



**Vergleichende Untersuchungen von sekundären  
Pflanzeninhaltsstoffen: Zelluläre Effekte von  
Hydroxycimtsäuren, Flavonoiden und  
Isothiocyanaten**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Daniela Ackermann**

aus Homberg (Efze)

Düsseldorf, Dezember 2012

aus dem Institut für Toxikologie und  
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. W. Wätjen

Korreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Januar 2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	7
1.1.1 Polyphenole	7
1.1.1.1 Phenolsäuren	7
1.1.1.2 Flavonoide	8
1.1.2 Glucosinolate	9
1.2 Aufnahme und Metabolismus von Polyphenolen	11
1.2.1 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen	11
1.2.2 Absorption von Phenolsäuren und Flavonoiden	12
1.2.3 Metabolisierung von Polyphenolen und ITC	14
1.3 Pharmakologische Effekte von Polyphenolen und ITC	18
1.4 Sicherheit von Polyphenolen	19
1.5 Polyphenole und Isothiocyanate als Nahrungsergänzungsmittel	20
1.6 Polyphenole und Isothiocyanate als Antioxidantien	21
1.7 Oxidativer Stress	23
1.8 Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose	25
1.8.1 Induktion von Nekrose	25
1.8.2 Induktion von Apoptose	26
1.9 Zellzyklus	28
1.10 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
1.11 Verwendete Substanzen	30
1.12 Zielsetzung	34
<b>2. Material</b>	<b>35</b>
2.1 Zelllinien	35
2.2 Zellkulturmedien	35
2.3 Lösungen und Puffer	35
2.4 Chemikalien und Kits	36
2.5 Geräte	38
2.6 Computersoftware	39
2.7 Sonstige Materialien	39
<b>3. Methoden</b>	<b>40</b>
3.1 Kultivierung der Zellen	40
3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	40
3.3 Inkubation und Schädigung der Zellen	40
3.4 Antioxidatives Potential (TEAC Assay)	41
3.5 Anti- und prooxidatives Potential (DCF Assay)	41
3.6 Zytotoxizitäts-Assay (MTT Assay)	42
3.7 Ermittlung der Art des Zelltodes (Apoptose vs. Nekrose)	43

3.7.1	Induktion von Nekrose (LDH Assay)	43
3.7.2	Induktion von Apoptose und Nekrose (Annexin-V/PI Staining)	44
3.7.3	Induktion von Apoptose und Nekrose (Acridinorange/Ethidiumbromid Färbung)	44
3.7.4	Induktion von Apoptose (Caspase und Apo One Assay)	45
3.7.5	Induktion von Apoptose (DNA-Fragmentationsanalyse)	46
3.8	DNA-Strangbrüche (Comet Assay)	47
3.9	Zellzyklusanalyse [mit subG <sub>1</sub> Messung]	48
3.10	Aufnahmestudien	49
3.10.1	Detektion der Hydroxymethylsäurederivate und Flavonoide mittels HPLC	49
3.10.2	Detektion der Metabolite mittels HPLC-ESI-MS	50
3.10.3	Kulturbedingungen der Aufnahmestudien	51
3.10.4	Aufarbeitung der Zellen	51
3.10.5	Aufarbeitung der Überstände	52
3.10.6	Transwell Versuche	52
3.10.7	Färbung mit Naturstoffreagenz A	54
3.10.7.1	Fluoreszenzspektren-Analyse der „Flavonoid-NSRA-Komplexe“	55
3.10.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Betrachtungen	55
3.10.7.3	Messung der Flavonoid-NSRA-Fluoreszenz im Durchflusszytometer	55
3.11	ABC Transporter Assay	56
3.12	Proteinbestimmung nach Lowry	57
3.13	Proteinbestimmung nach Bradford	57
3.14	SEAP Assay	57
3.15	<i>Caenorhabditis elegans</i>	58
3.15.1	Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	58
3.15.2	Semisynchronisation von <i>C. elegans</i>	59
3.15.3	Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der intrazellulären Flavonoide mittels NSRA Färbung	59
3.15.4	Messung der intrazellulären ROS Akkumulation in <i>C. elegans</i> (DCF Assay)	59
3.16	Statistische Auswertung	60
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
4.1	Zelluläre Effekte von Quercetin- und Myricetin-Derivaten	61
4.1.1	Antioxidative Eigenschaften von Quercetin- und Myricetin-Derivaten	61
4.1.1.1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels TEAC Assay	61
4.1.1.2	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels DCF Assay im Durchflusszytometer	63
4.1.2	Zytotoxische Effekte von Quercetin- und Myricetin-Derivaten	65
4.1.2.1	Zytotoxische Effekte von Quercetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien	66
4.1.2.2	Zytotoxische Effekte von Myricetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien	68
4.1.3	Aufnahme und Metabolismus von Quercetin- und Myricetin-Derivaten	72
4.1.3.1	Intrazelluläre Detektion und Metabolisierung von Quercetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien mittels HPLC	72

4.1.3.2	Intrazelluläre Detektion und Metabolisierung von Myricetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien mittels HPLC	80
4.1.3.3	Permeationsstudien von Myricetin-Derivaten im Transwell-System	98
4.1.3.4	Intrazelluläre Detektion von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels NSRA-Komplexierung	100
4.1.3.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Quercetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung	100
4.1.3.4.2	Detektion der zellulären Aufnahme von Quercetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer	101
4.1.3.4.3	Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Myricetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung	107
4.1.3.4.4	Detektion der zellulären Aufnahme von Myricetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer	108
4.1.3.5	Interaktion von Myricetin-Derivaten mit ABC Transportern	113
4.1.4	Aufnahme von Myricetin-Derivaten in <i>C. elegans</i>	115
4.1.5	Einfluss von Myricetin-Derivaten auf die Hitze-induzierte ROS-Akkumulation in <i>C. elegans</i>	117
4.2	Zelluläre Effekte strukturverwandter Flavonoide	118
4.2.1	Antioxidative Eigenschaften strukturverwandter Flavonoide	118
4.2.1.1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von strukturverwandten Flavonoiden mittels TEAC Assay	118
4.2.1.2	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von strukturverwandten Flavonoiden mittels DCF Assay	119
4.2.2	Zytotoxische Effekte von strukturverwandten Flavonoiden in verschiedenen Zelllinien	120
4.2.3	Zelluläre Aufnahme von strukturverwandten Flavonoiden	121
4.2.4	Detektion von strukturverwandten Flavonoiden nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer	124
4.3	Zelluläre Effekte von Hydroxyzimtsäurederivaten	126
4.3.1	Antioxidative Eigenschaften von Hydroxyzimtsäurederivaten	126
4.3.1.1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Hydroxyzimtsäurederivaten mittels TEAC Assay	126
4.3.1.2	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Hydroxyzimtsäurederivaten mittels DCF Assay	127
4.3.2	Zytotoxische Effekte von Hydroxyzimtsäurederivaten in verschiedenen Zelllinien	128
4.3.3	Zelluläre Aufnahme von Hydroxyzimtsäurederivaten	130
4.4	Zelluläre Effekte strukturverwandter Isothiocyanate	133
4.4.1	Antioxidative Eigenschaften von Isothiocyanaten	133
4.4.1.1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Isothiocyanaten mittels TEAC Assay	133
4.4.1.2	Bestimmung der prooxidativen Eigenschaften von Isothiocyanaten mittels DCF Assay	134
4.4.1.3	Bestimmung der prooxidativen Eigenschaften von Isothiocyanaten in <i>C. elegans</i>	138
4.4.2	Zytotoxische Effekte von Isothiocyanaten	139
4.4.3	Ermittlung der durch Isothiocyanate ausgelösten Art des Zelltodes	142

4.4.3.1	Induktion von Nekrose – Nachweis via LDH-Aktivität	142
4.4.3.2	Induktion von Apoptose und Nekrose – Nachweis via Annexin-V/PI Staining	144
4.4.3.3	Induktion von Apoptose und Nekrose – Nachweis via Acridinorange/ Ethidiumbromid Färbung	146
4.4.3.4	Induktion von Apoptose– Nachweis via DNA-Fragmentationsanalyse	146
4.4.3.5	Induktion von Apoptose durch Aktivierung von Caspasen	147
4.4.4	Einfluss von Isothiocyanaten auf die Phasen des Zellzyklus	153
4.4.6	Modulation des Transkriptionsfaktors NFκB durch Isothiocyanate	158
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>161</b>
5.1	Antioxidative Kapazität verschiedener Hydroxymethylsäurederivate und Flavonoide	161
5.2	Zytotoxisches Potential verschiedener Hydroxymethylsäurederivate und Flavonoide	167
5.3	Aufnahme und Metabolismus verschiedener Hydroxymethylsäurederivate und Flavonoide	171
5.4	Zelluläre Effekte strukturverwandter Isothiocyanate	187
5.4.1	Anti-und prooxidative Eigenschaften der Isothiocyanate	187
5.4.2	Zytotoxische Eigenschaften der Isothiocyanate	190
5.4.3	Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes	192
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	<b>199</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>201</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>219</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>220</b>
	Tabellen der Originaldaten	220
	Veröffentlichungen	275
	Lebenslauf	276
	Danksagung	277
	Eidesstattliche Erklärung	278

## **1. Einleitung**

### **1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe**

Neben den primären Pflanzeninhaltsstoffen, zu denen die Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zählen, gibt es eine große Gruppe an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Diese werden im primären Stoffwechselweg der Pflanzen weder synthetisiert noch metabolisiert und sind chemisch höchst heterogen. Sie sind weder für die Pflanze noch für die menschliche Ernährung essentiell, haben im Pflanzenreich jedoch vielfältige Funktionen wie beispielsweise als Geruchs- und Abwehrstoffe sowie als Farbstoffe für Blüten und Früchte. Mehr als 200000 verschiedene Strukturen existieren in der Natur, von denen wiederum etwa 5000 bis 10000 Verbindungen in der menschlichen Ernährung vorkommen. Die Gehalte an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen sind von vielen Faktoren abhängig, unter anderem von der Sorte (Genotyp), verschiedenen Umwelteinflüssen wie Sonneneinstrahlung und Regen sowie von der Zusammensetzung des Bodens (Miglio et al. 2008; Napolitano et al. 2004). Des Weiteren spielen die Jahreszeit, der Reifegrad, die Wachstums-, Ernte- und Lagerbedingungen, der verwendete Pflanzenteil und dessen anschließende Verarbeitung eine Rolle (Miglio et al. 2008; Napolitano et al. 2004).

Die vier bedeutendsten Klassen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind Terpenoide, Phenole und Polyphenole, Alkaloide und Schwefel-Verbindungen. Auf zwei dieser Klassen wird im Folgenden genauer eingegangen.

#### **1.1.1 Polyphenole**

Polyphenole zeichnen sich durch mindestens einen aromatischen Ring, substituiert mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen, als gemeinsames Strukturmerkmal aus. Mehr als 8000 dieser Verbindungen, die ubiquitär im Pflanzenreich vorkommen, sind bekannt (Fraga et al. 2010). Sie werden über den Shikimatweg, den Acetat-Mevalonatweg oder den Terpenoidsyntheseweg gebildet. Zur Gruppe der Polyphenole zählen Phenolsäuren, Flavonoide, Lignane und Stilbene.

##### **1.1.1.1 Phenolsäuren**

Zwei Hauptklassen lassen sich bei den Phenolsäuren unterscheiden: die Hydroxybenzoesäuren und die Hydroxyzimtsäuren. Sie sind biosynthetisch die Vorstufen von Flavonoiden und oft mit organischen Säuren oder Glykosiden verestert. Die bekanntesten Vertreter der Hydroxybenzoesäuren sind Gallussäure, Syringasäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure (Übersichtsartikel von Gulcin 2012). Bei den Hydroxyzimtsäuren sind vor allem Kaffeesäure, Ferulasäure, p-Coumarsäure, Sinapinsäure, Rosmarinsäure und Chlorogensäure als Hauptvertreter zu nennen (Gulcin 2012). In Nahrungsmitteln kommen

Hydroxyzimtsäuren entweder in der freien Form vor, häufiger jedoch als einfache lösliche Esterverbindungen. Vollkornprodukte zeichnen sich durch das zusätzliche Vorhandensein von unlöslichen Esterformen aus (Übersichtsartikel von Robbins 2003). In der Pflanze kommen die Phenolsäuren hauptsächlich in den Randschichten vor, wo sie zur Stabilität der Zellwände beitragen (Übersichtsartikel von Watzl und Rechkemmer 2001a).

Sowohl Hydroxybenzoesäuren als auch Hydroxyzimtsäuren zeichnen sich durch ihre antioxidativen Eigenschaften aus, wobei letztere das größere antioxidative Potential besitzen (Chen und Ho 1997; Cuvelier 1992) (siehe Abschnitt 1.6).

### 1.1.1.2 Flavonoide

Flavonoide sind die am häufigsten vorkommenden Polyphenole in der menschlichen Ernährung (Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000). Der Name Flavonoid ergibt sich aufgrund ihrer oft intensiven Färbung (lateinisch flavus = gelb). Die  $C_6-C_3-C_6$  Grundstruktur besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B), die über einen O-heterozyklischen Ring (C) miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.1). In Abhängigkeit vom Substitutions- und Oxidationsgrad des C-Ringes lassen sich sechs verschiedene Klassen von Flavonoiden unterscheiden: Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide (Tabelle 1.1). Durch diese strukturelle Vielfalt ergeben sich mehr als 6500 verschiedene Verbindungen (Übersichtsartikel von Watzl und Rechkemmer 2001b).

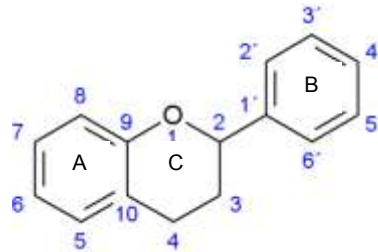
**Tabelle 1.1:** Strukturelle Einteilung von Flavonoiden mit Beispielen und Vorkommen (modifiziert nach Watzl und Rechkemmer 2001b)

Klasse	Beispiele	Vorkommen
<b>Flavonole</b>	Quercetin, Myricetin	Zwiebel, Apfel, Rotwein
<b>Flavanole</b>	Catechin, Epicatechingallat	Rotwein, Apfel, Grüner Tee
<b>Flavanone</b>	Naringenin, Hesperetin	Grapefruit, Orangen
<b>Flavone</b>	Apigenin, Luteolin	Sellerie, Paprika, Petersilie
<b>Anthocyane</b>	Malvidin, Cyanidin	rote Trauben, Kirschen
<b>Isoflavonoide</b>	Daidzein, Genistein	Soja

Biosynthetisch entstehen Flavonoide aus einem aktivierten Zimtsäurederivat (aus Phenylalanin über den Shikimatweg gebildet), an das drei Malonyl-CoA Einheiten angehängt werden. In der Pflanze liegen die verschiedenen Flavonoide mit Ausnahme der Gruppe der Flavanole überwiegend glykosidisch gebunden vor. Als Zucker tritt dabei primär Glukose auf, aber auch Galaktose, Arabinose, Glukorhamnose, Xylose und Rhamnose



kommen vor (Harborne 1994). Das Vorkommen von Flavonoiden ist besonders in Randschichten der Pflanzen und in äußeren Teilen der Blätter und Früchte wie z.B. der Schale besonders hoch (Übersichtsartikel von Corcoran et al. 2012).



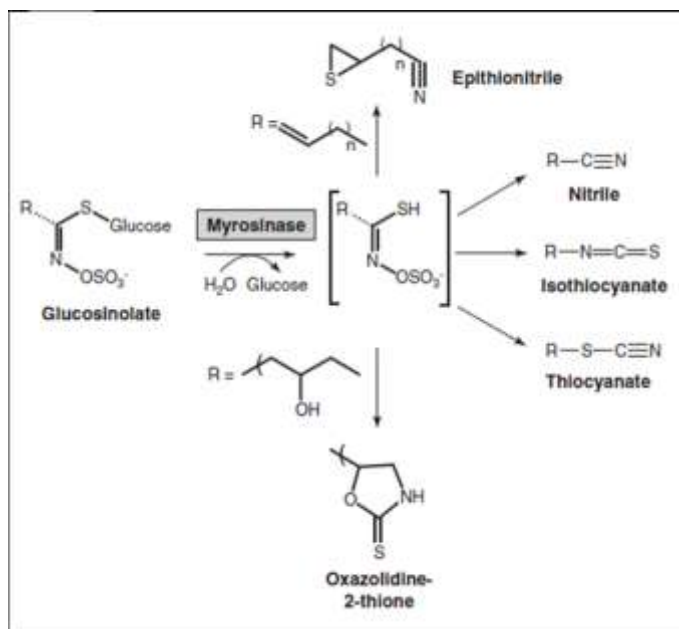
**Abbildung 1.1:** Flavonoidgrundgerüst mit C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> Struktur (A-Ring - C-Ring - B-Ring) und Nummerierung der C-Atome.

In der Pflanze haben die verschiedenen Flavonoide spezifische Funktionen z.B. als Farbstoffe für Blüten und Früchte, wodurch sie an der Verbreitung der Samen beteiligt sind (Übersichtsartikel von Corcoran et al. 2012). Durch ihren zum Teil bitteren Geschmack dienen sie zudem als Abwehrstoffe gegen Herbivoren (Cipollini et al. 2008) oder schützen die Pflanze vor Pilz- und Bakterienbefall (Orhan et al. 2009). Flavonoide absorbieren Licht im Bereich von 200 bis 380 nm und dienen somit den Pflanzen als Schutz vor UV-Strahlung (Rozema et al. 2002).

### 1.1.2 Glucosinolate

Glucosinolate (S-β-Thioglucosid-N-hydroxysulfat) sind schwefelhaltige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die aus einer β-Thioglucose-Einheit, einer sulfonierten Oxim-Einheit und einer variablen Seitenkette bestehen, die sich aus Aminosäuren (Methionin, Phenylalanin, Tryptophan oder verzweigtkettigen Aminosäuren) ableitet (Kliebenstein et al. 2005). Über 120 verschiedene Glucosinolate wurden bisher identifiziert, von denen der Großteil aus der Familie der *Brassicaceae* (= *Cruciferae*, Kreuzblütler) isoliert wurde (Sonderby et al. 2010). Bei Kreuzblütlern wie Senf, Rettich oder Meerrettich sind sie für den charakteristischen bitteren und scharfen Geschmack verantwortlich (Übersichtsartikel von Herr und Büchler 2010). Glucosinolate unterscheiden sich in ihrem jeweiligen Aglykonrest, genauer einer Aryl-, Alkyl-, Alkenyl- oder Indolstruktur. Sie sind die Thioglycosid Ausgangsstoffe für Isothiocyanate (ITC), die sich durch Vorhandensein einer N=C=S funktionellen Gruppe auszeichnen. Man unterscheidet unter anderem zwischen Allyl-Isothiocyanaten (AITC), Benzyl-Isothiocyanaten (BITC), Phenethyl-Isothiocyanaten (PITC) und Sulforaphan und dessen Derivaten. In Kreuzblütlern wie Brokkoli, Blumenkohl, Rosenkohl, Weißkohl, Grünkohl, Kresse, Rucola, Rettich und Senf kommen die Glucosinolate zusammen mit dem Enzym Myrosinase (β-Thioglucosidase) vor. Beide

befinden sich jedoch in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb der Zellen (Ratzka et al. 2002). Eine Zerstörung der Pflanzenzelle durch mikrobielle Angriffe, Ernte, mechanisches Prozessieren oder durch Kauen beim Verzehr bringt die Glucosinolate mit der Myrosinase in Kontakt, wodurch diese hydrolysiert werden (Ratzka et al. 2002). Dabei wird die Glukose freigesetzt und es entstehen instabile Aglykone, die sich spontan umlagern und so eine Reihe bioaktiver Verbindungen wie Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile bilden (siehe Abbildung 1.2) (Übersichtsartikel von Dinkova-Kostova und Kostov 2012). Die biologische Aktivität beruht fast ausschließlich auf den Myrosinase-Hydrolyseprodukten, vor allem den Isothiocyanaten, Glucosinolate selbst sind nicht bioaktiv (Cheung und Kong 2010; Dinkova-Kostova und Kostov 2012). Im menschlichen Organismus, der keine Myrosinase-Aktivität besitzt, kann die Hydrolyse von Glucosinolaten zu Isothiocyanaten durch die bakterielle Darmflora erfolgen (Dinkova-Kostova und Kostov 2012; Shapiro et al. 1998).



**Abbildung 1.2:** Hydrolyse von Glucosinolaten und Entstehung von aktiven Hydrolyseprodukten wie Isothiocyanaten (modifiziert nach Dinkova-Kostova und Kostov 2012)

Eines der am besten erforschten Isothiocyanate ist Sulforaphan, welches aus Glucoraphanin entsteht und in großen Mengen vor allem in Brokkoli vorkommt (Fahey et al. 1997). Eine Portion Brokkoli kann, abhängig von Sorte, Jahreszeit und Frische bis zu 60 mg Glucoraphanin enthalten (Übersichtsartikel von Herr und Büchler 2010). Generell enthalten Brokkolisprossen 100 – 200 mal mehr Glucoraphanin als ausgewachsene Brokkoliköpfe (Fahey et al. 1997). Anzumerken ist jedoch, dass nur etwa 20% des Glucoraphanin bioverfügbar sind und *in vivo* in Sulforaphan umgewandelt werden (Shapiro et al. 2006; Shapiro et al. 1998). Plasmakonzentrationen von Sulforaphan und dessen Metaboliten, die nach Verzehr einer Portion Brokkoli erreicht wurden, lagen zwischen 1 und 2,25  $\mu\text{M}$  (Gasper et al. 2005; Ye et al. 2002). Zu den positiven Eigenschaften, die mit Sulforaphan in Verbindung gebracht werden, zählt vor allem sein antikanzerogenes Potential. Für diese

präventive Wirkung scheinen 3 bis 5 Portionen Brokkoli oder Blumenkohl pro Woche ausreichend zu sein (Übersichtsartikel von Herr und Büchler 2010). Durch eine Inhibierung der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) verhindert Sulforaphan die Bildung von Karzinogen-induzierten DNA Addukten (Shishu et al. 2003). Zudem induziert Sulforaphan in Krebszellen einen Zellzyklusarrest sowie Apoptose, unter anderem durch eine Inhibierung der Histondeacetylasen (Clarke et al. 2008). Durch seine inhibierende Wirkung auf Angiogenese und Metastasierung kann Sulforaphan auch das Wachstum bereits etablierter Tumore beeinflussen (Übersichtsartikel von Bertl et al. 2006; Juge et al. 2007).

Die pro Kopf Aufnahme an Glucosinolaten in Deutschland wurde Anhand von Daten aus den achtziger Jahren auf etwa 46 mg pro Tag in Wintermonaten und auf etwa 36 mg/Tag in Sommermonaten geschätzt (Holst und Williamson 2004). Steinbrecher und Linseisen (2009) ermittelten aus Daten der neunziger Jahre jedoch nur eine mittlere pro Kopf Aufnahme von etwa 14 mg pro Tag an Glucosinolaten für Deutschland. Generell schwankt die totale Aufnahme an Glucosinolaten in der europäischen Bevölkerung zwischen 4,7 und 65 mg am Tag (Steinbrecher und Linseisen 2009).

## **1.2 Aufnahme und Metabolismus von Polyphenolen**

Während die Phenolsäuren etwa ein Drittel der täglichen Aufnahme an Polyphenolen ausmachen, tragen Flavonoide zu zwei Dritteln bei (Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000). Die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Flavonoide sind Catechine und Proanthocyanidine aus der Gruppe der Flavanole sowie Anthocyane und deren Oxidationsprodukte (Scalbert und Williamson 2000). Unter den Phenolsäuren sind Kaffeesäure und Ferulasäure sowie die veresterte Chlorogensäure die häufigsten Vertreter (Scalbert and Williamson 2000). Eine Tasse Kaffee (200 ml) enthält beispielsweise 50 bis 150 mg Chlorogensäure (Übersichtsartikel von Clifford 2000). Aufgrund der großen Mengen an Kaffee, die weltweit täglich verzehrt werden, und dessen breitem Spektrum an sekundären (Pflanzen)Inhaltsstoffen stellt Kaffee eine der Hauptquellen an Polyphenolen aus der Nahrung dar (Clifford 2000).

### **1.2.1 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen**

Verschiedene Nahrungsbestandteile können einen Einfluss auf die Aufnahme von Flavonoiden aus der Nahrung haben. Es wurde gezeigt, dass Fette durch einen Einschluss der löslichen Polyphenole in Mizellen deren Aufnahme erhöhen können (Lesser et al. 2004; Ortega et al. 2009). Eine Prozessierung und Homogenisierung von Lebensmitteln kann die Bioverfügbarkeit einiger Flavonoide erhöhen. Diese Tatsache wurde am Beispiel des

Flavavons Naringenin gezeigt, das aus verarbeiteten Tomaten-Produkten besser aufgenommen werden kann als aus frischen Tomaten (Porrini und Riso 2008). Ein Beispiel einer geringeren Bioverfügbarkeit stellt die Bindung von Flavonoiden an Ballast- oder Faserstoffe dar. Durch diese Immobilisierung stehen die Flavonoide der Hydrolyse durch Enzyme des Dünndarms nicht mehr zur Verfügung und werden durch die Darmflora des Dickdarms degradiert (Perez-Jimenez et al. 2009).

Manach et al. (2005) haben die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen anhand von Daten aus 97 Bioverfügbarkeitsstudien verglichen und festgestellt, dass die Hydroxybenzoesäure Gallussäure die höchste Bioverfügbarkeit besitzt. Die am besten absorbierten Flavonoide stammen aus der Klasse der Isoflavone, gefolgt von Catechinen, Flavanonen und Quercetin-Glycosiden. Proanthocyanidine und Anthocyane werden im Darm so gut wie nicht absorbiert. Insgesamt werden mit einer typischen „Western Diet“ pro Tag etwa 1 g Polyphenole aufgenommen (Kuhnau 1976; Scalbert und Williamson 2000). Typische Quellen sind vor allem Obst, Getränke wie Tee, Kaffee, Wein und Fruchtsäfte und zu einem geringeren Teil Gemüse, Cerealien und Hülsenfrüchte (Übersichtsartikel von Scalbert et al. 2002). Die maximale Plasmakonzentration aller Polyphenole nach Verzehr einer polyphenolhaltigen Mahlzeit wird mit 1 – 10  $\mu\text{M}$  angegeben (Kroon et al. 2004). Diese relativ niedrigen Werte resultieren aus einer geringen Absorption, einer hohen Metabolisierung und einer raschen Elimination der aufgenommenen Polyphenole (Clifford 2004; Manach et al. 2004; Manach et al. 2005). Nach Aufnahme von 50 mg Flavonoid-Aglyka-Metaboliten lag die Plasmakonzentration aller Metabolite im Bereich von 0 – 4  $\mu\text{M}$  (Manach et al. 2005). Die relative Exkretionsrate über den Urin betrug 0,3% – 43% der aufgenommenen Flavonoidmenge (Manach et al. 2005). Die humanen Plasmakonzentrationen von Hydroxyzimtsäurederivaten sind generell sehr niedrig, die maximalen Werte liegen unter 1  $\mu\text{M}$  (Clifford 2004).

### **1.2.2 Absorption von Phenolsäuren und Flavonoiden**

Bei Phenolsäuren wie auch bei Flavonoiden ist die Bioverfügbarkeit von der chemischen Struktur abhängig. Im Gegensatz zu freien Hydroxyzimtsäuren, die bereits im Magen und Dünndarm aufgenommen werden können, müssen veresterte Hydroxyzimtsäurederivate erst durch Esterasen im Darm freigesetzt werden (Übersichtsartikel von Zhao und Moghadasian 2009). Die Esterbindung kann die Absorption von Hydroxyzimtsäurederivaten vermindern wie im Falle von Chlorogensäure gezeigt (Olthof et al. 2001). Die Absorption von Chlorogensäure geschieht nach Spaltung der Esterbindung durch mikrobielle Esterasen primär im Dickdarm (Manach et al. 2005). Freie Hydroxyzimtsäuren werden dagegen rasch im Magen und Dünndarm aufgenommen, wobei verschiedene Mechanismen diskutiert werden. Die Beteiligung eines Natrium-abhängigen Transporters in der Bürstensaummembran der Enterozyten konnte im Rattenmodell gezeigt werden (Wolffram et

al. 1995). Eine alternative Variante ist die Absorption von Hydroxyzimtsäuren in Enterozyten durch Monocarboxylat Transporter (MCT) (Konishi et al. 2005; Konishi und Shimizu 2003). Als wahrscheinlichster Mechanismus für die Absorption von Hydroxyzimtsäuren im Dünndarm gilt jedoch die passive Diffusion. Daten aus *in vitro* Versuchen (Poquet et al. 2008; Zhao et al. 2004) und *in situ* Perfusionsstudien (Adam et al. 2002) legen dies nahe. Nach der Aufnahme werden sie ähnlich wie Flavonoide glukuronidiert und/oder sulfatiert (Clifford 2000; Cremin et al. 2001). Diese Reaktionen können sowohl in der Darmmukosa oder durch die intestinale Mikroflora, als auch klassischerweise in Leber und Niere stattfinden (Chesson et al. 1999; Zhao und Moghadasian 2008). In der Leber können aufgenommen Hydroxyzimtsäuren durch  $\beta$ -Oxidation abgebaut oder nach Methylierung über die Galle ausgeschieden werden (Übersichtsartikel von Watzl und Rechkemmer 2001a). Die relative Bioverfügbarkeit verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate wurde von Zhao und Moghadasian (Übersichtsartikel von 2009) nach Evaluation der „Area under the Curve“ (AUC) wie folgt angegeben: p-Coumarsäure > Ferulasäure > Kaffeesäure > Rosmarinsäure > Chlorogensäure. Diese Autoren beschrieben eine höhere Absorptionsrate für Hydroxyzimtsäuren mit mono-Hydroxylgruppen wie p-Coumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure und deren komplette Aufnahme im Darm. Nach Konjugation in der Leber werden diese Hydroxyzimtsäuren schließlich als freie oder konjugierte Form über den Urin ausgeschieden (Zhao und Moghadasian 2009).

Flavonoide kommen in Pflanzen praktisch nur glykosidisch gebunden vor (Harborne 1994). Um die Bürstensaummembran der Enterozyten passieren zu können, müssen die Flavonoid-Glykoside im Dünndarm enzymatisch gespalten werden. Als mögliche Enzyme kommen hier zytosolische  $\beta$ -Glukosidasen im Inneren der Enterozyten (Gee et al. 2000) oder das Enzym Laktase Phlorizin Hydrolase (LPH) auf der Außenseite der Bürstensaummembran (Day et al. 2000a) zum Einsatz. Die freigesetzten Aglyka können anschließend aufgrund ihrer erhöhten Lipophilie durch passive Diffusion absorbiert werden (Day et al. 2000a). Eine Ausnahme stellen Flavonoide, die an Rhamnose gebunden sind, dar. Rhamnoside können nicht durch  $\beta$ -Glukosidasen gespalten werden und werden daher erst im Dickdarm nach Hydrolyse durch die in der dortigen Mikroflora ansässigen  $\alpha$ -Rhamnosidasen absorbiert (Scalbert und Williamson 2000).

Vor Abgabe in die Blutzirkulation über die Portalvene werden die Flavonoid-Aglyka intensiv metabolisiert. Praktisch alle aufgenommenen Flavonoide werden zu O-Glukuroniden, Sulfateestern oder O-Methylethern konjugiert, sodass im Plasma so gut wie keine freien Flavonoid-Aglyka zu finden sind (Bell et al. 2000; Manach et al. 1998). Eine Ausnahme kann die Verwendung von Flavonoiden in pharmakologischen Dosen darstellen. So wurden in Studien, bei denen solch hohe Dosen verabreicht wurden, freie Aglyka im Plasma von Probanden gefunden. Als Erklärung dafür wurde die Sättigung der Stoffwechselwege, die für

die Konjugationsreaktionen zuständig sind, angeführt (Das 1971). Die Metabolisierung der Flavonoide kann bereits in der Darmmukosa erfolgen wie beispielsweise für Quercetin gezeigt wurde (Crespy et al. 1999). Die Konjugation der Flavonoide mit Glukuronsäuren und Sulfatgruppen erhöht deren Hydrophilie und ermöglicht so eine rasche Elimination (D'Archivio et al. 2010; Day et al. 2000b). Die Elimination von Flavonoiden geschieht hauptsächlich über den Urin und die Galle. Die konjugierten Flavonoide gelangen über die biliäre Route auch in den Dickdarm, wo sie von der bakteriellen Mikroflora hydrolysiert und erneut aufgenommen werden können und so einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (Aura et al. 2002). Biotransformationsreaktionen von Flavonoiden im Dickdarm schließen Dehydroxylierung, Reduktion, C-Ring Spaltung und Methylierung ein und führen oft zu bioaktiven Verbindungen, die sowohl im Darm als auch in der systemischen Zirkulation nachweisbar sind (Übersichtsartikel von Corcoran et al. 2012). Zu diesen bioaktiven Verbindungen zählen unter anderem aromatische Säuren wie beispielsweise Phenylvaleriansäure, Phenylpropansäure, Phenylelessigsäure und Benzoesäure mit geringem Molekulargewicht (Übersichtsartikel von Scalbert et al. 2002). Die in Plasma und Urin nachweisbaren Verbindungen sind in der Regel glukuronidierte und/oder sulfatierte Verbindungen und keine oder nur sehr geringe Mengen der Ausgangssubstanzen (Manach et al. 2005).

### **1.2.3 Metabolisierung von Polyphenolen und ITC**

#### **Phasen I und II**

Flavonoide werden von den gleichen Enzymen des Fremdstoffmetabolismus metabolisiert wie Xenobiotika. Im Unterschied zu Pharmaka, die in Dosen von mehreren 100 mg verabreicht werden können, liegen Polyphenole meist in weitaus geringeren Mengen vor (typischerweise weniger als 100 mg) (Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000). Pharmaka sind somit in der Lage, eine Sättigung der am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme, die vom Vorhandensein von Cofaktoren abhängen, zu erreichen. Polyphenole, die in viel geringeren Konzentrationen vorliegen, sind kaum dazu in der Lage und kommen daher fast ausschließlich als Konjugate in der Zirkulation vor (Bell et al. 2000; Manach et al. 1998). Generell entscheidet die aufgenommene Dosis über die Art der Metabolisierung. Während hohe Dosen primär in der Leber metabolisiert werden, können geringere Mengen an Polyphenolen bereits in der Dünndarmmukosa verstoffwechselt werden. Diese Konjugate können anschließend in der Leber weiter modifiziert werden (Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000).

Isothiocyanate werden beim Menschen nach einer Konjugation mit Glutathion durch die Glutathion-S-transferasen (GST) metabolisiert (Mercaptursäureweg) und meist als N-Acetylcystein-Isothiocyanat Konjugate (Mercaptursäuren) rasch über den Urin

ausgeschieden (Mennicke et al. 1983; Mennicke et al. 1988). Nach der Konjugation mit Glutathion erfolgt die sukzessive Spaltung des  $\gamma$ -Glutamyl Restes durch die  $\gamma$ -Glutamyltransferase, die Entfernung des Glycin Restes durch die Cysteinylglycinase und schließlich die N-Acetylierung durch N-Acetyltransferasen (NAT) (Übersichtsartikel von Herr und Büchler 2010). Das Vorhandensein dieser N-Acetylcystein-Isothiocyanat Konjugate im Urin dient als Marker für die Aufnahme von Isothiocyanaten und Glucosinolaten, maximale Konzentrationen werden nach 2 bis 4 h nach Verzehr erreicht (Chung et al. 1998; Duncan et al. 1997; Rose et al. 2000). In Humanstudien konnte gezeigt werden, dass nach 12 h bereits 70% der aufgenommenen Menge an Sulforaphan über den Urin ausgeschieden wurde (Egner et al. 2011).

Der Phase I Metabolismus besteht primär aus der Oxidation des Fremdstoffes, um dessen Interaktion mit intrazellulären Angriffspunkten zu minimieren. CYPs spielen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von (vor allem lipophilen) Xenobiotika, können aber gleichzeitig auch Fremdstoffe zu toxischen Metaboliten aktivieren und sind vor allem in der Leber für die Intensität und Dauer der Wirkung von Pharmaka verantwortlich (Klaassen et al. 2008). Die Aktivität verschiedener CYP-Isoformen unterliegt einer hohen Intraspeziesvariabilität bedingt durch genetische Faktoren und Umweltfaktoren. Als Umweltfaktoren zählen Medikamente (inklusive pflanzlicher Arzneimittel), Nahrungsmittel (z.B. Kreuzblütler), soziale Gewohnheiten (Rauchen, Alkoholkonsum) sowie das Vorhandensein verschiedener Erkrankungen wie Diabetes, Infektionen, Leber- und Nierenerkrankungen (Klaassen et al. 2008). Daneben wird in der Literatur auch von der Modulierbarkeit der CYP-Enzyme durch Polyphenole, vor allem Flavonoide (Wood et al. 1986), und Isothiocyanate (Hayes et al. 2008) berichtet, was einen erheblichen Einfluss auf den Metabolismus von Xenobiotika haben kann.

Polyphenole können durch das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT), das in vielen Geweben vorkommt, methyliert werden (Kuhnle et al. 2000). Im Gegensatz zu anderen Konjugationsreaktionen senkt eine Methylierung die Wasserlöslichkeit von Xenobiotika und maskiert zudem deren funktionelle Gruppen, die sonst durch andere Phase II Reaktionen konjugiert werden könnten (Klaassen et al. 2008). CYPs können Polyphenole demethylieren. Dieser Prozess scheint vor allem bei methylierten Polyphenolen wichtig zu sein und läuft langsamer ab als die Konjugation unmethylierter Flavonoide (Wen und Walle 2006).

Die prominentesten Phase II Enzyme sind UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT), GST, NAT und Methyltransferasen. Glukuronidierung durch UGTs ist ein Entgiftungsvorgang, bei dem Xenobiotika und elektrophile Phase I Metabolite wasserlöslicher gemacht werden, wodurch ihre Elimination über die Galle oder den Urin erleichtert wird (Kiang et al. 2005). Polyphenole werden primär durch die UGT1A Familie, die

in Darm, Leber und Nieren vorkommt, glukuronidiert (Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000). Innerhalb der Zelle sind die UGT Enzyme im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Glukuronidierungsreaktionen sind im Allgemeinen regiospezifisch und Isoform-abhängig (Tang et al. 2009; Tang et al. 2010a). Die Expression der UGT Enzyme ist zudem durch Umwelteinflüsse, Ernährung und genetische Polymorphismen modulierbar (Yang et al. 1998). SULT Enzyme befinden sich im Zytosol der Zellen und katalysieren die Übertragung einer Sulfonatgruppe auf ein entsprechendes Substrat (Wang und James 2006). Eine weitere Form der Entgiftung von Fremdstoffen stellt deren Konjugation mit Glutathion durch die GST oder die Acetylierung durch NAT dar (Bosch et al. 2006). Generell wird die Hydrophilie durch diese Konjugationsreaktionen gesteigert, was zusammen mit dem erhöhten Molekulargewicht die Elimination dieser Konjugate durch Galle und Urin erleichtert (D'Archivio et al. 2010). Für SULT Enzyme konnte gezeigt werden, dass Polyphenole verschiedene SULT Isoformen inhibieren können, so inhibiert beispielsweise Quercetin SULT1A1 (Walle et al. 1995).

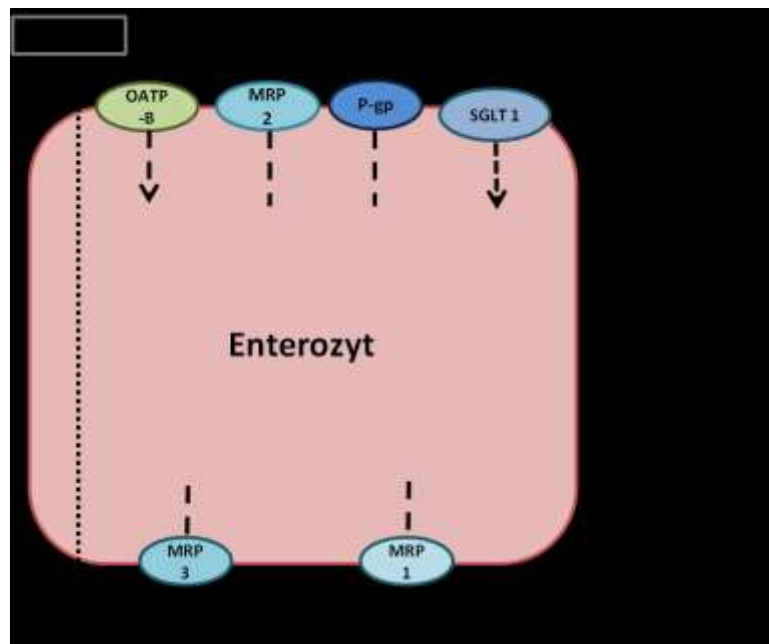
Eine Aktivierung der Phase II Enzyme wie UGT, GST und NAD(P)H:chinon Oxidoreduktase (NQO1) durch Flavonoide resultiert in der Entgiftung verschiedener Karzinogene und stellt somit einen Wirkmechanismus ihrer antikanzerogenen Aktivität dar (Moon et al. 2006). GST Enzyme können neben der Entgiftung von Xenobiotika aber auch zu einer Giftung von Fremdstoffen führen, so dass deren Aktivierung nicht ausschließlich als positiv angesehen werden kann. Neben Flavonoiden sind auch Isothiocyanate in der Lage Phase I Enzyme zu inhibieren und diverse Phase II sowie antioxidative Enzyme zu induzieren und somit ihre chemopräventive und antioxidative Wirkung auszuüben (Talalay et al. 1979). Sowohl im Falle der Flavonoide als auch bei den Isothiocyanaten geschieht die Induktion zumindest partiell über den Nrf2/ARE-Signalweg (Nrf2: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, ARE: Antioxidative Responsive Element) (Chen et al. 2000; Dinkova-Kostova und Talalay 1999; Fahey et al. 1997) (siehe auch Abschnitt 1.6).

