       |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 84,11   | 69,87 |       |
| Versuch 2 OD  | 0,94      | 0,78    | 0,67  |       |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 83,79   | 71,43 |       |
| Versuch 3 OD  | 2,02      | 1,61    | 1,57  |       |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 79,56   | 77,88 |       |
| Versuch 4 OD  | 1,34      | 1,00    | 0,82  |       |
| Versuch 4 [%] | 100,00    | 74,82   | 61,35 |       |
| Versuch 5 OD  | 0,74      | 0,68    | 0,63  | 0,52  |
| Versuch 5 [%] | 100,00    | 90,97   | 84,33 | 70,35 |
| Versuch 6 OD  | 0,24      | 0,21    | 0,20  | 0,13  |
| Versuch 6 [%] | 100,00    | 85,74   | 81,72 | 53,87 |
| MW OD         | 1,09      | 0,89    | 0,79  | 0,33  |
| MW [%]        | 100,00    | 83,17   | 74,43 | 62,11 |

**Tabelle 97: Rohdaten zu Abb. 51 und 52: 48 h Zytotoxizität der Koinkubationen von Verapamil mit Doxorubicin bzw. Quercetin in HepG2 Zellen.** Oben: Koinkubation mit Doxorubicin, Unten: Koinkubation mit Quercetin.

| HepG2        | Doxorubicin |        |        |        | Doxorubicin + 12,5 Verapamil |        |        |        | Doxorubicin + 25 Verapamil |        |        |        |  |  |  |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|--------|--|--|--|
|              | 0 µM        | 125 µM | 250 µM | 500 µM | 0 µM                         | 125 µM | 250 µM | 500 µM | 0 µM                       | 125 µM | 250 µM | 500 µM |  |  |  |
| Versuch 1 OD | 1,24        | 0,99   | 0,87   | 0,70   | 1,04                         | 0,68   | 0,60   | 0,21   | 0,87                       | 0,54   | 0,51   | 0,07   |  |  |  |
| Versuch 2 OD | 0,94        | 0,85   | 0,74   | 0,55   | 0,78                         | 0,54   | 0,37   | 0,06   | 0,67                       | 0,45   | 0,25   | 0,04   |  |  |  |
| Versuch 3 OD | 1,34        | 1,14   | 1,03   | 0,74   | 1,00                         | 0,77   | 0,58   | 0,12   | 0,82                       | 0,59   | 0,43   | 0,10   |  |  |  |
| MW OD        | 1,17        | 0,99   | 0,88   | 0,66   | 0,94                         | 0,66   | 0,52   | 0,13   | 0,79                       | 0,53   | 0,39   | 0,07   |  |  |  |
| MW [%]       | 100,00      | 84,82  | 75,16  | 56,71  | 100,00                       | 70,45  | 54,68  | 13,79  | 100,00                     | 66,94  | 50,23  | 8,87   |  |  |  |

| HepG2        | Quercetin |         |       |       |        | Quercetin + 12,5 Verapamil |         |       |       |        | Quercetin + 25 Verapamil |         |       |       |        |
|--------------|-----------|---------|-------|-------|--------|----------------------------|---------|-------|-------|--------|--------------------------|---------|-------|-------|--------|
|              | 0 µM      | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM                       | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM                     | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD | 1,24      | 1,15    | 1,02  | 0,92  | 0,68   | 1,04                       | 1,19    | 0,83  | 0,76  | 0,71   | 0,87                     | 0,61    | 0,69  | 0,68  | 0,59   |
| Versuch 2 OD | 0,94      | 0,93    | 0,73  | 0,47  | 0,38   | 0,78                       | 0,62    | 0,53  | 0,38  | 0,33   | 0,67                     | 0,50    | 0,41  | 0,33  | 0,28   |
| Versuch 3 OD | 1,34      | 1,24    | 1,21  | 0,94  | 0,80   | 1,00                       | 0,98    | 0,94  | 0,84  | 0,80   | 0,82                     | 0,72    | 0,84  | 0,73  | 0,63   |
| MW OD        | 1,17      | 1,11    | 0,99  | 0,78  | 0,62   | 0,94                       | 0,93    | 0,77  | 0,66  | 0,61   | 0,79                     | 0,61    | 0,65  | 0,58  | 0,50   |
| MW [%]       | 100,00    | 94,37   | 84,05 | 66,27 | 52,79  | 100,00                     | 98,30   | 81,42 | 70,23 | 64,89  | 100,00                   | 77,19   | 82,56 | 73,66 | 63,73  |

**Tabelle 98: Rohdaten zu Abb. 53: 48 h Zytotoxizität der Koinkubation von Verapamil mit Quercetin in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Quercetin |         |       |       |        | Quercetin + 12,5 Verapamil |         |        |       |        | Quercetin + 25 Verapamil |         |       |       |        |
|---------------|-----------|---------|-------|-------|--------|----------------------------|---------|--------|-------|--------|--------------------------|---------|-------|-------|--------|
|               | 0 µM      | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM                       | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM | 100 µM | 0 µM                     | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,33      | 1,39    | 1,03  | 0,05  | 0,01   | 1,14                       | 1,34    | 1,34   | 0,05  | 0,01   | 0,83                     | 0,92    | 0,80  | 0,06  | 0,01   |
| Versuch 1 [%] | 100,00    | 104,08  | 77,56 | 4,12  | 0,56   | 100,00                     | 117,41  | 117,17 | 4,66  | 0,96   | 100,00                   | 110,80  | 96,65 | 6,64  | 1,51   |
| Versuch 2 OD  | 2,80      | 2,75    | 2,59  | 2,73  | 2,06   | 2,83                       | 2,75    | 2,75   | 2,70  | 2,32   | 2,86                     | 2,74    | 2,70  | 2,61  | 1,49   |
| Versuch 2 [%] | 100,00    | 98,25   | 92,67 | 97,49 | 73,78  | 100,00                     | 97,26   | 97,04  | 95,26 | 81,85  | 100,00                   | 95,95   | 94,52 | 91,41 | 52,32  |
| Versuch 3 OD  | 2,55      | 2,40    | 2,41  | 2,33  | 2,04   | 2,47                       | 2,50    | 2,33   | 2,35  | 2,18   | 2,45                     | 2,48    | 2,37  | 2,25  | 2,04   |
| Versuch 3 [%] | 100,00    | 94,33   | 94,67 | 91,36 | 80,08  | 100,00                     | 101,19  | 94,17  | 95,12 | 88,21  | 100,00                   | 101,48  | 96,76 | 91,95 | 83,22  |
| Versuch 4 OD  | 1,86      | 1,73    | 1,58  | 1,30  | 1,16   | 1,83                       | 1,72    | 1,50   | 1,35  | 1,11   | 1,52                     | 1,63    | 1,47  | 1,27  | 0,92   |
| Versuch 4 [%] | 100,00    | 93,31   | 85,19 | 70,02 | 62,56  | 100,00                     | 94,24   | 82,24  | 73,64 | 60,71  | 100,00                   | 107,12  | 96,90 | 83,64 | 60,64  |
| MW OD         | 2,13      | 2,07    | 1,90  | 1,60  | 1,32   | 2,07                       | 2,08    | 1,98   | 1,61  | 1,40   | 1,91                     | 1,94    | 1,84  | 1,55  | 1,12   |
| MW [%]        | 100,00    | 97,49   | 87,52 | 65,75 | 54,25  | 100,00                     | 102,52  | 97,65  | 67,17 | 57,93  | 100,00                   | 103,84  | 96,21 | 68,41 | 49,42  |