### **Phase III**

Als Phase III des Fremdstoffmetabolismus bezeichnet man die Efflux Transporter. Transporter sind für die zelluläre Aufnahme und den effektiven Export von Xenobiotika und deren Konjugaten des Phase II Metabolismus zuständig. Dabei werden zwei Hauptklassen unterschieden: die ABC Transporter, die zur Familie der „ATP-binding cassette“ gehören und die Transporter der „solute carrier“ Familie (SLC Transporter) (Cermak 2008). Eine Übersicht über die wichtigsten Mitglieder beider Familien bietet Abbildung 1.3. Die Klasse der SLC Transporter besteht aus dem „organic anion transporting polypeptide“ (OATP), „organic cation transporter“ (OCT), „organic cation/carnitine transporter“ (OCTN) und den „organic anion transporter“ (OAT) (Übersichtsartikel von Hagenbuch und Meier 2004; Koepsell und



Endou 2004). Die ABC Transporter werden aufgrund ihrer Rolle bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auch als multidrug resistance (MDR) Transporter bezeichnet. Die wichtigsten Vertreter beim Menschen sind das P-Glykoprotein (P-gp oder auch MDR1), verschiedene Mitglieder der „multidrug resistance-associated proteins“ (MRP1 bis MRP9) und das „breast cancer resistance protein“ (BCRP). Die ABC Transporter schleusen aktiv Xenobiotika aus der Zelle und verbrauchen dabei Energie in Form von ATP (Senior et al. 1995). P-gp, MRP2 und BCRP sind auf der apikalen Membranseite von Enterozyten und am Übergang der Hepatozyten zu den Gallengängen zu finden. Hier spielen sie neben den Phase II Enzymen eine zentrale Rolle bei der Detoxifikation von oral aufgenommenen Xenobiotika, indem sie die hepatobiliäre sowie direkte intestinale Elimination vermitteln (Alvarez et al. 2009; Szakacs et al. 2008).



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung eines Enterozyten mit Transportern (modifiziert nach Chabane et al. 2009).

Die Interaktion von Polyphenolen mit diesen Aufnahme und Efflux Transportern wird als ein Grund für die geringe Bioverfügbarkeit von Polyphenolen, durch eine erleichterte Abgabe der hydrophilen Konjugate in Galle und Urin, angesehen (Silberberg et al. 2006). Flavonoide können als Substrate von ABC Transportern von diesen transportiert werden und somit eine kompetitive Hemmung gegenüber anderen potentiellen Substraten bewirken (Alvarez et al. 2009). Zudem können verschiedene Flavonoide die Aktivität von ABC Transportern modulieren. Dabei kann ein Flavonoid (je nach verwendeter Konzentration) sowohl eine inhibitorische als auch eine aktivierende Wirkung auf einen spezifischen Transporter haben, wie am Beispiel von Quercetin und Kaempferol gezeigt (Mitsunaga et al. 2000).

### 1.3 Pharmakologische Effekte von Polyphenolen und ITC

Polyphenolen werden *in vivo* neben ihren antioxidativen Eigenschaften weitere Wirkungen vor allem hinsichtlich der Chemoprävention nachgesagt. Sie sollen verschiedene Phase I Enzyme hemmen, Phase II Enzyme induzieren, mit der DNA wechselwirken, Apoptose induzieren, die Zellproliferation hemmen, mit aktivierten Kanzerogenen wechselwirken und das Immunsystem modulieren (Übersichtsartikel von Watzl und Rechkemmer 2001b). Als weitere biologische Effekte werden eine verminderte Vaskularisierung, Schutz von Neuronen gegenüber oxidativem Stress, Stimulierung von Vasodilatation und eine verbesserte Insulinsekretion angeführt (Ferguson et al. 2004; Silva et al. 2008).

Bezüglich der Krebsprävention von Flavonoiden kamen Arts und Hollman (2005) nach Auswertung verschiedener prospektiver Studien und Fallstudien zu dem Ergebnis, dass signifikante Zusammenhänge nur für Lungenkrebs und möglicherweise Dickdarmkrebs bestehen. Sie konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen für die Aufnahme von Flavonoiden und die Inzidenz von Magen-, Ovarial-, Prostata- und Hodenkrebs finden. Bei anderen chronischen Erkrankungen fanden die Autoren eine inverse Assoziation für Asthma. So kann sich die Aufnahme von Flavonoiden positiv auf die Lungenfunktion und die Symptome der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease = COPD) auswirken (Arts und Hollman 2005). Ebenso untersuchten diese Autoren den Zusammenhang zwischen Flavonoidzufuhr und kardiovaskulären Erkrankungen (coronary artery disease = CAD). Anhand der Daten einiger, jedoch nicht aller untersuchten prospektiven Studien zeigten Flavonole, Flavone und Catechine positive Effekte hinsichtlich des Auftretens von CAD und senkten das Mortalitätsrisiko um bis zu 65% (Arts und Hollman 2005).

Isothiocyanaten werden verschiedene protektive Eigenschaften nachgesagt, vor allem hinsichtlich einer Chemoprävention. Zu den zugrunde liegenden Mechanismen zählen Veränderungen im Metabolismus von Karzinogenen durch Modulation der Aktivität von Phase I und II Enzymen, Induktion eines Zellzyklusarrestes sowie von Apoptose, Inhibierung von Angiogenese und Metastasierung und Veränderungen im Histon Acetylierungsstatus. Daneben sind zudem die antioxidativen, antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Aktivitäten der Isothiocyanate von großer Bedeutung (Übersichtsartikel von Dinkova-Kostova und Kostov 2012).

Für Sulforaphan konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass es ein starker Aktivator des Nrf2/ARE-Signalweges ist. Diese Aktivierung bewirkt die Transkription vieler cytoprotektiver Gene wie die des Phase II Metabolismus und antioxidativer Enzyme (siehe Abschnitt 1.6 zu Antioxidantien), die eine zelluläre Reaktion auf Elektrophile und Oxidantien ermöglichen. Neben Nrf2 ist mit NFκB ein weiterer redoxsensitiver Transkriptionsfaktor durch Sulforaphan modulierbar. NFκB ist an der Regulation von Proliferation, Angiogenese, Apoptose und

Differenzierung sowie von immunologischen und inflammatorischen Reaktionen beteiligt (Perkins und Gilmore 2006). Sulforaphan reduzierte signifikant die durch TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-abhängige Genexpression (TNF $\alpha$  ist einer der bekanntesten Aktivatoren von NF $\kappa$ B) (Moon et al. 2009a; Xu et al. 2005).

Epidemiologische Studien haben eine inverse Assoziation zwischen dem Verzehr von Brokkoli und dem Risiko für Blasenkrebs bzw. der Überlebensrate bei Blasenkrebs festgestellt (Michaud et al. 1999; Tang et al. 2008, 2010b). Im Allgemeinen wird den in diversen Kreuzblütlern enthaltenen Isothiocyanaten eine chemopräventive Rolle bei Lungen-, Brust- und Pankreaskrebs sowie kolorektalen Tumoren zugesprochen (Übersichtsartikel von Herr und Büchler 2010).

#### 1.4 Sicherheit von Polyphenolen

Generell gilt die Aufnahme von Flavonoiden aus der Nahrung als sicher. Durch die geringe Bioverfügbarkeit der Polyphenole ist nicht davon auszugehen, dass durch den Verzehr von polyphenolhaltigen Lebensmitteln toxische Konzentrationen *in vivo* erreicht werden können. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass durch die Aufnahme hoher Dosen an Flavonoiden wie sie beispielsweise in Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) eingesetzt werden, negative Effekte speziell bei gefährdeten Personengruppen auftreten können (Egert und Rimbach 2011). Besonders die älteren Bevölkerungsgruppen, die generell anfälliger sind, scheinen hier betroffen zu sein. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass sie vermehrt Mangelerscheinungen haben und eher zu NEM greifen, und zum anderen an der vermehrten Einnahme von Medikamenten (Prasain et al. 2010). Da Flavonoide durch die klassischen Enzyme des Fremdstoffmetabolismus verstoffwechselt werden, können sie mit der Absorption, dem Metabolismus und der Ausscheidung von Medikamenten interferieren (Cermak 2008). Für einige Flavonoide konnte eine solche Wechselwirkung mit Pharmaka gezeigt werden, wodurch die gleichzeitige Einnahme von NEM und Medikamenten ein Risiko bergen kann. Das Flavanon Naringenin, das in hohen Konzentrationen in Grapefruitsaft vorkommt, ist in der Lage das CYP 3A4 zu hemmen. Dieses ist eines der wichtigsten CYP Enzyme im Phase I Stoffwechsel in Darm und Leber (Traka und Mithen 2011) und für die Metabolisierung von etwa der Hälfte aller verschriebenen Pharmaka verantwortlich (Rendic 2002; Wojnowski und Kamdem 2006). Durch die Hemmung von CYP 3A4 durch Naringenin wird beispielsweise der Metabolismus von Statinen unterdrückt, wodurch diese sich folglich in der Zirkulation anreichern und negative Auswirkungen haben können (Erdman et al. 2007; Girenavar et al. 2006). Einen weiteren negativen Effekt können Polyphenole auf die Aufnahme von Makronährstoffen haben. So wurde gezeigt, dass Polyphenole aus der Nahrung in der Lage sind nicht-häm Eisen im Darm zu komplexieren und es somit für die Aufnahme unverfügbar zu machen (Traka und Mithen 2011). Daher kann eine erhöhte

Flavonoidzufuhr wie durch den Verzehr von Getränken mit hohem Gehalt an Polyphenolen (z.B. Tee, Kaffee, Kakao und Rotwein) und vor allem durch NEM (besonders bei Personengruppen mit inadäquater Eisenzufuhr wie junge Frauen und Senioren) zu Eisenmangelzuständen führen (Hurrell et al. 1999; Temme und Van Hoydonck 2002). Neben Eisen sind auch Interaktionen von Flavonoiden mit Kupfer (Frejnagel und Wroblewska 2010) und Mangan (Record et al. 1996) bekannt.

Daten aus *in vitro* und Tierversuchen deuten auf goitrogene Eigenschaften verschiedener Flavonoide hin (Egert und Rimbach 2011; Erdman et al. 2007). Bisher gibt es jedoch keine Hinweise darauf, dass Sojaprodukte oder darin vorkommende Isoflavone negative Eigenschaften auf die Schilddrüsenfunktion bei gesunden Menschen haben (Messina und Redmond 2006). *In vitro* Daten zur Mutagenität und Genotoxizität von Flavonoiden wie Quercetin konnten *in vivo* nicht bestätigt werden (Harwood et al. 2007).

### **1.5 Polyphenole und Isothiocyanate als Nahrungsergänzungsmittel**

Durch die in epidemiologischen Studien gezeigten positiven Effekte einer Ernährung, die reich an Obst und Gemüse ist, und der damit verbundenen verringerten Inzidenz verschiedener degenerativer Erkrankungen, wuchs in den letzten Jahrzehnten das Interesse an den polyphenolhaltigen Inhaltsstoffen dieser Lebensmittel. Verschiedene Leitlinien wie beispielsweise die Kampagne „5 am Tag“ der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfehlen den Verzehr von mindestens 5 Portionen Obst und Gemüse am Tag. Neben den in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden Vitaminen und Mineralstoffen werden die positiven Effekte bezüglich der Krankheitsprävention (speziell kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs) vor allem phenolhaltigen Substanzen wie Flavonoiden und Hydroxymitsäurederivaten zugesprochen. Dies erklärt den immer größer werdenden Markt an Polyphenolen und vor allem Flavonoiden als NEM (Espin et al. 2007) und sogenanntem „Functional Food“, Lebensmittel, die mit Polyphenolen und anderen Mikronährstoffen angereichert werden. Durch das natürliche Vorkommen von Flavonoiden in pflanzlichen Produkten könnten flavonoidhaltige NEM bei Verbrauchern den Anschein erwecken, sie seien sicher (Poppenga 2001). Die Einnahme von hohen Dosen an Flavonoiden, wie sie in NEM vorkommen, ist bisher jedoch kaum untersucht. Generell gibt es für Verbraucher kaum Informationen über die Produktsicherheit, Kontraindikationen, Interaktionen mit Medikamenten sowie der Wirksamkeit der verwendeten Supplemente (Espin et al. 2007). Bei Verwendung von Quercetin als NEM kann die empfohlene tägliche Verzehrmenge 1000 mg pro Tag überschreiten (Harwood et al. 2007). Verglichen dazu beträgt die natürliche Aufnahme von Quercetin durch Obst und Gemüse gerade einmal 10 – 100 mg/Tag (Erdman et al. 2007; Scalbert und Williamson 2000). Vor allem Isoflavone werden häufig als NEM verwendet, obwohl bisher keine effektiv wirksame Dosis mit Beweis der positiven Effekte auf

den Menschen festgelegt werden konnte (Espin et al. 2007). Aufgrund dieser mangelnden Beweise und möglicher adverser Effekte von Isoflavonen, empfiehlt die American Heart Association keine isoflavonhaltigen NEM zu verwenden (Sacks et al. 2006). Generell kann ein Supplement eines isolierten Flavonoids nicht den gesundheitsfördernden Effekt des Verzehrs von Obst und Gemüse mit seiner komplexen Zusammensetzung an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen ersetzen (Ross und Kasum 2002).

Neben Flavonoiden werden auch Isothiocyanate als NEM vertrieben. Hierbei kommen vor allem Brokkoli-Extrakte mit hohem Gehalt an Sulforaphan zum Einsatz, die mit gesundheitsfördernden Eigenschaften vor allem hinsichtlich einer Krebsprävention beworben werden (Übersichtsartikel von Zhu et al. 2010). Allerdings konnten eine therapeutisch wirksame Dosis von Sulforaphan als Leitsubstanz der Isothiocyanate in klinischen Studien bisher nicht festgelegt werden und Daten aus Tierstudien sind nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Während ein normaler Verzehr von Gemüse aus der Familie der Kreuzblütler durchaus positive Auswirkungen auf den Gesundheitszustand im Menschen haben kann, könnte eine erhöhte Aufnahme der in dieser Gattung enthaltenen Substanzklasse jedoch zu unerwünschten Effekten führen (mögliche goitrogene Effekte und Genotoxizität) (Übersichtsartikel von Fimognari et al. 2012). Bisher gibt es allerdings keine gesicherten Befunde oder genaue toxikologische Bewertungen, dass solch hohe Konzentrationen kein gesundheitliches Risiko bergen. Diese Gutachten sind jedoch dringend erforderlich, um den Einsatz von Isothiocyanaten als NEM als gesundheitlich unbedenklich einzustufen und einen erhöhten Verzehr von Isothiocyanaten durch die Nahrung oder auch als Supplement zu empfehlen.

## **1.6 Polyphenole und Isothiocyanate als Antioxidantien**

Bei antioxidativen Effekten unterscheidet man zwischen direkten und indirekten Antioxidantien. Direkte Antioxidantien sind in der Regel niedermolekulare Substanzen wie Ascorbat, Glutathion und Tocopherole, welche direkte radikalfangende Eigenschaften haben und somit ROS und reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species = RNS) inaktivieren können (Übersichtsartikel von Dinkova-Kostova und Talalay 2008; Fahey und Talalay 1999; Gao et al. 2001). Da direkte Antioxidantien während der Inaktivierung von ROS und RNS chemisch modifiziert werden, müssen sie entweder regeneriert oder kontinuierlich ersetzt werden. Indirekte Antioxidantien sind dagegen in der Lage antioxidative Enzyme wie beispielsweise Superoxid Dismutase (SOD) zu induzieren und somit für die Inaktivierung von ROS und RNS zu sorgen (Dinkova-Kostova und Talalay 2008; Fahey und Talalay 1999; Gao et al. 2001). Für Polyphenole konnte gezeigt werden, dass sie sowohl als direkte als auch als indirekte Antioxidantien wirken können (Dinkova-Kostova und Talalay 2008).

Eine physiologische Relevanz von Polyphenolen als direkte Antioxidantien ist für die meisten Organe aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit und der hohen Metabolisierung nicht zu erwarten. Eine Ausnahme könnten jedoch Organe sein, die mit hohen Konzentrationen unmetabolisierter Polyphenole in Kontakt kommen, wie beispielsweise der Gastrointestinaltrakt (Fraga 2007; Galleano et al. 2010). Hinsichtlich der z.B. glukuronidierten oder methylierten Metabolite ist von einer geringeren antioxidativen Kapazität verglichen mit den ursprünglichen Polyphenolen auszugehen, da die phenolischen Hydroxylgruppen blockiert sind (Shirai et al. 2006; Williamson et al. 2005). Generell könnte die Rolle von Polyphenolen als indirekte Antioxidantien von größerer Bedeutung sein als ihre direkte Wirkung als Antioxidans. Ein Übersichtsartikel von Hu (2011) zeigt, dass neben dem ITC Sulforaphan, einem potenten Induktor des Nrf2/ARE-Signalweges, auch Polyphenole wie Epigallocatechingallat (EGCG) und Curcumin in der Lage sind, antioxidative Enzyme zu induzieren und somit eine wichtige Rolle im zellulären Verteidigungssystem einnehmen.

Das antioxidative Potential der Phenolsäuren hängt von Anzahl und Position der am aromatischen Ring gebundenen Hydroxylgruppen, den Bindungsstellen und der Art des Substituenten ab (Rice-Evans et al. 1996; Sroka und Cisowski 2003). Die größere antioxidative Kapazität der Hydroxymethylsäuren liegt am Vorhandensein der  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$  Gruppe verglichen mit der  $\text{COOH}$  Gruppe der Hydroxybenzoesäuren (Shahidi 1997). Das Vorhandensein von Hydroxylgruppen in *ortho* oder *para* Stellung verstärkt zusätzlich die antioxidative Aktivität der Phenolsäuren (Chimi et al. 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Rosmarinsäure ein besseres Antioxidans ist als Kaffeesäure (Übersichtsartikel von Gulcin 2012). Die Veresterung der Kaffeesäure mit Glykosiden wie im Falle der Chlorogensäure wirkt sich negativ auf das antioxidative Potential aus (Chen und Ho 1997; Cuvelier 1992).

Ähnlich wie bei den Phenolsäuren ist das antioxidative Potential der Flavonoide stark von ihrer chemischen Struktur abhängig. Als wichtigste Strukturmerkmale wurden dabei die 3',4'-Dihydroxystruktur des B-Ringes, die 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Oxo-Gruppe im C-Ring, das Vorhandensein einer 3-Hydroxylgruppe im C-Ring und eine 5-Hydroxylgruppe im A-Ring ausgemacht (Das und Pereira 1990; Rice-Evans et al. 1996). Flavonoide mit freien Hydroxylgruppen können generell als Radikalfänger agieren. Je mehr Hydroxylgruppen vorhanden sind, desto größer ist im Allgemeinen die antioxidative Kapazität eines Flavonoids (Rice-Evans et al. 1996). Besonders wichtig ist das Vorhandensein dieser Hydroxylgruppen im B-Ring, da diese primär für die Inhibition von Oxidationsreaktionen verantwortlich sind (Jovanovic et al. 1994). Flavonoide, welche alle oben genannten Strukturmerkmale besitzen und sich somit als sehr gute Antioxidantien *in vitro* auszeichnen, sind die Flavonole Quercetin und Myricetin.

Isothiocyanate wie Sulforaphan wirken als indirekte Antioxidantien und können großen Einfluss auf den Metabolismus von Xenobiotika und die Generierung von ROS haben

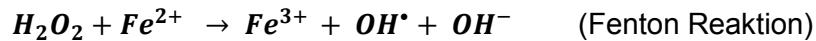
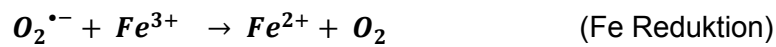
(Übersichtsartikel von Fimognari et al. 2012). Aufgrund ihrer Struktur besitzen sie nicht die Fähigkeit wie beispielsweise Flavonoide ROS direkt abzufangen und zu inaktivieren. Als indirekte Antioxidantien induzieren sie jedoch antioxidative Enzyme, was vor allem über den Nrf2/ARE-Signalweg geschieht, und wirken so der Bildung freier Radikale entgegen (Dinkova-Kostova und Talalay 2008). Gene, die durch den Nrf2/ARE-Signalweg reguliert werden, sind unter anderem antioxidative Enzyme wie Hämoxigenase-1 (HO-1) und Enzyme zur Glutathion Synthese und NAD(P)H Generierung (Kobayashi und Yamamoto 2006). Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Redox-Homöostase und eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs durch Isothiocyanate stellt somit eine Art Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress und Karzinogene dar (Fimognari et al. 2012). Neben ihrer Wirkung als indirekte Antioxidantien wurden einige Isothiocyanate auch mit prooxidativen Eigenschaften hinsichtlich einer gesteigerten ROS Produktion in Verbindung gebracht, ein Mechanismus der bei vielen indirekten Antioxidantien beobachtet werden kann (Wu und Hua 2007). So sind Isothiocyanate, die in ihrer Molekülstruktur ein oxidiertes Schwefelatom aufweisen wie beispielsweise Sulforaphan und Erysoiin potente Induktoren von ROS. Isothiocyanate wie Erucin, die keinen oxidierten Schwefel besitzen, zeigten bei gleichen Konzentrationen keine Induktion von ROS (Kim et al. 2010).

## 1.7 Oxidativer Stress

Unter physiologischen Bedingungen ist das Verhältnis von Prooxidantien zu Antioxidantien innerhalb der Zelle ausgeglichen. Durch eine erhöhte Produktion von Sauerstoffspezies oder durch die Abnahme von Antioxidantien verschiebt sich dieses Verhältnis jedoch zugunsten der Prooxidantien. In diesem Fall spricht man von oxidativem Stress, einem Begriff, der von Sies als die Auflösung des prooxidativen zu antioxidativen Gleichgewichts definiert wurde (Sies 1997).

Der Begriff ROS umfasst eine Gruppe freier Radikale, die von Sauerstoff abstammen und zu denen das Superoxidradikalanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxylradikale ( $HO^{\cdot}$ ), Peroxylradikale ( $ROO^{\cdot}$ ), Alkoxyradikale ( $RO^{\cdot}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zählen (Halliwell und Cross 1994). Freie Radikale sind chemische Spezies, die sehr instabil und reaktiv sind und eines oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (Übersichtsartikel von Gulcin 2012). Eine der Hauptquellen für intrazelluläre ROS sind Mitochondrien, in denen 1-2% des Vorkommens an  $O_2$  in ROS umgewandelt wird, vor allem im Bereich der Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette (Ames et al. 1993; Turrens 2003). Superoxidradikalanionen werden durch die SOD zu  $H_2O_2$  umgesetzt, in der Gegenwart von Metallionen wie Eisen ( $Fe^{2+/3+}$ ) können über die Fenton und/oder Haber-Weiss Reaktion (siehe Abbildung 1.4) hochreaktive Hydroxylradikale entstehen, die zelluläre Makromoleküle und die DNA schädigen können (Circu und Aw 2010). Hydroxylradikale sind die reaktivsten aller ROS mit

einer extrem kurzen Halbwertszeit, wodurch sie bereits am Entstehungsort Reaktionen eingehen (sogenannte „site-specificity“) (Diplock et al. 1998).



**Abbildung 1.4:** Eisen-katalysierte Haber-Weiss Reaktion

Neben der mitochondrialen Atmungskette gibt es weitere Quellen für ROS wie den Purinabbau, den Katecholaminstoffwechsel, den Arachidonsäurestoffwechsel, die Detoxifikation von Xenobiotika sowie UV- und ionisierende Strahlung. ROS können nicht nur in den Mitochondrien gebildet werden, sondern auch in Peroxisomen (hier vor allem  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dem endoplasmatischen Retikulum (durch CYP-katalysierte Reaktionen) und an der Plasmamembran (durch NADPH Oxidasen) (Circo und Aw 2010). Zu den physiologischen Funktionen von ROS zählt die Immunabwehr. Phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Granulozyten synthetisieren durch NADPH Oxidasen große Mengen an  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und nutzen dieses zur Tötung von Bakterien („respiratory burst“) (Rice-Evans und Burdon 1993). Des Weiteren konnten regulatorische Funktionen von ROS bei verschiedenen Enzymfunktionen wie z.B. bei CYP und Cyclooxygenasen (COX) gezeigt werden (Rice-Evans und Burdon 1993). ROS können mit zellulären Signalmolekülen interagieren und als second messenger die Regulation zellulärer Funktionen beeinflussen (Sauer et al. 2001). Demgegenüber stehen die weitaus bekannteren pathogenen Effekte von ROS. So sind sie in der Lage Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate sowie Lipide und ungesättigte Fettsäuren zu schädigen (Übersichtsartikel von Gulcin 2012). Ein bekanntes Beispiel ist die Lipidperoxidation, bei der durch den Angriff von ROS auf die Doppelbindung von Phospholipiden eine radikalische Kettenreaktion in Gang gesetzt wird. Zudem können ROS die DNA schädigen und dadurch Apoptose auslösen (Lenaz et al. 2002; Van Houten et al. 2006). ROS sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert, zu den prominentesten zählen die Krebsentstehung, allgemeine Alterungsprozesse und degenerative Erkrankungen (Bertram und Hass 2008).

Durch das Vorhandensein verschiedener Schutzmechanismen können sich Zellen vor der Schädigung durch ROS effektiv schützen und oxidativen Stress vermeiden. So verfügt der menschliche Organismus über eine Reihe natürlicher Antioxidantien, Moleküle, die in der Lage sind die Oxidation anderer Moleküle zu inhibieren. Antioxidative Substanzen können freie Radikale inaktivieren und bereits ablaufende radikalische Kettenreaktionen unterbrechen. Zu den natürlichen Antioxidantien, die über die Nahrung aufgenommen



werden, zählen Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherole (Vitamin E), Carotenoide (Vitamin A), Polyphenole wie Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate. Daneben gibt es zelleigene Antioxidantien wie Glutathion (GSH) und Ubichinon. Ubichinon kann in der reduzierten Form als Ubichinol effektiv die Lipidperoxidation inhibieren (Forsmark et al. 1991). Glutathion wirkt als zelluläres „Redoxsystem“ und hat sowohl eine Funktion als Antioxidans als auch in der Detoxifikation. Reduziertes GSH (biologisch aktive Form) wird bei oxidativem Stress zu reduziertem Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG zeigt unter physiologischen Bedingungen einen deutlichen Überschuss an GSH (etwa 100:1 in der Leber) und verschiebt sich durch oxidativen Stress oder Apoptose zugunsten von GSSG (Meister und Anderson 1983). Als enzymatische Schutzsysteme, die auch als indirekte Antioxidantien bezeichnet werden, besitzt die Zelle NQO1, SOD, GST, Glutathion Peroxidasen (GPx), Haemoxigenase-1, Glutamat Cystein Ligase, Katalase und Thioredoxin (Hu 2011). SOD ist beispielsweise für die Entgiftung von  $O_2^{\cdot-}$  zuständig, wodurch  $H_2O_2$  und Sauerstoff entstehen. Das so gebildete  $H_2O_2$  kann anschließend sowohl über die GPx als auch über die Katalase zu  $H_2O$  entgiftet werden.

## **1.8 Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose**

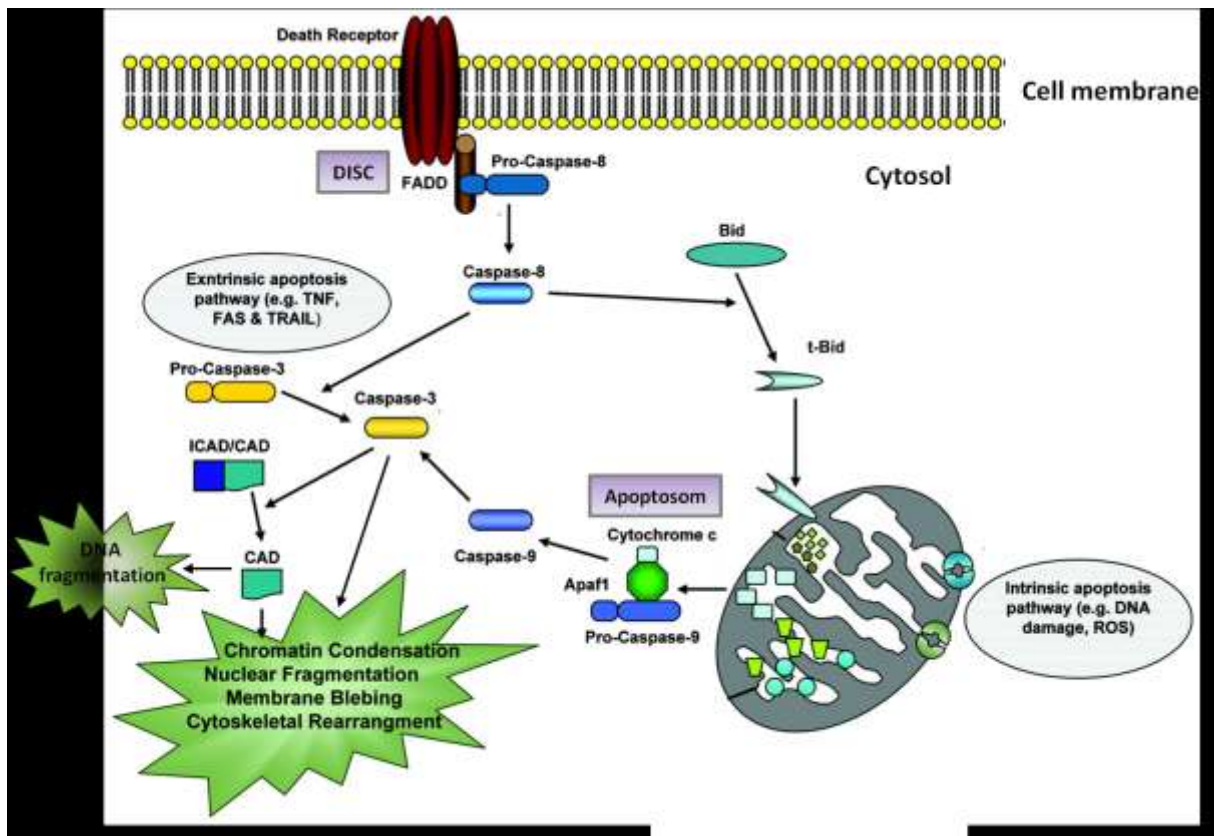
Generell unterscheidet man zwei Arten des Absterbens von Zellen: den pathologischen Zelltod (Nekrose) und den programmierten oder physiologischen Zelltod (Apoptose). Während es sich bei der Nekrose um einen passiven Vorgang handelt, stellt die Apoptose einen aktiven Vorgang dar, der energieabhängig ist. Morphologisch lassen sich beide Arten des Zelltodes dadurch unterscheiden, dass apoptotische Zellen schrumpfen und dann sich apoptotische Körperchen (kleine Vesikel, sogenannte „apoptotic bodies“) bilden, welche unter anderem von Makrophagen phagozytiert werden.

### **1.8.1 Induktion von Nekrose**

Beim nekrotischen Zelltod handelt es sich um einen passiven Vorgang, der eintritt, wenn kein kontrollierter Zelluntergang wie bei der Apoptose mehr stattfinden kann, da die Zellen zu stark geschädigt sind. Ursachen hierfür können Verletzungen des Gewebes aufgrund von Hitzeeinwirkung, Vergiftung oder Strahlung sein. Bei der Nekrose kommt es durch die Schädigung zum Einstrom von  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  Ionen, wodurch die Ionenhomöostase zerstört wird, die einen weiteren Einstrom von Wasser nach sich ziehen. Dadurch schwillt die Zelle soweit an, bis ihre Zellmembran lysiert und der gesamte Inhalt in den Extrazellularraum freigesetzt wird. Als Folge kommt es zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe (Kroemer et al. 1998; Van Cruchten und Van Den Broeck 2002).

### 1.8.2 Induktion von Apoptose

Der Vorgang der Apoptose wurde erstmals 1972 beschrieben (Kerr et al. 1972). Dieser aktive, gesteuerte Prozess kann als terminaler Differenzierungsschritt der Zellen angesehen werden und spielt auch bei physiologischen Vorgängen eine Rolle. Beispiele hierfür gibt es in der menschlichen Embryonalentwicklung, bei der Immunantwort und bei der Gewebshomöostase, bei der die Apoptose die Zellzahl und die Größe von Geweben reguliert. Zusätzlich spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Vernichtung von entarteten oder seneszenten Zellen, ein Vorgang, der in Tumorzellen verloren gegangen ist, wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation dieser Zellen kommt. Charakteristisch für die Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen mit dem sogenannten „membrane blebbing“ (Ausstülpungen auf der Zelloberfläche), die Abschnürung von apoptotischen Körperchen mit intakten Zellorganellen, die Kondensation des Chromatins und die DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen (Caspase-aktivierte DNasen (CAD)), wodurch charakteristische DNA-Fragmente mit einem Vielfachen von 180 Basenpaaren entstehen. Ein weiteres Charakteristikum ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite, wodurch die Membransymmetrie verloren geht. Gleichzeitig dient diese Verlagerung der Erkennung und Beseitigung der apoptotischen Körperchen durch Makrophagen (das Phosphatidylserin fungiert für sie als sogenanntes „eat me“ Signal) (Van Cruchten und Van Den Broeck 2002). Eine entscheidende Rolle im Verlauf der Apoptose kommt den Caspasen zu. Dabei handelt es sich um Cystein-abhängige Proteasen, die die Regulation und Exekution des apoptotischen Zelltodes vermitteln. Sie liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor und müssen erst proteolytisch aktiviert werden, bevor sie ihr Substrat spezifisch hinter Aspartatresten spalten können. In Säugern sind 14 verschiedene Caspasen charakterisiert worden (Nicholson 1999). Man unterscheidet zwischen Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen, letztere benötigen die Aktivierung von Initiatorcaspasen, um das apoptotische Signal weiterleiten zu können. Zu den Initiatorcaspasen zählen die Caspasen 2, 8, 9 und 10, zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7. Diese führen die finalen Schritte der Apoptose aus, indem sie ihre Substrate spalten, zu denen Mediatoren und Regulatoren der Apoptose, Strukturproteine, DNA Reparaturproteine und Proteine des Zellzyklus zählen (Degterev et al. 2003). Zellen können über zwei verschiedene Wege in die Apoptose gehen: den intrinsischen Weg, der über die Mitochondrien vermittelt wird, und den extrinsischen Weg, der durch Todesrezeptoren ausgelöst wird (siehe Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5:** Vereinfachtes Schema der extrinsischen und intrinsischen Apoptose Signalwege (modifiziert nach Ghavami et al. 2009).

Der intrinsische Weg wird als Antwort auf bestimmte Stimuli wie oxidativen Stress (ROS), DNA Schäden, ionisierende oder UV-Strahlung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen sowie Zytostatika ausgelöst (Foo et al. 2005). Charakteristisch für den intrinsischen Weg ist die Beteiligung der Mitochondrien. Die äußere Membran der Mitochondrien wird unter Mitwirkung einiger Proteine der Bcl-2 Familie permeabel, was zum Ausstrom von Cytochrom C in das Zytoplasma führt. Dort wechselwirkt es unter Mitwirkung von dATP mit dem Adapter-Protein Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und der Procaspase 9 und bildet mit beiden das sogenannte Apoptosom (Zou et al. 1999). Dadurch kommt es zur Aktivierung der Caspase 9, die die weitere Aktivierung der Effektorcaspase-Kaskade über die Caspasen 3 und 7 auslöst.

Der extrinsische Weg wird durch Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor ausgelöst. Als Rezeptoren kommen Mitglieder der TNF (tumor necrosis factor) -Rezeptor-Superfamilie wie beispielsweise der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), der Fas-Rezeptor (auch CD95 oder APO-1) und der „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) -Rezeptor infrage. Liganden für diese Todesrezeptoren sind TNF $\alpha$ , FasL oder TRAIL (Ashkenazi und Dixit 1998). Nach der Anlagerung des Adapter-Proteins FADD (Fas associated death domain protein) an den Todesrezeptor, kommt es intrazellulär zur Bildung des DISC (death inducing signalling complex), wodurch die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktiviert werden (Kischkel et al. 1995). Die

aktivierten Caspasen 8 und 10 können ihrerseits die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren und so die Apoptose einleiten. Über die Caspasen 8 und 10 ist auch ein Cross-Talk zum intrinsischen Weg über die Mitochondrien möglich. So kann beispielsweise das Bcl-2 Protein Bid (aktiviert durch Caspase 8) die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien induzieren und damit zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase 9 führen (Rust and Gores 2000). Wie in Abbildung 1.5 gezeigt, entscheidet das Vorhandensein an aktivierter Initiatorcaspase 8 über welchen Weg (extrinsisch vs. intrinsisch) die Caspase-Kaskade ausgelöst wird (Barnhart et al. 2003).

## 1.9 Zellzyklus

Für die Verdopplung von Zellen ist eine spezifische Abfolge von Schritten nötig, die Zellzyklus genannt wird. Er gliedert sich in die vier Phasen  $G_1$ , S und  $G_2$  (als Interphase bezeichnet) und die M- (Mitose) Phase. Alle Phasen unterliegen exakten Kontrollmechanismen um sicherzustellen, dass sie in der richtigen Reihenfolge ablaufen, dass eine Phase beendet ist, bevor die nächste anfängt und dass eine geschädigte Zelle nicht ungehindert weiter proliferieren darf. Eine Beeinträchtigung dieser Regulationsmechanismen stellt einen wichtigen Aspekt in der Krebsentstehung dar.

Für die Regulation des Zellzyklus, der zwischen 20 und 24 Stunden dauert, sind im Wesentlichen 3 Proteinfamilien verantwortlich. Zu ihnen zählen Cyclin-abhängige Kinasen (cyclin dependent kinase, CDK), Cycline und Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (cyclin dependent kinase inhibitors, CKIs) (Gillett und Barnes 1998). CDKs werden nur dann aktiviert, wenn die Konzentration an Cyclinen hoch genug ist. In diesem Fall bilden beide Partner einen Komplex, der den Eintritt in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus steuert. Die Konzentration an Cyclinen variiert im Laufe des Zellzyklus. Erreicht sie ein Maximum, interagiert sie mit den entsprechenden CDKs und stellt somit einen Kontrollpunkt im Zyklus dar. Anschließend kommt es zur Degradation der Cycline, damit die Zelle in die nächste Phase eintreten kann.

Die erste Phase der Interphase, die sich an die Mitose anschließt, bildet die  $G_1$ -Phase (g für „gap“, engl. = Lücke). Diese Phase zeichnet sich durch Zellwachstum und Bildung von Zellkompartimenten wie Zytoplasma und Zellorganellen aus. Gleichzeitig bereitet sie die Zelle auf die anschließende S-Phase vor, indem nötige Komponenten synthetisiert und bereitgestellt werden. Fehlerhafte DNA kann in dieser Phase repariert werden. Ein entscheidendes Charakteristikum während eines späten Zeitpunktes dieser Phase ist der Restriktionspunkt (point of no return oder R-point). An diesem Kontrollpunkt wird entschieden, ob die Zelle die weiteren Phasen durchläuft oder in die  $G_0$ -Phase (Arrest) eintritt und sich differenziert (z.B. wenn nicht ausreichend Wachstumsfaktoren vorhanden sind). Durch entsprechende Stimuli können Zellen aus der  $G_0$ -Phase erneut in den Zellzyklus

eintreten. Ein Beispiel hierfür stellen langsam proliferierende Hepatozyten dar, die nach operativer Entfernung von Teilen der Leber wieder proliferieren können (Gillett und Barnes 1998). In der darauf folgenden Synthese Phase (S-Phase) findet die Replikation der DNA statt. Die Zellen, die nun jeweils zwei Chromatiden pro Chromosom besitzen, gehen anschließend in die G<sub>2</sub>-Phase. Hier werden die in der G<sub>1</sub>-Phase produzierten Komponenten (v.a. Proteine) prozessiert, um sich auf die Mitose-Phase vorzubereiten. Die Mitose ist die eigentliche Zellteilung. Bevor die Zellen jedoch in die Mitose eintreten können, müssen sie einen weiteren Kontrollpunkt am Ende der G<sub>2</sub>-Phase durchlaufen. Hier werden DNA Schäden registriert und im besten Fall repariert. Ist der Schaden jedoch zu groß, können die Zellen sowohl am Restriktionspunkt als auch an diesem Kontrollpunkt in die Apoptose geführt werden (Gillett und Barnes 1998). Einen Einfluss darauf hat unter anderem das Tumorsuppressorgen p53, das auch als Wächter des Genoms bezeichnet wird. Als Antwort auf eine Schädigung der DNA wie beispielsweise durch ionisierende oder UV-Strahlung wird p53 aktiviert und induziert dann die Expression von p21, einem Zellzyklusinhibitor der zur Familie der CKIs gehört (el-Deiry et al. 1994). Über ein Zusammenspiel von p21 mit CDKs und Cyclinen kommt es dann zum Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase.

### **1.10 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans***

Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* ist ein freilebender etwa 1 mm langer Erdnematode. Er wurde aufgrund vieler Vorteile und seiner einfachen genetischen Modulierbarkeit von Sidney Brenner in die wissenschaftliche Welt eingeführt (Brenner 1974). Zu den Vorteilen dieses multizellulären Organismus (959 somatische Zellkerne beim Hermaphrodit, 1031 Zellkerne beim Männchen) gehören die kurze Lebensspanne (ca. drei Wochen), die einfache Kultivierung in großer Zahl unter Laborbedingungen und die kurze Generationszeit mit einer hohen Anzahl an Nachkommen (bis zu 300 Individuen). Zudem verfügt *C. elegans* mit etwa 97 Megabasenpaaren und ca. 19000 Genen über ein kompaktes Genom, welches seit 1998 komplett entschlüsselt ist (*C. elegans* Sequencing Consortium (1998)). Weitere Vorteile sind der invariable Zellstammbaum von der Zygote bis zum adulten Tier und die große Homologie zu Säugern in grundlegenden zellulären Prozessen. Durch molekularbiologische und genetische Manipulationen lassen sich leicht transgene und mutante Stämme von *C. elegans* herstellen. Durch neuere Techniken wie die RNA vermittelte Interferenz (RNAi) können zudem gezielt Gene stumm geschaltet werden, indem die genspezifischen Transkripte abgebaut werden (Fire et al. 1998). Durch seine Transparenz kann der Nematode (als lebendes Präparat) auf zellulärer Ebene mikroskopiert werden. Somit lässt sich beispielsweise der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Ausbildung einzelner Organe wie der Vulva mikroskopisch untersuchen.

Der einfache Bauplan beinhaltet eine äußere Hülle bestehend aus Kutikula, Hypodermis, Neuronen und Muskeln. Im Inneren befinden sich die Leibeshöhle, die mit Flüssigkeit gefüllt ist, der Darm und die Gonaden. Der Nematode tritt in zwei Geschlechtern auf, als selbstbefruchtender Hermaphrodit (XX) und als Männchen (X0). Die Population an Männchen entsteht durch spontanen Verlust des X-Chromosoms („non-disjunction“) während der Meiose, sie ist jedoch sehr gering (0,1%). Ein Hermaphrodit lebt unter Laborbedingung durchschnittlich drei Wochen und produziert etwa 300 Embryonen. Während des Lebenszyklus durchläuft der Wurm 4 Larvalstadien (L1 bis L4) und entwickelt sich innerhalb von 50 Stunden zum Adulten. Ein besonderes Merkmal ist die Fähigkeit die normale Larvalentwicklung unterbrechen zu können und in ein Dauerstadium überzugehen. Unter ungünstigen Umweltbedingungen wie Nahrungskarenz, Hitzestress oder zu hohe Populationsdichte können L2 Larven in dieses bis zu sechsmonatige Dauerstadium eintreten. Verbessern sich die Bedingungen, so setzt die Dauerlarve ihre Entwicklung mit dem L4 Stadium fort und durchläuft anschließend den Lebenszyklus eines normalen adulten Tieres (Schierenberg und Cassada 1986).

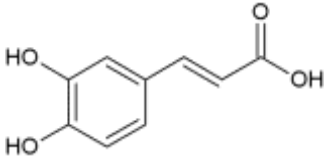
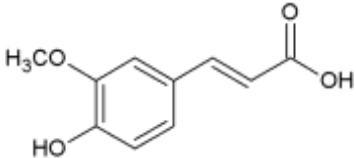
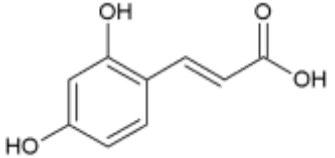
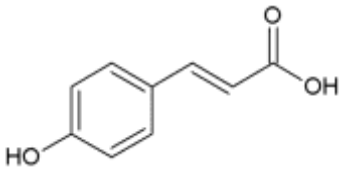
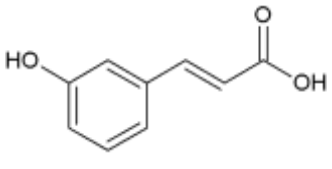
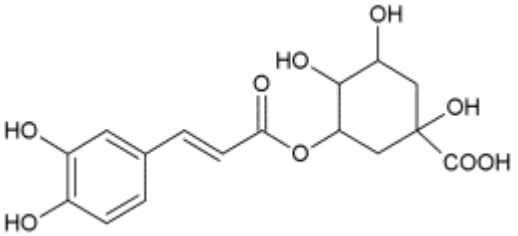
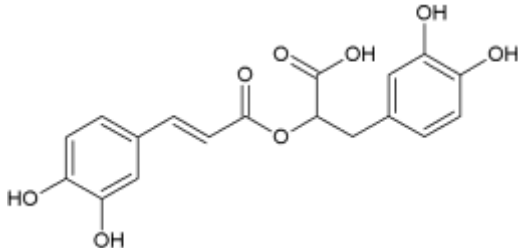
In der Forschung wird der Nematode vor allem im Bereich der Genomics, Zellbiologie, Neurowissenschaften und Alterung eingesetzt. Speziell zur Aufklärung von Prozessen der Alterung war der Einsatz von *C. elegans* hilfreich, so konnten viele Gene, die im Zusammenhang mit Alterung stehen (sogenannte Gerontogene) gefunden werden (Finch und Ruvkun 2001; Johnson et al. 2002). Der Nematode eignet sich aufgrund der kurzen Lebensdauer hervorragend zur Untersuchung der Einflüsse von Pharmaka oder Naturstoffen auf seine Lebensspanne. So konnte für einige Flavonoide wie Quercetin (Kampkötter et al. 2008; Saul et al. 2008; Surco-Laos et al. 2011), EGCG (Abbas und Wink 2009) und Resveratrol (Wood et al. 2004) eine Verlängerung der Lebensspanne gezeigt werden. Zusätzlich war Quercetin in der Lage das intrazelluläre ROS-Level zu senken sowie die zelluläre Signaltransduktion zu modulieren, was zu einer erhöhten Stressresistenz in *C. elegans* führte (Kampkötter et al. 2007).

### 1.11 Verwendete Substanzen

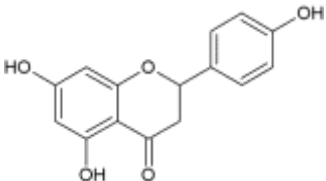
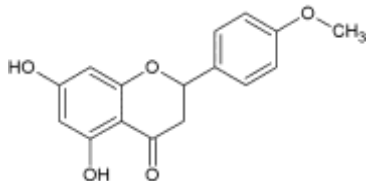
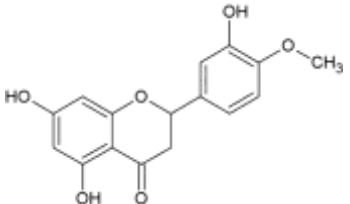
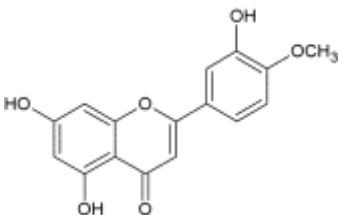
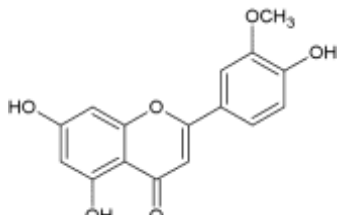
Bei den in dieser Arbeit getesteten Substanzen handelt es sich um verschiedene Gruppen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, genauer um Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonoide und Isothiocyanate. Eine Übersicht über alle verwendeten Substanzen bieten die Tabellen 1.2 bis 1.6. Bei den Flavonoiden wurden Vertreter aus der Klasse der Flavanone (Naringenin, Isosakuranetin und Hesperetin) und der Flavone (Diosmetin und Chrysoeriol) getestet. Weiterführende Untersuchungen fanden mit acht Substanzen aus der Klasse der Flavonole statt. Dabei wurden die beiden Flavonole Quercetin und Myricetin als Leitsubstanz ausgewählt. Für die Erstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR = structure activity

relationship) wurden zusätzlich modifizierte Derivate verwendet, die an verschiedenen Positionen im A- und vor allem im B-Ring methyliert waren. Hierbei lag das Augenmerk auf dem Einfluss der Methylierung auf das antioxidative Potential, die Toxizität und die zelluläre Aufnahme dieser Verbindungen im Vergleich zur Leitsubstanz. Bei der Klasse der Isothiocyanate kam Sulforaphan als Ausgangssubstanz zum Einsatz. Die verwendeten Analoga Berteroin, Erucin und Erysolin waren entweder in der Anzahl der C-Atome oder im Oxidationszustand des Schwefels modifiziert und dienten ebenfalls zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

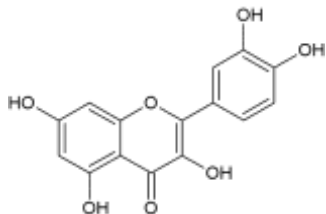
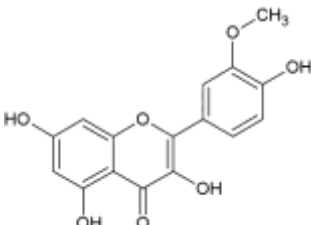
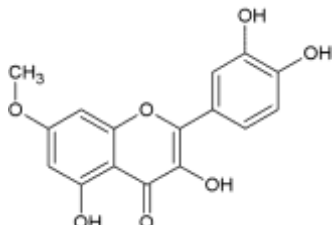
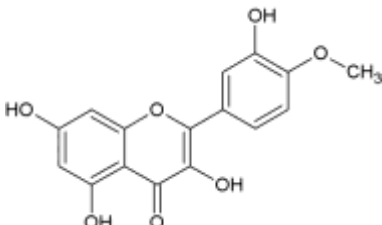
**Tabelle 1.2:** Strukturformeln, Summenformeln und Molekulargewichte der verwendeten Hydroxyzimtsäurederivate

<p><b>Kaffeesäure</b></p> <p><math>C_9H_8O_4</math> MW: 180,2 g/mol</p> 	<p><b>Ferulasäure</b></p> <p><math>C_{10}H_{10}O_4</math> MW: 194,2 g/mol</p> 	<p><b>2,4-Dihydroxyzimtsäure</b></p> <p><math>C_9H_8O_4</math> MW: 180,2 g/mol</p> 
<p><b>p-Coumarsäure</b></p> <p><math>C_9H_8O_3</math> MW: 164,2 g/mol</p> 	<p><b>m-Coumarsäure</b></p> <p><math>C_9H_8O_3</math> MW: 164,2 g/mol</p> 	
<p><b>Chlorogensäure</b></p> <p><math>C_{16}H_{18}O_9</math> MW: 354,3 g/mol</p> 		<p><b>Rosmarinsäure</b></p> <p><math>C_{18}H_{16}O_8</math> MW: 360,3 g/mol</p> 

**Tabelle 1.3:** Strukturformeln, Summenformeln und Molekulargewichte der verwendeten Flavonoide

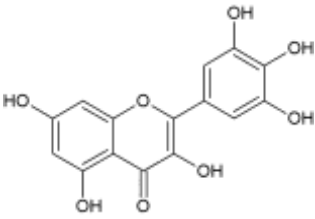
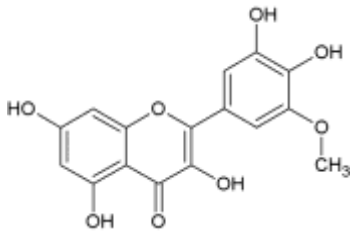
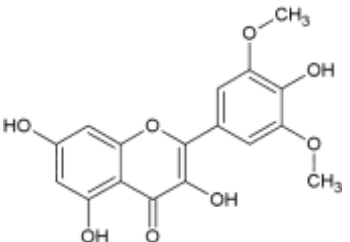
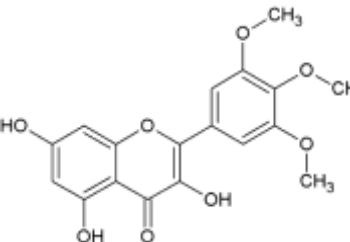
<p><b>Naringenin</b></p> <p><math>C_{15}H_{12}O_5</math> MW: 272,3 g/mol</p> 	<p><b>Isosakuranetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{14}O_5</math> MW: 286,3 g/mol</p> 	<p><b>Hesperetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{14}O_6</math> MW: 302,3 g/mol</p> 
<p><b>Diosmetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_6</math> MW: 300,3 g/mol</p> 	<p><b>Chrysoeriol</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_6</math> MW: 300,3 g/mol</p> 	

**Tabelle 1.4:** Strukturformeln, Summenformeln und Molekulargewichte von Quercetin und dessen methylierten Derivaten

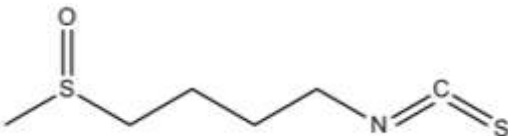
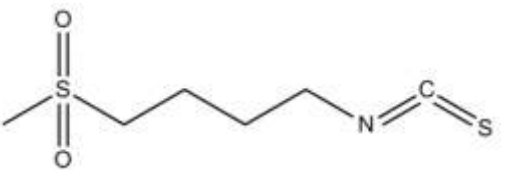


	<p><b>Quercetin</b></p> <p><math>C_{15}H_{10}O_7</math> MW: 302,2 g/mol</p> 	
<p><b>Isorhamnetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_7</math> MW: 316,3 g/mol</p> 	<p><b>Rhamnetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_7</math> MW: 316,3 g/mol</p> 	<p><b>Tamarixetin</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_7</math> MW: 316,3 g/mol</p> 



**Tabelle 1.5:** Strukturformeln, Summenformeln und Molekulargewichte von Myricetin und dessen methylierten Derivaten

	<p><b>Myricetin</b></p> <p><math>C_{15}H_{10}O_8</math> MW: 318,2 g/mol</p> 	
<p><b>Laricitrin</b></p> <p><math>C_{16}H_{12}O_8</math> MW: 332,3 g/mol</p> 	<p><b>Syringetin</b></p> <p><math>C_{17}H_{14}O_8</math> MW: 346,3 g/mol</p> 	<p><b>Myricetin-Trimethylether</b></p> <p><math>C_{18}H_{16}O_8</math> MW: 360,3 g/mol</p> 

**Tabelle 1.6:** IUPAC-Namen, Strukturformeln, Summenformeln und Molekulargewichte der verwendeten Isothiocyanate

<p><b>Sulforaphan</b></p> <p>1-Isothiocyanato-4-methylsulfinylbutan</p> <p><math>C_6H_{11}NOS_2</math> MW: 177,3 g/mol</p> 	<p><b>Erysolin</b></p> <p>1-Isothiocyanato-4-methylsulfonylbutan</p> <p><math>C_6H_{11}NO_2S_2</math> MW: 193,3 g/mol</p> 
<p><b>Berteroin</b></p> <p>1-Isothiocyanato-5-methylsulfonylpentan</p> <p><math>C_7H_{13}NS_2</math> MW: 175,3 g/mol</p> 	<p><b>Erucin</b></p> <p>1-Isothiocyanato-4-methylsulfonylbutan</p> <p><math>C_6H_{11}NS_2</math> MW: 161,3 g/mol</p> 

## 1.12 Zielsetzung

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, zu denen die Substanzklassen der Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonoide und Isothiocyanate gehören, kommen ubiquitär in pflanzlichen Nahrungsmitteln vor und werden daher häufig mit der Nahrung aufgenommen. In epidemiologischen Studien korrelierte ein hoher Verzehr von Obst und Gemüse mit einer verringerten Inzidenz an degenerativen Erkrankungen und Krebs. Daher besteht ein gesteigertes Interesse an den in der Ernährung vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, was sich unter anderem am immer größer werdenden Markt an NEM auf Basis dieser Inhaltsstoffe zeigt. Die Einnahme von hohen Dosen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, wie sie in NEM vorkommen, ist bisher kaum untersucht und es gibt nur wenige Informationen zur Wirksamkeit und Produktsicherheit. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf der Erfassung der biologischen Wirksamkeit verschiedener Vertreter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe wie Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonoide und Isothiocyanate. Da der Darm das Organ des Erstkontaktes mit Nahrungsbestandteilen darstellt, wurden Kolonkarzinomzellen (Hct116 und Caco-2) als Modell zur Untersuchung der zellulären Effekte der Polyphenole und Isothiocyanate ausgewählt. Zusätzlich wurden Experimente in Hepatomzellen (HepG2 und H4IIE) sowie dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* durchgeführt.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide im zellfreien System mittels TEAC Assay sowie deren Einfluss auf die zelluläre ROS Konzentration in Hct116 Zellen und in *C. elegans* mithilfe eines DCF Assays. Neben dem antioxidativen Potential wurden zytotoxische Effekte dieser Substanzen in verschiedenen Zelllinien untersucht. Das Hauptaugenmerk lag auf mechanistischen Untersuchungen zur Aufnahme der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide in Kolonkarzinom- und Hepatomzellen. Zusätzlich sollten die intestinale und hepatische Metabolisierung der Substanzen betrachtet werden. Bei der Substanzklasse der Flavonoide wurde spezifisch der Einfluss einer Methylierung im B-Ring anhand von methylierten Quercetin- und Myricetin-Derivaten untersucht. Neben der Analyse der intrazellulären Gehalte mittels HPLC bestand das Ziel der Etablierung einer einfachen und schnellen Methode zum Nachweis der intrazellulären Aufnahme von Flavonoiden. Hierzu wurde der Fluoreszenzverstärker NSRA gewählt, der durch Komplexbildung mit Flavonoiden diese fluoreszenzmikroskopisch sichtbar macht.

Im zweiten Teil der Arbeit lag das Augenmerk auf den zellulären Effekten von vier ausgewählten Isothiocyanaten. Dazu sollte das antioxidative bzw. prooxidative sowie zytotoxische Potential dieser Substanzen in Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Weiterführend sollten die molekularen Mechanismen des Zelltodes aufgeklärt werden.

## **2. Material**

### **2.1 Zelllinien**

Hct116	humane Kolonkarzinomzellen (Fogh et al. 1977a)
Caco-2	humane Kolonkarzinomzellen (Fogh et al. 1977b)
HepG2	humane Hepatomzellen (Knowles et al. 1980)
H4IIE	Hepatomzellen der Ratte (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
MEM	+ 20 % FCS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### **2.3 Lösungen und Puffer**

Annexin V-Bindungspuffer	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,4
Assay-Puffer (Caspase)	55 mM HEPES pH 7,4, 110 mM NaCl, 110 µM EDTA, 0,1% CHAPS, 0,1 M DTT, 10% Glycerin, Lagerung 4°C
Bleiche-Lösung ( <i>C. elegans</i> )	50% Natriumhypochlorit [13 % Cl-Ionen]; 50% 5 M Natriumhydroxid
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)	6,2 ml Zellkulturmedium + 1 ml DMSO
H <sub>2</sub> DCF-DA Stocklösung	100 mM H <sub>2</sub> DCF-DA in DMSO
HBSS-Puffer	138 mM NaCl, 5,33 mM KCl, 0,34 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,44 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 5,56 mM Glukose, 4,17 mM NaHCO <sub>3</sub>
Isothiocyanat-Stocklösung	100 mM Isothiocyanate in DMSO
Lösung A ( <i>C. elegans</i> )	0,5 g Cholesterin, 100 ml 96% EtOH
Lösung B ( <i>C. elegans</i> )	27,8 g CaCl <sub>2</sub> ad 250 ml mit dH <sub>2</sub> O
Lösung C ( <i>C. elegans</i> )	30,1 g MgSO <sub>4</sub> ad 250 ml mit dH <sub>2</sub> O
Lösung D ( <i>C. elegans</i> )	27,08 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,90 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 250 ml mit dH <sub>2</sub> O
Lyse-Puffer (Caspase)	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 µM EDTA, 0,1% CHAPS, 0,1% 1 M DTT, Lagerung 4°C
Lyse-Lösung (Comet)	2,5 M NaCl, 100 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Laurylsarkosinat, pH 10,0
Lyse-Gebrauchslsg. (Comet)	89 ml Lyselösung, 1 ml Triton X-100, 10 ml DMSO
Lyse-Puffer (DNA-Leiter)	10 ml TrisHCl (1 M, pH 8,0), 30 ml 20% [w/v] SDS, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l, Lagerung 4°C
Lyse-Puffer (Zellzyklus)	15 mM Tris, 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 0,5 mM Spermintetrahydrochlorid, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% [v/v] Triton X-100; auf pH 7,5 einstellen (mit 1 N HCl), Zugabe von 15 mM β-Mercaptoethanol, filtrieren (0,2 µm), Lagerung 4°C
MTT-Lösung	5 mg/ml in dH <sub>2</sub> O, Lagerung 4°C
M9 Puffer ( <i>C. elegans</i> )	6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 g NaCl, 0,25 g MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O ad 1 L mit dH <sub>2</sub> O, autoklavieren
Na-Acetat (DNA-Leiter)	29,5 % Eisessig in dH <sub>2</sub> O, mit NaOH auf pH 4,8
NaCl-Lösung (DNA-Leiter)	5 M NaCl
Naturstoffreagenz A Stocklsg.	5% [w/v] Naturstoffreagenz A in DMSO, Lagerung 4°C

NGM-Agar ( <i>C. elegans</i> )	3 g NaCl, 2,5 g Soja-Pepton, 20 g Bacto-Agar ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O, autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C Zugabe von 1 ml Lsg. A, 0,5 ml Lsg. B, 1 ml Lsg. C, 25 ml Lsg. D
NGM flüssig ( <i>C. elegans</i> )	3 g NaCl, 2,5 g Soja-Pepton ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O, autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C Zugabe von 1 ml Lsg. A, 0,5 ml Lsg. B, 1 ml Lsg. C, 25 ml Lsg. D
NGM-BSA (10x) ( <i>C. elegans</i> )	10 g BSA, 500 µl 100 mg/ml Streptomycin ad 100 ml mit NGM, sterilfiltrieren
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>
PBST	0,1% Tween 20 in PBS
Phenol-Chloroform (DNA-Leiter)	250 µl Chloroform, 500 µl Rotiphenol
Polyphenole-Stocklösungen	100 mM Polyphenole in DMSO
Propidiumiodid	1 mg/ml in dH <sub>2</sub> O, Lagerung 4°C
RNAse A	10 mg RNAse A in 1 ml Wasser, sterilfiltrieren, 15 min bei 90°C denaturiert, Lagerung in Aliquots bei -20°C
SDS 10% [w/v]	100 g SDS ad 1 l dH <sub>2</sub> O, unter Rühren lösen
Stabilisierungslösung	Acetonitril + 2,5% Ameisensäure
TEAC-Lösung	14 mM ABTS, 4,9 mM APS
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
TE - Puffer	10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0
Tris HCl pH 8,0	0,1 M Trizma <sup>®</sup> -Base

## 2.4 Chemikalien und Kits

2-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
6x Loading dye (green)	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
ABC-Transporter Assay Kit	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
ABTS	Sigma	Steinheim, Deutschland
Acetonitril	Merck	Darmstadt, Deutschland
Acridinorange	Sigma	Steinheim, Deutschland
Agarose Neo Ultra	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Annexin-V FITC	Invitrogen	Heidelberg, Deutschland
APO-ONE <sup>®</sup> Homogenous Caspase-3/-7 Assay-Kit	Promega	Madison, Wisconsin, USA
Ascorbinsäure	Sigma	Steinheim, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad	München, Deutschland
Borsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
BSA Proteinstandard	Calbiochem	San Diego, Kalifornien / USA
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Caspase-Substrate	ICN Biomedicals	Irvine, Kalifornien, USA
CHAPS	Fluka	Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck	Darmstadt, Deutschland
Cytotoxicity Detection KitPlus (LDH)	Roche	Mannheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland

DMEM (farblos)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
DMEM ( <i>high glucose</i> , L-Glutamin, Phenolrot)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol	Sigma	Steinheim, Deutschland
EDTA	MP Biomedicals	Solon, Ohio / USA
Essigsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	VWR	Darmstadt, Deutschland
FCS gold	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Formaldehyd 37% [v/v]	Roth	Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerol ( $\geq 99,5$ %)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> DCF-DA	Sigma	Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma	Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdisulfit	Merck	Darmstadt, Deutschland
LMP-Agarose	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Lucifer Yellow	Sigma	Steinheim, Deutschland
MEM (L-Glutamin, Phenolrot)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Methanol ultrapur	VWR	Darmstadt, Deutschland
MTT	Sigma	Steinheim, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma	Steinheim, Deutschland
Naturstoffreagenz A	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natrium-EDTA	Sigma	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsarkosinat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma	Steinheim, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumvanadat	Merck	Darmstadt, Deutschland
nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Octanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Paraquat	Sigma	Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Phenol (Rotiphenol®)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
RNAse A	Serva	Heidelberg, Deutschland
rrTNF- $\alpha$	R&D Systems	Minneapolis, Minneapolis / USA
Salzsäure 37% [v/v]	Merck	Darmstadt, Deutschland
SDS	Serva	Heidelberg, Deutschland
Spermintetrahydrochlorid	Sigma	Steinheim, Deutschland
TrisHCl	MP Biomedicals	Solon, Ohio / USA
Triton X-100	Sigma	Steinheim, Deutschland
Trizma-Base	Sigma	Steinheim, Deutschland
Trolox	Calbiochem	San Diego, Kalifornien / USA
Trypsin (0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA-HNa)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	MP Biomedicals	Solon, Ohio / USA
Wasserstoffperoxid 30%	Roth	Karlsruhe, Deutschland

## 2.5 Geräte

Durchflusszytometer	Accuri C6, Accuri
Eismaschine	Icematic F90, Compact Electronics
Elektrophorese-Kammern	Pequlab
	DNA SubCell, Bio Rad
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, Zeiss
	Axiovert 40 CFL, Zeiss
	Olympus BX43, Olympus
Geldokumentationsanlage	BIO-RAD
Heizblock	Ori-Block® DB-3, Techne
	Dry Bath System, Starlab
HPLC-DAD	
Pumpe	P 580, Dionex
Probengeber	ASI-100, Dionex
Detektor	UVD 340 S, Dionex
Säulenofen	STH585, Dionex
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer (5 µM, 125 x 4 mm)
HPLC-DAD (= HPLC 2)	
Pumpe	LaChrom L-7100, Merck-Hitachi
Probengeber	LaChrom Elite L-2200, Merck-Hitachi
Detektor	LaChrom L-7450, Merck-Hitachi
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer (5 µM, 125 x 4 mm)
Inkubator	Binder
inverses Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Kamera Fluoreszenzmikroskop	CoolSNAP-Pro (INAS), Zeiss
	Axio Cam ICm1, Zeiss
	Olympus XC 10
LC-MS	
HPLC	HP 1100, Agilent
Detektor	G1315 B DAD 1100, Agilent
Injektor	G1313 A ALS 1100, Agilent
Säule	Eurosphere 100-C18, Knauer
Massenspektrometer	Finnigan LCQ Deca, Thermoquest
Vakuumpumpe	Edwards 30, BOC
pH - Meter	Radiometer Copenhagen PHM 93
Photometer	Lambda 25 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer
	Lambda 12 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer
	NanoVue plus, GE Healthcare
Plattenlesegerät	Wallac Victor 1420, Perkin Elmer
	Infinite f200, Tecan
	Sunrise Multiplate Absorbance Reader, Tecan
Power Supply	E143, Consort
	EV231, Consort
	E835, Consort
Rührer	Heidolph MR2002
Schüttler	Swip, Edmund Bühler
	Roto-Shake Genie, Scientific Industries
Spektrofluorometer	Horiba Scientific Fluoromax-4
Sterilbänke	Jouan IC2.12
	Gelaire BSB4
	Hera safe, Thermo Scientific
Thermoprinter	Mitsubishi P91
Ultraschallbad	Branson 2210, Branson

Ultraschallstab	B. Braun Labsonic 1510, 100 Watt
Volt-Ohm-Meter	WPI, Sarasota
Waage	Sartorius 3716MP Sartorius Analysenwaage MC1
Wasserbad	Kern ABS W22, Mendingen Thermomix 1420, B. Braun Certomat WR, B. Braun Köttermann
Wasser-Deionisierungsanlage	Milli-Q Advantage A10, Millipore
Zentrifugen	Hettich universal 30F Eppendorf 5415R Beckman Microfuge R Beckman Coulter Avant J – 25 Hettich R 24 – 48 Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific

## 2.6 Computersoftware

Axio Vision	Zeiss
Cell Sense	Olympus
CFlow Plus Software	Accuri
Comet Score	
Endnote X1	Thomson Reuters
GraphPad Prism 5	GraphPad
HPLC-DAD	Chromeleon 6.30
LC-MS	Xcalibur, Version 1.3
UV-Winlab	Perkin Elmer
Quantity One 4.1.0	Bio Rad
Wallac 1420 Workstation	Perkin Elmer

## 2.7 Sonstige Materialien

HPLC-Zubehör	Macherey-Nagel
Membranfilter	Porengröße 0,2 µm und 0,4 µm, Sartorius
Reaktionsgefäße	SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml, Sarstedt Safe Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf
SPE-Säulen	Macherey-Nagel
Zählkammer (Neubauer)	Welabo
Zellkulturmaterialien	Cellstar, Greiner bio-one Falcon, Becton Dickinson

### **3. Methoden**

#### **3.1 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien Hct116 und Caco-2 (beides humane Kolonkarzinomzellen) sowie HepG2 (humane Hepatomzellen) und H4IIE (Hepatomzellen der Ratte) erfolgte bei 37°C in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub>. Als Kulturmedium wurde bei allen Zelllinien (mit Ausnahme von Caco-2) DMEM high glucose komplettiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Caco-2 Zellen wurden in MEM mit 20% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 1% nicht essentiellen Aminosäuren kultiviert.

Hct116 Zellen wurden mit einer Dichte von 1-1,5x10<sup>6</sup> Zellen pro T75 Kulturflasche ausgesät, HepG2, H4IIE und Caco-2 mit einer Dichte von 2-3x10<sup>6</sup> Zellen. Die Subkultivierung erfolgte zweimal wöchentlich bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80%. Dazu wurden die Zellen zuerst lichtmikroskopisch auf Kontamination, Morphologie und Viabilität untersucht. Dann wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen für 2-5 min mit 3 ml einer 0,5% Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 8 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 560 rpm zentrifugiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit 100 µl dieser Zellsuspension nach einer 1:10 Verdünnung in einer Neubauer Zählkammer. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation mit Medium auf 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und für die entsprechenden Experimente verwendet.

#### **3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben von den Kulturflaschen abgelöst und auf 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml mit Zellkulturmedium eingestellt. 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden mit 0,6 ml einer Mischung aus 6,2 ml Medium und 1 ml DMSO versetzt und in Kryoröhrchen gefüllt. Nach 15 min auf Eis wurden die Kryoröhrchen zuerst 2 h bei -20°C eingefroren und anschließend dauerhaft bei -80°C gelagert.

Nach zügigem Auftauen der Kryoröhrchen wurde die flüssige Zellsuspension in eine T75 Kulturflasche mit 20 ml Kulturmedium pipettiert. Nach 24 h Anwachszeit erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **3.3 Inkubation und Schädigung der Zellen**

Für die entsprechenden Versuche wurden die Zellen in 96-Wellplatten, 6-Wellplatten, 35 mm Schalen oder 60 mm Schalen ausgesät. Die jeweils verwendete Zellzahl ist den einzelnen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen. Die Anwachszeit der Zellen betrug mindestens 24 h, bei einigen Experimenten wurde sie auf 48 h ausgedehnt. Inkubiert wurden die Zellen



für 6 h, 24 h, 48 h oder 72 h in Medium, das mit der entsprechenden Konzentration an Noxen versetzt wurde. Je nach Versuch wurde entweder konditioniertes Medium (Aufnahmestudien) oder frisches Zellkulturmedium verwendet. Die verwendeten Noxen wurden zuvor in DMSO gelöst und bei 4°C oder -20°C gelagert. Bei allen Experimenten wurde DMSO als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

### **3.4 Antioxidatives Potential (TEAC Assay)**

Der „trolox equivalent antioxidative capacity“ (TEAC) Assay dient als zellfreier Nachweis radikalfangender Eigenschaften von Substanzen (Re et al. 1999). Das Prinzip dieser Nachweisreaktion ist die reduktive Umsetzung eines stabilen, grünen Radikals durch ein Antioxidans. Durch diese Reduktion wird die farbige Lösung entfärbt und kann photometrisch quantifiziert werden. Bei Substanzen ohne antioxidative Eigenschaften kommt es nicht zur Entfärbung der radikalischen Versuchslösung. Somit dient die Entfärbung der Radikallösung als Maß für die antioxidative Kapazität einer Substanz. Als Referenzsubstanz dient das synthetische Vitamin E Derivat Trolox.

Die radikalische Versuchslösung wurde am Vortag aus einer 1:1 Mischung aus 4,9 mM APS und 14 mM ABTS angesetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Absorption dieser Lösung bei 734 nm wurde mit Ethanol auf 1,4 eingestellt. Die Referenz- und Testsubstanzen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 25 µM getestet, indem 500 µl der Versuchslösung mit 500 µl der Substanzen gemischt wurden. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde über 2 min im Photometer bei 734 nm gemessen.

### **3.5 Anti- und prooxidatives Potential (DCF Assay)**

Im Zellkultursystem wurde die im TEAC Assay getestete antioxidative Kapazität der Testsubstanzen mittels DCF Assay verifiziert. Dieser wurde zum einen im 96-Wellformat im Plattenlesegerät und zum anderen bei ausgewählten Proben im Durchflusszytometer durchgeführt. Der Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte in diesem Assay über die Fluoreszenzsonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Burow und Valet 1987). Durch die Acetylierung der beiden polaren Hydroxylgruppen wird das nicht-fluoreszierende Molekül lipophiler und kann rasch die Zellmembran passieren. Im Zytosol erfolgt durch Esterasen eine Deacetylierung und somit die Freisetzung des H<sub>2</sub>DCF, welches die Membran nur noch schwer passieren kann und im Zytosol akkumuliert. Die in der Zelle entstehenden ROS oxidieren das nicht fluoreszierende H<sub>2</sub>DCF zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF). Die gemessene Fluoreszenzintensität ist ein Maß für den intrazellulären Gehalt an ROS. Da die Fluoreszenzsonde lichtempfindlich ist, fanden (soweit möglich) alle Arbeiten mit der Sonde unter dunklen Lichtverhältnissen statt.

Für den DCF Assay wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen (Hct116 und H4IIE) in 96-Wellplatten ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Um antioxidative Effekte der verwendeten Substanzen zu testen, wurden die Zellen für 4 h mit diesen in farblosem DMEM vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in farblosem Medium für 30 min. Um die Bildung von ROS zu induzieren, wurden die Zellen vor der Messung für 1 h mit  $750 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Die entstehende Fluoreszenz wurde über 2 h bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm am Spektrophotometer gemessen.

Für die Messung von prooxidativen Eigenschaften erfolgte die Inkubation mit den zu testenden Substanzen für 2 h in farblosem DMEM (96-Wellplatten). Anschließend wurden die Zellen mit  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in farblosem Medium für 30 min inkubiert und unmittelbar danach im Plattenlesegerät fluorimetrisch gemessen. Auf die Induktion der ROS Bildung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde in diesem Ansatz verzichtet.

Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte mit Hct116 Zellen. Diese wurden in 6-Well in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well ausgesät, 24 h anwachsen gelassen und dann für 4 h mit den Testsubstanzen in serumfreien DMEM inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für 15 min mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  inkubiert. Danach erfolgte nach einem weiteren Waschschrift eine einstündige Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um die Bildung von ROS zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in einem definierten Volumen PBS aufgenommen und bis zur Messung im Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Pro Probe wurden 20000 counts mit mittlerer Geschwindigkeit gemessen.

Für die Messung prooxidativer Eigenschaften verschiedener Testsubstanzen im Durchflusszytometer wurden die Hct116 Zellen für 1 h mit diesen inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  für 15 min bevor die Zellen gewaschen, in PBS aufgenommen und direkt im Durchflusszytometer gemessen wurden. Um zu testen, ob die durch die Testsubstanzen induzierte Bildung von ROS durch eine Inkubation mit Antioxidantien reversibel ist, wurden die Zellen mit  $500 \mu\text{M}$  N-Acetylcystein 1 h vorinkubiert. Ein alternativer Ansatz bestand in einer einstündigen Co-Inkubation mit  $500 \mu\text{M}$  N-Acetylcystein. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den Substanzen und  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  behandelt und im Durchflusszytometer gemessen.

### 3.6 Zytotoxizitäts-Assay (MTT Assay)

Der MTT Assay ist ein indirekter Nachweis der Viabilität der Zellen durch Bestimmung ihrer metabolischen Aktivität (Mosmann 1983). Das gelbe, lösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein blaues, wasserunlösliches Formazan umgewandelt. Dieses Reduktionsprodukt kann in DMSO gelöst werden und photometrisch mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm gemessen werden. Die Absorption bei 560 nm ist

proportional zum Anteil an blauem Formazan und dient als Maß der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Da diese nur in viablen Zellen aktiv sind, kann die gemessene Absorption somit als Maß für die Viabilität der Zellen betrachtet werden.

Die Viabilität der Zellen wurde nach einer Inkubation mit Noxen für 24 h, 48 h, und 72 h bestimmt. Dazu wurden  $1,5 \times 10^4$  Zellen (Hct116) und  $2 \times 10^4$  Zellen (Caco-2, HepG2 und H4IIE) in 96-Wellplatten ausgesät, für 24 h anwachsen lassen und dann für weitere 24 h geschädigt. Bei einer Schädigungsdauer von 48 h und 72 h wurde die entsprechende Zellzahl um jeweils  $0,5 \times 10^4$  Zellen vermindert. Für die Inkubation mit Noxen wurden diese vorher in Zellkulturmedium in den entsprechenden Konzentrationen (bis  $100 \mu\text{M}$ ) in Reaktionsgefäßen gemischt.  $100 \mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden nach Absaugen des konditionierten Mediums in je drei Wells der 96-Wellplatte pipettiert. DMSO (max. 0,5%) wurde als Lösungsmittelkontrolle in jedem Experiment mitgeführt. Nach Ende der Schädigung wurden die Zellen mit  $20 \mu\text{l}$  MTT-Gebrauchslösung pro Well für 30-35 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde der komplette Inhalt der Wells entfernt und das sich gebildete blaue Formazan mit  $100 \mu\text{l}$  DMSO pro Well durch 10 minütiges Schütteln extrahiert. Die Messung der Farbintensität erfolgte bei 560 nm im Plattenlesegerät.

### **3.7 Ermittlung der Art des Zelltodes (Apoptose vs. Nekrose)**

#### **3.7.1 Induktion von Nekrose (LDH Assay)**

Die Messung der Freisetzung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) wurde mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* der Firma Roche durchgeführt. Beim nekrotischen Zelltod geht - im Gegensatz zur Apoptose - die Membranintegrität verloren und der Zellinhalt inklusive LDH wird freigesetzt. Das Vorhandensein größerer Mengen an LDH im Zellkulturmedium dient als Nachweis für eine Nekrose der behandelten Zellen. Mit Hilfe des verwendeten Kits wird die LDH über eine enzymatische Reaktion bestimmt. Hierbei wird zuerst durch die LDH Laktat zu Pyruvat oxidiert und parallel  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. Anschließend reduziert NADH das gelbe Tetrazoliumsalz, wodurch ein rotes Formazansalz entsteht. Dieses kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen werden.