**Tabelle 99: Rohdaten zu Tab. 16: Vergleich der Peakflächen von Quercetin bei Koinkubation mit DIDS in HepG2 Zellen.**

| HepG2              | Quercetin |        |        | Quercetin + 50 µM DIDS |        |        |
|--------------------|-----------|--------|--------|------------------------|--------|--------|
|                    | 5 min     | 15 min | 60 min | 5 min                  | 15 min | 60 min |
| Versuch 1 [mV*min] | 2,54      | 7,79   | 3,71   | 4,57                   | 7,2    | 5,67   |
| Versuch 2 [mV*min] | 4,39      | 6,65   | 9      | 2,96                   | 6,34   | 6,75   |
| Versuch 3 [mV*min] | 3,94      | 7,34   | 7,68   | 3,34                   | 5,7    | 7,83   |
| MW [mV*min]        | 3,62      | 7,26   | 6,80   | 3,62                   | 6,41   | 6,75   |

**Tabelle 100: Rohdaten zu Abb. 56: Antioxidatives Potential ausgewählter Catechine im TEAC-Assay.**

| TEAC         | Trolox |        |      |         |       | Epicatechin |        |      |         |       | Epicatechingallat |        |      |         |       |
|--------------|--------|--------|------|---------|-------|-------------|--------|------|---------|-------|-------------------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM              | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,71   | 0,58   | 0,49 | 0,10    | 0,04  | 0,73        | 0,52   | 0,41 | 0,15    | 0,03  | 0,74              | 0,01   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| Versuch 2 OD | 0,71   | 0,62   | 0,51 | 0,28    | 0,00  | 0,69        | 0,48   | 0,40 | 0,20    | 0,04  | 0,69              | 0,04   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| Versuch 3 OD | 0,69   | 0,54   | 0,50 | 0,26    | 0,00  | 0,69        | 0,47   | 0,37 | 0,25    | 0,15  | 0,74              | 0,00   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| MW OD        | 0,70   | 0,58   | 0,50 | 0,21    | 0,01  | 0,71        | 0,49   | 0,39 | 0,20    | 0,07  | 0,72              | 0,02   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| SD OD        | 0,01   | 0,04   | 0,01 | 0,10    | 0,02  | 0,02        | 0,03   | 0,02 | 0,05    | 0,07  | 0,03              | 0,02   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| SEM OD       | 0,01   | 0,02   | 0,01 | 0,06    | 0,01  | 0,01        | 0,02   | 0,01 | 0,03    | 0,04  | 0,02              | 0,01   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| MW [%]       | 100    | 82     | 71   | 30      | 2     | 100         | 69     | 56   | 28      | 10    | 103               | 3      | 0    | 0       | 0     |
| SD [%]       | 2      | 5      | 2    | 14      | 3     | 3           | 4      | 3    | 7       | 10    | 4                 | 3      | 0    | 0       | 0     |
| SEM [%]      | 1      | 3      | 1    | 8       | 2     | 2           | 2      | 2    | 4       | 6     | 2                 | 2      | 0    | 0       | 0     |

| TEAC         | Epigallocatechin |        |      |         |       | Catechin |        |      |         |       | Epigallocatechingallat |        |      |         |       |
|--------------|------------------|--------|------|---------|-------|----------|--------|------|---------|-------|------------------------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM             | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM                   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,72             | 0,44   | 0,25 | 0,02    | 0,00  | 0,70     | 0,39   | 0,29 | 0,15    | 0,00  | 0,71                   | 0,01   | 0,00 | 0,00    | 0,00  |
| Versuch 2 OD | 0,71             | 0,53   | 0,27 | 0,00    | 0,00  | 0,72     | 0,45   | 0,33 | 0,13    | 0,00  | 0,69                   | 0,29   | 0,06 | 0,00    | 0,00  |
| Versuch 3 OD | 0,69             | 0,37   | 0,24 | 0,00    | 0,00  | 0,71     | 0,44   | 0,35 | 0,10    | 0,01  | 0,71                   | 0,22   | 0,14 | 0,00    | 0,00  |
| MW OD        | 0,71             | 0,45   | 0,25 | 0,01    | 0,00  | 0,71     | 0,43   | 0,32 | 0,13    | 0,00  | 0,70                   | 0,17   | 0,07 | 0,00    | 0,00  |
| SD OD        | 0,02             | 0,08   | 0,02 | 0,01    | 0,00  | 0,01     | 0,03   | 0,03 | 0,03    | 0,00  | 0,01                   | 0,15   | 0,07 | 0,00    | 0,00  |
| SEM OD       | 0,01             | 0,05   | 0,01 | 0,01    | 0,00  | 0,01     | 0,02   | 0,02 | 0,02    | 0,00  | 0,01                   | 0,08   | 0,04 | 0,00    | 0,00  |
| MW [%]       | 100              | 63     | 36   | 1       | 0     | 101      | 61     | 46   | 18      | 1     | 100                    | 24     | 10   | 0       | 0     |
| SD [%]       | 2                | 12     | 3    | 2       | 0     | 2        | 5      | 4    | 4       | 0     | 2                      | 21     | 10   | 0       | 0     |
| SEM [%]      | 1                | 7      | 1    | 1       | 0     | 1        | 3      | 2    | 2       | 0     | 1                      | 12     | 6    | 0       | 0     |

**Tabelle 101: Rohdaten zu Abb. 57: Antioxidatives Potential ausgewählter Catechine im DPPH-Assay.**

| DPPH         | Trolox |        |      |         |       | Epicatechin |        |      |         |       | Epicatechingallat |        |      |         |       |
|--------------|--------|--------|------|---------|-------|-------------|--------|------|---------|-------|-------------------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM        | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM              | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,70   | 0,56   | 0,54 | 0,25    | 0,12  | 0,70        | 0,64   | 0,59 | 0,44    | 0,34  | 0,71              | 0,27   | 0,13 | 0,05    | 0,04  |
| Versuch 2 OD | 0,69   | 0,62   | 0,58 | 0,42    | 0,13  | 0,71        | 0,63   | 0,58 | 0,45    | 0,26  | 0,71              | 0,28   | 0,10 | 0,04    | 0,04  |
| Versuch 3 OD | 0,72   | 0,65   | 0,65 | 0,44    | 0,10  | 0,72        | 0,65   | 0,61 | 0,55    | 0,40  | 0,73              | 0,29   | 0,15 |         |       |
| MW OD        | 0,70   | 0,61   | 0,59 | 0,37    | 0,12  | 0,71        | 0,64   | 0,59 | 0,48    | 0,33  | 0,72              | 0,28   | 0,12 | 0,05    | 0,04  |
| SD OD        | 0,02   | 0,04   | 0,06 | 0,11    | 0,02  | 0,01        | 0,01   | 0,02 | 0,06    | 0,07  | 0,01              | 0,01   | 0,02 | 0,00    | 0,00  |
| SEM OD       | 0,01   | 0,03   | 0,03 | 0,06    | 0,01  | 0,01        | 0,01   | 0,01 | 0,03    | 0,04  | 0,01              | 0,00   | 0,01 | 0,00    | 0,00  |
| MW [%]       | 100    | 87     | 84   | 52      | 17    | 101         | 91     | 84   | 68      | 47    | 102               | 40     | 18   | 6       | 6     |
| SD [%]       | 2      | 6      | 8    | 15      | 3     | 1           | 2      | 2    | 9       | 11    | 1                 | 1      | 3    | 0       | 1     |
| SEM [%]      | 1      | 4      | 5    | 9       | 2     | 1           | 1      | 1    | 5       | 6     | 1                 | 1      | 2    | 0       | 0     |