In einer 96-Wellplatte wurden  $1,5 \times 10^6$  Hct116 Zellen und  $2,0 \times 10^6$  H4IIE Zellen pro Well ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Es folgte eine Inkubation mit den Testsubstanzen für 24 h. Nach Ende der Inkubation wurde in zwei unbehandelte Wells  $2,5 \mu\text{l}$  *Lysis Solution* pipettiert und 15 min inkubiert. Diese Probe diente als *high control*, um die maximal freisetzbare LDH Menge zu ermitteln. In eine neue 96-Wellplatte wurden von jeder Probe  $50 \mu\text{l}$  Zellüberstand übertragen und  $50 \mu\text{l}$  der Reaktionslösung, bestehend aus je  $56,25 \mu\text{l}$  *Dye solution* und  $1,25 \mu\text{l}$  *Catalyst* pro Well, zugegeben. Die Messung der freigesetzten Menge an LDH erfolgte über 30 min im Plattenlesegerät bei 490 nm. Neben der erwähnten *high control*

wurden zusätzlich eine *low control* (unbehandelte Zellen) sowie eine Negativkontrolle in Form von mit DMSO behandelten Zellen gemessen.

### 3.7.2 Induktion von Apoptose und Nekrose (Annexin-V/PI Staining)

Dieses Experiment dient dem Nachweis und der Quantifizierung von apoptotischen Zellen (Boersma et al. 1996; Homburg et al. 1995). Durch eine Co-Färbung mit Propidiumiodid (PI) können nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen diskriminiert werden. Annexin-V gehört zur Familie der Calcium-abhängigen Phospholipid-bindenden Proteine und weist eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS) auf. PS ist in intakten Zellen auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Im Laufe der Apoptose erfolgt jedoch eine Relokalisation der Phospholipide inklusive der Verlagerung von PS in die äußere Lipidschicht der Zellmembran. Annexin-V ist impermeabel und kann von intakten Zellen nicht aufgenommen werden. Bei apoptotischen Zellen bindet Annexin-V in Gegenwart von Calcium an das auf der Außenseite lokalisierte PS und kann – gekoppelt an fluoreszente Marker wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) – mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Durch Co-Färbung mit PI können späte Apoptosen und Nekrosen nachgewiesen und quantifiziert werden.

Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Hct116 Zellen in 6-Wellplatten ausgesät. Nach 24 h Anwachszeit erfolgte die Schädigung mit Testsubstanzen für weitere 24 h. Als Positivkontrolle dienten  $500 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Das Kulturmedium wurde nach Ende der Inkubation in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden mit 0,5 ml 0,025% Trypsin abgelöst und in das Falcon mit dem Medium pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 600 rpm) wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Bindungs-Puffer auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Zu 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden 2,5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC und 10  $\mu\text{l}$  PI hinzugefügt und 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Ansatz gab es zusätzlich jeweils eine Probe, die weder mit Annexin-V-FITC noch mit PI inkubiert wurde bzw. nur mit einer der beiden Substanzen. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Bindungs-Puffer pro Probe, die danach im Durchflusszytometer gemessen wurde (10000 events, Geschwindigkeit medium, Kanal 1 (Annexin-V): 530/30 nm, Kanal 2 (PI): 585/40 nm).

### 3.7.3 Induktion von Apoptose und Nekrose (Acridinorange/Ethidiumbromid Färbung)

Die Acridinorange/Ethidiumbromid Färbung dient dem Nachweis apoptotischer (apoptotische Körperchen) und nekrotischer Zellen (Cohen 1993). Acridinorange ist in der Lage in Zellen mit intakter Zellmembran einzudringen und interkaliert dort in die DNA. Ethidiumbromid kann nur in Zellen gelangen, deren Membranintegrität verloren gegangen ist und interkaliert dort ebenfalls in die DNA. Durch die unterschiedliche Membrangängigkeit der beiden Farbstoffe, kann man bei der Doppelfärbung zwischen viablen und apoptotischen bzw. nekrotischen

Zellen unterscheiden. Dabei weisen intakte Zellen einen grünen Zellkern auf, frühe apoptotische Zellen zeigen einen stark leuchtenden grünen Zellkern mit kondensiertem oder fragmentiertem Chromatin. Das Chromatin im Zellkern von späten apoptotischen Zellen leuchtet orange und ist ebenfalls kondensiert und fragmentiert. Nekrotische Zellen zeigen einen leuchtend orangen Zellkern mit normaler Morphologie (ohne kondensiertes Chromatin).

Hct116 Zellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen) wurden in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät, 24 h anwachsen gelassen und für 24 h mit den Testsubstanzen geschädigt. Als Positivkontrolle wurde  $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  verwendet. Nach Ende der Schädigung wurden die Zellen mit dem Kulturmedium von den Schalen abgespült, zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde bis auf ca. 50  $\mu\text{l}$  abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in den restlichen 50  $\mu\text{l}$  resuspendiert und mit 4  $\mu\text{l}$  einer 1:1 Mischung aus Acridinorange und Ethidiumbromid (jeweils 100  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. 20  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen. Die Objektträger wurden unmittelbar danach fluoreszenzmikroskopisch (Olympus BX 43) ausgewertet. Dabei ist Acridinorange im Kanal 2 (Anregung 460-495 nm, Emission 510-550 nm) und Ethidiumbromid im Kanal 3 (Anregung 530-550 nm, Emission 575-625 nm) sichtbar. Die Fotos wurden mit einer Belichtungszeit von 80 ms und 20x Objektiv aufgenommen. Pro Probe wurden 50 Zellen ausgewertet.

### **3.7.4 Induktion von Apoptose (Caspase und Apo One Assay)**

Die Aktivierung der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 wurde kolorimetrisch durch Peptidsubstrate, die von den genannten Caspasen spezifisch geschnitten werden, bestimmt. Die verschiedenen Peptidsubstrate enthalten jeweils eine p-Nitroanilin (pNA) Gruppe, die je nach vorheriger Aminosäuresequenz spezifisch von den aktivierten Caspasen geschnitten wird. Caspase 3 schneidet spezifisch das Substrat Ac-DEVD-pNA, Caspase 8/10 schneidet Ac-IETD-pNA und Caspase 9 schneidet Ac-LEHD-pNA. Durch dieses Prozessieren wird p-Nitroanilin freigesetzt, dessen Absorption bei 405 nm gemessen und quantifiziert werden kann.

Zur Proteinisolation wurden  $2 \times 10^6$  Zellen (H4IIE und Hct116) in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit den Substanzen erfolgte für 6 h und 24 h. Anschließend wurden die Zellen mit dem Kulturmedium aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 2000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das trockene Pellet wurde kurz in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lyse des Zellpellets erfolgte durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und 15 min Rühren (bei  $4^\circ\text{C}$ ). Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde abgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$

gelagert. Ein Teil des Überstandes wurde zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford (siehe 3.13) verwendet.

Für die Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 wurden in eine 96-Wellplatte 170 µl Assaypuffer und 20 µl Protein vorgelegt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der entsprechenden Caspase-Substrate (1:50 in Assaypuffer verdünnt) zugegeben und die Proben nach 0 h, 3 h und 24 h bei 405 nm am Plattenlesegerät gemessen.

Zum weiteren Nachweis der Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde zusätzlich des *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay Kit* der Firma Promega verwendet. Eine Aktivierung dieser beiden Effektorcaspasen, die sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg erfolgen kann, dient als genereller Nachweis für den apoptotischen Zelltod. Bei diesem Kit wird ein fluoreszenzmarkiertes Substrat (Z-DEVD-Rhodamin 110) spezifisch durch die Caspasen 3 und 7 gespalten, wodurch der fluoreszierende Farbstoff Rhodamin 110 freigesetzt wird. Rhodamin 110 hat nach Anregung bei 500 nm ein Fluoreszenzmaximum bei 520 nm. Die über die Zeit gemessene Fluoreszenzintensität dient als Maß für die Caspase 3/7-Aktivität.

Für diesen Versuch wurden  $4,0 \times 10^4$  Hct116 Zellen und  $3,5 \times 10^4$  H4IIE Zellen auf 96-Wellplatten ausgesät. Nach 24 h Anwachszeit wurden die Zellen für 24 h oder 6 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Vor Zugabe des Apo-ONE Reagenz (50 µl) erfolgte eine Volumenreduktion auf 50 µl. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde über 3 h bei 37°C im Plattenlesegerät gemessen (Anregung 485 nm, Emission 535 nm).

### 3.7.5 Induktion von Apoptose (DNA-Fragmentationsanalyse)

Einen weiteren Apoptose-Nachweis liefert die DNA-Fragmentationsanalyse (DNA-Leiter), bei der spezifische DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden (Wyllie 1980). Während der Apoptose wird die nukleäre DNA durch apoptotische Endonukleasen in den Linkerregionen, die die Nukleosomen miteinander verbinden, gespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente weisen eine Größe von  $n \times 180$  bp auf, was der etwaigen Anzahl der Basenpaare eines Nukleosoms entspricht. Wird die fragmentierte DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, entsteht ein größenspezifisches Bandenmuster, welches dem Bild einer Leiter ähnelt.

$1 \times 10^6$  H4IIE Zellen wurden pro Well in eine 6-Wellplatte ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Die Zellen wurden mit den zu testenden Substanzen für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 mM Paraquat verwendet. Die Zellen wurden mit dem Kulturmedium von den Wells abgespült und in 15 ml Falcontubes überführt. Die Wells wurden mit 1 ml TBS Puffer gespült und dieser anschließend in die jeweiligen Falcons pipettiert. Nach einem

Zentrifugationsschritt (5 min, 1200 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 2 ml TBS in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Zur Lyse der Zellmembran wurde das Pellet in 1 ml Extraktionspuffer (pH 8,0) aufgenommen, invertiert und für 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 250 µl NaCl (5 M) für 1 h bei 4°C. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C) und der Überstand wurde mit 10 µl RNAse A für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden weitere Proteine durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (500 µl Chloroform + 500 µl Rotiphenol) entfernt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 15000 rpm, Raumtemperatur) wurde die obere wässrige Phase, die die DNA enthielt, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und 0,7 Volumen kaltem Isopropanol (die Volumina beziehen sich auf den abgenommenen Überstand) für 1 h bei -20°C oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (15 min, 15000 rpm, 4°C), der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Die Pellets wurden für etwa 30 min luftgetrocknet bevor sie in 50 µl TE Puffer aufgenommen und gelöst wurden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C. Die DNA-Konzentration sowie deren Reinheit wurden direkt mit 2 µl Probe am Spektrophotometer (NanoVue) bestimmt. Jeweils 5-15 µg DNA pro Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer gemischt und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurde *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V über 3 h. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV an einer Geldokumentationsanlage.

### 3.8 DNA-Strangbrüche (Comet Assay)

Der Comet Assay ist mittels Einzelzell-Gelelektrophorese ein Nachweis von DNA Schäden in einzelnen Zellen (Singh et al. 1988). Zellen mit intakter DNA wandern im elektrischen Feld kaum, kleine DNA Bruchstücke dagegen schon und zeigen somit eine unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit. Die gewanderten Bruchstücke weisen bei mikroskopischer Betrachtung die Form eines Kometenschweifs auf, wobei die Migrationsstrecke proportional zur Fragmentierung der DNA und somit der Schädigung der Zelle ist. Bei neutralen Bedingungen ist einzig die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen möglich, bei alkalischer Lyse der Zellen (pH>13) werden DNA-Einzel- und Doppelstrandbrüche detektiert.

H4IIE Zellen wurden in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well auf einer 6-Wellplatte ausgesät, für 24 h oder 48 h anwachsen gelassen und dann für 6 h oder 24 h mit den Testsubstanzen geschädigt. Als Positivkontrolle dienten jeweils 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden nach Ende der Inkubation mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl konditioniertem Medium aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 120 µl LMP-Agarose versetzt und mit einem Deckglas auf beschichteten Objektträgern fixiert. Nach

kurzer Polymerisation bei 4°C wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger in Lyse-Gebrauchslösung gestellt. Die Lyse erfolgte über Nacht (bei den Zellen, die für 24 h geschädigt wurden) beziehungsweise über 1 h (bei 6 h Schädigung der Zellen) jeweils lichtgeschützt bei 4°C. Nach der Lyse wurden die Objektträger kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht. Die Elektrophorese der Objektträger fand unter alkalischen Bedingungen (Elektrophoresepuffer mit pH>13) statt und wurde in einer mit Eis gekühlten Elektrophoresekammer durchgeführt. Zuerst erfolgte unter Lichtausschluss eine Denaturierung für 25 min bevor die Elektrophorese für weitere 25 min bei 25 V und 300 mA gestartet wurde. Nach Beendigung wurden die Objektträger kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht und dann mit Neutralisationspuffer dreimal für 5 min neutralisiert. Abschließend wurden die Objektträger erneut in dH<sub>2</sub>O getaucht, danach in 80% Ethanol fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Visualisierung der Kometen und somit der Strangbrüche wurden die Objektträger mit 50 µl Propidiumiodid (50 µg/µl) angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei zehnfacher Vergrößerung (Olympus BX43, Anregung 530-550 nm, Emission 575-625 nm). Pro Probe wurden 50 Zellen mit der Computersoftware Comet Score ausgewertet. Als Ergebnis wurde die Menge an DNA im Schweif (% DNA in Tail) dargestellt.

### 3.9 Zellzyklusanalyse [mit subG<sub>1</sub> Messung]

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers kann bei der Zellzyklusanalyse der relative DNA Gehalt von Einzelzellen gemessen werden. Dabei passieren die Zellen nach hydrodynamischer Fokussierung einen Laser, wodurch es zur Brechung und Streuung des Lichts und zur Anregung der Fluorochrome kommt. Die Größe der Zellen wird vom Vorwärtsstreulicht (forward scatter) erfasst und die Granularität der Zellen vom „side scatter“. Die verschiedenen Fluoreszenzdetektoren messen die Intensität in bestimmten Bereichen des Spektrums.

Durch die unterschiedliche Menge an DNA während des Zellzyklus lassen sich dessen einzelne Phasen nach Abfärbung der DNA mit einem fluoreszenten Marker, der in die DNA interkaliert (z.B. PI), mit dieser Methode gut unterscheiden. Dabei weist die Zelle in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase einen einfachen DNA-Gehalt auf, in der S-Phase einen ein- bis zweifachen DNA-Gehalt und in der G<sub>2</sub>/M-Phase einen doppelten DNA-Gehalt auf. Durch Analyse des Inkubationsmediums kann die Zellzyklusanalyse zusätzlich als Apoptose-Nachweis dienen. Genauer lässt sich eine subG<sub>1</sub>-Phase mit apoptotischen Zellkernen identifizieren, deren DNA-Gehalt geringer ist als in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase.

5x10<sup>5</sup> Zellen (Hct116 und H4IIE) wurden in 6-Wellplatten ausgesät, 24 h anwachsen gelassen und dann für 24 h oder 48 h mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Als Positivkontrolle diente 0,5-1,0 µM Doxorubicin. Nach Ende der Schädigung wurde das



Kulturmedium in 15 ml Falcontubes überführt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und dies ebenfalls in das entsprechende Falcon überführt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 500 µl Trypsin (0,5%) abgelöst, in 1,5 ml PBS aufgenommen und mit dem Inhalt im Falcon vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 500 rpm) wurde das Pellet mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend erneut in 2 ml PBS aufgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 1 ml der eingestellten Zellsuspension wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zentrifugation (2 min, 5000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in 500 µl Lysepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl RNase A (1 mg/ml) und 5 µl Propidiumiodid (1 mg/ml) wurden die Zellen für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen (10000 events, Geschwindigkeit medium, Kanal 2: 585/40 nm).

### 3.10 Aufnahmestudien

#### 3.10.1 Detektion der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide mittels HPLC

Die Detektion und Quantifizierung der intrazellulären Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide erfolgte mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hierzu wurde eine HPLC-Anlage mit Dioden-Array-Detektor (DAD) und interner UV-Spektren-Datenbank (Firma Dionex) verwendet. Bei einigen Proben kam ein Gerät der Firma Merck-Hitachi (= HPLC 2) zum Einsatz.

Bei diesem aus zwei Phasen bestehenden chromatischen Trennverfahren können Mischungen hoher Analytenanzahl ihrer Polarität nach mit hoher Auflösung in kurzer Zeit aufgetrennt werden. Die flüssige oder mobile Phase besteht aus einem Lösungsmittel (meist Gemische von Wasser mit Puffer oder Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril), welches als Trägermedium dient. Die stationäre Phase besteht aus einer Trennsäule mit einer Länge von 10-50 cm und einem Durchmesser von 2-5 mm, die wahlweise mit Kieselgel, Aluminiumoxid oder Kieselgel-Derivaten (mit C-18 „Endcapping“) gefüllt ist. Die Trennleistung einer HPLC ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase und der Länge der Trennsäule. Die geringe Partikelgröße der stationären Phase erhöht den Gegendruck, wodurch die mobile Phase mit hohem Druck durch den Strömungswiderstand der stationären Phase gepresst werden muss. Das Analytengemisch wird nach der Injektion in der mobilen Phase gelöst und zeigt Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Bei starker Wechselwirkung bleibt ein Analyt lange auf der Säule und hat somit eine lange Retentionszeit. Die Erfassung des Signals geschieht mit Hilfe geeigneter Detektoren (z.B. UV-VIS oder DAD). Anhand der Retentionszeit, die charakteristisch für jeden Analyten ist,

und der Stärke des Signals lassen sich die Analyten unter Verwendung von Standards quantifizieren.

In dieser Arbeit wurde eine *reversed phase* (RP) Säule verwendet (Eurospher 100-C18, Knauer (5 µM, 125 x 4 mm)) und eine Gradientenelution nach folgendem Schema durchgeführt:

**Tabelle 3.1: Standardgradient der HPLC, Flussrate: 1 ml/min**

Zeit (min)	NANOpur Wasser, pH 2 (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

Die verwendete Anlage verfügte über eine integrierte Spektren-Bibliothek, womit man durch Vergleich der gemessenen und der internen UV-Spektren einen ersten Anhaltspunkt für die Identität der Analyten erhielt. Wie oben beschrieben wurde als mobile Phase ein binäres Lösungsmittelgemisch aus Wasser (mit Ameisensäure auf pH 2 eingestellt) und Methanol verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml pro Minute und das gesamte Trennprogramm dauerte jeweils 1 h. Das Injektionsvolumen betrug 40 µl pro Probe. Die Chromatogramme wurden bei Wellenlängen von 235 nm, 254 nm, 280 nm und 340 nm aufgezeichnet.

### 3.10.2 Detektion der Metabolite mittels HPLC-ESI-MS

Bei der HPLC-MS oder kurz LC-MS wird ein chromatographisches Verfahren mit der Elektrospray-Massenspektrometrie gekoppelt, wodurch neben der chromatographischen Auftrennung eines Analytengemisches nach der Polarität der einzelnen Analyten auch deren charakteristisches Zerfallsmuster bestimmt werden kann. Das Verfahren der MS/MS-Fragmentierung liefert zusätzlich weitere Anhaltspunkte bezüglich der chemischen Struktur der Analyten. Durch Vergleich der Molekulargewichte der Analyten mit bekannten Verbindungen können somit die Art und Anzahl der Modifikation(en) ermittelt werden.

Das Fließmittel bei der in dieser Arbeit verwendeten Anlage bestand aus einem binären Gradienten aus NANOpur Wasser (versetzt mit 0,1% Ameisensäure) und Methanol. Der Standardgradient war aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit dem der HPLC angepasst. Die Flussrate des HPLC-Systems betrug 0,25 ml pro Minute. Das Injektionsvolumen variierte zwischen 5 und 50 µl pro Proben. Die Messung der Proben erfolgte im positiven und im negativen Probenmodus.

**Tabelle 3.2: Standardgradient der HPLC-MS, 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

### 3.10.3 Kulturbedingungen der Aufnahmestudien

Für die Aufnahmestudien wurden  $1,5 \times 10^6$  Hct116 Zellen,  $2,0 \times 10^6$  HepG2 und  $2,5 \times 10^6$  Caco-2 Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden nach einer Anwachszeit von 48 h mit 50-100  $\mu\text{M}$  Hydroxyzimtsäurederivaten oder Flavonoiden behandelt. Die Inkubation fand bei 37°C in konditioniertem Kulturmedium statt, welches mit 500  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure versetzt wurde, um eine Degradation der Polyphenole zu verhindern. In Vorversuchen zur zellulären Detektion von Flavonoiden konnte Sven Ruhl in seiner Dissertation (Ruhl 2009) eine starke Degradation bzw. einen Abbau der Flavonoide im Zellkulturmedium feststellen. Exemplarisch zeigte er Anhand von Quercetin, dass eine Stabilisierung durch Ascorbinsäure (500  $\mu\text{M}$ ) diese Degradation stark verlangsamte, sodass nach einer Inkubationszeit von 2 h noch etwa 70% der eingesetzten Menge vorhanden waren. Auf Basis dieser Vorversuche wurden in der vorliegenden Arbeit die verwendeten Flavonoide bei allen Aufnahmestudien, die mit konditioniertem Medium stattfanden, mit 500  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure stabilisiert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 15 min und 6 h.

Die Aufnahmeversuche bei 4°C wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Jedoch wurden die Zellkulturschalen vor der Inkubation für 15 min auf 4°C im Kühlschrank abgekühlt und die gesamte Inkubation mit Flavonoiden über 15 min und 1 h fand bei 4°C statt

Für die Detektion der Metaboliten mittels HPLC-MS wurden die Hct116 und HepG2 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ( $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml) ausgesät.

### 3.10.4 Aufarbeitung der Zellen

Das Inkubationsmedium wurde nach Beendigung der Inkubation entfernt und zur späteren Aufarbeitung zuerst auf Eis und dann bei -20°C gelagert. Der Zellrasen wurde mit 1 ml kaltem PBS mit 1% BSA gewaschen und dieses mit dem Inkubationsmedium vereinigt. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml kaltem PBS mit BSA aufgenommen und pelletiert (5 min, 5600 rpm, 4°C). Der Überstand wurde mit dem Medium vereinigt. Die Zellkulturschalen wurden erneut mit 1 ml kaltem PBS mit BSA gespült und dies wurde dann zu den pelletierten Zellen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 5600 rpm, 4°C)

wurde der Überstand mit dem Medium vereinigt und das Pellet in 300 µl HPLC-Methanol aufgenommen. Die vereinigten Überstände wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren mit Hilfe eines Ultraschallstabes. Dazu wurden die Proben auf Eis gelagert und zweimal für 30 Sekunden bei 100 Watt sonifiziert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13200 rpm, 4°C), um die Zellbestandteile vom Methanol zu separieren. Der methanolische Überstand wurde in HPLC-Gefäße mit Mikroeinsatz pipettiert und dann mittels HPLC analysiert.

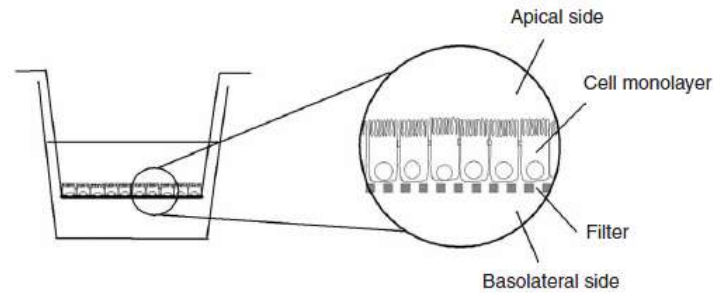
Zur Normierung der Menge an detektierten Polyphenolen auf den Proteingehalt der Zellen wurde das Pellet nach der Zentrifugation (10 min, 13200 rpm, 4°C) in 10% SDS aufgenommen und durch Sonifizieren im Ultraschallbad lysiert bis das Pellet komplett gelöst war. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Lowry Assay (siehe 3.12) nach einer 1:10 Verdünnung der Proteine.

### **3.10.5 Aufarbeitung der Überstände**

Für die Aufarbeitung der Überstände wurden 2,5 ml des Überstandes mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat versetzt und zweimal etwa 0,5 min gevortext. Die Falcontubes wurden zentrifugiert (5 min, 5000 rpm, 4°C). Die obere Ethylacetat-Phase wurde abgenommen und in neue 50 ml Falcontubes überführt. Anschließend wurde zur unteren Phase erneut 5 ml Ethylacetat gegeben, gevortext und zentrifugiert. Dieser Prozess wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Die gesammelten Ethylacetat-Phasen (ca. 15 ml) wurden vereinigt und unter Luftstrom abgedampft. Die trockenen Falcontubes wurden bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert. Kurz vor der Analyse wurde 1 ml HPLC-Methanol zu den Falcontubes gegeben, kräftig gevortext und zentrifugiert (5 min, 5000 rpm, 4°C). Die obere methanolische Phase wurde in HPLC-Gefäße überführt und in der HPLC gemessen.

### **3.10.6 Transwell Versuche**

Die Permeationsstudien mit Caco-2 Zellen wurden in sogenannten Transwell-Systemen durchgeführt. Caco-2 Zellen können eine apikale-basolaterale Orientierung entwickeln, wenn sie zu einem konfluenten Monolayer ausdifferenzieren (siehe Abbildung 3.1). Durch diese Ausdifferenzierung ähneln sie Enterozyten hinsichtlich der Expression von bestimmten Phase II Enzymen und Transportern (Artursson et al. 1993). Die Expression und Orientierung verschiedener ABC-Transporter auf der apikalen und basolateralen Seite der Plasmamembran spielt eine wichtige Rolle bei der Polarisierung der Zelle (Shah et al. 2006).



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Transwell-Einsatzes mit Caco-2 Monolayer** (modifiziert nach Hubatsch et al. 2007).

Das Transwell-System, das in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht aus einer 6-Wellplatte, in deren Vertiefungen sich die herausnehmbaren Transwell-Einsätze befinden. Diese bestehen aus einer Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von  $0,4 \mu\text{m}$  und einer Filterfläche von  $4,25 \text{ cm}^2$ . Die Caco-2 Zellen werden auf diese Einsätze ausgesät und wachsen zu einem konfluenten Monolayer heran. Dadurch wird das Well in zwei Kompartimente unterteilt. Das obere, apikale Kompartiment spiegelt in der *in vivo* Situation das Darmlumen wider, das untere, basolaterale Kompartiment stellt die dem Blut zugewandte Seite dar. Pro Well wurden  $0,5 \times 10^6$  Caco-2 Zellen ausgesät. In das untere Kompartiment wurden  $2,5 \text{ ml}$  Medium gegeben, in das obere  $1,5 \text{ ml}$  Medium. Das Kulturmedium wurde während der Differenzierung der Zellen, die in der Regel etwa 21 Tage betrug, jeweils montags, mittwochs und freitags erneuert. Um den Grad der Differenzierung und somit die Intaktheit des Monolayers zu beurteilen, wurde zweimal pro Woche der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER-Wert) gemessen. Der TEER-Wert gibt den Widerstand gegenüber dem Ionenfluss über den Zellmonolayer an, der vor allem über Tight Junctions verläuft. Somit ist der TEER-Wert ein Maß für die „Dichtigkeit“ der Tight Junctions und dadurch indirekt für die Integrität des Zellmonolayers. Der TEER-Wert berechnet sich aus dem effektiven Widerstand des Zellmonolayers multipliziert mit der Fläche des Transwell-Einsatzes ( $4,25 \text{ cm}^2$ ). Der Widerstand eines Transwell-Einsatzes ohne Zellen (Blank) beträgt  $\sim 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , um diesen Wert müssen die gemessenen Werten der Einsätze mit Zellen korrigiert werden. Damit die Zellen für die Permeationsstudien verwendet werden können, muss der TEER-Wert der einzelnen Wells höher als  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  sein.

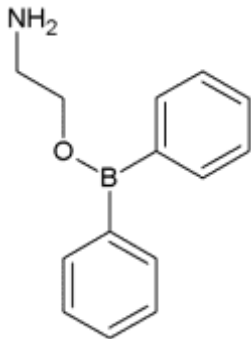
Die Permeationsstudien mit den entsprechenden Flavonoiden wurden 21-30 Tage nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Einen Tag zuvor wurde das Zellkulturmedium erneuert. Am Versuchstag wurde zuerst der TEER-Wert im warmen Medium gemessen. Hierzu wurde ein Volt-Ohm-Meter mit „chopstick“ Elektroden verwendet. Zusätzlich wurde die Integrität des Monolayers vor Versuchsbeginn mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (LY) überprüft. Hierzu wurde  $1 \text{ ml}$  HBSS Puffer mit  $100 \mu\text{g/ml}$  LY in das apikale Kompartiment pipettiert und für  $1 \text{ h}$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot aus dem basolateralen

Kompartiment fluoreszenzspektrometrisch in einer 96-Wellplatte bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Lag der errechnete Wert der LY-Passage unter 1% pro Stunde, wurde der Zellmonolayer als intakt angesehen. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit LY zweimal mit HBSS gewaschen (apikal 1 ml, basolateral 1,5 ml). Die Inkubation mit Flavonoiden erfolgte ebenfalls in HBSS. Dazu wurden die Flavonoide in 1 ml HBSS angesetzt und diese Lösung in das apikale Kompartiment pipettiert. Alle Inkubationen erfolgten stets von apikal nach basolateral, d.h. die Inkubationslösung wurde in das apikale Kompartiment gegeben. In das basolaterale Kompartiment wurde mit 1,5 ml HBSS pipettiert und die 6-Wellplatte wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Inkubationslösung aus dem apikalen Kompartiment sowie das HBSS aus dem basolateralen Kompartiment in separate Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion der darin enthaltenen Flavonoide erfolgte mittels Ethylacetat. Dazu wurden die kompletten Überstände wie in Abschnitt 3.10.5 beschrieben jeweils dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden eingedampft und bis zur Messung in der HPLC bei -20°C gelagert. Vor der Messung wurden die Proben mit 500 µl HPLC-Methanol versetzt, kräftig gevortext, zentrifugiert (10 min 5000 rpm, 4°C) und die Methanol-Phase schließlich in HPLC-Gefäße überführt. Für die Aufarbeitung der Zellen wurden die Transwell-Einsätze mit dem Monolayer vorsichtig mit 500 µl kaltem HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit der Rückseite einer 100 µl Pipettenspitze vorsichtig vom Einsatz abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (5 min, 5600 rpm, 4°C). Der Transwell-Einsatz wurde erneut mit 500 µl HBSS gespült, um die restlichen Zellen aufnehmen zu können. Das HBSS wurde zum Pellet pipettiert, kurz gevortext und nochmals zentrifugiert (5 min, 5600 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren mit Hilfe eines Ultraschallstabes. Dazu wurden die Proben auf Eis gelagert und zweimal für 30 Sekunden bei 100 Watt sonifiziert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13200 rpm, 4°C), um die Zellbestandteile vom Methanol zu separieren. Der methanolische Überstand wurde in HPLC-Gefäße mit Mikroinsert pipettiert und dann mittels HPLC analysiert.

### **3.10.7 Färbung mit Naturstoffreagenz A**

Naturstoffreagenz A (2-Aminoethyl-diphenylborinat; NSRA, siehe Abbildung 3.2) wird gewöhnlich als Sprühreagenz in der Dünnschichtchromatographie zur Detektion von Flavonoiden sowie in der Histochemie von Pflanzen eingesetzt (Azar et al. 1987). Flavonoide sind – abhängig von der Substitution mit Hydroxylgruppen im B- und C-Ring – in der Lage mit NSRA einen Komplex mit einer charakteristischen Fluoreszenz zu bilden (Neu 1957). Diese Eigenschaft von NSRA als Fluoreszenzverstärker wurde in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, um Flavonoide durch NSRA fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen. Des

Weiteren wurden Zellen, die mit Flavonoiden inkubiert wurden, mit NSRA behandelt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Bei ausgewählten Flavonoiden wurde zusätzlich das Fluoreszenzspektrum des „Flavonoid-NSRA“-Komplexes aufgezeichnet.



**Abbildung 3.2: Strukturformel von NSRA**

Naturstoffreagenz A (2-Aminoethyl-diphenylborinat),  $C_{14}H_{16}BNO$ ,  
MW: 225,1 g/mol

### 3.10.7.1 Fluoreszenzspektren-Analyse der „Flavonoid-NSRA-Komplexe“

Die Fluoreszenzspektren der „Flavonoid-NSRA-Komplexe“ wurden an einem Spektrofluorometer aufgenommen. Die Anregungswellenlänge wurde analog der des Durchflusszytometers gewählt und betrug 488 nm. Pro Probe wurden 50  $\mu$ M Flavonoid (in DMSO) mit 0,2% NSRA (in DMSO) vermischt und die Emission der NSRA-Flavonoid Fluoreszenz wurde mit einer Integrationszeit von 0,5 s aufgezeichnet. Zusätzlich wurde von jedem Flavonoid jeweils eine Probe ohne NSRA gemessen.

### 3.10.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtungen

Um die Verteilung der Flavonoide innerhalb der Zelle sichtbar zu machen, wurden die verwendeten Zelllinien mit Flavonoiden vorinkubiert und anschließend mit NSRA gefärbt.  $2,5 \times 10^5$  Hct116 Zellen und  $5 \times 10^5$  Caco-2 Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschalen für 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit Flavonoiden (50  $\mu$ M) in konditioniertem Medium inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellkulturschalen wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit 0,2% NSRA in PBS (1,5 ml). Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet (Zeiss Axiovert; 40x Objektiv, Anregung 450-490 nm, Emission 515 nm).

### 3.10.7.3 Messung der Flavonoid-NSRA-Fluoreszenz im Durchflusszytometer

Einen zusätzlichen Hinweis bezüglich der Aufnahme verschiedener Flavonoide in die Zellen lieferte die Analyse im Durchflusszytometer. Werden die Flavonoide intrazellulär aufgenommen, bildet das NSRA einen fluoreszierenden Komplex mit den Flavonoiden.

Dieser ist im Durchflusszytometer detektierbar und zeigt sich im Diagramm als Rechtsverschiebung auf der X-Achse (Fluoreszenzintensität) im Vergleich zu Kontrollzellen (Ernst et al. 2010).

$5 \times 10^5$  Hct116 Zellen und  $7,5 \times 10^5$  HepG2 Zellen wurden auf einer 6-Wellplatte ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit 50  $\mu$ M Flavonoiden erfolgte über 15 min, 2 h, 4 h und 6 h (Kinetik). Bei einem anderen Ansatz wurde die Inkubationszeit konstant gehalten (1 h) und die Konzentration an Flavonoiden variiert (5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M). Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit 750  $\mu$ l PBS gewaschen und für 5 min mit 0,2% NSRA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und dann in 750  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Proben wurden auf Eis gelagert und unmittelbar im Durchflusszytometer gemessen (20.000 – 25.000 events, Geschwindigkeit medium, Kanal 1: 530/30 nm).

### 3.11 ABC Transporter Assay

Um den Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die beiden ABC Transporter P-gp (P-glycoprotein) und MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) zu testen, wurde das „BD Gentest ATPase Assay Kit“ der Firma BD Bioscience verwendet. Mit diesem kolorimetrischen Assay kann man mit Hilfe isolierter Membranen Substanzen als potentielle ABC Transporter Substrate oder Inhibitoren testen. Dabei wird die ATPase Aktivität bestimmt, indem man die Menge an freigesetztem inorganischen Phosphat misst, das aus der Substrat-stimulierten Hydrolyse von ATP stammt. Die Modulation der ATP Hydrolyse durch bestimmte Testsubstanzen ist ein Anzeichen für deren Interaktion mit dem entsprechenden Transporter. Das ATPase Aktivitätsprofil zeigt zudem in den meisten Fällen die Art der Interaktion der Testsubstanz mit dem Transportprotein an. Eine Aktivierung der ATPase deutet auf eine aktiv transportierte Substanz hin, während eine Inhibierung auf eine direkte Interferenz mit der Funktion des Transporters hinzeigt (Hegedus et al. 2009). Mit dem hier gewählten Versuchsdesign wurde untersucht, ob die verwendeten Flavonoide Substrate von P-gp und MRP2 darstellen, eine Inhibierung der beiden Transporter wurde nicht untersucht.

Der Versuch wurde nach den Angaben des Herstellers auf 96-Wellplatten durchgeführt. Die eingesetzte Menge an Flavonoiden lag bei 50  $\mu$ M. Die Inkubationszeit betrug beim P-gp Assay 20 min, als Positivkontrolle wurde Verapamil (20  $\mu$ M) verwendet. Beim MRP2 Assay betrug die Inkubationszeit der Membranen mit den Flavonoiden 40 min und als Positivkontrolle diente Probenecid (1 mM). Es wurden jeweils 1 mg/ml der Transporter-Membranen verwendet. 20  $\mu$ l Membran wurden mit 20  $\mu$ l Flavonoiden und Natrium-Orthovanadat (NaOV) bzw. mit Flavonoiden ohne NaOV vermischt. NaOV ist als Inhibitor der ATPase Funktion der hier verwendeten ABC Transporter bekannt. Die Aktivität, die im



Beisein von NaOV gemessen wurde (= nicht P-gp- bzw. MRP2-abhängige ATPase Aktivität), wurde bei der Auswertung von der ATPase Aktivität abgezogen, die ohne Vorhandensein von NaOV gemessen wurde. Somit konnte die P-gp bzw. MRP2 Aktivität als Vanadat-sensitive Substrat-stimulierte ATPase Aktivität dargestellt werden.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von MgATP gestartet und dann für die entsprechenden Zeiten (20 min für P-gp und 40 min für MRP) bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10% SDS wurde die Reaktion gestoppt. Die Messung des durch ATP Hydrolyse freigesetzten anorganischen Phosphats, welches mit Molybdat in der Anwesenheit von  $Zn^{2+}$  einen chromophoren Komplex bildet, erfolgte spektrophotometrisch bei 800 nm.

### **3.12 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung der Zellpellets aus den Aufnahmestudien wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) durchgeführt. Hierzu wurde das „Bio-Rad DC Protein Assay“ Kit von Bio-Rad Laboratories nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Proteinproben wurden zuvor (je nach verwendeter Zellzahl) 1:5 oder 1:10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Proteinstandard wurde zur Erstellung einer Kalibrierung BSA verwendet (0,1–1,0 mg/ml). Je 5 µl der Proben und Standards wurden auf eine 96-Wellplatte aufgetragen (Dreifachbestimmung) und mit den im Kit enthaltenen Lösungen für 15 min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenlesegerät bei 595 nm.

### **3.13 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung der Proben aus dem Caspase Assay wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Hierzu wurde ein für eine 96-Wellplatte modifizierter Assay nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Als Proteinstandard diente BSA (0,05–0,5 mg/ml). Zu 10 µl Probe, die zuvor 1:10 in dH<sub>2</sub>O verdünnt wurde, wurden 90 µl Bradford-Reagenz (1:5 dH<sub>2</sub>O verdünnt) pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 am Plattenlesegerät gemessen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### **3.14 SEAP Assay**

Der SEAP (sekretorische embryonale alkalische Phosphatase) Assay wurde als Reporterassay zur Bestimmung der NFκB Aktivierung durchgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete Reporterkonstrukt (stabil transfiziert in Rattenhepatomzellen H4IIE, von Frau Dr. Yvonne Chovolou aus dem Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert und zur Verfügung gestellt) stellte die SEAP unter die Kontrolle eines sechs kappaB-sites tragenden Promotors. 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 luminometrisch detektiert werden. Der Anstieg der Chemolumineszenz ist dabei proportional zur Aktivität der SEAP und ermöglicht somit den Nachweis der NFκB-abhängigen SEAP-Aktivität.  $4 \times 10^5$  H4IIE-SEAP Zellen pro Well wurden in 24-Well Platten für 24 h anwachsen gelassen. Nach der Vorinkubation mit den Testsubstanzen für 1 h erfolgte die Behandlung mit 4 ng/ml rekombinantem TNFα (aus der Ratte) für 24 h. Die Überstände der behandelten Zellen wurden nach Beendigung der Inkubation zentrifugiert, der Überstand 1:4 mit Verdünnungspuffer verdünnt und endogene Phosphatasen für 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, 20000 rpm) wurden die Proben auf Eis gekühlt. 30 µl der hitzeinaktivierten Überstände wurden in weiße 96-Wellplatten überführt, 5 min mit 30 µl Assay-Puffer inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30 µl Substratlösung gestartet. Die erste Messung erfolgte nach 5 min. Um toxische Effekte der Verbindungen auszuschließen wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die Lumineszenz wurde anschließend auf die Kontrolle bezogen.