| DPPH         | Epigallocatechin |        |      |         |       | Catechin |        |      |         |       | Epigallocatechingallat |        |      |         |       |
|--------------|------------------|--------|------|---------|-------|----------|--------|------|---------|-------|------------------------|--------|------|---------|-------|
|              | 0 µM             | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM     | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM | 0 µM                   | 2,5 µM | 5 µM | 12,5 µM | 25 µM |
| Versuch 1 OD | 0,67             | 0,48   | 0,41 | 0,20    | 0,05  | 0,70     | 0,58   | 0,57 | 0,43    | 0,34  | 0,70                   | 0,18   | 0,09 | 0,05    | 0,04  |
| Versuch 2 OD | 0,69             | 0,51   | 0,44 | 0,21    | 0,06  | 0,69     | 0,60   | 0,58 | 0,42    | 0,27  | 0,67                   | 0,40   | 0,29 | 0,07    | 0,04  |
| Versuch 3 OD | 0,72             | 0,56   | 0,45 | 0,23    | 0,10  | 0,70     | 0,66   | 0,64 | 0,53    | 0,42  | 0,68                   | 0,39   | 0,36 | 0,13    | 0,06  |
| MW OD        | 0,69             | 0,52   | 0,43 | 0,21    | 0,07  | 0,70     | 0,61   | 0,59 | 0,46    | 0,34  | 0,68                   | 0,32   | 0,25 | 0,08    | 0,05  |
| SD OD        | 0,03             | 0,04   | 0,02 | 0,01    | 0,03  | 0,01     | 0,04   | 0,04 | 0,06    | 0,07  | 0,01                   | 0,13   | 0,14 | 0,04    | 0,01  |
| SEM OD       | 0,02             | 0,02   | 0,01 | 0,01    | 0,02  | 0,00     | 0,02   | 0,02 | 0,04    | 0,04  | 0,01                   | 0,07   | 0,08 | 0,03    | 0,01  |
| MW [%]       | 99               | 73     | 62   | 30      | 10    | 99       | 87     | 84   | 65      | 49    | 97                     | 46     | 35   | 12      | 7     |
| SD [%]       | 4                | 6      | 3    | 2       | 4     | 1        | 6      | 5    | 9       | 10    | 2                      | 18     | 20   | 6       | 2     |
| SEM [%]      | 2                | 3      | 2    | 1       | 2     | 0        | 3      | 3    | 5       | 6     | 1                      | 10     | 12   | 4       | 1     |

**Tabelle 102: Rohdaten zu Abb. 58: 48 h Zytotoxizität der Catechinderivate in HepG2 Zellen.**

| HepG2         | Epigallocatechingallat |         |       |       |        | Epicatechingallat |         |        |       |        | Epigallocatechin |         |        |       |        |
|---------------|------------------------|---------|-------|-------|--------|-------------------|---------|--------|-------|--------|------------------|---------|--------|-------|--------|
|               | 0 µM                   | 12,5 µM | 25 µM | 50 µM | 100 µM | 0 µM              | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM | 100 µM | 0 µM             | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,37                   | 1,29    | 1,15  | 1,07  | 0,61   | 1,37              | 1,37    | 1,45   | 1,32  | 0,93   | 1,37             | 1,44    | 1,38   | 1,28  | 1,02   |
| Versuch 1 [%] | 100,00                 | 93,86   | 83,93 | 77,53 | 44,21  | 100,00            | 99,47   | 105,59 | 96,35 | 67,55  | 100,00           | 104,54  | 100,23 | 92,90 | 74,17  |
| Versuch 2 OD  | 1,32                   | 1,25    | 1,16  | 1,03  | 0,45   | 1,32              | 1,19    | 1,23   | 1,11  | 0,85   | 1,32             | 1,33    | 1,23   | 1,18  | 1,03   |
| Versuch 2 [%] | 100,00                 | 94,59   | 88,23 | 78,00 | 33,89  | 100,00            | 90,22   | 93,30  | 83,89 | 64,85  | 100,00           | 101,16  | 93,57  | 89,19 | 77,83  |
| Versuch 3 OD  | 1,32                   | 1,34    | 1,21  | 1,19  | 0,75   | 1,32              | 1,23    | 1,30   | 1,32  | 1,09   | 1,32             | 1,30    | 1,31   | 1,30  | 1,19   |
| Versuch 3 [%] | 100,00                 | 101,22  | 91,60 | 89,69 | 56,92  | 100,00            | 92,78   | 98,06  | 99,33 | 82,69  | 100,00           | 98,10   | 99,31  | 98,51 | 89,97  |
| MW OD         | 1,34                   | 1,29    | 1,18  | 1,09  | 0,60   | 1,34              | 1,26    | 1,33   | 1,25  | 0,96   | 1,34             | 1,36    | 1,31   | 1,25  | 1,08   |
| MW [%]        | 100,00                 | 96,56   | 87,92 | 81,74 | 45,01  | 100,00            | 94,16   | 98,98  | 93,19 | 71,70  | 100,00           | 101,27  | 97,70  | 93,54 | 80,66  |

| HepG2         | Epicatechin |         |        |        |        | Catechin |         |        |        |        |  |  |  |  |  |
|---------------|-------------|---------|--------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|--|--|--|--|--|
|               | 0 µM        | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM     | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |  |  |  |  |  |
| Versuch 1 OD  | 1,37        | 1,39    | 1,23   | 1,48   | 1,54   | 1,37     | 1,38    | 1,37   | 1,34   | 1,35   |  |  |  |  |  |
| Versuch 1 [%] | 100,00      | 100,93  | 89,31  | 107,83 | 111,85 | 100,00   | 100,32  | 99,49  | 97,36  | 98,41  |  |  |  |  |  |
| Versuch 2 OD  | 1,32        | 1,22    | 1,26   | 1,37   | 1,36   | 1,32     | 1,30    | 1,28   | 1,28   | 1,25   |  |  |  |  |  |
| Versuch 2 [%] | 100,00      | 92,48   | 95,74  | 103,61 | 102,97 | 100,00   | 98,71   | 97,05  | 96,95  | 94,95  |  |  |  |  |  |
| Versuch 3 OD  | 1,32        | 1,36    | 1,40   | 1,33   | 1,37   | 1,32     | 1,24    | 1,35   | 1,33   | 1,27   |  |  |  |  |  |
| Versuch 3 [%] | 100,00      | 102,62  | 105,76 | 100,08 | 103,55 | 100,00   | 93,48   | 101,84 | 100,21 | 96,13  |  |  |  |  |  |
| MW OD         | 1,34        | 1,32    | 1,30   | 1,39   | 1,42   | 1,34     | 1,31    | 1,33   | 1,31   | 1,29   |  |  |  |  |  |
| MW [%]        | 100,00      | 98,68   | 96,94  | 103,84 | 106,13 | 100,00   | 97,50   | 99,46  | 98,17  | 96,50  |  |  |  |  |  |

**Tabelle 103: Rohdaten zu Abb. 59: 48 h Zytotoxizität der Catechinderivate in Hct116 Zellen.**

| Hct116        | Epigallocatechingallat |         |        |        |        | Epicatechingallat |         |        |        |        | Epigallocatechin |         |        |       |        |
|---------------|------------------------|---------|--------|--------|--------|-------------------|---------|--------|--------|--------|------------------|---------|--------|-------|--------|
|               | 0 µM                   | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM              | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM             | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM | 100 µM |
| Versuch 1 OD  | 1,74                   | 1,69    | 1,94   | 1,83   | 1,17   | 1,74              | 1,56    | 1,79   | 1,89   | 1,79   | 1,74             | 1,63    | 1,83   | 1,10  | 0,64   |
| Versuch 1 [%] | 100,00                 | 97,13   | 111,25 | 105,33 | 67,06  | 100,00            | 89,32   | 102,86 | 108,33 | 102,58 | 100,00           | 93,79   | 104,90 | 62,96 | 36,54  |
| Versuch 2 OD  | 1,32                   | 1,47    | 1,30   | 1,10   | 0,76   | 1,32              | 1,26    | 1,61   | 1,11   | 1,20   | 1,32             | 1,30    | 1,20   | 0,93  | 0,91   |
| Versuch 2 [%] | 100,00                 | 111,90  | 99,03  | 83,52  | 58,07  | 100,00            | 95,45   | 122,53 | 84,29  | 90,94  | 100,00           | 99,09   | 90,92  | 70,25 | 68,94  |
| Versuch 3 OD  | 2,00                   | 1,92    | 1,69   | 1,51   | 0,94   | 2,00              | 1,83    | 2,02   | 1,60   | 1,48   | 2,00             | 1,95    | 1,92   | 1,76  | 1,06   |
| Versuch 3 [%] | 100,00                 | 96,34   | 84,38  | 75,49  | 47,19  | 100,00            | 91,76   | 100,88 | 79,92  | 74,34  | 100,00           | 97,64   | 96,34  | 88,22 | 52,95  |
| MW OD         | 1,69                   | 1,70    | 1,64   | 1,48   | 0,96   | 1,69              | 1,55    | 1,81   | 1,53   | 1,49   | 1,69             | 1,63    | 1,65   | 1,26  | 0,87   |
| MW [%]        | 100,00                 | 101,79  | 98,22  | 88,11  | 57,44  | 100,00            | 92,18   | 108,76 | 90,84  | 89,28  | 100,00           | 96,84   | 97,39  | 73,81 | 52,81  |
|               |                        |         |        |        |        |                   |         |        |        |        |                  |         |        |       |        |
| Hct116        | Epicatechin            |         |        |        |        | Catechin          |         |        |        |        |                  |         |        |       |        |
|               | 0 µM                   | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM | 0 µM              | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |                  |         |        |       |        |
| Versuch 1 OD  | 1,74                   | 1,66    | 1,69   | 1,65   | 1,62   | 1,74              | 1,68    | 1,72   | 1,67   | 1,57   |                  |         |        |       |        |
| Versuch 1 [%] | 100,00                 | 95,34   | 97,18  | 94,56  | 92,93  | 100,00            | 96,53   | 98,79  | 96,05  | 90,10  |                  |         |        |       |        |
| Versuch 2 OD  | 1,32                   | 1,23    | 1,39   | 1,23   | 1,07   | 1,32              | 1,28    | 1,22   | 1,11   | 1,25   |                  |         |        |       |        |
| Versuch 2 [%] | 100,00                 | 93,51   | 105,79 | 93,76  | 81,35  | 100,00            | 97,13   | 92,27  | 84,09  | 94,69  |                  |         |        |       |        |
| Versuch 3 OD  | 2,00                   | 1,88    | 1,73   | 1,80   | 1,70   | 2,00              | 1,96    | 1,92   | 1,85   | 1,72   |                  |         |        |       |        |
| Versuch 3 [%] | 100,00                 | 93,87   | 86,73  | 89,90  | 85,31  | 100,00            | 98,25   | 95,99  | 92,81  | 86,28  |                  |         |        |       |        |
| MW OD         | 1,69                   | 1,59    | 1,61   | 1,56   | 1,46   | 1,69              | 1,64    | 1,62   | 1,54   | 1,51   |                  |         |        |       |        |
| MW [%]        | 100,00                 | 94,24   | 96,57  | 92,74  | 86,53  | 100,00            | 97,30   | 95,68  | 90,98  | 90,36  |                  |         |        |       |        |

**Tabelle 104: Rohdaten zu Abb. 60: Stabilität von Epigallocatechingallat in DMEM.**

| EGCG          | DMEM + 1 mM Ascorbinsäure |        |        |        |         | DMEM + 0,5 mM Ascorbinsäure |        |        |        |         | DMEM   |        |        |        |         |
|---------------|---------------------------|--------|--------|--------|---------|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|
|               | 0 min                     | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min | 0 min                       | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min | 0 min  | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Versuch 1 OD  | 0,86                      | 0,89   | 0,87   | 0,82   | 0,59    | 0,91                        | 0,88   | 0,75   | 0,64   | 0,19    | 0,81   | 0,33   | 0,28   | 0,15   | 0,04    |
| Versuch 1 [%] | 100,00                    | 103,66 | 100,56 | 94,57  | 68,32   | 100,00                      | 96,50  | 82,71  | 70,78  | 20,88   | 100,00 | 41,13  | 34,22  | 18,03  | 5,21    |
| Versuch 2 OD  | 0,92                      | 0,89   | 0,88   | 0,79   | 0,71    | 0,89                        | 0,88   | 0,83   | 0,73   | 0,43    | 0,72   | 0,29   | 0,26   | 0,13   | 0,06    |
| Versuch [%]   | 100,00                    | 96,69  | 95,46  | 85,20  | 77,11   | 100,00                      | 98,51  | 93,95  | 82,03  | 48,17   | 100,00 | 40,61  | 36,73  | 17,82  | 7,90    |
| Versuch 3 OD  | 0,92                      | 0,87   | 0,74   | 0,79   | 0,69    | 0,93                        | 0,82   | 0,78   | 0,66   | 0,20    | 0,78   | 0,31   | 0,21   | 0,13   | 0,05    |
| Versuch [%]   | 100,00                    | 94,50  | 80,74  | 85,98  | 75,31   | 100,00                      | 87,78  | 83,58  | 70,18  | 20,89   | 100,00 | 40,05  | 26,53  | 17,04  | 6,99    |
| MW OD         | 0,90                      | 0,89   | 0,83   | 0,80   | 0,67    | 0,91                        | 0,86   | 0,79   | 0,68   | 0,27    | 0,77   | 0,31   | 0,25   | 0,14   | 0,05    |
| MW [%]        | 100,00                    | 98,28  | 92,25  | 88,58  | 73,58   | 100,00                      | 94,26  | 86,75  | 74,33  | 29,98   | 100,00 | 40,60  | 32,49  | 17,63  | 6,70    |