### **3.15 *Caenorhabditis elegans***

#### **3.15.1 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans***

In dieser Arbeit wurden ausschließlich wildtypische Nematoden des Stammes N2 (var. Bristol) verwendet (Brenner 1974). Die Würmer wurden ab dem L4-Larvalstadium in die entsprechenden Experimente eingebracht. Die Kultivierung der Würmer erfolgte bei 20°C in Petrischalen auf Nematode Growth Medium (NGM). Als Nahrungsquelle dienen *Escherichia coli* Stamm OP50 Bakterien (Lewis and Fleming 1995). Sowohl der wildtypische N2 Stamm als auch die *E. coli* OP50 und OP50-1 Bakterien wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) der University of Minnesota (USA) bezogen. Eine Subkultivierung der Würmer auf neue Petrischalen mit OP50 Bakterien erfolgte alle 3 bis 4 Tage, um die Populationsdichte nicht zu groß werden zu lassen. Dies könnte zu Hungerstress führen und die Versuchsbedingungen nachhaltig beeinflussen. Für die Inkubation mit den Testsubstanzen wurde die Kultivierung der Würmer in Flüssigmedium durchgeführt. Dazu wurden die L4-Larven in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml NGM-BSA (ohne Bacto-Agar) und verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanzen (50-100 µM) überführt. Als Nahrungsquelle dienen hier Streptomycin-resistente *Escherichia coli* OP50-1 Bakterien in einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml. Die Inkubation erfolgte unter täglichem Wechsel des Inkubationsmediums für 48 h.

### 3.15.2 Semisynchronisation von *C. elegans*

Die Experimente mit *C. elegans* wurden stets mit Würmern gleichen Alters durchgeführt. Zur Alterssynchronisation wurden die Würmer mit einer Bleiche-Lösung inkubiert. Diese tötet adulte Würmer und Larven ab. Nur die von der Eischale geschützten Embryonen überleben die Behandlung. Da das Alter der Embryonen in etwa gleich ist, erhält man eine homogene Population.

Die Würmer wurden mit 3 ml NGM von der Petrischale ab gespült und in Reaktionsgefäßen zentrifugiert (1 min, 5000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde bis auf 500 µl abgenommen und das Pellet wurde für 2 min mit 500 µl Bleiche-Lösung inkubiert. Dabei wurden die Reaktionsgefäße stets gevortext. Nach der Bleiche Behandlung wurden die Würmer pelletiert (1 min, 5000 rpm, 4°C) und durch drei Waschschrirte mit NGM wurde die restliche Bleiche-Lösung entfernt. Beim letzten Schritt wurde der Überstand bis auf einen Rest von 200 – 400 µl NGM entfernt. Darin wurde das Pellet resuspendiert und auf neue NGM Platten mit OP50 Bakterien verteilt.

### 3.15.3 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der intrazellulären Flavonoide mittels NSRA Färbung

Die Lokalisation der verwendeten Flavonoide in distinkten Organen des Nematoden wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dazu wurden L4-Larven wie in Abschnitt 3.16.1 beschrieben mit Flavonoiden inkubiert. Anschließend wurden die Würmer mit 10% hitze-abgetöteten Bakterien und 0,2% NSRA für 2 h inkubiert. Danach wurden die Würmer auf Objektträger überführt und bei einer Anregungswellenlänge von 460-495 nm und einer Emissionswellenlänge von 510-550 nm fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die Aufnahme der Flavonoide wurde dabei nur qualitativ erfasst (Fluoreszenz sichtbar oder nicht), eine densitometrische Auswertung der NSRA-Flavonoid Fluoreszenz erfolgte nicht.

### 3.15.4 Messung der intrazellulären ROS Akkumulation in *C. elegans* (DCF Assay)

Als Nachweis der durch thermale Stressbedingungen ausgelösten intrazellulären Akkumulation von ROS wurde ein DCF Assay durchgeführt. Hierbei wurde wie im Zellkulturversuch die fluoreszente Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Substanzen auf die Akkumulation von ROS unter thermalem Stress wurden wildtypische L4-Larven in 35 mm Petrischalen mit 4 ml NGM-BSA und 50 µM oder 100 µM Testsubstanz für 48 h inkubiert (bei 20°C). Das Inkubationsmedium wurde nach jeweils 24 h erneuert.

Vor der Messung wurden die inkubierten Würmer in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml PBST überführt und darin für 1 h gewaschen. Anschließend wurden 7 µl M9 Puffer pro Well in die

Wells einer 384-Wellplatte pipettiert. Jedes Well wurde mit einem Wurm bestückt (in 1  $\mu$ l Waschmedium), pro Testsubstanz wurden 16 Wells (= 16 Würmer) verwendet. Um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln, wurden als Kontrolle 16 Wells mit 8  $\mu$ l M9 Puffer gefüllt. Danach wurde im Dunkeln in jedes Well 2  $\mu$ l einer 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA-Lösung pipettiert (50  $\mu$ M Endkonzentration im Well). Die 384-Wellplatte mit klarem Boden wurde mit einer lichtundurchlässigen schwarzen Folie abgeklebt und am Fluoreszenzspektrophotometer (Anregung 485 nm, Emission 535 nm) bei einer Temperatur von 37°C gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden alle 15 min aufgezeichnet, wodurch der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit und somit der Anstieg der intrazellulären ROS Akkumulation ermittelt werden konnte.

### **3.16 Statistische Auswertung**

Sofern nicht anders angegeben, sind alle Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation = SD) von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Signifikanzanalyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (oneway ANOVA) mit anschließendem Dunnett oder Bonferroni Posthoc-Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Version 5 Software. Dabei wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

## **4. Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurden sowohl pharmakologische Eigenschaften von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen als auch deren Bioverfügbarkeit *in vitro* und im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* untersucht. Die Ergebnisse sind entsprechend der verwendeten Klassen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in drei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die zellulären Effekte verschiedener strukturverwandter Flavonoide und deren Aufnahme in diverse Zellkultursysteme sowie den Modellorganismus *C. elegans* behandelt. Im zweiten Abschnitt wird die Wirkung von Hydroxyzimtsäurederivaten betrachtet. Abschließend werden im dritten Teil die Ergebnisse zur Untersuchung der molekularen Effekte von Isothiocyanaten auf Kolonkarzinom- und Hepatomzellen beschrieben. Auch hier wurden exemplarisch die Eigenschaften dieser Verbindungen auf den zellulären ROS Status in *C. elegans* untersucht.

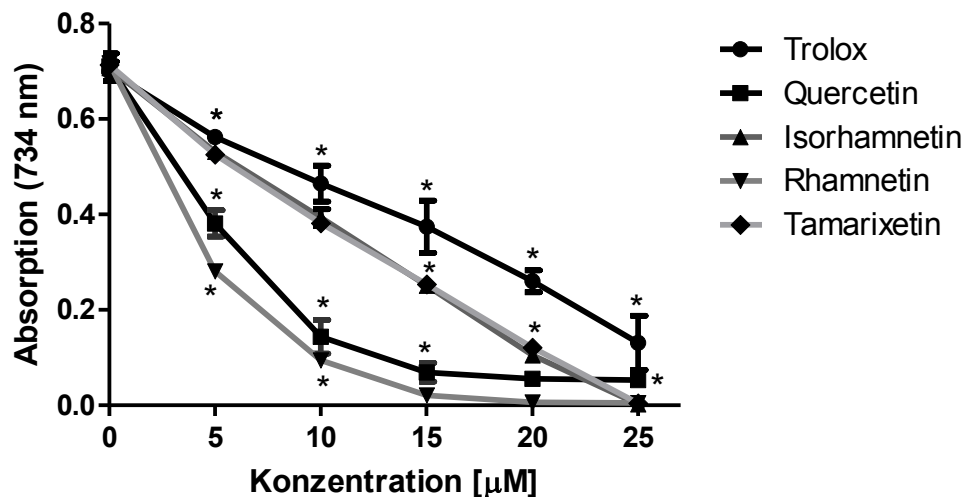
### **4.1 Zelluläre Effekte von Quercetin- und Myricetin-Derivaten**

#### **4.1.1 Antioxidative Eigenschaften von Quercetin- und Myricetin-Derivaten**

Eine Ernährung, die reich an Obst und Gemüse und somit an Polyphenolen wie z.B. Flavonoiden ist, ist in epidemiologischen Studien mit einer geringeren Inzidenz an degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Diese präventiven Effekte der Flavonoide werden auf ihr antioxidatives Potential zurückgeführt. Daher wurden in dieser Arbeit die antioxidativen Eigenschaften der beiden Flavonole Quercetin und Myricetin zuerst im zellfreien System bestimmt und anschließend in Kolonkarzinomzellen überprüft. Beide Substanzen dienten als Leitstrukturen zur Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen hinsichtlich des Einflusses einer Methylierung an verschiedenen Positionen im Molekül, welche einen Schritt der Biotransformation von Flavonoidem im Phase II Metabolismus darstellt. Dazu wurden die methylierten Quercetin Derivate Isorhamnetin, Rhamnetin und Tamarixetin verwendet. Bei den Myricetin-Derivaten kamen Laricitrin, Syringetin und Myricetin-Trimethylether (MTM) zum Einsatz.

##### **4.1.1.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels TEAC Assay**

Die antioxidative Kapazität der Flavonoide Quercetin und Myricetin sowie deren Derivate wurde mithilfe des TEAC Assays bestimmt. Dabei wird die Entfärbung der radikalischen blau-grünen ABTS-Lösung über die Zeit photometrisch bei 734 nm bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet.

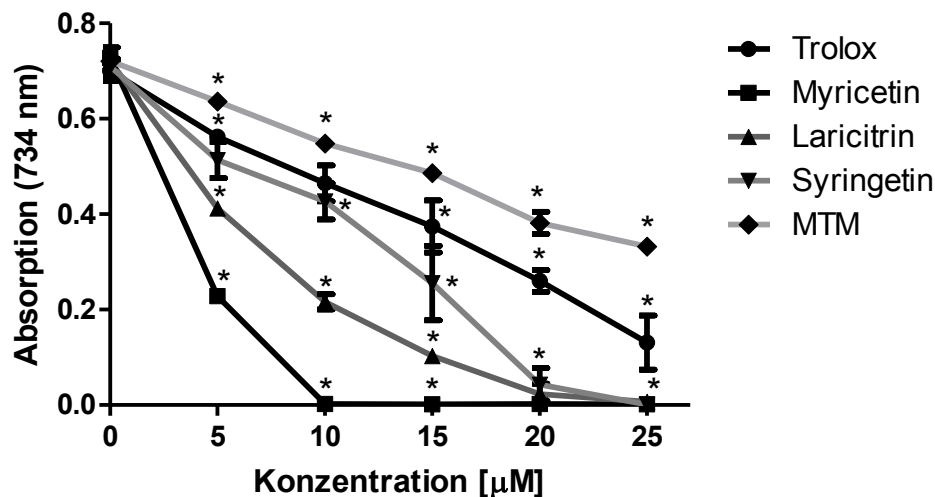


**Abbildung 4.1: Antioxidatives Potential der Quercetin-Derivate im TEAC-Assay**

Die Abnahme der Absorption der farbigen ABTS-Lösung wurde 2 min nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 734 nm als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle).

Sowohl Quercetin als auch dessen Derivate zeigen im TEAC Assay (Abbildung 4.1) eine ausgeprägte antioxidative Kapazität, die in allen eingesetzten Konzentrationen größer ist als die der Referenzsubstanz Trolox. Die radikalfangenden Eigenschaften sind bei Rhamnetin ausgeprägter als bei Quercetin. Isorhamnetin und Tamarixetin zeigen ein ähnliches antioxidatives Potential, das bis zu einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  jedoch schwächer ist als das der beiden nicht im B-Ring methylierten Derivate Quercetin und Rhamnetin.

Bei Myricetin und dessen Derivaten konnte für jede der hier verwendeten Konzentrationen eine antioxidative Kapazität festgestellt werden (Abbildung 4.2). Das größte antioxidative Potential zeigt Myricetin, gefolgt vom einfach methylierten Laricitrin. Syringetin mit zwei Methylgruppen hat stärkere radikalfangende Eigenschaften als die Referenzsubstanz Trolox, aber schwächere als Myricetin und Laricitrin. Der im B-Ring an drei Positionen methylierte MTM das schwächste antioxidative Potential.



**Abbildung 4.2: Antioxidatives Potential der Myricetin-Derivate im TEAC-Assay**

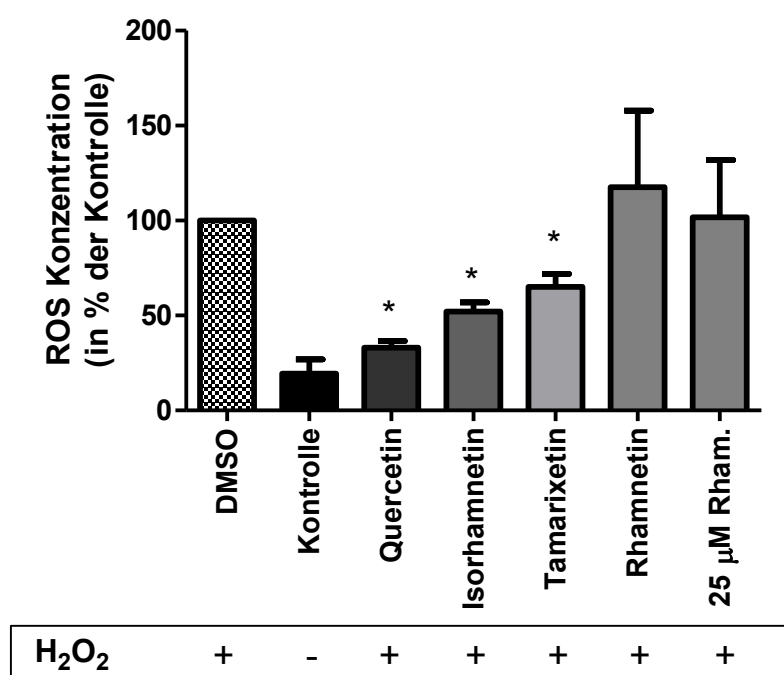
Die Abnahme der Absorption der farbigen ABTS-Lösung wurde 2 min nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 734 nm als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

#### 4.1.1.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels DCF Assay im Durchflusszytometer

Ist das Verhältnis von Prooxidantien zu Antioxidantien innerhalb der Zelle zugunsten der Prooxidantien verschoben, so spricht man von oxidativem Stress. Alternativ kann man oxidativen Stress auch als Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und der Fähigkeit eines biologischen Systems die entstehenden Intermediate rasch zu eliminieren definieren. Diese Fähigkeit sollte in der vorliegenden Arbeit mittels DCF Assay in Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Das antioxidative Potential der verwendeten Quercetin- und Myricetin-Derivate wurde im TEAC Assay bereits ermittelt und sollte in Hct116 Zellen überprüft werden. Zur Messung der intrazellulären ROS Konzentration im Durchflusszytometer wurde die Fluoreszenzsonde  $H_2DCF-DA$  verwendet. Um den Einfluss der Flavonoide auf die intrazelluläre ROS Konzentration nach Zugabe von  $H_2O_2$  zu testen, wurden Hct116 Zellen für 4 h mit Flavonoiden vorbehandelt (50  $\mu M$ ), 30 min mit der Fluoreszenzsonde inkubiert und weitere 60 min mit 500  $\mu M$   $H_2O_2$  gestresst.

In Abbildung 4.3 ist der Effekt einer Vorbehandlung von Hct116 Zellen mit Quercetin-Derivaten auf die  $H_2O_2$ -induzierte intrazelluläre ROS Konzentration dargestellt. Dabei zeigt sich, dass eine Inkubation mit Quercetin die DCF-Fluoreszenz als Maß für die ROS Konzentration annähernd auf Kontroll-Niveau (Zellen, die nicht mit  $H_2O_2$  behandelt wurden) senken kann. Zellen, die nur mit den verwendeten Quercetin-Derivaten und nicht mit  $H_2O_2$

inkubiert wurden, zeigten keine veränderte DCF-Fluoreszenz (Daten im Anhang). Somit ist eine prooxidative Wirkung dieser Flavonoide in der getesteten Konzentration unwahrscheinlich. Bei einer Vorinkubation der Zellen mit den methylierten Derivaten Isorhamnetin und Tamarixetin war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei Quercetin selbst, jedoch statistisch signifikant. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Daten aus dem TEAC Assay, in dem Quercetin eine höhere antioxidative Kapazität als Isorhamnetin und Tamarixetin aufwies. Einzig Rhamnetin, das im TEAC Assay das größte antioxidative Potential zeigt, ist im DCF Assay nicht als Antioxidans wirksam. Eine Behandlung der Hct116 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Rhamnetin führt nicht zu einer Reduktion der intrazellulären ROS Konzentration im Vergleich mit der Positivkontrolle. Auch mit 25  $\mu\text{M}$  Rhamnetin ist keine signifikante Erniedrigung der intrazellulären ROS Konzentration zu erkennen, auch wenn die Fluoreszenzwerte etwas niedriger sind als bei 50  $\mu\text{M}$  Rhamnetin und sich auf dem Niveau der Positivkontrolle bewegen. Das in diesem Assay ermittelte antioxidative Potential der Quercetin-Derivate stellt sich in absteigender Reihenfolge wie folgt dar: Quercetin > Isorhamnetin > Tamarixetin > [Rhamnetin].



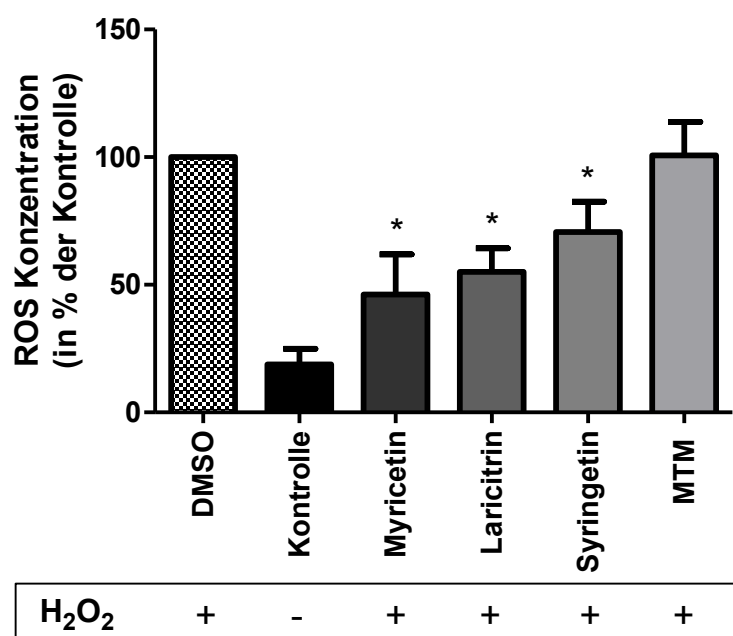
**Abbildung 4.3: Antioxidatives Potential der Quercetin-Derivate im DCF-Assay**

Hct116 Zellen wurden 4 h mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin-Derivaten vorinkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 15 min) wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h inkubiert, um so oxidativen Stress zu induzieren. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte fluorimetrisch im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte in % der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DMSO-Kontrolle +/- SD (n $\geq$ 3, \*: p<0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DMSO-Kontrolle).

Analog zu den Quercetin-Derivaten wurde das antioxidative Potential der Myricetin-Derivate in Hct116 Kolonkarzinomzellen überprüft. In Abbildung 4.4 ist der Effekt einer Vorbehandlung von Hct116 Zellen mit Myricetin-Derivaten auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte intrazelluläre ROS



Konzentration dargestellt. Zellen, die nur mit Myricetin-Derivaten jedoch nicht mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert wurden, zeigen keine veränderte DCF-Fluoreszenz (Daten im Anhang). In Abbildung 4.4 ist ersichtlich, dass Myricetin und Laricitrin das stärkste antioxidative Potential *in vitro* besitzen und die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte ROS Konzentration signifikant reduzieren. Auch das doppelt methylierte Derivat Syringetin wirkt antioxidativ und führt zu einer signifikanten Reduktion von intrazellulären ROS. MTM mit drei Methylgruppen besitzt in diesem Zellsystem kein antioxidatives Potential, wodurch die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte ROS Konzentration auf dem Niveau der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -DMSO-Kontrolle liegt. Diese Ergebnisse stimmen mit dem im TEAC Assay ermittelten antioxidativen Potential der Myricetin-Derivate überein, welches sich in absteigender Reihenfolge wie folgt darstellt: Myricetin > Laricitrin > Syringetin > [MTM].



**Abbildung 4.4: Antioxidatives Potential der Myricetin-Derivate im DCF-Assay**

Hct116 Zellen wurden 4 h mit 50  $\mu\text{M}$  Myricetin-Derivaten vorinkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  als Fluoreszenzsonde (für 15 min) wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 1 h inkubiert, um so oxidativen Stress zu induzieren. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte fluorimetrisch im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte in % der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -DMSO-Kontrolle  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ , \*:  $p < 0,05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -DMSO-Kontrolle).

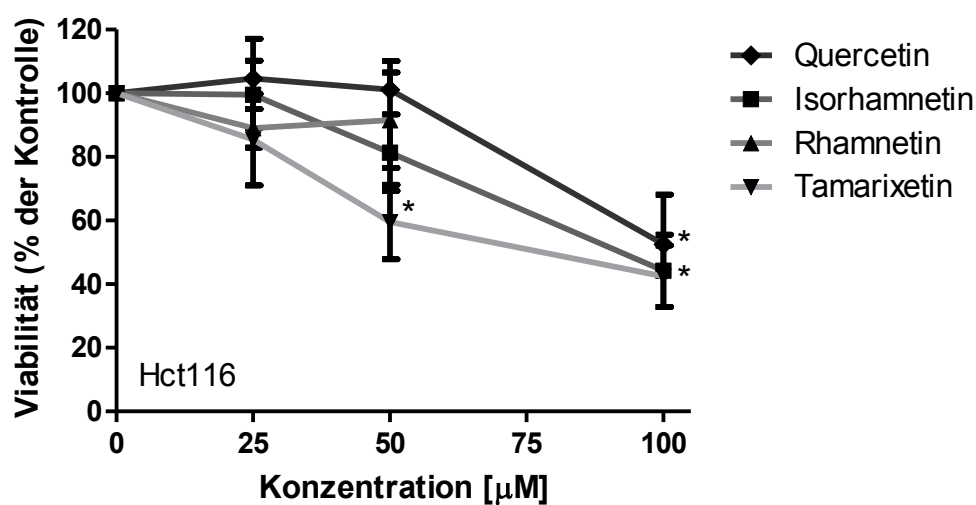
#### 4.1.2 Zytotoxische Effekte von Quercetin- und Myricetin-Derivaten

Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der Quercetin- und Myricetin-Derivate erfolgte mittels MTT Assay. Hierbei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen zur Bestimmung der Zellviabilität herangezogen. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf dem Darm als Gewebe des Erstkontaktes bei der Aufnahme von Nahrungsinhaltsstoffen lag, wurde die Wirkung der verwendeten Flavonoide auf die beiden Kolonkarzinomzellen Hct116

und Caco-2 getestet. Zusätzlich dazu wurde die Zellviabilität in HepG2 humanen Hepatomzellen untersucht, da bekannt ist, dass Flavonoide stark biotransformiert werden und diese Reaktionen primär in der Leber ablaufen.

#### 4.1.2.1 Zytotoxische Effekte von Quercetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien

Zytotoxische Effekte der verwendeten Quercetin-Derivate wurden in den beiden Kolonkarzinomzelllinien Hct116 und Caco-2 mit einer Inkubationszeit von 24 h getestet. Zudem wurden der Effekt von Isorhamnetin und Rhamnetin auf die Zellviabilität in Hct116 und Caco-2 nach 48 h und 72 h überprüft.



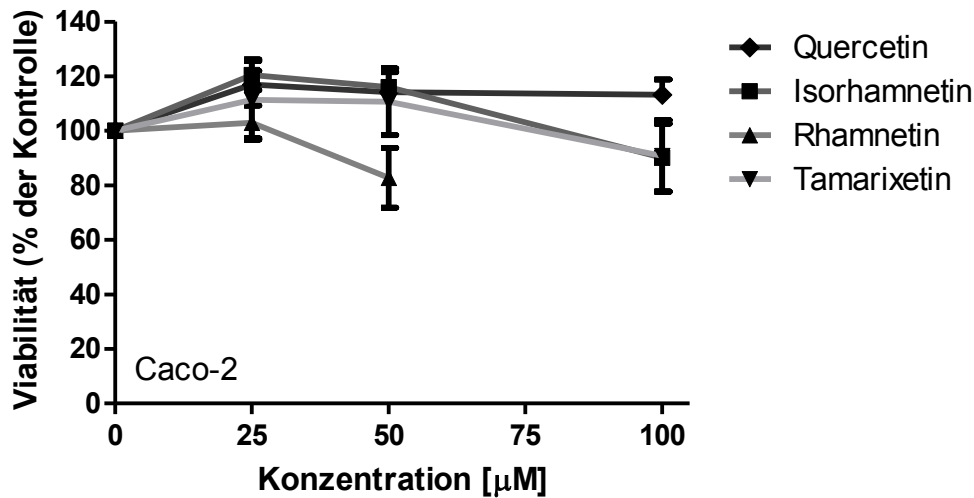
**Abbildung 4.5: Zytotoxizität der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden für 24 h mit Quercetin-Derivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle). Der 100 µM Wert für Rhamnetin wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht ausgewertet.

In Abbildung 4.5 sind die zytotoxischen Effekte der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen dargestellt. Außer Tamarixetin ist keine der verwendeten Substanzen in der Lage, die Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 50 µM signifikant zu hemmen. Quercetin und Isorhamnetin zeigen statistisch signifikante Effekte hinsichtlich einer Zytotoxizität erst bei einer Konzentration von 100 µM. Da es bei Rhamnetin zu Löslichkeitsproblemen bei dieser Konzentration kam, sind keine Daten für eine Inkubation mit 100 µM dargestellt. Für alle weiteren Zytotoxizitätstests wurde Rhamnetin nur im Konzentrationsbereich von 25 und 50 µM verwendet.

Abbildung 4.6 zeigt das zytotoxische Potential der Quercetin-Derivate in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation. Hierbei ist zu erkennen, dass keine der verwendeten Substanzen einen Effekt auf die Viabilität der Kolonkarzinomzellen hat. Während Konzentrationen von 100 µM

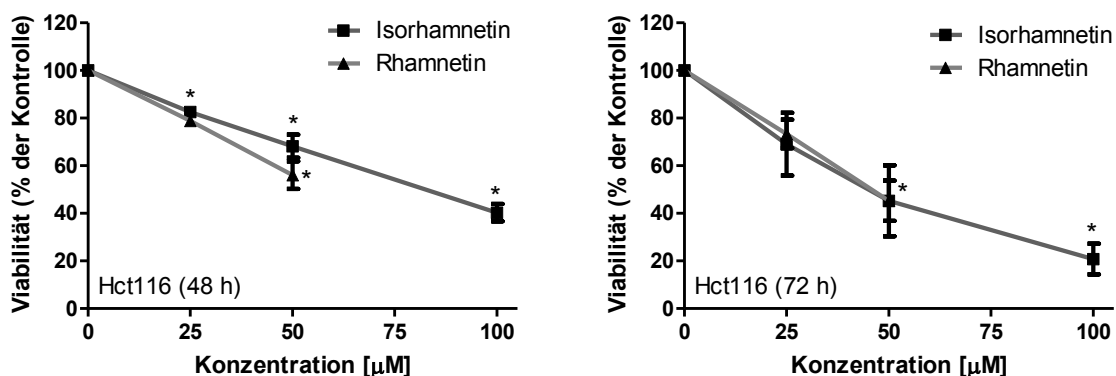
zytotoxisch auf Hct116 Zellen wirken, reagieren die Caco-2 Zellen bei diesen Konzentrationen weniger empfindlich.



**Abbildung 4.6: Zytotoxizität der Quercetin-Derivate in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden für 24 h mit Quercetin-Derivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle). Der 100 µM Wert für Rhamnetin wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht ausgewertet.

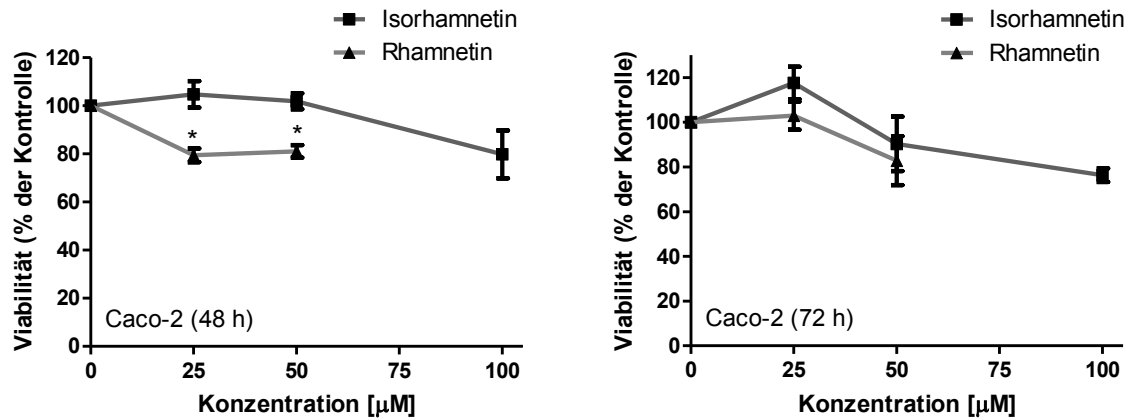
Die Derivate Isorhamnetin und Rhamnetin, die in beiden Zelllinien keine signifikante Toxizität zeigen (außer 100 µM Isorhamnetin in Hct116 Zellen), wurden sowohl in Caco-2 als auch in Hct116 mit verlängerten Inkubationszeiten von 48 h und 72 h getestet (siehe Abbildungen 4.7 und 4.8).



**Abbildung 4.7: Zytotoxizität der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden für 48 h und 72 h mit Isorhamnetin oder Rhamnetin inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle). Der 100 µM Wert für Rhamnetin wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht ausgewertet.

Im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 24 h sind die zytotoxischen Effekte von Isorhamnetin und Rhamnetin nach 48 h Inkubationszeit deutlicher ausgeprägt. So wirken beiden Substanzen bereits ab 25  $\mu\text{M}$  toxisch auf Hct116 Zellen.



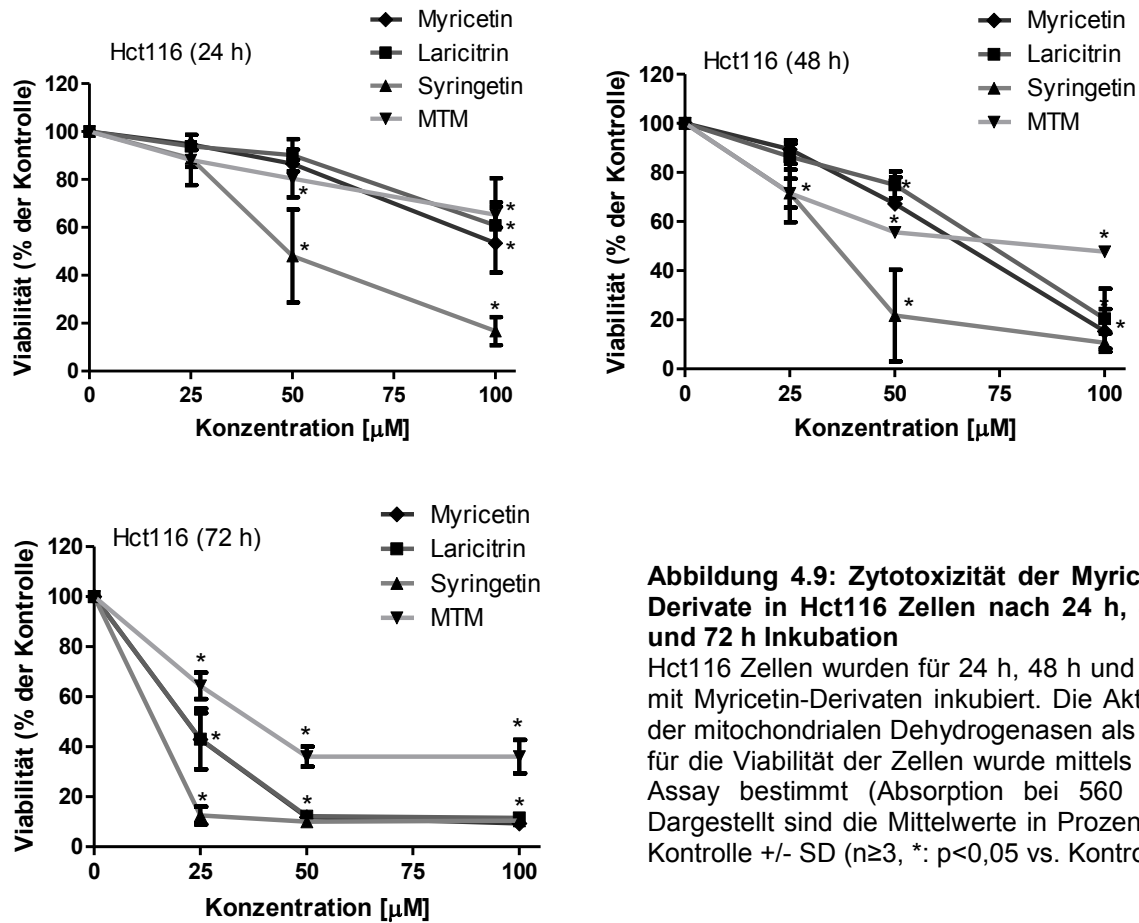
**Abbildung 4.8: Zytotoxizität der Quercetin-Derivate in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden für 48 h und 72 h mit Isorhamnetin oder Rhamnetin inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle  $\pm$  SD ( $n=4$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Der 100  $\mu\text{M}$  Wert für Rhamnetin wurde aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht ausgewertet.

In Abbildung 4.8 ist das zytotoxische Potential von Isorhamnetin und Rhamnetin in Caco-2 Zellen nach 48 h und 72 h Inkubation dargestellt. Im Vergleich zur Inkubation über 24 h zeigt sich keine Veränderung in der Viabilität der Zellen nach Behandlung mit Isorhamnetin. Einzig nach 72 h zeigt Isorhamnetin die Tendenz einer Reduktion der Zellviabilität. Für Rhamnetin kann nur nach 48 h eine Reduktion in der Zellviabilität beobachtet werden. Nach 72 h zeigt auch Rhamnetin die Tendenz einer reduzierten Viabilität. Analog zur Inkubation für 24 h reagieren Caco-2 Zellen weniger sensitiv auf eine Behandlung mit Isorhamnetin und Rhamnetin im Vergleich zu Hct116 Zellen.

#### 4.1.2.2 Zytotoxische Effekte von Myricetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien

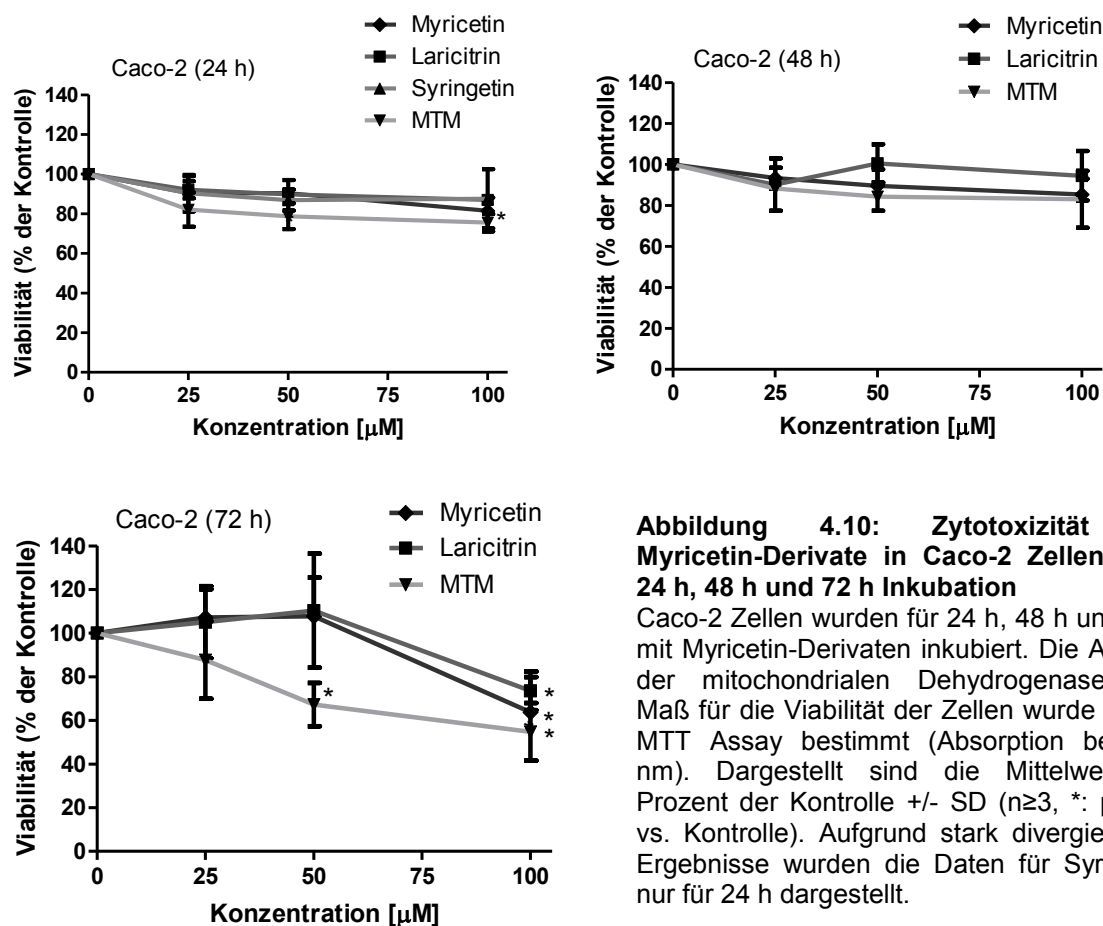
Zytotoxische Effekte der verwendeten Myricetin-Derivate wurden in den beiden Kolonkarzinomzelllinien Hct116 und Caco-2 sowie in HepG2 humanen Hepatomzellen mit einer Inkubationszeit von 24 h, 48 h und 72 h untersucht.



**Abbildung 4.9: Zytotoxizität der Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation**

Hct116 Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit Myricetin-Derivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n≥3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

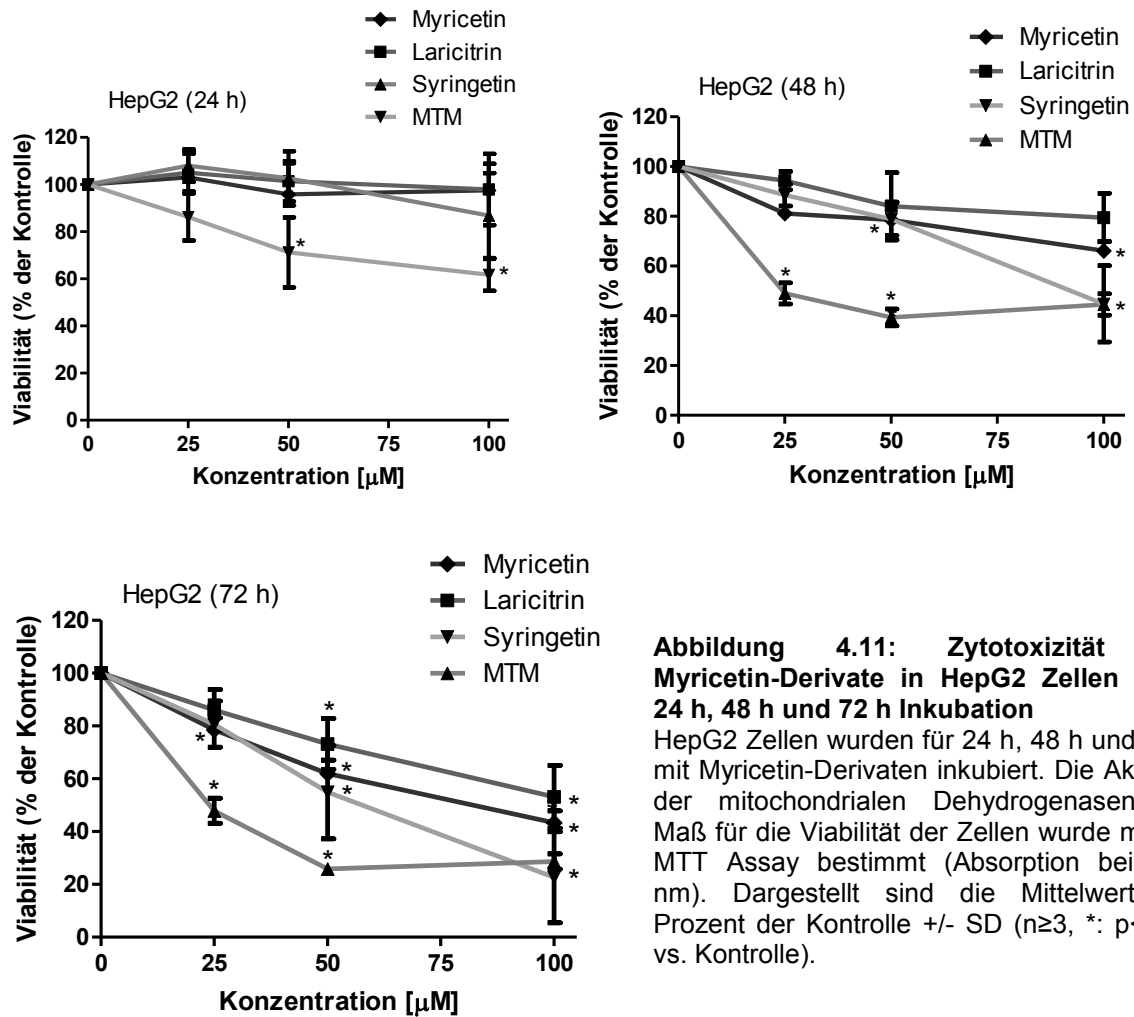
Abbildung 4.9 zeigt das zytotoxische Potential der verwendeten Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation. Den stärksten Effekt hinsichtlich einer Zytotoxizität zeigt nach allen Inkubationszeitpunkten Syringetin. Nach 24 h Inkubation mit 50 µM Syringetin ist die Viabilität der Zellen etwa um die Hälfte reduziert. Nach 48 h Inkubationszeit liegt die Viabilität bei dieser Konzentration nur noch bei ca. 20%. Der dreifach methylierte MTM ist nach 24 h und 48 h bis zu einer Konzentration von 50 µM toxischer als Myricetin und Laricitrin. Laricitrin und Myricetin wirken nach 24 h nur bei einer Konzentration von 100 µM zytotoxisch auf die Hct116 Zellen. Nach 48 h Inkubationszeit zeigt sich bereits bei 50 µM Myricetin und Laricitrin eine Verminderung der Zellviabilität und nach 72 h tritt dieser Effekt bereits bei 25 µM ein. Nach 72 h Schädigung stellt sich bei allen verwendeten Substanzen ab 50 µM ein Plateau ein und die Viabilität nimmt nicht weiter ab.