**Tabelle 105: Rohdaten zur Ermittlung der Eichgeraden.** Die Eichreihen wurden mit den Werten von 12,5 µM bis 100 µM (ECG) bzw. 3,125 µM bis 100 µM (EGCG) berechnet. Die Konzentrationen von 1,625 µM bis 6,25 µM dienen der Ermittlung des Detektionslimits. Eichgerade EGCG:  $y=0,0219x-0,0557$ ;  $R^2 = 0,9988$ ; Eichgerade ECG:  $y=0,0328x-0,5555$ ;  $R^2 = 0,9971$ .

| EGCG                | 0    | 1,625 µM | 3,125 µM | 6,25 µM | 12,5 µM | 25 µM  | 50 µM  | 100 µM |
|---------------------|------|----------|----------|---------|---------|--------|--------|--------|
| ng / Injektion      | 0,00 | 14,31    | 28,63    | 57,25   | 114,50  | 229,00 | 458,00 | 916,00 |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0,00 |          |          |         | 2,82    | 5,15   | 10,82  | 22,26  |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0,00 |          |          |         | 2,61    | 4,89   | 10,16  | 19,81  |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0,00 |          |          |         | 2,70    | 1,88   | 11,00  | 22,03  |
| Versuch 4 [mAU*min] | 0,00 |          |          |         | 1,77    | 3,86   | 7,46   | 15,04  |
| Versuch 5 [mAU*min] | 0,00 |          | 0,90     | 1,15    | 2,68    | 5,22   | 11,14  | 21,31  |
| Versuch 6 [mAU*min] | 0,00 | 0,36     | 0,60     | 1,26    | 2,47    | 5,46   | 10,59  | 19,38  |
| MW [mAU*min]        | 0,00 | 0,36     | 0,75     | 1,20    | 2,51    | 4,41   | 10,19  | 19,97  |
|                     |      |          |          |         |         |        |        |        |
| ECG                 | 0    | 3,125 µM | 6,25 µM  | 12,5 µM | 25 µM   | 50 µM  | 100 µM |        |
| ng / Injektion      | 0,0  | 27,7     | 55,3     | 110,6   | 221,3   | 442,5  | 885,0  |        |
| Versuch 1 [mAU*min] | 0,0  | 0,9      | 1,1      | 2,7     | 5,5     | 11,2   | 26,6   |        |
| Versuch 2 [mAU*min] | 0,0  | 0,3      | 0,6      | 1,7     | 5,2     | 10,6   | n.d.   |        |
| Versuch 3 [mAU*min] | 0,0  | 0,7      | 1,5      | 4,8     | 9,0     | 16,8   | 31,5   |        |
| MW [mAU*min]        | 0,0  | 0,6      | 1,1      | 3,1     | 6,5     | 12,9   | 29,0   |        |

**Tabelle 106: Rohdaten zu Abb. 61: Intrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen - Epicatechingallat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HCT116 ECG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Protein | ng EGCG/µg Protein |
|------------|----------|--------------|-------------|---------|--------------------|
| Versuch 1  | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]    |                    |
| 0 h        | 0,00     | 16,94        | 254,04      | 3547,90 | 0,07               |
| 1/4 h      | 0,51     | 32,48        | 487,27      | 3459,60 | 0,14               |
| 1 h        | 2,75     | 100,78       | 1511,66     | 4395,58 | 0,34               |
| 2 h        | 3,94     | 137,06       | 2055,87     | 3272,41 | 0,63               |
| 4 h        | 6,39     | 211,75       | 3176,30     | 4642,83 | 0,68               |
| 6 h        | 8,70     | 282,18       | 4232,70     | 2717,88 | 1,56               |
| Versuch 2  |          |              |             |         |                    |
| 0 h        | 0,00     | 16,94        | 254,04      | 2436,26 | 0,10               |
| 1/4 h      | 0,00     | 16,94        | 254,04      | 2901,12 | 0,09               |
| 1 h        | 1,25     | 55,05        | 825,69      | 2646,08 | 0,31               |
| 2 h        | 1,59     | 65,41        | 981,17      | 2905,86 | 0,34               |
| 4 h        | 3,77     | 131,88       | 1978,13     | 2944,49 | 0,67               |
| 6 h        | 3,84     | 134,01       | 2010,14     | 2626,14 | 0,77               |
| Versuch 3  |          |              |             |         |                    |
| 0 h        | 0,00     | 16,94        | 254,04      | 2953,45 | 0,09               |
| 1/4 h      | 0,72     | 39,01        | 585,14      | 3170,30 | 0,18               |
| 1 h        | 3,93     | 136,88       | 2053,13     | 3269,82 | 0,63               |
| 2 h        | 6,74     | 222,27       | 3334,07     | 3139,28 | 1,06               |
| 4 h        | 9,30     | 300,53       | 4508,00     | 3191,03 | 1,41               |
| 6 h        | 9,14     | 295,59       | 4433,92     | 3380,79 | 1,31               |

**Tabelle 107: Rohdaten zu Abb. 61: Intrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen - Epigallocatechingallat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein. n.d.: nicht detektiert

| Hct116 EGCG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein | ng EGCG/µg Protein |
|-------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|--------------------|
| Versuch 1   | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |                    |
| 0 h         |          |              |             |             | 2417,69 |                    |
| 1/4 h       | n.d.     | 0,00         | 2,54        | 38,15       | 2402,92 | 0,02               |
| 1 h         | 15,49    | 1,61         | 76,15       | 1142,26     | 2420,25 | 0,47               |
| 2 h         | 15,51    | 2,57         | 120,08      | 1801,16     | 2693,80 | 0,67               |
| 4 h         | 15,52    | 3,41         | 158,43      | 2376,51     | 2446,49 | 0,97               |
| 6 h         | 15,51    | 4,06         | 187,89      | 2818,29     | 2614,97 | 1,08               |
| Versuch 2   |          |              |             |             |         |                    |
| 0 h         |          |              |             |             | 2935,24 |                    |
| 1/4 h       | n.d.     | 0,00         | 2,54        | 38,15       | 2848,83 | 0,01               |
| 1 h         | 15,46    | 1,17         | 56,11       | 841,58      | 3102,76 | 0,27               |
| 2 h         | 15,52    | 3,05         | 142,00      | 2129,93     | 2695,21 | 0,79               |
| 4 h         | 15,51    | 4,45         | 205,92      | 3088,84     | 3202,89 | 0,96               |
| 6 h         | 15,47    | 4,48         | 206,88      | 3103,22     | 2566,50 | 1,21               |
| Versuch 3   |          |              |             |             |         |                    |
| 0 h         | n.d.     |              |             |             | 2577,06 |                    |
| 1/4 h       | n.d.     | 0,00         | 2,54        | 38,15       | 2759,33 | 0,01               |
| 1 h         | 15,51    | 1,39         | 66,01       | 990,21      | 2706,54 | 0,37               |
| 2 h         | 15,50    | 2,37         | 110,53      | 1658,01     | 2807,11 | 0,59               |
| 4 h         | 15,51    | 3,36         | 155,74      | 2336,10     | 2671,96 | 0,87               |
| 6 h         | 15,51    | 3,59         | 166,29      | 2494,32     | 2662,27 | 0,94               |