**Abbildung 4.10: Zytotoxizität der Myricetin-Derivate in Caco-2 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation**

Caco-2 Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit Myricetin-Derivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ , \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle). Aufgrund stark divergierender Ergebnisse wurden die Daten für Syringetin nur für 24 h dargestellt.

Die methylierten Myricetin-Derivate zeigen in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 keine signifikant toxischen Effekte nach einer Inkubationszeit von 24 h und 48 h (Abbildung 4.10). Nur Myricetin hat in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  einen Einfluss auf die Zellviabilität nach 24 h. Nach 48 h Inkubation mit den Myricetin-Derivaten sind keine toxischen Effekte erkennbar. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h bewirkt eine Reduktion der Viabilität der Zellen durch MTM (ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ ). Myricetin und Laricitrin zeigen erst ab 100  $\mu\text{M}$  eine signifikante Toxizität. Da die Ergebnisse für Syringetin bei mehr als 24 h Inkubationszeit sehr schwankten, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. Generell scheinen Caco-2 Zellen weniger sensitiv auf Myricetin-Derivate zu reagieren als Hct116 Zellen.



Die toxischen Effekte einer Inkubation von humanen Hepatomzellen (HepG2) mit Myricetin-Derivaten sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei allen getesteten Zeitpunkten erweist sich der dreifach methylierte MTM als am stärksten toxische Derivat. Nach 48 h und 72 h Inkubation sind 25 µM MTM in der Lage, die Viabilität der HepG2 Zellen um etwa die Hälfte zu reduzieren. Keine der anderen drei getesteten Substanzen ist dazu in diesem Konzentrationsbereich in der Lage. Lediglich eine Inkubation mit 100 µM Syringetin und Myricetin über 48 h bzw. 72 h (für Myricetin) senkt die Viabilität um etwa 50%. Verglichen mit den anderen beiden getesteten Zelllinien Hct116 und Caco-2 scheinen die HepG2 Zellen eine mittlere Position hinsichtlich der Sensitivität gegenüber den verwendeten Myricetin-Derivaten einzunehmen.

### **4.1.3 Aufnahme und Metabolismus von Quercetin- und Myricetin-Derivaten**

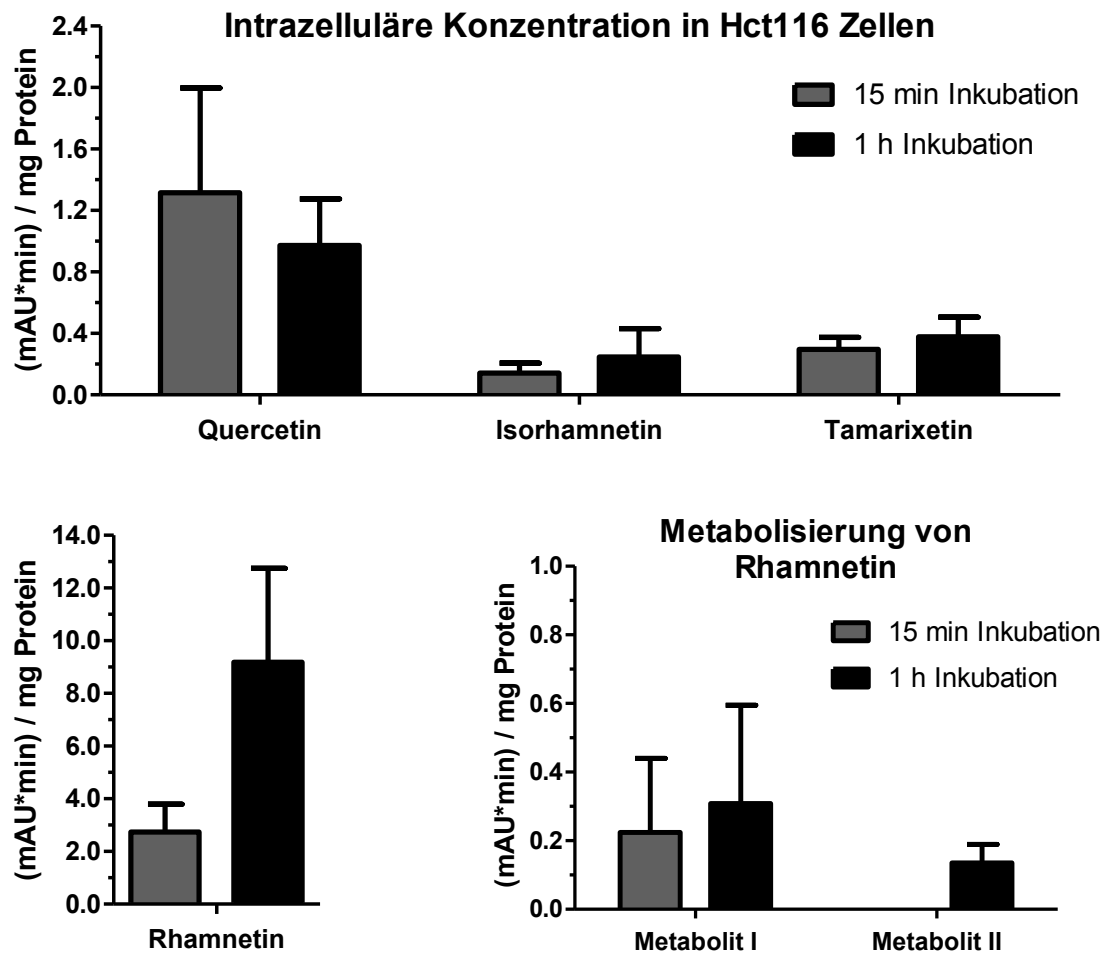
Die Detektion intrazellulärer Mengen an Quercetin- und Myricetin-Derivaten erfolgte primär mittels HPLC. Wurden dabei weitere Substanzen zusätzlich zu den verwendeten Flavonoiden detektiert (hier als „Metabolite“ bezeichnet), wurden die Proben in der LC-MS analysiert, um deren Identität anhand ihres Aufzählens zu klären.

Eine andere Methode zur Ermittlung des intrazellulären Vorhandenseins sowie der genaueren Lokalisation der verwendeten Flavonoide innerhalb der Zelle erfolgte fluoreszenzmikroskopisch nach Inkubation mit dem Fluoreszenzverstärker NSRA. Diese Methode diente als zusätzlicher Hinweis, dass die Zellen die Quercetin- und Myricetin-Derivate intrazellulär aufnahmen.

#### **4.1.3.1 Intrazelluläre Detektion und Metabolisierung von Quercetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien mittels HPLC**

In Abbildung 4.12 sind die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit 50 µM Quercetin-Derivaten in Hct116 Zellen nach 15 min sowie 1 h dargestellt. Außer bei Rhamnetin zeigen sich keine Unterschiede in der intrazellulär detektierten Menge an Flavonoid zwischen 15 min und 1 h. Lediglich bei einer Inkubation mit Rhamnetin ist nach 1 h etwa die dreifache Menge dessen vorhanden, was nach 15 min intrazellulär detektierbar ist. Zusätzlich konnten hier zwei Metabolite des Rhamnetins detektiert werden, die eine unterschiedliche Retentionszeit verglichen mit Rhamnetin (28,2 min) aufweisen. Die Retentionszeiten betragen 22,8 min (=Metabolit I) und 30,7 min (=Metabolit II), letzteres kann jedoch nur nach einstündiger Inkubation detektiert werden. Verglichen mit Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin sind die intrazellulären Gehalte an Rhamnetin um ein Vielfaches höher. Generell sind die intrazellulär detektierten Mengen an Isorhamnetin und Tamarixetin sehr niedrig, was darauf schließen lässt, dass diese beiden Flavonoide nur schlecht absorbiert werden oder effektiv exportiert werden. Quercetin scheint in Hct116 Zellen besser aufgenommen zu werden als Isorhamnetin und Tamarixetin, hier sind die auf den Proteingehalt normierten AUC-Werte deutlich höher. Nach 15 min Inkubationszeit sind die intrazellulären Quercetin-Mengen größer als nach 1 h, jedoch weichen die Werte der Einzelversuche bei 15 min stärker voneinander ab.

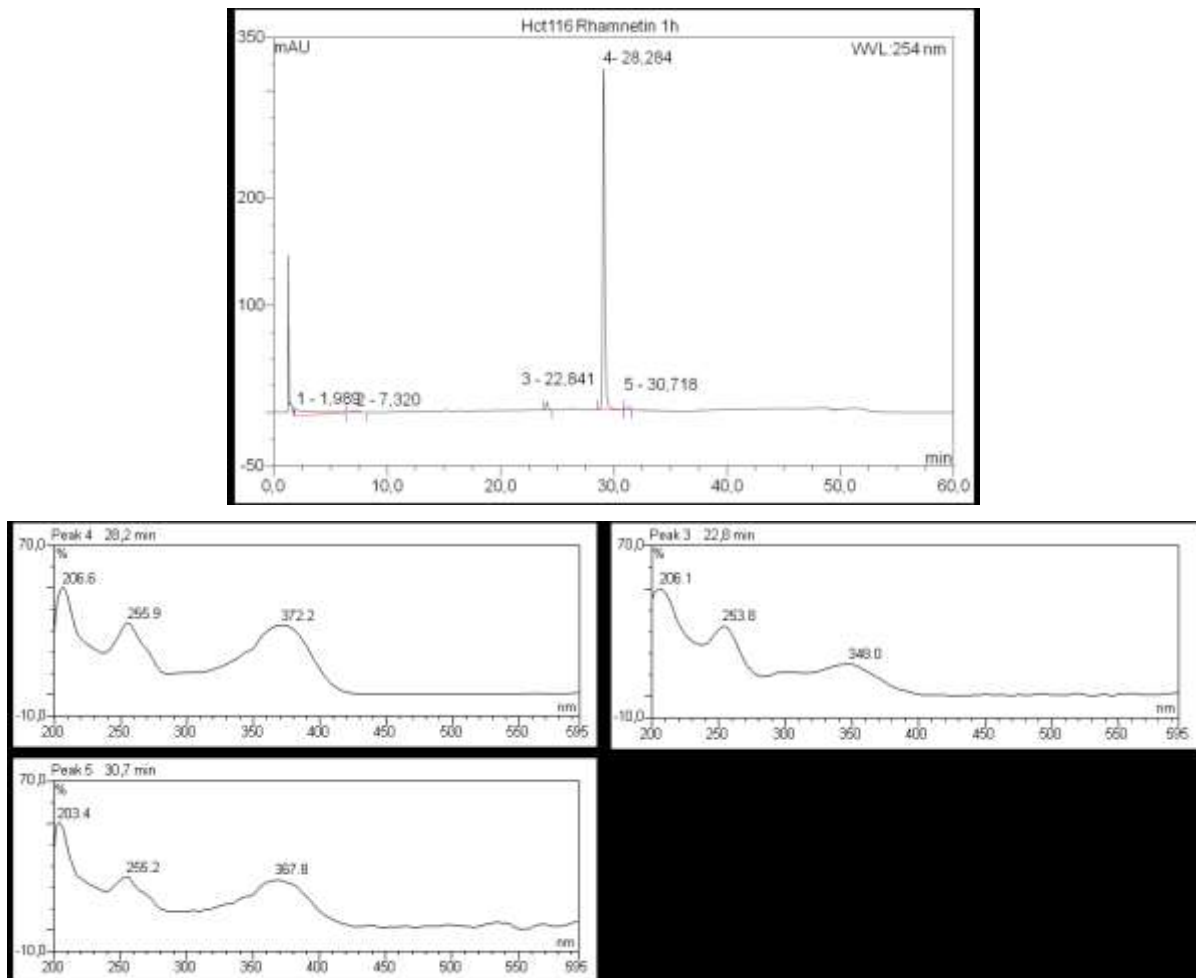




**Abbildung 4.12: Intrazelluläre Konzentration der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min bzw. 1 h mit 50  $\mu$ M Quercetin-Derivaten inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Quercetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Flavonoid-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Nach Inkubation mit Rhamnetin wurden zwei zusätzliche Peaks mit unterschiedlicher Retentionszeit verglichen mit Rhamnetin detektiert, die hier als Rhamnetin-Metabolite in einer separaten Grafik gezeigt werden. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

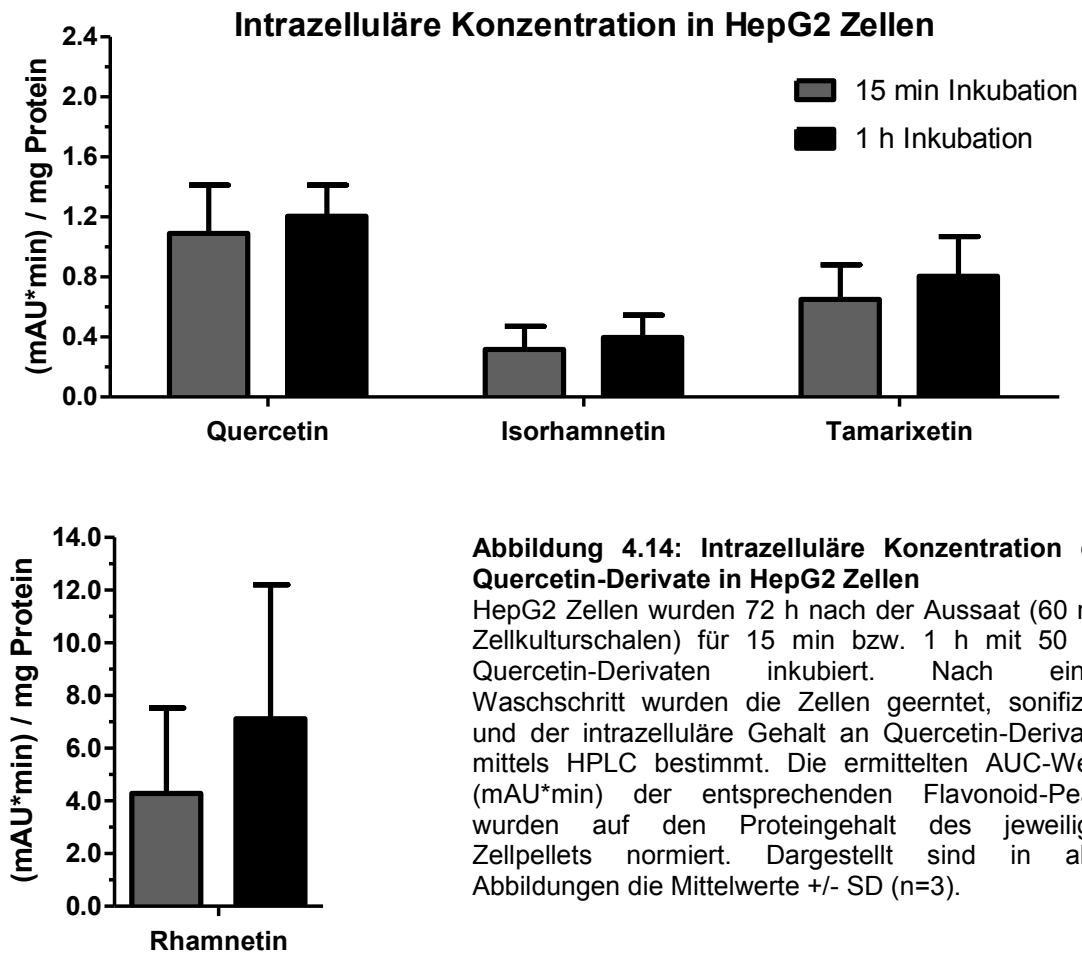
Beispielhaft ist in Abbildung 4.13 ein Chromatogramm mit entsprechenden UV-Spektren der 1 h Inkubation von Hct116 Zellen mit Rhamnetin dargestellt. Zusätzlich zum Rhamnetin Peak nach 28,2 min sind die beiden Metabolite mit einer Retentionszeit von 22,8 min und 30,7 min erkennbar.



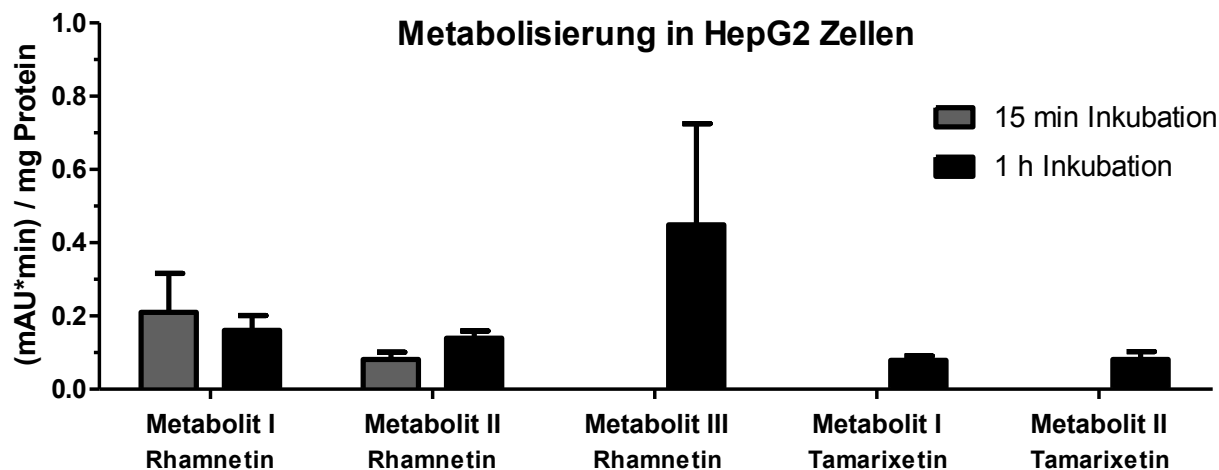
**Abbildung 4.13: Beispielhaftes Chromatogramm der zellulären Aufnahme von Rhamnetin in Hct116 Zellen nach 1 h Inkubation**

Das abgebildete Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer HPLC mit DAD der Firma Dionex aufgezeichnet. Peak Nr. 4 stellt Rhamnetin dar, Peak Nr. 3 (Retentionszeit von 22,8 min) und Peak Nr. 5 (Retentionszeit von 30,7 min) sind die im Text beschriebenen Rhamnetin-Metabolite I und II. In der unteren Abbildung sind die dazugehörigen UV-Spektren dargestellt.

Die intrazellulären Mengen an Quercetin-Derivaten in HepG2 Zellen sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Hierbei ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Hct116 Zellen, allerdings sind die auf den Proteingehalt normierten AUC-Werte der Hepatomzellen höher als die der Kolonkarzinomzellen. Die intrazellulären Mengen an Isorhamnetin und Tamarixetin sind auch hier sehr gering verglichen mit den etwa doppelt so hohen Quercetin-Gehalten. Eine Inkubation mit Rhamnetin führt zu deutlich höheren intrazellulären Mengen verglichen mit den anderen Quercetin-Derivaten.



Ein Vergleich der beiden Inkubationszeitpunkte zeigt eine minimale Zunahme der intrazellulären Gehalte nach 1 h verglichen mit einer 15 min Inkubation bei Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin und eine deutliche Zunahme bei Rhamnetin. Bei dieser Substanz weichen jedoch die Einzelexperimente stärker voneinander ab. Ähnlich wie in Hct116 Zellen sind nach einer Inkubation mit Rhamnetin verschiedene Metabolite mit unterschiedlichen Retentionszeiten detektierbar. Dieser Effekt tritt in HepG2 Zellen zusätzlich bei einer Inkubation mit Tamarixetin auf. Die detektierten Metabolite beider Substanzen sind in Abbildung 4.15 als die jeweiligen Rhamnetin- bzw. Tamarixetin-Metabolite dargestellt.

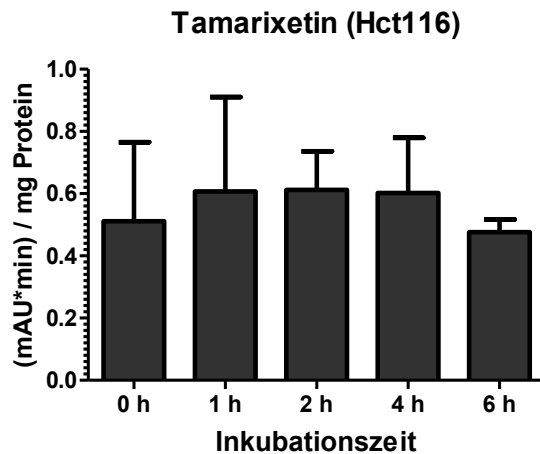


**Abbildung 4.15: Metabolisierung der Quercetin-Derivate in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden wie in Abbildung 4.14 beschrieben behandelt. Nach Inkubation mit Rhamnetin und Tamarixetin wurden zusätzliche Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten verglichen mit den Ausgangssubstanzen detektiert, die hier als Rhamnetin-Metabolite bzw. Tamarixetin-Metabolite gezeigt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

Als Rhamnetin-Metabolit I wird eine Substanz mit einer Retentionszeit von 22,8 min detektiert, als Rhamnetin-Metabolit II eine Substanz mit einer Retentionszeit von 24,9 min und als Rhamnetin-Metabolit III eine Substanz mit einer Retentionszeit von 30,7 min. Analog zum Metabolit in Hct116 Zellen kann der Rhamnetin-Metabolit III (Retentionszeit 30,7 min) auch in den HepG2 Zellen nur nach 1 h Inkubation detektiert werden. Die beiden anderen Metabolite werden jeweils nach 15 min und 1 h Inkubation detektiert. Anhand der Retentionszeiten und der UV-Spektren dieser Metabolite ist davon auszugehen, dass es sich bei Rhamnetin-Metabolit I und Metabolit III um die gleichen Metabolite handelt, die auch in Hct116 Zellen detektiert werden. Zusätzlich zu Rhamnetin wird auch Tamarixetin von den HepG2 Zellen metabolisiert, so dass 2 verschiedene Metabolite detektierbar sind. Dabei hat der Tamarixetin-Metabolit I eine Retentionszeit von 23,5 min und der Tamarixetin-Metabolit II eine Retentionszeit von 24,1 min (Vergleich: Retentionszeit Tamarixetin 27,3 min). Beide Metabolite sind nur nach 1 h Inkubationszeit vorhanden. Wie bei Rhamnetin wurde auch hier die Identität der Metabolite nicht aufgeklärt, da die intrazellulären Gehalte der Metabolite zu gering waren um mittels LC-MS analysiert zu werden.

In weiteren Experimenten wurde der zeitliche Verlauf der Inkubation mit zwei Quercetin-Derivaten in Hct116 Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen für bis zu 6 h mit Rhamnetin und Tamarixetin inkubiert. Zusätzlich wurde die zelluläre Aufnahme von Rhamnetin exemplarisch in weiteren Zelllinien (Caco-2 und HepG2) untersucht.

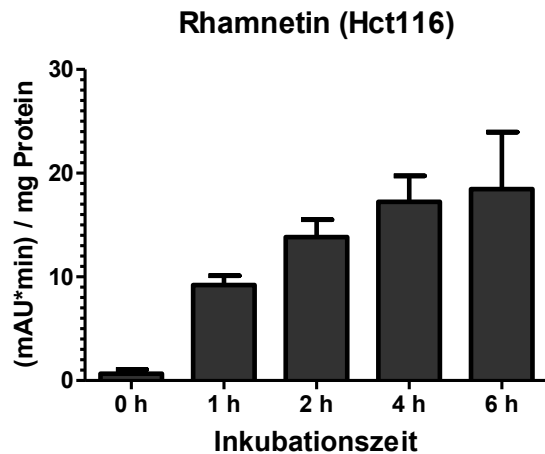


**Abbildung 4.16: Intrazelluläre Konzentration von Tamarixetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu$ M Tamarixetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Tamarixetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

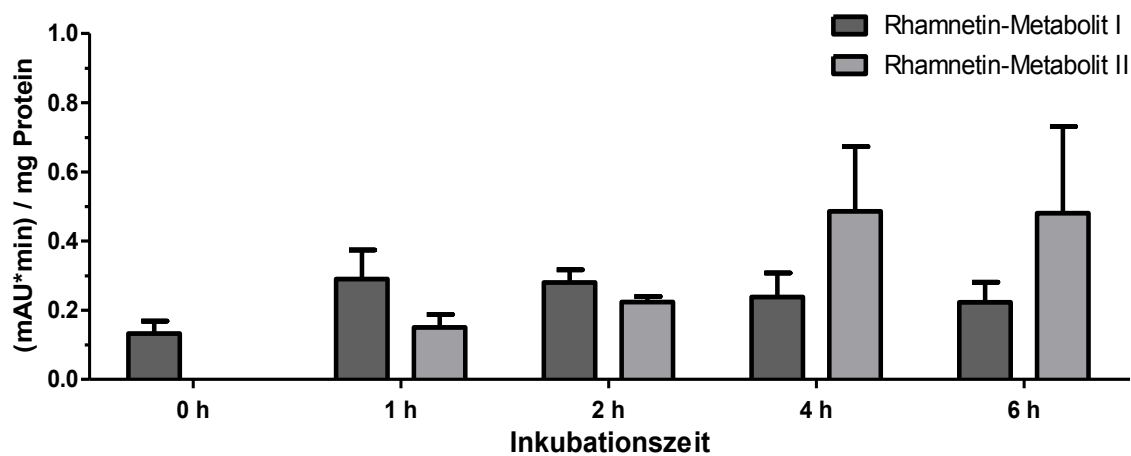
Die zelluläre Aufnahme von Tamarixetin in Hct116 Zellen zeigt keine Zunahme über den hier getesteten Inkubationszeitraum und ist generell sehr gering (Abbildung 4.16). Zum Zeitpunkt 0 h sind bereits intrazelluläre Mengen an Tamarixetin detektierbar. Dies ist methodisch bedingt, da von der Inkubation der Zellen bis zur Aufarbeitung der Zellen etwa zwei bis fünf Minuten vergingen und der 0 h Wert somit nicht direkt 0 h darstellt.

Abbildung 4.17 zeigt die intrazellulären Gehalte an Rhamnetin in Hct116 Zellen zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Hierbei ist eine zeitliche Akkumulation von Rhamnetin zu erkennen. Analog zu Abbildung 4.12 (intrazelluläre Konzentration der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen) sind auch hier zwei Metabolite detektierbar, die als Rhamnetin-Metabolit I (Retentionszeit 22,8 min) und Rhamnetin-Metabolit II (Retentionszeit 30,7 min) dargestellt sind (im Vergleich: Retentionszeit von Rhamnetin: 28,2 min). Aufgrund der gleichen Retentionszeiten ist davon auszugehen, dass es sich bei beiden Experimenten um dieselben Metabolite handelt. In weiterführenden Experimenten wurden die zelluläre Aufnahme von Rhamnetin sowie dessen Metabolisierung in einer zweiten Kolonkarzinomzelllinie (Caco-2 Zellen) und in HepG2 Hepatomzellen untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.18 und 4.19 gezeigt.

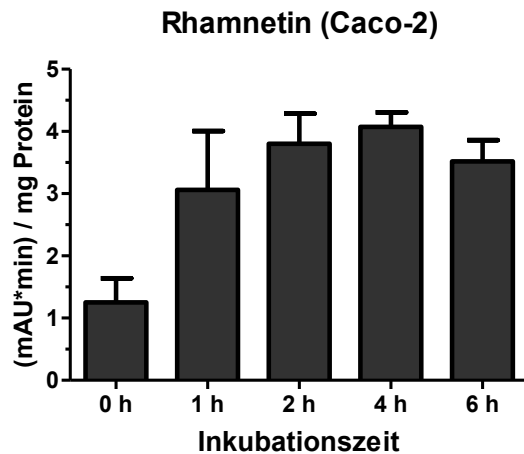


**Abbildung 4.17: Intrazelluläre Konzentration von Rhamnetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu$ M Rhamnetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen gerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Rhamnetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des Zellpellets normiert. In der unteren Abbildung sind die Rhamnetin Metabolite gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

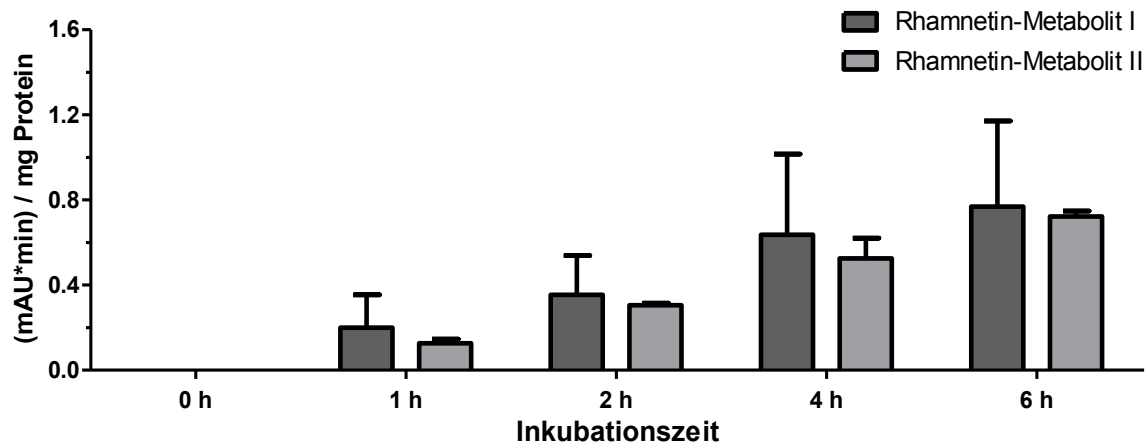


Die in Abbildung 4.18 dargestellten AUC-Werte der mit Rhamnetin inkubierten Caco-2 Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationszeiten. Im Gegensatz zu Hct116 Zellen sind die intrazellulären Mengen um ein Vielfaches geringer. Hinsichtlich einer Metabolisierung zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei Hct116 Zellen. Auch in Caco-2 Zellen sind zwei Rhamnetin-Metabolite detektierbar, Metabolit I hat dabei eine Retentionszeit von 29,8 min und Metabolit II eine Retentionszeit von 30,7 min. Da Metabolit II die gleiche Retentionszeit wie der Metabolit in Hct16 Zellen besitzt, gibt es Hinweise, dass es sich bei beiden um denselben Metaboliten handeln könnte.

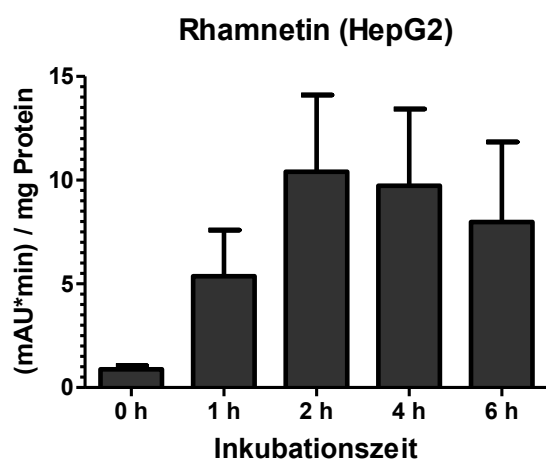


**Abbildung 4.18: Intrazelluläre Konzentration von Rhamnetin in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu$ M Rhamnetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Rhamnetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des Zellpellets normiert. In der unteren Abbildung sind die Rhamnetin Metabolite gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

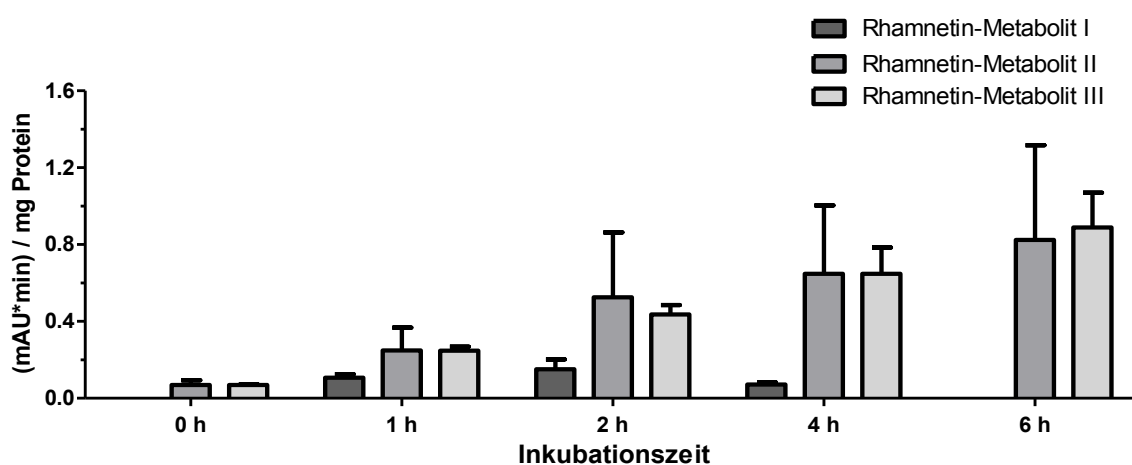


Bei einer Inkubation von HepG2 Zellen mit 50  $\mu$ M Rhamnetin (Abbildung 4.19) ist keine zelluläre Akkumulation dieser Substanz erkennbar. Die intrazellulär detektierten Mengen nehmen bis 2 h Inkubationszeit zu, bleiben dann jedoch bis zu 6 h auf etwa dem gleichen Niveau. Verglichen mit den anderen beiden verwendeten Zelllinien liegen die intrazellulären Konzentrationen an Rhamnetin zwischen den in Hct116 und den in Caco-2 detektierten Mengen. Hinsichtlich einer Metabolisierung von Rhamnetin ist bei HepG2 Zellen ein zusätzlicher Metabolit nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubationszeit detektierbar (Rhamnetin-Metabolit I mit einer Retentionszeit von 24,9 min). Daneben sind auch die bereits in Hct116 und Caco-2 detektierten Metabolite mit Retentionszeiten von 29,8 min (Rhamnetin-Metabolit II) und 30,7 min (Rhamnetin-Metabolit III) in HepG2 Zellen zu finden. Beide sind im Gegensatz zu Metabolit I bei allen untersuchten Zeitpunkten detektierbar. Generell sind die Absorption von Rhamnetin und somit die intrazellulären Gehalte in allen drei untersuchten Zelllinien hoch verglichen mit den anderen Quercetin-Derivaten. Die Aufnahme von Quercetin und Tamarixetin ist in den beiden verwendeten Zelllinien Hct116 und HepG2 sehr gering und es findet keine Metabolisierung beider Substanzen in der Kolonkarzinomzelllinie statt.



**Abbildung 4.19: Intrazelluläre Konzentration von Rhamnetin in HepG2 Zellen**

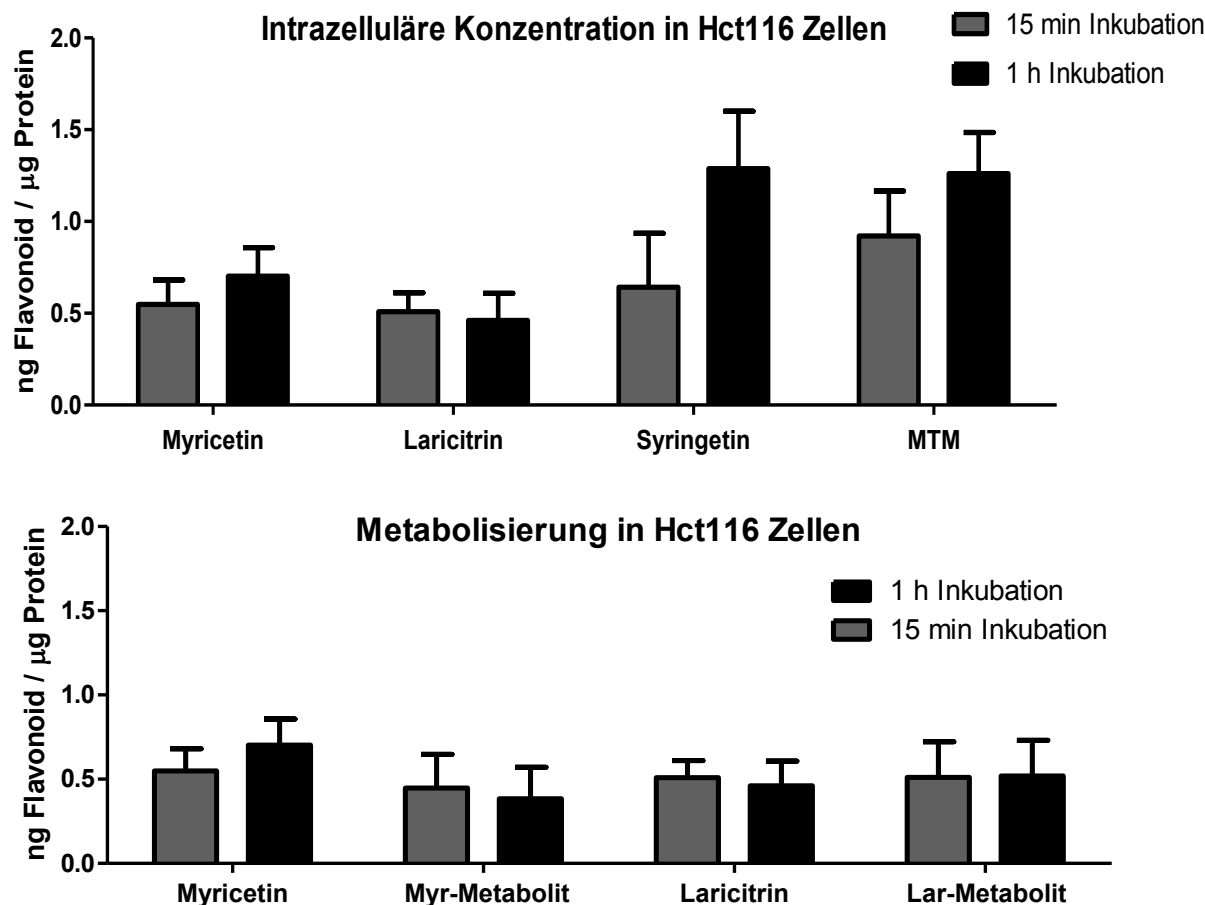
HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu\text{M}$  Rhamnetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Rhamnetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. In der unteren Abbildung sind die Rhamnetin Metabolite gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).



#### 4.1.3.2 Intrazelluläre Detektion und Metabolisierung von Myricetin-Derivaten in verschiedenen Zelllinien mittels HPLC

Die Aufnahmestudien wurden mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  Myricetin, Laricitrin, Syringetin und MTM durchgeführt. Dabei betrug die Inkubationszeit der Kolonkarzinomzellen Hct116 und Caco-2 sowie der Hepatomzellen HepG2 jeweils 15 min und 1 h. Zusätzlich wurde die Aufnahme dieser Flavonoide bei 4°C untersucht, um den Einfluss aktiver Transportvorgänge abschätzen zu können. Ferner wurden mit allen vier Substanzen Kinetiken von 0 h, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h in den oben genannten Zelllinien aufgenommen. Bei allen Aufnahmestudien wurde die AUC (mAU\*min) der einzelnen Peaks mithilfe von Kalibrierungen in ng Flavonoid umgerechnet und schließlich auf den jeweiligen Proteingehalt (in  $\mu\text{g}$  Protein) normiert.





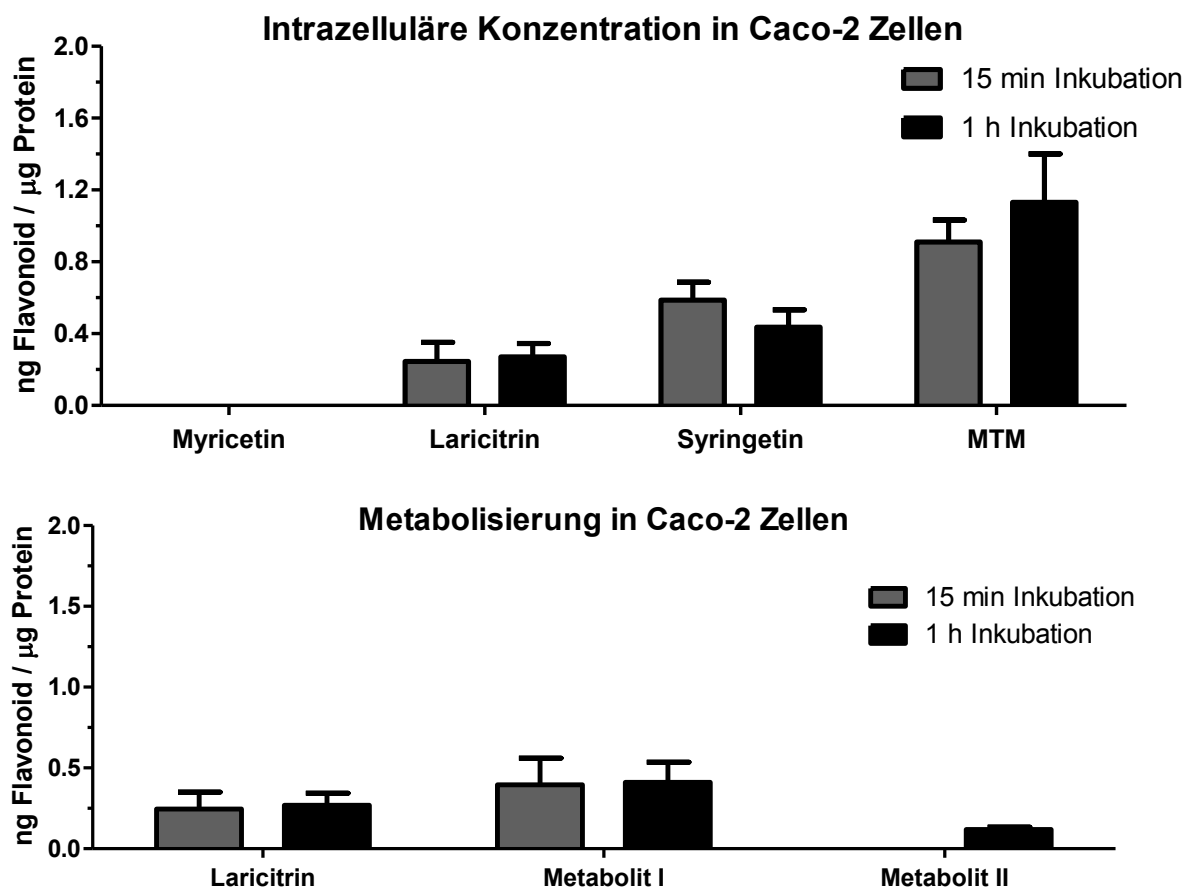
**Abbildung 4.20: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min und 1 h mit 50 µM Myricetin-Derivaten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach Inkubation mit Myricetin und Laricitrin wurde je ein zusätzlicher Peak detektiert, die hier als Myricetin- bzw. Laricitrin-Metabolite in einer separaten Grafik gezeigt werden. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte +/- SD (n=3).

In Abbildung 4.20 sind die intrazellulären Gehalte der Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation gezeigt. Während die Mengen an Myricetin und Laricitrin sich nur im Bereich von 0,5 – 0,7 ng Flavonoid/µg Protein bewegen, liegen die Werte für Syringetin und MTM nach 1 h Inkubation über 1,0 ng Flavonoid/µg Protein. Zusätzlich ist bei Syringetin und MTM die Tendenz einer Zunahme der intrazellulären Menge von 15 min Inkubation auf 1 h zu verzeichnen. Dies ist bei Laricitrin nicht der Fall. Bei Myricetin ist die Zunahme bei 1 h im Vergleich zur 15 min Inkubation nur sehr gering. Sowohl bei Myricetin als auch bei Laricitrin sind nach beiden Zeitpunkten Metabolite detektierbar. Der Myricetin-Metabolit weist mit etwa 17,5 min eine geringere Retentionszeit auf als Myricetin (23,0 min) und ist somit polarer als die Ausgangssubstanz. Die Retentionszeit des Laricitrin-Metaboliten beträgt etwa 20,0 min und ist wie bei Myricetin polarer als die Ausgangssubstanz (Retentionszeit Laricitrin: ca. 25,6 min) selbst. Die intrazellulären Mengen dieser Myricetin-

und Laricitrin-Metabolite entsprechen mit 0,5 ng Flavonoid/ $\mu\text{g}$  Protein in etwa denen von Myricetin und Laricitrin.

Für vergleichende Untersuchungen wurde eine weitere Kolonkarzinomzelllinie (Caco-2 Zellen) ebenfalls für 15 min und 1 h mit 50  $\mu\text{M}$  Myricetin-Derivaten inkubiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

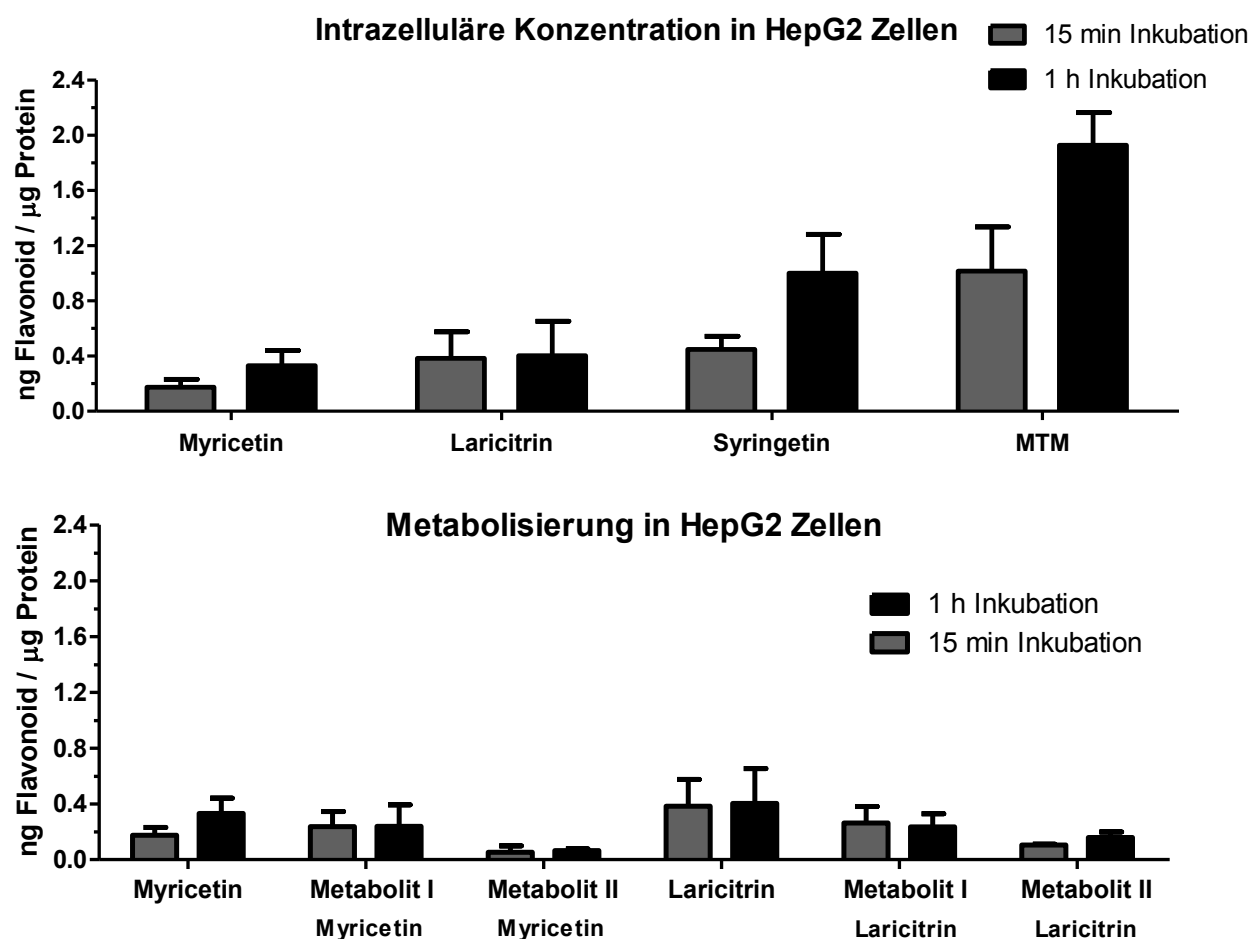


**Abbildung 4.21: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min und 1 h mit 50  $\mu\text{M}$  Myricetin-Derivaten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach Inkubation mit Laricitrin wurden zwei zusätzliche Peaks detektiert, die hier als Laricitrin-Metabolite in einer separaten Grafik gezeigt werden. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

Die in Caco-2 Zellen ermittelten intrazellulären Gehalte sind bei Laricitrin niedriger als bei Syringetin und MTM. Eine Inkubation mit MTM liefert mit 1,0 bis 1,2 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein die höchsten intrazellulären Mengen aller Myricetin-Derivate. Ähnlich wie in Hct116 Zellen wird Laricitrin von Caco-2 Zellen metabolisiert und es entstehen zwei verschiedene Metabolite. Laricitrin-Metabolit I hat eine Retentionszeit von etwa 20,0 min und Laricitrin-Metabolit II kann nach etwa 27,5 min detektiert werden. Die intrazellulären Gehalte von Metabolit I sind

geringfügig höher als die von Laricitrin selbst. Metabolit II kann nur nach 1 h Inkubation detektiert werden (in geringerer Menge als Metabolit I und Laricitrin). Anhand der Retentionszeit von Metabolit I ist davon auszugehen, dass es sich um den gleichen Metaboliten handelt, der auch in Hct116 Zellen nach 20,0 min detektiert werden kann. Auffallend ist bei der Inkubation der Caco-2 Zellen mit Myricetin-Derivaten, dass weder nach 15 min noch nach 1 h Inkubationszeit Myricetin detektiert werden kann.



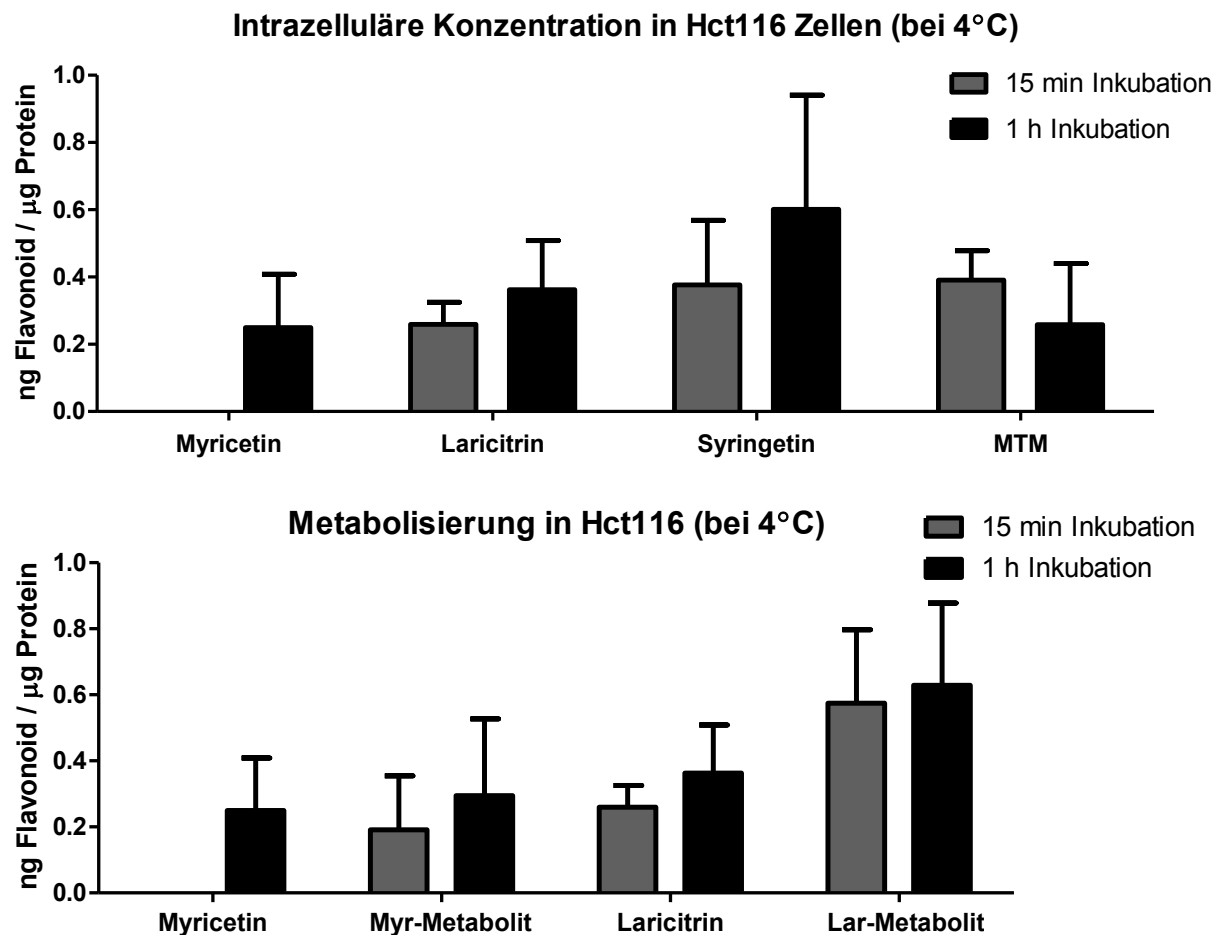
**Abbildung 4.22: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min und 1 h mit 50 µM Myricetin-Derivaten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach Inkubation mit Myricetin und Laricitrin wurden je zwei zusätzliche Peaks detektiert, die hier als Myricetin- bzw. Laricitrin-Metabolite in einer separaten Grafik gezeigt werden. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Vergleichend zu den Kolonkarzinomzellen wurde die zelluläre Aufnahme der Myricetin-Derivaten in der Hepatomzelllinie HepG2 untersucht (Abbildung 4.22). Hierbei zeigt sich, dass die intrazellulären Mengen mit dem Grad der Methylierung der Derivate ansteigen. Während der Gehalt an Myricetin nach 1 h Inkubation bei etwa 0,4 ng Myricetin/µg Protein liegt, ist der Gehalt an Syringetin mit etwa 1,0 ng Syringetin/µg Protein mehr als doppelt so

hoch wie der Myricetin-Gehalt. Die intrazelluläre Menge an MTM beträgt nach 1 h Inkubation etwa 2,0 ng MTM/ $\mu$ g Protein. Ähnlich wie bei Hct116 Zellen kann auch bei Verwendung der HepG2 Zellen eine Metabolisierung von Myricetin und Laricitrin, nicht aber von Syringetin und MTM konstatiert werden. Sowohl bei Myricetin als auch bei Laricitrin können zu beiden Inkubationszeitpunkten jeweils zwei Metabolite detektiert werden. Myricetin-Metabolit I besitzt eine Retentionszeit von 17,5 min, Myricetin-Metabolit II wird nach 25,0 min detektiert (Vergleich: Retentionszeit von Myricetin 23,0 min). Die beiden Metabolite von Laricitrin besitzen eine Retentionszeit von 20,0 min (Metabolit I) und 27,5 min (Metabolit II), während Laricitrin selbst nach 25,5 min detektiert wird. Hinsichtlich der intrazellulären Gehalte liegen alle vier detektierten Metabolite unter den Werten ihrer Ausgangssubstanzen Myricetin und Laricitrin.

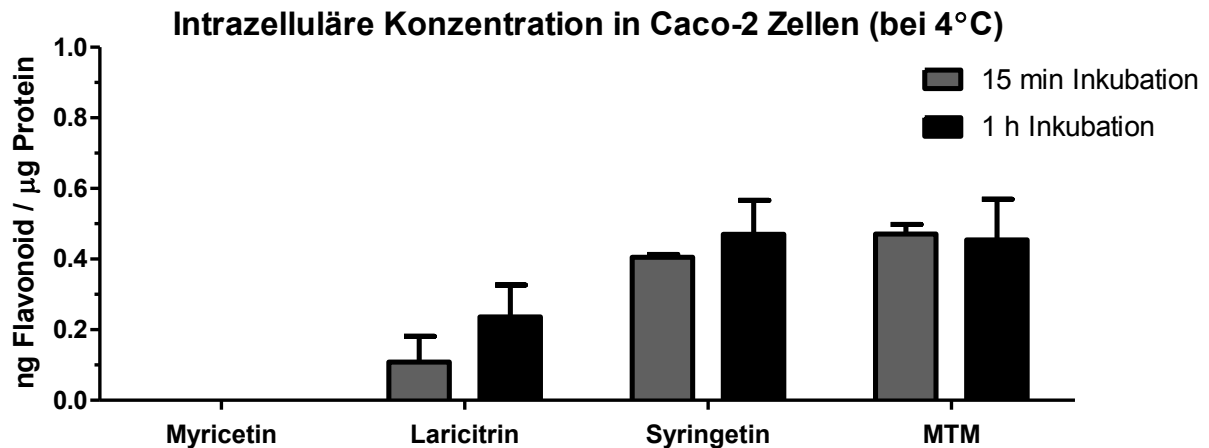
Um die Transportmechanismen, die der oben beschriebenen Aufnahme in die getesteten Zelllinien zugrunde liegen, genauer bestimmen zu können, wurden die Experimente bei 4°C wiederholt. Der Inkubationszeitraum betrug analog zu den bisherigen Aufnahmestudien 15 min und 1 h. Da die Versuche nicht wie bisher bei 37°C sondern nun bei 4°C stattfanden, war davon auszugehen, dass eine Aufnahme nur über passive Vorgänge wie Diffusion geschehen kann. Aktive Transportvorgänge wie beispielsweise über ABC Transporter sind generell energieabhängig. Bei 4°C ist die oxidative Phosphorylierung geringer, so dass weniger ATP für aktive Transportprozesse vorhanden ist. Daher ist ein aktiver Transport der Flavonoide bei 4°C unwahrscheinlich. Die Aufnahmestudien bei 4°C wurden mit den gleichen Bedingungen wie die Experimente bei 37°C durchgeführt. Die Inkubation mit den Myricetin-Derivaten fand in konditioniertem Zellkulturmedium statt, welches 15 min vor der Inkubation auf 4°C abgekühlt wurde. Zusätzlich wurden die Flavonoide wie in den bisherigen Aufnahmestudien mit 500  $\mu$ M Ascorbinsäure stabilisiert. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Inkubation bei 4°C aus technischen Gründen nicht in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre stattfinden konnte.



**Abbildung 4.23: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen bei 4°C**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min auf 4°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µM Myricetin-Derivaten für 15 min und 1 h bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach Inkubation mit Myricetin und Laricitrin wurde je ein zusätzlicher Peak detektiert, die hier als Myricetin- bzw. Laricitrin-Metabolite in einer separaten Grafik gezeigt werden. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

In Abbildung 4.23 sind die intrazellulären Gehalte der Myricetin-Derivate nach 15 min und 1 h Inkubation bei 4°C dargestellt. Myricetin selbst kann nur nach 1 h Inkubation detektiert werden, nach 15 min ist lediglich ein Metabolit mit einer Retentionszeit von 17,5 min detektierbar. Die intrazellulären Gehalte steigen mit zunehmender Methylierung an, einzig der dreifach methylierte MTM weist nach 1 h Inkubation niedrigere Mengen auf als doppelt methyliertes Syringetin. Verglichen mit der Inkubation bei 37°C nehmen die intrazellulären Mengen an MTM bei 4°C um mehr die Hälfte ab. Ähnlich wie bei Myricetin ist auch nach Inkubation mit Laricitrin ein Metabolit detektierbar. Verglichen mit Laricitrin sind die intrazellulären Gehalte des Metaboliten zu beiden Inkubationszeitpunkten höher. Aufgrund der Retentionszeit von 20,0 min ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem Metabolit um den gleichen wie bei der Inkubation bei 37°C handelt.

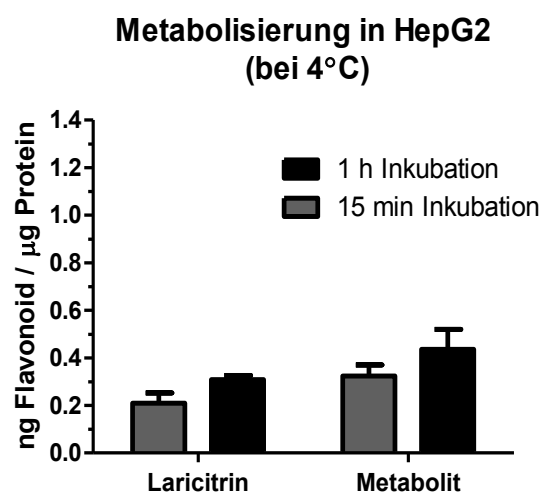
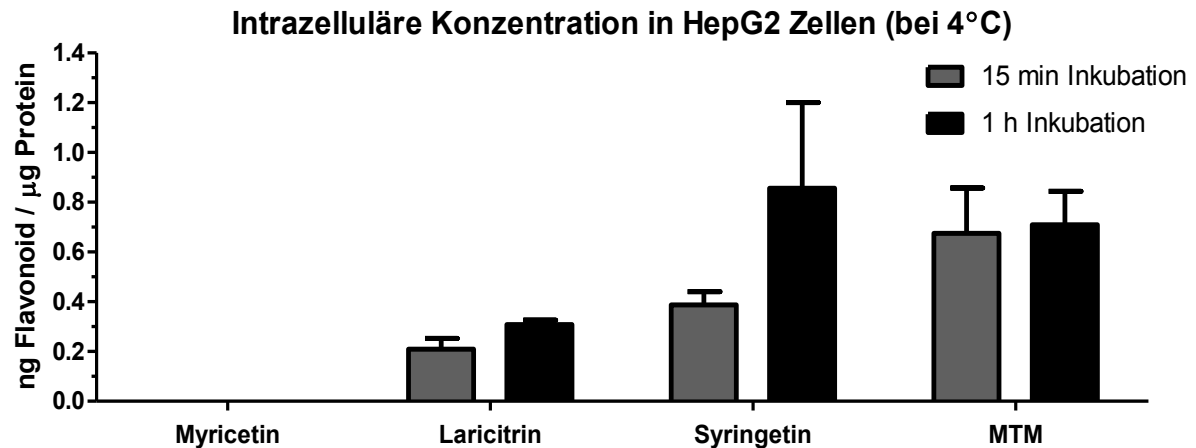


**Abbildung 4.24: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in Caco-2 Zellen bei 4°C**

Caco-2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für 15 min auf 4°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µM Myricetin-Derivaten für 15 min und 1 h bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Dargestellt sind in die Mittelwerte +/- SD (n=2).

Die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit Myricetin-Derivaten in Caco-2 Zellen bei 4°C sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Wie bei der Inkubation bei 37°C ist auch hier kein Myricetin detektierbar. Die intrazellulären Gehalte an Syringetin und MTM sind mit etwa 0,4 ng Flavonoid/µg Protein zu beiden Zeitpunkten annähernd gleich und etwa doppelt so hoch wie die von Laricitrin. Nach der Inkubation bei 4°C sind keine Laricitrin-Metabolite detektierbar. Ein Vergleich der intrazellulären Mengen bei 4°C und bei 37°C zeigt keine deutlichen Unterschiede bei Laricitrin und Syringetin. Einzig die Werte für MTM sind bei 4°C wesentlich geringer als bei 37°C (siehe auch Tabelle 4.1).

Zuletzt wurde die Inkubation in HepG2 Zellen bei 4°C durchgeführt um Hinweise bezüglich der Art der Aufnahme in Hepatomzellen zu erhalten. Die entsprechenden Ergebnisse sind der Abbildung 4.25 zu entnehmen. Zu keinem der beiden Inkubationszeitpunkte kann Myricetin detektiert werden. Die intrazellulären Mengen an Laricitrin sind sowohl nach 15 min als auch nach 1 h Inkubation sehr gering. Jedoch findet sich wie bei der Inkubation bei 37°C ein Laricitrin-Metabolit mit einer Retentionszeit von 20,0 min. Dessen intrazelluläre Gehalte sind leicht höher als die von Laricitrin selbst. Während kein zeitlicher Unterschied bei den Gehalten an MTM besteht, sind die intrazellulären Mengen an Syringetin nach 1 h gut doppelt so hoch wie nach 15 min Inkubationszeit.



**Abbildung 4.25: Intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate in HepG2 Zellen bei 4°C**  
 HepG2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für 15 min auf 4°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µM Myricetin-Derivaten für 15 min und 1 h bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt an Myricetin-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach Inkubation mit Laricitrin wurde ein zusätzlicher Peak detektiert, der hier als Laricitrin-Metabolit in einer separaten Grafik gezeigt wird. Dargestellt sind in allen Abbildungen die Mittelwerte +/- SD (n=2).

Einen abschließenden Vergleich aller Aufnahmestudien in den drei verwendeten Zelllinien bei 37°C sowie bei 4°C liefert die Tabelle 4.1, in der die intrazellulären Gehalte als ng Flavonoid/µg Protein zusammengefasst sind. Während sich die intrazellulären Mengen von Laricitrin und Syringetin bei 37°C und 4°C nicht merklich voneinander unterscheiden, ist der Unterschied bei der Inkubation von Myricetin und MTM zwischen den beiden Temperaturen deutlich erkennbar. Myricetin kann nach einer 1 h Inkubation bei 4°C lediglich in Hct116 Zellen detektiert werden, in HepG2 und Caco-2 Zellen ist kein intrazelluläres Myricetin messbar. Nach Inkubation mit MTM bei 4°C sind die intrazellulären Gehalte in allen drei Zelllinien maximal halb so hoch wie nach einer Inkubation bei 37°C.

**Tabelle 4.1: Vergleiche der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate bei 37°C und 4°C**

Die Mittelwerte der einzelnen Aufnahmestudien der Myricetin-Derivate wurden zusammengefasst und sind hier als ng Flavonoid/ $\mu$ g Protein angegeben. Während die Aufnahmestudien bei 37°C alle mit mindestens n=3 durchgeführt wurden, wurden die Experimente bei 4°C bei Caco-2 und HepG2 nur zweimal durchgeführt. \*=nur in 1 von 3 Experimenten war Myricetin in Hct116 Zellen detektierbar.

15 min (37°C)	Hct116	Caco-2	HepG2	1 h (37°C)	Hct116	Caco-2	HepG2
<b>Myricetin</b>	0.549	-	0.175	<b>Myricetin</b>	0.703	-	0.330
<b>Laricitrin</b>	0.509	0.245	0.383	<b>Laricitrin</b>	0.460	0.270	0.403
<b>Syringetin</b>	0.642	0.587	0.449	<b>Syringetin</b>	1.288	0.436	1.000
<b>MTM</b>	0.922	0.910	1.017	<b>MTM</b>	1.261	1.130	1.929

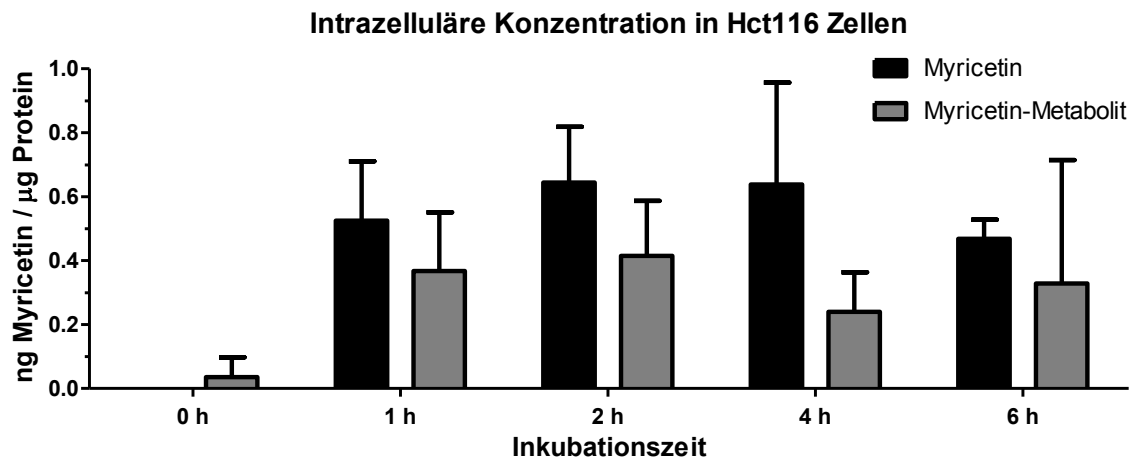
  

15 min (4°C)	Hct116	Caco-2	HepG2	1 h (4°C)	Hct116	Caco-2	HepG2
<b>Myricetin</b>	0.102*	-	-	<b>Myricetin</b>	0.250	-	-
<b>Laricitrin</b>	0.259	0.108	0.210	<b>Laricitrin</b>	0.363	0.237	0.309
<b>Syringetin</b>	0.377	0.405	0.387	<b>Syringetin</b>	0.601	0.471	0.857
<b>MTM</b>	0.391	0.471	0.676	<b>MTM</b>	0.258	0.455	0.709

Zusätzlich zu den Kurzzeitinkubationen der bisherigen Aufnahmestudien wurden mit allen Myricetin-Derivaten Kinetiken in Hct116, Caco-2 und HepG2 Zellen aufgenommen, um eine Akkumulation innerhalb der Zellen zu eruieren. Dazu wurden die entsprechenden Zelllinien mit 50  $\mu$ M Myricetin, Laricitrin, Syringetin oder MTM für bis zu 6 h bei 37°C inkubiert. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass der 0 h-Wert methodisch bedingt nicht 0 h darstellt, sondern vielmehr eine minimale Inkubationszeit von etwa 2 bis 5 min widerspiegelt. Somit ist auch eine Aufnahme der Myricetin-Derivate in die Zellen innerhalb dieser Zeit möglich.

In Abbildung 4.26 sind die intrazellulären Werte nach einer Inkubation von Hct116 Zellen mit 50  $\mu$ M Myricetin dargestellt. Nach 0 h ist kein Myricetin detektierbar, sondern nur ein Metabolit. Dieser besitzt mit 17,5 min eine niedrigere Retentionszeit als Myricetin selbst und konnte auch bei einer Kurzzeitinkubation (siehe Abbildung 4.20) nachgewiesen werden. Die intrazellulären Gehalte nehmen mit zunehmender Inkubationszeit leicht zu, die mittleren Gehalte bewegen sich durch die Streuung der Einzelexperimente jedoch auf etwa dem gleichen Niveau. Der 6 h Wert ist geringfügig niedriger als die 1 h bis 4 h Werte. Anhand dieser Ergebnisse ist nicht von einer Akkumulation von Myricetin in den Zellen auszugehen.



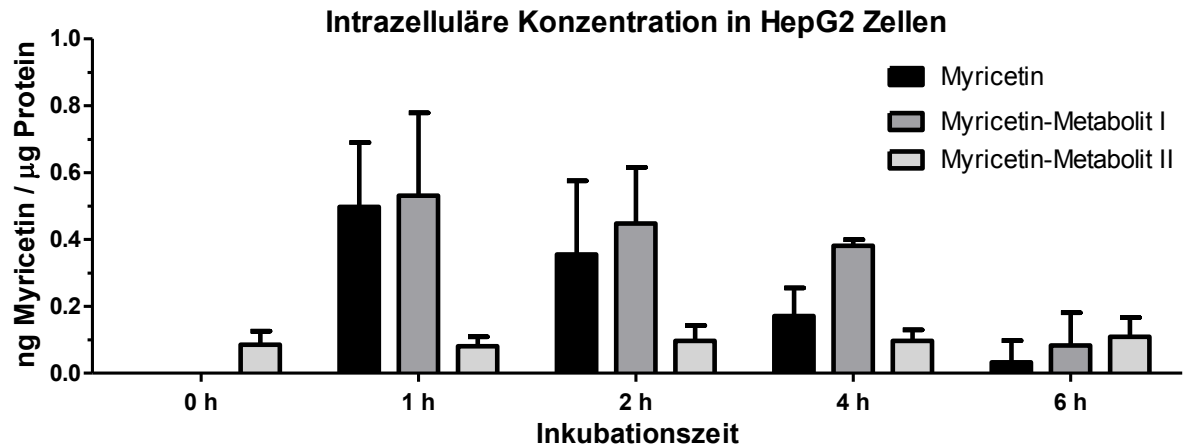


**Abbildung 4.26: Intrazelluläre Konzentration von Myricetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für die o.g. Zeitpunkte mit 50  $\mu$ M Myricetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Der zusätzlich zu Myricetin detektierte Peak ist hier (normiert auf Myricetin) als Myricetin-Metabolit abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4).

Die Aufnahme von Myricetin in die zweite Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 konnte nicht gezeigt werden, da zu keinem Zeitpunkt intrazelluläres Myricetin oder ein Myricetin-Metabolit detektierbar waren. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen aus Abbildung 4.21, bei der nach 15 min und 1 h Inkubation mit Myricetin-Derivaten keine Aufnahme von Myricetin nachweisbar war. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 6 h führte nicht zur intrazellulären Aufnahme von Myricetin in Caco-2 Zellen.

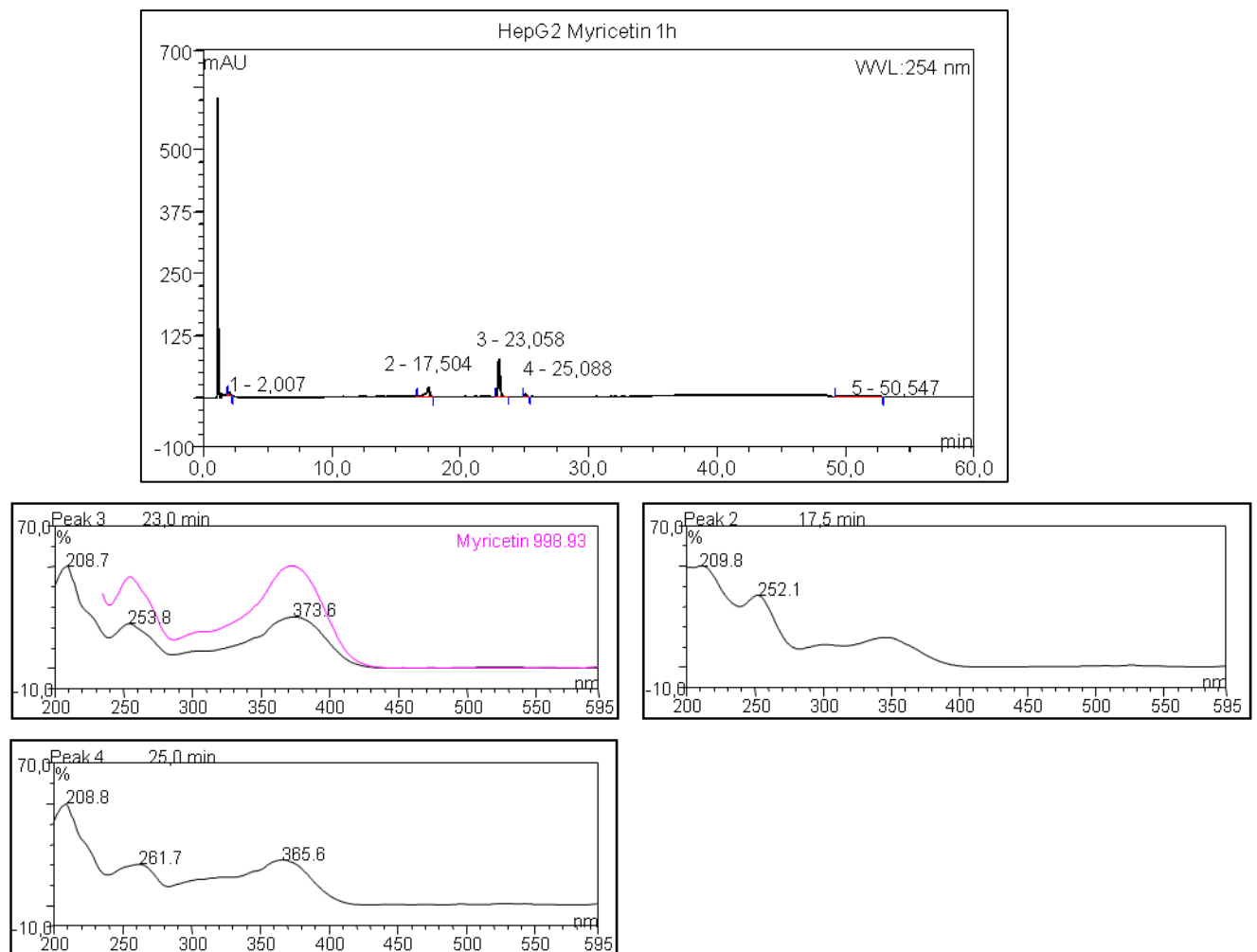
In einem weiteren Experiment wurden die Aufnahme und Metabolisierung von 50  $\mu$ M Myricetin in HepG2 Zellen untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Zu jedem getesteten Inkubationszeitpunkt sind zwei Metabolite nachweisbar. Myricetin-Metabolit I ist nach 17,5 min nachweisbar und Myricetin-Metabolit II nach 24,5 min. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit denen aus Abbildung 4.22 (Kurzzeitinkubation von HepG2 Zellen mit Myricetin-Derivaten) legt nahe, dass es sich in beiden Aufnahmestudien um die gleichen Metabolite handelt. Auffallend ist bei einer längeren Inkubation, dass die intrazellulären Myricetin-Gehalte mit der Zeit abnehmen. Liegen die Mengen nach 1 h Inkubation noch bei etwas mehr als 0,5 ng Myricetin/ $\mu$ g Protein, so ist nach 6 h nur noch weniger als 0,1 ng Myricetin/ $\mu$ g Protein nachweisbar. Diese Abnahme zeigt sich auch bei Metabolit I. Die Gehalte von Metabolit II bleiben dagegen über alle getesteten Zeitpunkte auf konstant niedrigem Niveau. Verglichen mit Hct116 Zellen sind die intrazellulären Gehalte nach 1 h Inkubation mit 0,5 ng Myricetin/ $\mu$ g Protein etwa gleich.



**Abbildung 4.27: Intrazelluläre Konzentration von Myricetin in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für die o.g. Zeitpunkte mit 50  $\mu\text{M}$  Myricetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Die zusätzlich zu Myricetin detektierten Peaks sind hier (normiert auf Myricetin) als Myricetin-Metabolite abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

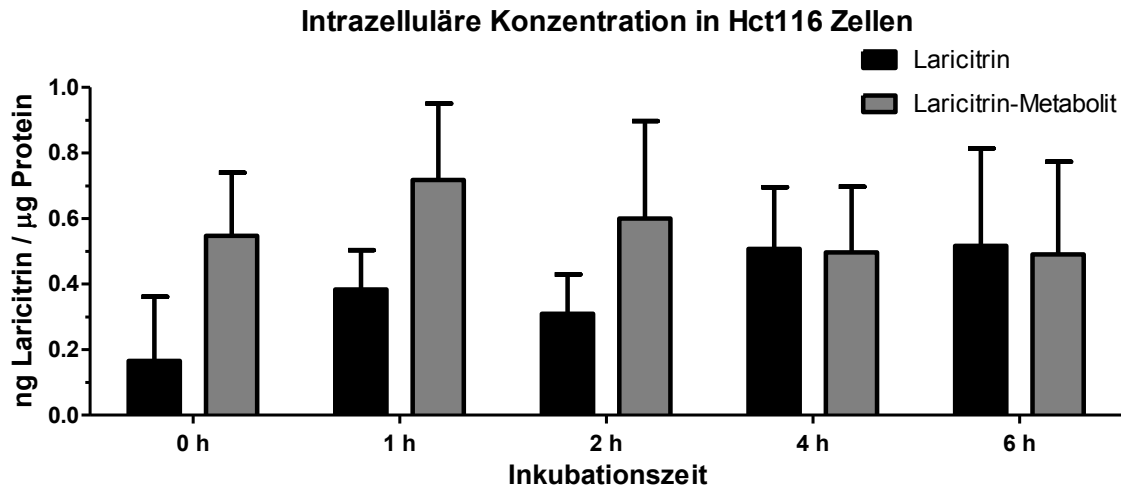
Beispielhaft ist in Abbildung 4.28 ein Chromatogramm mit entsprechenden UV-Spektren der 1 h Inkubation von HepG2 Zellen mit Myricetin dargestellt. Zusätzlich zum Myricetin Peak nach 23,0 min sind die beiden Myricetin-Metabolite mit einer Retentionszeit von 17,5 und 25,0 min (entspricht dem Metabolit II mit einer Retentionszeit von 24,5 min) erkennbar.