**Tabelle 108: Rohdaten zu Abb. 62: Extrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen - Epicatechingallat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein.

| Hct116 ECG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1  | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h        | 37,15    | 1149,54      | 189674,54   | 189,67      | 3547,90 |
| 1/4 h      | 32,56    | 1009,60      | 166584,60   | 166,58      | 3459,60 |
| 1 h        | 36,83    | 1139,79      | 188064,79   | 188,06      | 4395,58 |
| 2 h        | 27,62    | 858,99       | 141733,99   | 141,73      | 3272,41 |
| 4 h        | 30,15    | 936,13       | 154461,13   | 154,46      | 4642,83 |
| 6 h        | 31,77    | 985,52       | 162610,52   | 162,61      | 2717,88 |
| Versuch 2  |          |              |             |             |         |
| 0 h        | 22,39    | 699,54       | 115424,54   | 115,42      | 2436,26 |
| 1/4 h      | 16,21    | 511,13       | 84336,13    | 84,34       | 2901,12 |
| 1 h        | 19,78    | 619,97       | 102294,97   | 102,29      | 2646,08 |
| 2 h        | 18,05    | 567,23       | 93592,23    | 93,59       | 2905,86 |
| 4 h        | 15,45    | 487,96       | 80512,96    | 80,51       | 2944,49 |
| 6 h        | 11,67    | 372,71       | 61497,71    | 61,50       | 2626,14 |
| Versuch 3  |          |              |             |             |         |
| 0 h        | 22,70    | 708,99       | 116983,99   | 116,98      | 2953,45 |
| 1/4 h      | 20,00    | 626,68       | 103401,68   | 103,40      | 3170,30 |
| 1 h        | 16,69    | 525,76       | 86750,76    | 86,75       | 3269,82 |
| 2 h        | 20,54    | 643,14       | 106118,14   | 106,12      | 3139,28 |
| 4 h        | 17,24    | 542,53       | 89517,53    | 89,52       | 3191,03 |
| 6 h        | 18,81    | 590,40       | 97415,40    | 97,42       | 3380,79 |

**Tabelle 109: Rohdaten zu Abb. 62: Extrazelluläre Menge an EGCG und ECG in Hct116 Zellen - Epigallocatechingallat.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein. n.e.: Datenpunkt nicht erhoben, n.d. nicht detektiert.

| Hct116 EGCG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|-------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1   | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h         | n.d.     |              |             |             | 2417,69 |
| 1/4 h       | n.d.     |              |             |             | 2402,92 |
| 1 h         | 16,90    | 774,05       | 127718,29   | 127,72      | 2420,25 |
| 2 h         | 15,52    | 711,40       | 117381,30   | 117,38      | 2693,80 |
| 4 h         | 16,80    | 769,58       | 126979,93   | 126,98      | 2446,49 |
| 6 h         | 14,97    | 685,97       | 113184,73   | 113,18      | 2614,97 |
| Versuch 2   |          |              |             |             |         |
| 0 h         | 18,80    | 860,85       | 142040,89   | 142,04      | 2935,24 |
| 1/4 h       | 12,57    | 576,65       | 95147,74    | 95,15       | 2848,83 |
| 1 h         | 13,02    | 597,06       | 98515,55    | 98,52       | 3102,76 |
| 2 h         | 11,58    | 531,17       | 87643,63    | 87,64       | 2695,21 |
| 4 h         | 10,95    | 502,50       | 82912,12    | 82,91       | 3202,89 |
| 6 h         | 10,18    | 467,25       | 77095,68    | 77,10       | 2566,50 |
| Versuch 3   |          |              |             |             |         |
| 0 h         | 19,14    | 876,33       | 144595,00   | 144,60      | 2577,06 |
| 1/4 h       | 18,94    | 867,43       | 143125,82   | 143,13      | 2759,33 |
| 1 h         | 17,81    | 815,97       | 134634,73   | 134,63      | 2706,54 |
| 2 h         | n.e      | 2,54         | 419,66      | 0,42        | 2807,11 |
| 4 h         | 13,49    | 618,62       | 102071,71   | 102,07      | 2671,96 |
| 6 h         | n.e      | 2,54         | 419,66      | 0,42        | 2662,27 |

**Tabelle 110: Rohdaten zu Abb. 63: Intrazelluläre Menge an EGCG in HepG2 Zellen.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid, die Menge an Protein und der Quotient aus ng Flavonoid und µg Protein.

| HepG2 EGCG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Protein | ng EGCG/µg Protein |
|------------|----------|--------------|-------------|---------|--------------------|
| Versuch 1  | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]    |                    |
| 0 h        |          |              |             | 1874,80 |                    |
| 1/4 h      |          |              |             | 2116,80 |                    |
| 1 h        | 0,10     | 7,20         | 108,01      | 2211,38 | 0,05               |
| 2 h        | 0,52     | 26,42        | 396,37      | 2405,02 | 0,16               |
| 4 h        | 0,78     | 38,11        | 571,71      | 2218,17 | 0,26               |
| 6 h        | 0,94     | 45,47        | 681,99      | 1866,42 | 0,37               |
| Versuch 2  |          |              |             |         |                    |
| 0 h        | 0,02     | 3,41         | 51,16       | 3332,19 | 0,02               |
| 1/4 h      | 0,03     | 3,68         | 55,27       | 3120,41 | 0,02               |
| 1 h        | 0,51     | 25,83        | 387,47      | 3728,32 | 0,10               |
| 2 h        | 0,85     | 41,54        | 623,08      | 4099,50 | 0,15               |
| 4 h        | 1,16     | 55,60        | 834,04      | 3573,82 | 0,23               |
| 6 h        | 1,17     | 55,97        | 839,52      | 2898,89 | 0,29               |
| Versuch 3  |          |              |             |         |                    |
| 0 h        | 0,16     | 9,62         | 144,32      | 3541,47 | 0,04               |
| 1/4 h      | 0,15     | 9,16         | 137,47      | 4132,36 | 0,03               |
| 1 h        | 0,49     | 25,01        | 375,14      | 5243,55 | 0,07               |
| 2 h        | 1,15     | 54,96        | 824,45      | 4410,16 | 0,19               |
| 4 h        | 1,79     | 84,32        | 1264,86     | 3437,94 | 0,37               |
| 6 h        | 2,44     | 114,10       | 1711,44     | 3862,83 | 0,44               |

**Tabelle 111: Rohdaten zu Tab. 18: Extrazellulär detektiertes EGCG der HepG2-Inkubationen.** Dargestellt sind die ermittelten Peakflächen, die berechnete Menge an Flavonoid und die Menge an Protein. n.e.: Datenpunkt nicht erhoben. Bei Versuch 1 bei dem 2 h und dem 6 h Wert einen Teil der Probe verloren.

| HepG2 EGCG | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Gesamtmenge | Protein |
|------------|----------|--------------|-------------|-------------|---------|
| Versuch 1  | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]        | [µg]    |
| 0 h        | 22,96    | 1050,99      | 315297,26   | 315,30      | 1874,80 |
| 1/4 h      | 20,74    | 949,76       | 284927,40   | 284,93      | 2116,80 |
| 1 h        | 22,69    | 1038,43      | 311530,14   | 311,53      | 2211,38 |
| 2 h        | 6,89     | 317,06       | 95119,18    | 95,12       | 2405,02 |
| 4 h        | 23,90    | 1093,78      | 328132,88   | 328,13      | 2218,17 |
| 6 h        | 4,89     | 226,01       | 67804,11    | 67,80       | 1866,42 |
| Versuch 2  |          |              |             |             |         |
| 0 h        | 22,31    | 1021,13      | 306338,36   | 306,34      | 3332,19 |
| 1/4 h      | n.e.     |              |             |             | 3120,41 |
| 1 h        | 20,76    | 950,35       | 285105,48   | 285,11      | 3728,32 |
| 2 h        | 19,58    | 896,65       | 268995,89   | 269,00      | 4099,50 |
| 4 h        | n.e.     |              |             |             | 3573,82 |
| 6 h        | n.e.     |              |             |             | 2898,89 |
| Versuch 3  |          |              |             |             |         |
| 0 h        | 43,33    | 1981,22      | 594365,75   | 594,37      | 3541,47 |
| 1/4 h      | 38,68    | 1768,71      | 530612,33   | 530,61      | 4132,36 |
| 1 h        | 37,59    | 1719,03      | 515708,22   | 515,71      | 5243,55 |
| 2 h        | 34,71    | 1587,66      | 476297,26   | 476,30      | 4410,16 |
| 4 h        | 32,43    | 1483,37      | 445009,59   | 445,01      | 3437,94 |
| 6 h        | 19,35    | 885,88       | 265763,01   | 265,76      | 3862,83 |

**Tabelle 112: Rohdaten zu Tab. 19: Intrazelluläre Mengen an EGCG nach 4 h Inkubation bei 4°C und 37°C ohne HCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>-Puffer.**

| Hct116    | Area     | ng/Injektion | Gesamtmenge | Protein | ng EGCG/µg Protein |
|-----------|----------|--------------|-------------|---------|--------------------|
| Versuch 1 | [mV*min] |              | [ng]        | [µg]    |                    |
| 6 h       | 0,00     | 2,63         | 39,52       | 3018,10 | 0,01               |
| 6 h 37 °C | 1,68     | 79,26        | 1188,84     | 2541,28 | 0,47               |
| Versuch 2 |          |              |             |         |                    |
| 6 h       | n.d.     |              |             | 2599,48 |                    |
| 6 h 37 °C | 1,35     | 64,19        | 962,81      | 3225,97 | 0,30               |
| Versuch 3 |          |              |             |         |                    |
| 6 h       | n.d.     |              |             | 3194,18 |                    |
| 6 h 37 °C | 2,33     | 108,98       | 1634,73     | 3478,20 | 0,47               |

**Tabelle 113: Organgewichte der einzelnen Tiere.** Dargestellt sind die ermittelten Organgewicht in Gramm. Der Magen und der Darminhalt der Kontrollen 1 und 2 sind vor der Gewichtsermittlung nicht mit PBS gespült worden. ---: Blut nicht entnommen, da Tiere tot aufgefunden, n.d.: nicht detektiert, da Gehirn nicht entnommen.

|        | K 1  | K 2  | K 3  | E 2 | E 3  | E 4  | E 5  |
|--------|------|------|------|-----|------|------|------|
| Blut   | 2,4  | 2,5  | 5,4  | --- | 3,3  | ---  | 7,6  |
| Darm   | 17,4 | 18,4 | 6,3  | 6,5 | 6,5  | 6,6  | 6,7  |
| Magen  | 5,5  | 3,0  | 1,8  | 2,0 | 2,8  | 0,8  | 1,7  |
| Gehirn | 1,5  | 1,4  | 2,0  | 1,8 | 2,0  | n.d. | 2,0  |
| Leber  | 12,3 | 12,4 | 13,9 | 8,0 | 12,0 | 12,2 | 11,2 |
| Niere  | 2,0  | 2,0  | 2,5  | 2,5 | 1,9  | 2,4  | 2,0  |
| Lunge  | 1,4  | 1,5  | 1,8  | 2,1 | 1,8  | 1,9  | 1,4  |
| Herz   | 1,1  | 1,0  | 0,9  | 1,1 | 0,9  | 0,9  | 0,8  |
| Uterus | 2,9  | 2,6  | 3,5  | 1,1 | 4,1  | 4,8  | 3,1  |

**Tabelle 114: Gewichtsentwicklung der Tiere.** Aufgeführt sind die ermittelten Gewichte der Tiere in Gramm. Die Gewichte der Kontrolltiere 1 und 2 stehen nicht mehr zur Verfügung. Am Gestationstag 22 warfen Kontrolltier 1 bzw. 2 13 bzw. 14 Jungtiere \*: Tag der Geburt, †: Tier tot aufgefunden, #: Tier 1 h nach Behandlung getötet, -: Tier bei CO<sub>2</sub>-Narkose verstorben. Weitere Erklärungen siehe Text 4.12.

|        | K 3     | E1    | E2    | E3       | E 4     | E 5    | Bemerkung            |
|--------|---------|-------|-------|----------|---------|--------|----------------------|
| Tag 1  | 240 g   | 220 g | 270g  | 240 g    | 250 g   | 230 g  |                      |
| Tag 5  | 274 g   | 273 g | 305 g | 273 g    | 282 g   | 260 g  |                      |
| Tag 8  | 286 g   | 295 g | 315 g | 273 g    | 292 g   | 269 g  |                      |
| Tag 12 | 307 g   | 312 g | 340 g | 300 g    | 292 g   | 292 g  |                      |
| Tag 13 | 317 g   | 315 g | 342 g | 308 g    | 288 g   | 298 g  | Start der Behandlung |
| Tag 14 | 313 g   | †     | n.d.  | 309 g    | 281 g   | 297 g  |                      |
| Tag 15 | 331 g   |       | 317 g | 308 g    | 175 g   | 285 g  |                      |
| Tag 16 | 339 g   |       | 317 g | 288 g    | 258 g   | 281 g  | Gabe von BrDU        |
| Tag 17 | 343 g   |       | †     | 301 g    | 243 g # | 297 g  |                      |
| Tag 18 | 364 g   |       |       | 318 g    |         | 312 g  |                      |
| Tag 19 | 382 g   |       |       | 338 g    |         | 329 g  |                      |
| Tag 20 | 391 g   |       |       | 333 g    |         | 348 g  |                      |
| Tag 21 | 409 g   |       |       | 349 g    |         | 362 g  |                      |
| Tag 22 | 316 g * |       |       | 328 g    |         | 285g * |                      |
| Tag 23 | 303 g   |       |       | 239 g *- |         | 164 g  |                      |

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P. und Wätjen, W. (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 314-32

Wätjen, W., Kulawik, A., Suckow-Schnitker, A. K., Rohrig, R., Ruhl, S., Chovolou, C., Kampkötter, A., Addae-Kyereme, J., Wright, C. W. und Passreiter, C. M. (2007) Pterocarpans phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Toxicology* 242, 71-79

### Poster

Kaushik N, Kathuria V, Ruhl S., Edrada-Ebel R, Proksch P. (2007) Screening of phytochemical diversity and bioactivity of *Tylophora indica*. *50th Anniversary Meeting of the Phytochemical Society of Europe: highlights in the evolution of phytochemistry* (11.04.–14.04. 2007 Churchill College, Cambridge, UK)

Ruhl S., Rohrig R., Bothe H., Chovolou Y., Kampkötter A., Abel J., Proksch P., Wätjen W. Investigations on enhanced toxicity of methylated quercetin derivatives. *46<sup>th</sup> congress of the European Societies Of Toxicology* (13.09.-16.09.2009, International Congress Center, Dresden)

W. Wätjen, S. Ruhl, R. Rohrig, R. Schmitz, A. Bergermann, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch, R. Kahl. Marine natural compounds modulate intracellular signalling pathways, apoptosis and oxidative stress in mamalian cells. *46<sup>th</sup> congress of the European Societies Of Toxicology* (13.09.-16.09.2009, International Congress Center, Dresden)

Ruhl S., Wang Y., Wang Z., Rohrig R., Kulawik A., Prpksch P., Lou Y., Wätjen W., Pharmacological activity of phenolic compound isolated from *Psoralea corylifolia*. *48. Frühjahrstagung der DGPT* (13.03.-15.03.2007, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Wätjen, W., Rohrig, R., Kulawik, A., Ruhl, S., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Suckow-Schnitker, A. K., Passreiter, C. und Kahl, R. Proapoptotic compounds isolated from *Erythrina addisoniae*. *48. Frühjahrstagung der DGPT* (13.03.-15.03.2007, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Ruhl S., Rohrig R., Ohler S., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Proksch P. und Wätjen W. Effekte von Flavonoiden in Hct116-Zellen: Untersuchungen zur zellulären Aufnahme, antioxidativen Kapazität und Toxizität. *49. Frühjahrstagung der DGPT* (11.03.-13.03.2008, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Wätjen W., Suckow-Schnitker A.K., Kulawik A., Rohrig R., Ruhl S., Chovolou Y., Kampkötter A. und Passreiter C. Proapoptotische Substanzen aus *Erythrina addisoniae*. *49. Frühjahrstagung der DGPT* (11.03.-13.03.2008, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Ruhl S., Rohrig R., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Proksch P. und Wätjen W. Methylierung von Quercetin erhöht dessen Toxizität in HepG2-Zellen. *50. Frühjahrstagung der DGPT* (10.03.-12.03.2009, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Ruhl, Rohrig, Ohler, Kahl, Proksch, Wätjen. Effects of dietary flavonoids in Hct116 cells: Investigation on cellular uptake, antioxidant capacity and toxicity. *1<sup>st</sup> international Symposium Graduate College 1427* (04.10.-05.10.2007, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Ruhl, Rohrig, Ohler, Kahl, Proksch, Wätjen. Effects of dietary flavonoids in Hct116 cells: Investigation on cellular uptake, antioxidant capacity and toxicity. *2<sup>nd</sup> international Symposium Graduate College 1427* (03.04.-04.04.2008, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Ruhl S., Rohrig R., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Proksch P., Wätjen W. Investigation on enhanced toxicity of methylated quercetin derivatives in HepG2 cells. *3<sup>rd</sup> international Symposium Graduate College 1427* (05.03.-06.03.2009, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

## Lebenslauf

Dipl. Biol. Sven Ruhl  
Artusstrasse 54  
40470 Düsseldorf  
sven.ruhl@uni-duesseldorf.de

Geboren am: 16.06.1980 in Langenfeld (Rhld.)

## Studium

|             |                                                                                            |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit 11/06  | <b>Promotion</b> an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf                             |
| 2001 – 2006 | Studium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.<br>Abschluss: <b>Diplom Biologe</b> |

## Wehrdienst

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| 2000 - 2001 | Wehrdienst im Jagdbombergeschwader 33, Cochem / Büchel |
|-------------|--------------------------------------------------------|

## Berufsausbildung

|             |                                                                                                                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1996 - 2000 | Ausbildung am Städtischen Lessing-Berufskolleg, Düsseldorf. Abschluss:<br><b>Technischer Assistent für Biologie</b> staatlich geprüft, mit Europadiplom. |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Schulbildung

|             |                                                                             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1996 - 1999 | Städtisches Lessing-Gymnasium, Düsseldorf; <b>allgemeine Hochschulreife</b> |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|

Düsseldorf, den

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinen beiden Doktorvätern bedanken. Bei Herrn Prof. Peter Proksch besonders für die Möglichkeit nach der Diplomarbeit auch die Dissertation im Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus für das Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung bei analytischen Fragestellungen.

Bei Herrn PD Dr. Wim Wätjen bedanke ich mich ebenfalls für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Toxikologie fertigen zu dürfen, sowie mir die Teilnahme an der Fortbildung zum Fachtoxikologen - DGPT ermöglicht zu haben. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich für die nicht nur fachliche, sondern auch menschliche Führung durch die Arbeit, und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ein großer Dank geht ebenfalls an die Mitarbeiter und Kollegen beider Institute, welche mich jederzeit unterstützt und den Laboralltag auf sympathische Weise verkürzt haben.

- Den Privatdozenten und Postdocs beider Institute, namentlich Dr. Yvonne Chovolou, Dr. Andreas Kampkötter, Dr. Claudia Timpel und Dr. Jandirk Sendker, danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die unbürokratischen Kooperationen. Frau Dr. Chovolou insbesondere für die Messung der ~~NB~~ -abhängigen SEAP-Aktivität und Herr Dr. Kampkötter für die zur Verfügung gestellten Bilder der Flavonoidaufnahme in *C. elegans*.
- Ein besonderer Dank geht an die Sekretärinnen beider Institute: Mareike Thiel, Claudia Eckelskemper und Martina Bennat. Vielen Dank für eure Unterstützung und euren persönlichen Einsatz bei allen Fragestellungen und Problemen.
- Den Assistenten beider Institute besonders Sandra Ohler und Kerstin Wolters möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Hilfestellungen bei den Tücken des Laboralltags danken. Hermine Kannengießer und Ingrid Köhler außerdem für die Messung der SEAP-Aktivität bzw. des DCF-Assays.
- Den beiden anderen Doktoranden des Instituts für Toxikologie, Regine Lüpertz und Ricarda Rohrig, danke ich für die offenen Ohren wenn molekularbiologische Probleme zu klären waren, oder ich über die Ungerechtigkeit des Sports philosophieren musste. Außerdem für die schöne Zeit während der Kongress- und Fortbildungsreisen.
- Den Praktikanten danke ich für die vielen Stunden an denen sie antioxidative Potentiale der verschiedensten Verbindungen gemessen haben.

Abschließend danke ich meiner Familie dafür das sie da ist und mich unterstützt. Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung vom ersten bis zum heutigen Tag. Der größte Dank allerdings gebührt meiner Frau: „Es gibt keine zweite wie Dich“. Danke für Deine Liebe und die Unterstützung über all die Jahre.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Düsseldorf, den