**Abbildung 4.28: Beispielhaftes Chromatogramm der zellulären Aufnahme von Myricetin in HepG2 Zellen nach 1 h Inkubation**

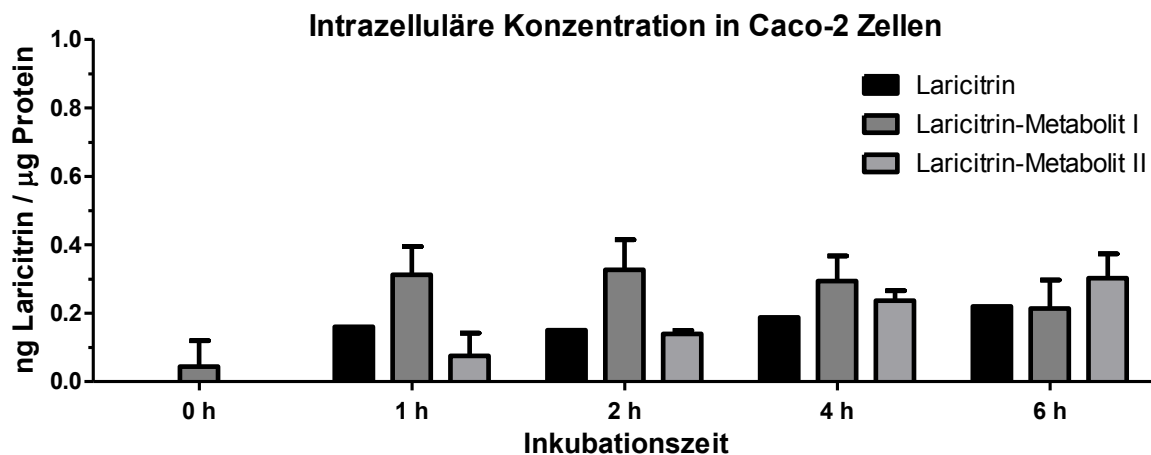
Das abgebildete Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer HPLC mit DAD der Firma Dionex aufgezeichnet. Es zeigt drei Peaks inklusive der dazugehörigen UV-Spektren (untere drei Abbildungen). Peak Nr. 3 stellt Myricetin dar, Peak Nr. 2 (Retentionszeit von 17,5 min) und Peak Nr. 4 (Retentionszeit von 25,0 min) sind die im Text beschriebenen Myricetin-Metabolite I und II.

Eine Kinetik in Hct116 Zellen mit 50  $\mu$ M Laricitrin ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Die intrazellulären Gehalte sind nach 1 h und 2 h Inkubation in etwa gleich und nehmen nach 4 h und 6 h Inkubation leicht zu. Bereits nach 0 h (= 2-5 min) ist Laricitrin intrazellulär detektierbar. Zusätzlich ist ein Laricitrin-Metabolit (Retentionszeit: 20,0 min) nach 0 h detektierbar, dessen Gehalte bis zur 2 h Inkubation höher sind als die von Laricitrin (Retentionszeit: ca. 25,6 min) selbst. Nach 4 h und 6 h sind die die intrazellulären Mengen an Laricitrin und dessen Metabolit mit ca. 0,5 ng Laricitrin/ $\mu$ g Protein gleich. Verglichen mit den intrazellulären Gehalten von Myricetin in Hct116 Zellen (Abbildung 4.26) sind die Werte etwas niedriger, was sich mit dem Bild in Abbildung 4.20 (Kurzzeitinkubation mit Myricetin-Derivaten in Hct116 Zellen) deckt.



**Abbildung 4.29: Intrazelluläre Konzentration von Laricitrin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für die o.g. Zeitpunkte mit 50 µM Laricitrin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Der zusätzlich zu Laricitrin detektierte Peak ist hier (normiert auf Laricitrin) als Laricitrin-Metabolit abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- SD (n=4).



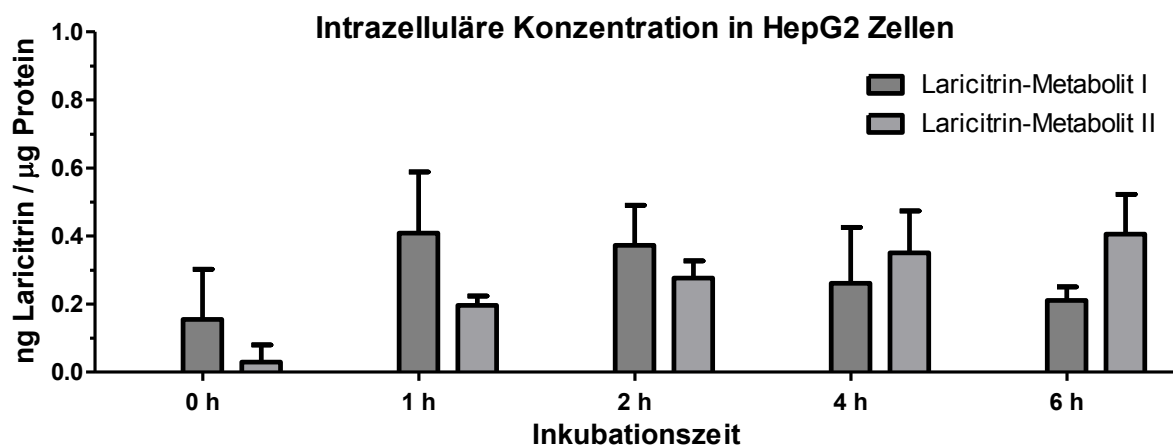
**Abbildung 4.30: Intrazelluläre Konzentration von Laricitrin in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für die o.g. Zeitpunkte mit 50 µM Laricitrin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Die zusätzlich zu Laricitrin detektierten Peaks sind hier (normiert auf Laricitrin) als Laricitrin-Metabolite abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- SD (n=3). Laricitrin selbst (schwarzer Balken) wurde nur bei 1 von 3 Experimenten detektiert, dieser Einzelwert ist hier abgebildet.

In Abbildung 4.30 sind die Ergebnisse der Inkubation von Caco-2 Zellen mit 50 µM Laricitrin dargestellt. Laricitrin (schwarzer Balken, Retentionszeit: 25,5 min) selbst kann nur in einem von drei Experimenten detektiert werden. Zwei Laricitrin-Metabolite sind ab 1 h Inkubationszeit nachweisbar. Dabei hat der Metabolit I eine Retentionszeit von 20,0 min und Metabolit II eine Retentionszeit von etwa 27,5 min. Entsprechende Metabolite mit diesen

Retentionszeiten konnten bereits nach 1 h Inkubation im Kurzzeitexperiment nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.21). Während die intrazellulären Gehalte von Metabolit I mit zunehmender Inkubationszeit abnehmen, wird der intrazelluläre Gehalt von Metabolit II mehr, sodass nach 6 h eine größere Menge an Metabolit II vorhanden ist als an Metabolit I.

Abschließend wurden die Aufnahme und Metabolisierung von Laricitrin (50  $\mu\text{M}$ ) in HepG2 Zellen untersucht (Abbildung 4.31). Wie in den vorhergegangenen Experimenten mit Hct116 und Caco-2 wurden die HepG2 Zellen für bis zu 6 h bei 37°C inkubiert.



**Abbildung 4.31: Intrazelluläre Konzentration von Laricitrin in HepG2 Zellen**

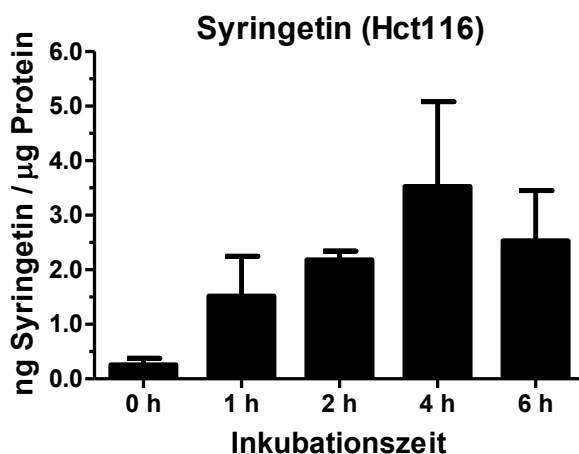
HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für die o.g. Zeitpunkte mit 50  $\mu\text{M}$  Laricitrin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Laricitrin selbst wurde bei keinem der drei Experimente detektiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

Bei keinem der drei Experimente kann Laricitrin detektiert werden. Es werden jedoch zwei Laricitrin Metabolite mit einer Retentionszeit von 20,0 min (Metabolit I) bzw. 27,5 min (Metabolit II) detektiert. Die intrazellulären Gehalte von Metabolit I sind mit ca. 0,4 ng Laricitrin/ $\mu\text{g}$  Protein am höchsten und nehmen kontinuierlich mit fortlaufender Inkubationszeit ab. Im Gegensatz dazu werden die intrazellulären Mengen an Metabolit II mit zunehmender Inkubationsdauer mehr, sodass nach 6 h etwa 0,4 ng Laricitrin/ $\mu\text{g}$  Protein vorhanden sind (vgl. weniger als 0,1 ng Laricitrin/ $\mu\text{g}$  Protein nach 0 h Inkubation). Ein Vergleich mit den Daten aus Abbildung 4.22 legt nahe, dass es sich bei beiden Metaboliten um die gleichen handelt, die auch im Kurzzeitversuch nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu kann jedoch bei der Kinetik (Abbildung 4.31) zu keinem Zeitpunkt Laricitrin selbst detektiert werden.

Der weitere Einfluss der Methylierung auf die intrazelluläre Aufnahme wurde anhand der doppelt und dreifach methylierten Derivate Syringetin und MTM untersucht. Zuerst werden

die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit Syringetin in Hct116, Caco-2 und HepG2 Zellen dargestellt. Den Abschluss dieses Kapitels bilden die Ergebnisse mit MTM in diesen Zelllinien.

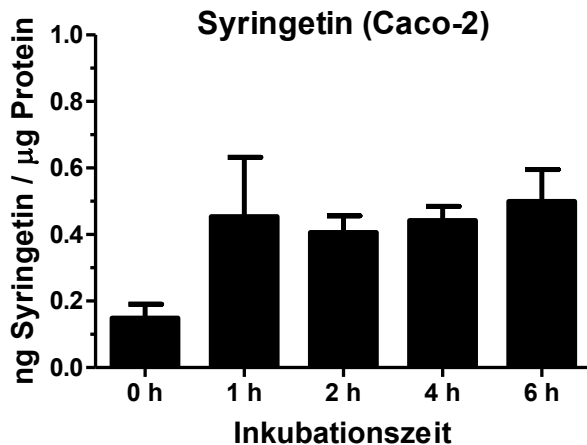
Abbildung 4.32 zeigt die Resultate einer 0 h bis 6 h Inkubation von Hct116 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Syringetin. Hier ist zu sehen, dass die intrazellulären Syringetin-Gehalte bis zu 4 h Inkubationszeit ansteigen, bevor sie bei 6 h wieder leicht abfallen. Nach 1 h Inkubation sind etwa 1,5 ng Syringetin/ $\mu\text{g}$  Protein in den Zellen detektierbar, nach 4 h sind es mehr als 3,5 ng Syringetin/ $\mu\text{g}$  Protein und nach 6 h Inkubation bewegen sich die intrazellulären Gehalte an Syringetin im Bereich von 2,5 ng Syringetin/ $\mu\text{g}$  Protein. Aufgrund dieser Daten kann eine Akkumulation innerhalb der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zur Inkubation mit Myricetin und Laricitrin konnten nach Inkubation mit Syringetin keine Metabolite detektiert werden.



**Abbildung 4.32: Intrazelluläre Konzentration von Syringetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für bis zu 6 h mit 50  $\mu\text{M}$  Syringetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

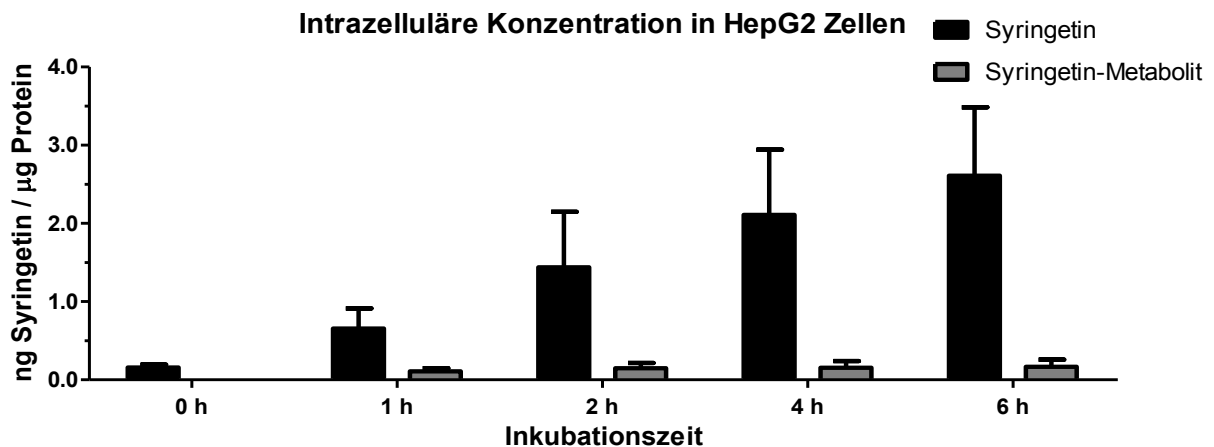
In Abbildung 4.33 sind die Ergebnisse einer Inkubation mit Syringetin in Caco-2 Zellen dargestellt. Verglichen mit den Resultaten aus Abbildung 4.32 ist die Aufnahme in Caco-2 Zellen wesentlich geringer. Eine Zunahme der intrazellulären Gehalte mit der Zeit ist bei Caco-2 Zellen nicht erkennbar. Die mittleren Gehalte bewegen sich im Bereich von etwa 0,5 ng Syringetin/ $\mu\text{g}$  Protein und es sind zu keinem Zeitpunkt Metabolite detektierbar.



**Abbildung 4.33: Intrazelluläre Konzentration von Syringetin in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden für 48 h anwachsen gelassen und anschließend für 0 h bis 6 h mit 50 µM Syringetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Die zelluläre Aufnahme von Syringetin in HepG2 Zellen ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Syringetin wird in geringem Maße zu einem Syringetin-Metabolit mit einer Retentionszeit von 25,3 min metabolisiert. Der intrazelluläre Gehalt von Syringetin (Retentionszeit: 27,5 min) nimmt über die Zeit zu. Während nach 1 h Inkubation nur etwa 0,6 ng Syringetin/µg Protein in den Zellen vorhanden ist, steigt der Wert nach 6 h auf etwa 2,5 ng Syringetin/µg Protein an. Die Mengen an Myricetin-Metabolit verändern sich nicht mit zunehmender Inkubationsdauer, sondern bleiben auf dem konstanten Niveau von etwa 0,15 ng Syringetin/µg Protein.



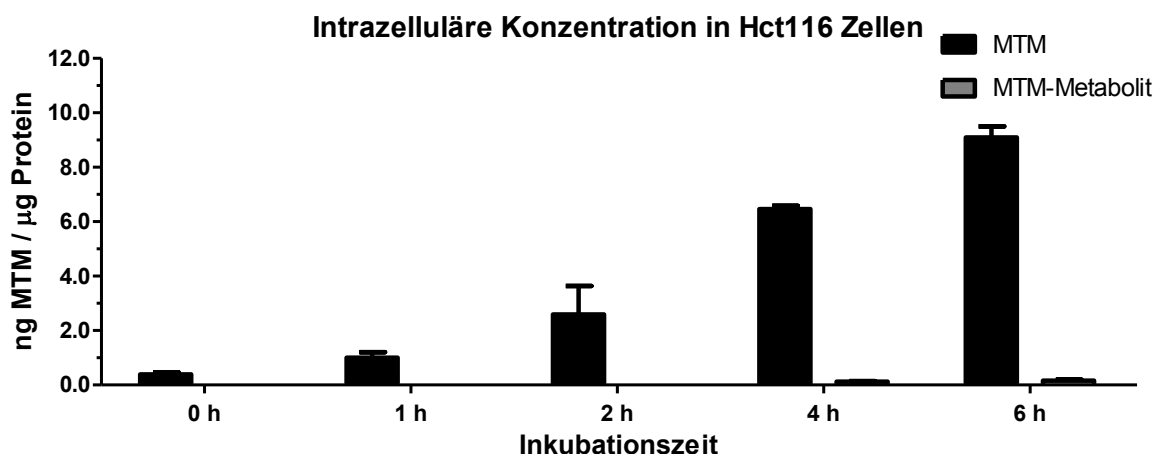
**Abbildung 4.34: Intrazelluläre Konzentration von Syringetin in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat für die o.g. Zeitpunkte mit 50 µM Syringetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Der Peak, der in zwei von drei Experimenten zusätzlich zu Syringetin detektiert wurde, ist hier (normiert auf Syringetin) als Syringetin-Metabolit abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Vergleicht man die Aufnahme von Syringetin in die drei verwendeten Zelllinien, so sind die intrazellulären Gehalte in Hct116 am höchsten. Zudem ist ein Anstieg der Gehalte mit

fortlaufender Inkubationszeit zu konstatieren. Dies trifft auch auf HepG2 Zellen zu, in denen die zweithöchsten intrazellulären Syringetin-Gehalte nachweisbar sind. Caco-2 Zellen scheinen Syringetin schlechter aufzunehmen als die beiden anderen Zelllinien und es ist keine Akkumulation von Syringetin innerhalb der Zellen messbar.

Abschließend wurde die Aufnahme des dreifach methylierten Derivates MTM in die o.g. Zelllinien untersucht. In Abbildung 4.35 sind die Ergebnisse der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  MTM in Hct116 Zellen gezeigt. Die intrazellulären Gehalte steigen von etwa 1,0 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein nach 1 h Inkubation auf knapp 9,0 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein nach 6 h Inkubationszeit an. Diese Daten zeigen deutlich eine Akkumulation von MTM innerhalb der Zellen. Zusätzlich kann nach 4 h und 6 h ein Metabolit mit einer Retentionszeit von 27,6 min detektiert werden (Retentionszeit von MTM: 29,5 min). Anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums könnte es sich bei diesem Metabolit um Syringetin handeln.

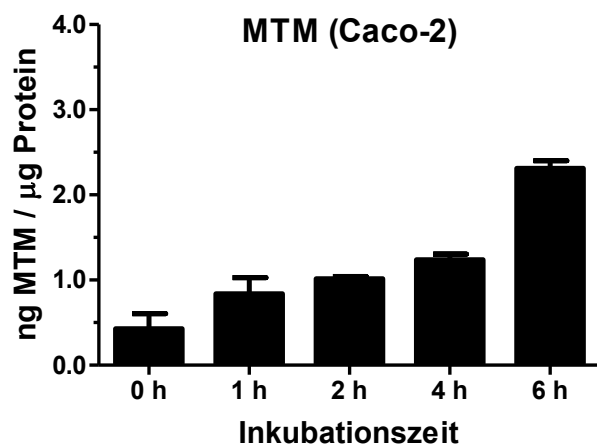


**Abbildung 4.35: Intrazelluläre Konzentration von MTM in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu\text{M}$  MTM inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Nach 4 h und 6 h wurde zusätzlich zu MTM ein weiterer Peak detektiert, der hier (normiert auf MTM) als MTM-Metabolit abgebildet ist. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

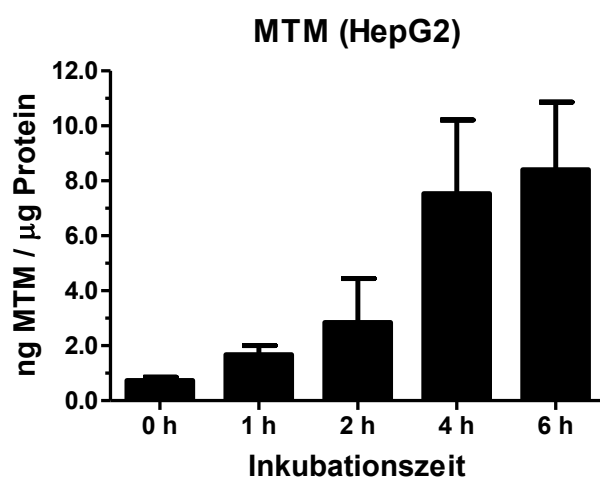
Der zeitliche Verlauf einer Inkubation von Caco-2 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  MTM ist in Abbildung 4.36 dargestellt. Verglichen mit der Aufnahme in Hct116 Zellen ist die Aufnahme in Caco-2 Zellen deutlich geringer. Nach 1 h Inkubation liegen die intrazellulären Gehalte bei ca. 1,0 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein. Bis zu 4 h Inkubation steigen diese Werte kaum an, nach 6 h Inkubation ist der intrazelluläre Gehalt jedoch mehr als doppelt so hoch (ca. 2,5 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein). Nach der Inkubation der Caco-2 Zellen mit MTM können zu keinem Zeitpunkt Metabolite detektiert werden.





**Abbildung 4.36: Intrazelluläre Konzentration von MTM in Caco-2 Zellen**  
Caco-2 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu$ M MTM inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

In Abbildung 4.37 sind die Ergebnisse der Inkubation in HepG2 Zellen mit 50  $\mu$ M MTM dargestellt. Die intrazellulären Gehalte an MTM steigen mit zunehmender Inkubationszeit deutlich an. Während nach 1 h Inkubation ca. 2,0 ng MTM/ $\mu$ g Protein in den Zellen vorhanden ist, steigt der Gehalt nach 6 h auf über 8,0 ng MTM/ $\mu$ g Protein an. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen der Aufnahmestudien mit Hct116 Zellen (Abbildung 4.35), bei denen ähnliche intrazelluläre Werte detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu kann bei einer Inkubation von HepG2 Zellen mit MTM keine Metabolisierung dieser Substanz konstatiert werden. Zu keiner der gewählten Inkubationszeiten können Metabolite von MTM detektiert werden.

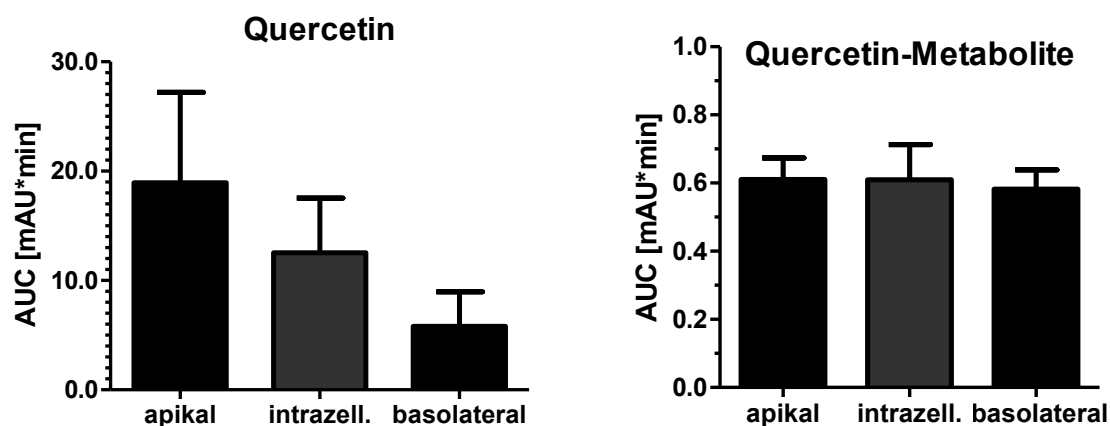


**Abbildung 4.37: Intrazelluläre Konzentration von MTM in HepG2 Zellen**  
HepG2 Zellen wurden 72 h nach der Aussaat für 0 h bis 6 h mit 50  $\mu$ M MTM inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte wurden auf den Flavonoidgehalt (in ng) normiert und dann auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

#### 4.1.3.3 Permeationsstudien von Myricetin-Derivaten im Transwell-System

Der Versuchsansatz im Transwell-System dient der Aufklärung der Transportmechanismen sowie der Metabolisierung der verwendeten Myricetin-Derivate in Caco-2 Zellen.

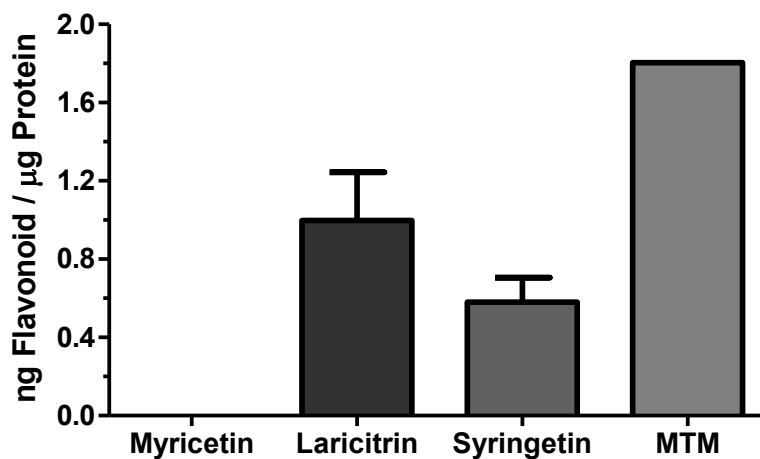
Die Etablierung des Transwell-Systems erfolgte mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin. In Abbildung 4.38 sind die Ergebnisse der Austestung mit Quercetin dargestellt. Erwartungsgemäß kann im apikalen Kompartiment, in dem die Inkubation stattfand, die größte Menge an Quercetin detektiert werden (AUC von ca. 19 mAU\*min). Quercetin wird von den Caco-2 Zellen aufgenommen und ist mit einer AUC von ca. 12,5 mAU\*min detektierbar. Auch im basolateralen Kompartiment ist Quercetin nachweisbar (AUC von 5,8 mAU\*min). Da die Intaktheit des Monolayers vorher sichergestellt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Zellen Quercetin aktiv in das basolaterale Kompartiment transportiert haben. Zusätzlich zu Quercetin kann sowohl intrazellulär als auch in den beiden Kompartimenten je ein Metabolit nachgewiesen werden. Die Retentionszeit des intrazellulär detektierten Metaboliten beträgt dabei 27,4 min. Anhand dieser Retentionszeit und des UV-Spektrums liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Metaboliten um Isorhamnetin handelt. Die Retentionszeit des Metaboliten, der sowohl apikal (in 2 Experimenten) als auch basolateral (in 4 Experimenten) detektiert wurde, beträgt 23,6 min.



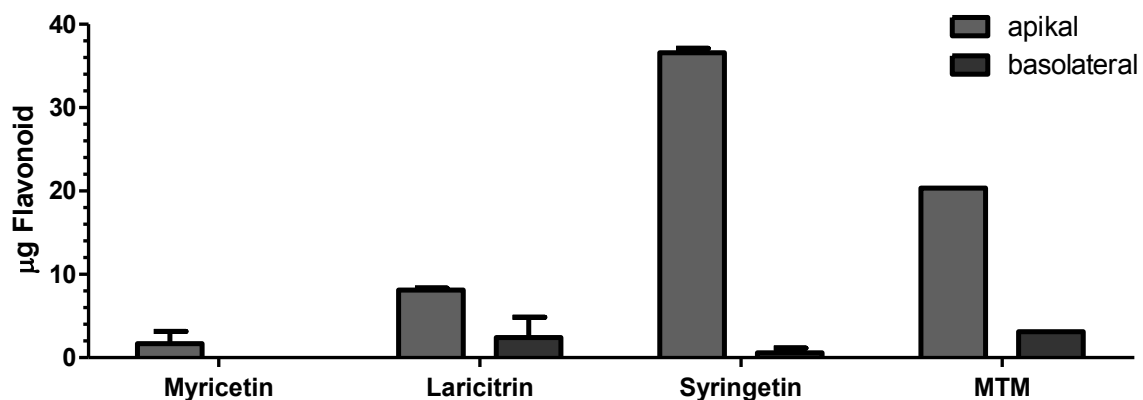
**Abbildung 4.38: Permeationsstudien von Quercetin im Caco-2 Transwell-System**

Caco-2 Zellen wurden für 21-30 Tage auf Transwell-Einsätzen unter 2-3 tägigem Mediumwechsel anwachsen gelassen. Vor der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin für 1 h wurde die Integrität des Monolayers mit Hilfe des TEER-Wertes und der LY-Passage überprüft. Die Inkubation fand in HBSS Puffer statt und erfolgte von apikaler nach basolateraler Richtung (durch Zugabe von Quercetin ins das apikale Kompartiment). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt (als mAU\*min). Die apikalen und basolateralen Überstände wurden mit Ethylacetat extrahiert, eingedampft, in Methanol aufgenommen und der Quercetin-Gehalt mittels HPLC bestimmt. In der rechten Abbildung sind die Metabolite, die zusätzlich zu Quercetin in den jeweiligen Kompartimenten sowie intrazellulär detektiert wurden, gezeigt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SD (n=7).

### Aufnahme in Caco-2 Zellen (Transwell)



### Flavonoid-Gehalt in apikalem & basolateralem Kompartiment



#### Abbildung 4.39: Permeationsstudien der Myricetin-Derivate im Caco-2 Transwell-System

Caco-2 Zellen wurden für 21-30 Tage auf Transwell-Einsätzen unter 2-3 tägigem Mediumwechsel anwachsen gelassen. Vor der Inkubation mit 50 µM Myricetin, Laricitrin, Syringetin oder MTM für 1 h wurde die Integrität des Monolayers mit Hilfe des TEER-Wertes und der LY-Passage überprüft. Die Inkubation fand in HBSS Puffer statt und erfolgte von apikaler nach basolateraler Richtung (durch Zugabe der Myricetin-Derivate in das apikale Kompartiment). Nach einem Waschschritt wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die apikalen und basolateralen Überstände wurden mit Ethylacetat extrahiert, eingedampft, in Methanol aufgenommen und der Flavonoid-Gehalt mittels HPLC bestimmt. In der unteren Abbildung sind die Gehalte in den jeweiligen Kompartimenten gezeigt (als µg Flavonoid). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte +/- SD (n=3-4; für MTM nur n=1).

Nach der Etablierung des Transwell-Systems mithilfe von Quercetin wurden die Permeationsstudien mit den Myricetin-Derivaten durchgeführt. Auch hier erfolgte die Inkubation für 1 h in HBSS Puffer durch Zugabe der Myricetin-Derivate (jeweils 50 µM) ins apikale Kompartiment. Die AUC Werte wurden in ng Flavonoid umgerechnet und die intrazellulären Gehalte auf den jeweiligen Proteingehalt normiert. Wie in den vorherigen Versuchen kann kein Myricetin intrazellulär detektiert werden. Konsequenterweise ist auch im basolateralen Kompartiment kein Myricetin nachweisbar. Lediglich im apikalen

Kompartiment sind minimale Mengen an Myricetin detektierbar. Die Inkubation mit Laricitrin im apikalen Kompartiment führt zu einer Aufnahme dieser Substanz in die Zellen und einem Transport ins basolaterale Kompartiment. Der intrazelluläre Gehalt an Laricitrin liegt mit 1,0 ng Laricitrin/ $\mu\text{g}$  Protein etwas höher als der von Syringetin (etwa 0,6 ng Syringetin/ $\mu\text{g}$  Protein). Mit ca. 1,8 ng MTM/ $\mu\text{g}$  Protein weist MTM die höchsten intrazellulären Flavonoid-Mengen auf, allerdings wurde dieses Experiment nur einmal durchgeführt. Alle drei Derivate können im basolateralen Kompartiment detektiert werden, was einen Transport dieser Substanzen aus der Zelle nahelegt. Jedoch sind die hier detektierten Mengen sehr gering. Im Gegensatz zu den Permeationsstudien mit Quercetin können bei einer Inkubation mit den Myricetin-Derivaten keine Metabolite nachgewiesen werden. Weder intrazellulär noch im apikalen oder basolateralen Kompartiment sind Peaks detektierbar, die nicht den Ausgangssubstanzen entsprechen.

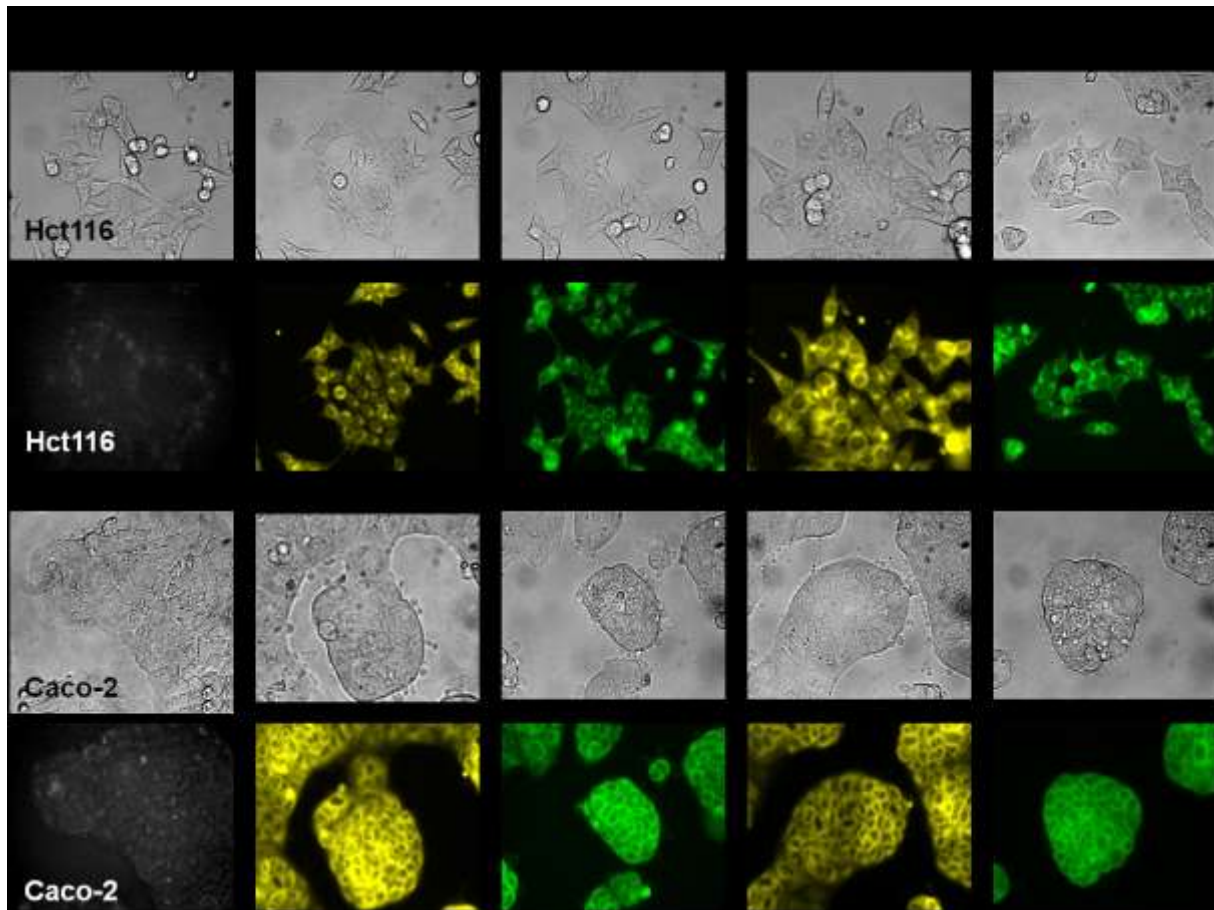
#### **4.1.3.4 Intrazelluläre Detektion von Quercetin- und Myricetin-Derivaten mittels NSRA-Komplexierung**

Naturstoffreagenz A (NSRA) wurde in dieser Arbeit als Fluoreszenzverstärker zur intrazellulären Detektion von Flavonoiden verwendet. Je nach Substitution mit Hydroxylgruppen im B- und C-Ring sind Flavonoide in der Lage mit NSRA einen Komplex mit einer charakteristischen Fluoreszenz zu bilden. Diese Eigenschaft von NSRA wurde hier ausgenutzt, um Flavonoide durch NSRA fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen.

##### **4.1.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Quercetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung**

Um die Verteilung der Flavonoide innerhalb der Zelle sichtbar zu machen, wurden die beiden Kolonkarzinomzelllinien Hct116 und Caco-2 für 1 h mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin-Derivaten inkubiert und anschließend für 5 min mit NSRA (0,2% NSRA in PBS) gefärbt.

In Abbildung 4.40 sind jeweils repräsentative Bilder von Hct116 und Caco-2 Zellen, die für 1 h mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin-Derivaten inkubiert wurden, dargestellt. In beiden Kolonkarzinomzelllinien sind die verwendeten Quercetin-Derivate diffus im Zytosol verteilt. Eine Aufnahme in den Zellkern ist dabei nicht erkennbar. Jedoch ist eine quantitative Aussage bezüglich der intrazellulären Gehalte mit dieser Methode nicht möglich. Hierfür wurden die NSRA-gefärbten Zellen im Durchflusszytometer analysiert.



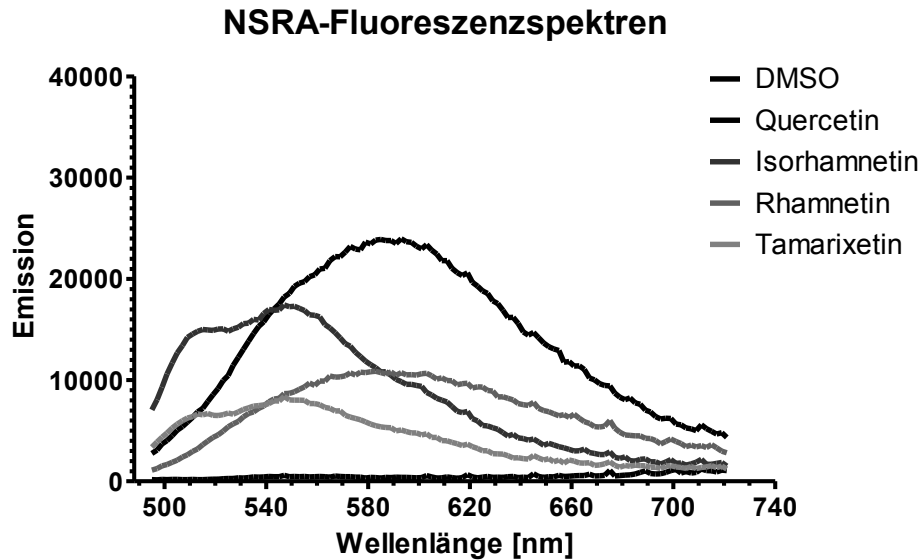
**Abbildung 4.40: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Quercetin-Derivate in Hct116 und Caco-2 Zellen**

Hct116 und Caco-2 Zellen wurden nach 24 h bzw. 48 h Anwuchszeit für 1 h mit Quercetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS für 5 min) wurde als Fluoreszenzverstärker eingesetzt, um die intrazelluläre Verteilung der Flavonoide im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Anregung 365 nm, Emission 420 nm). Dargestellt sind jeweils repräsentative Durchlichtbilder sowie die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen eines von drei unabhängigen Experimenten.

#### **4.1.3.4.2 Detektion der zellulären Aufnahme von Quercetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer**

Eine einfache und schnelle Methode zur Detektion der intrazellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate bietet die Analyse der mit NSRA gefärbten Zellen im Durchflusszytometer.

Zuvor wurden mit einem Spektrofluorimeter die Emissionen der NSRA-Flavonoid Komplexe aufgezeichnet. Hier wurde die Anregungswellenlänge mit 488 nm an die des Durchflusszytometers angepasst. Die entsprechenden Fluoreszenzspektren der vier Quercetin-Derivate mit NSRA sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

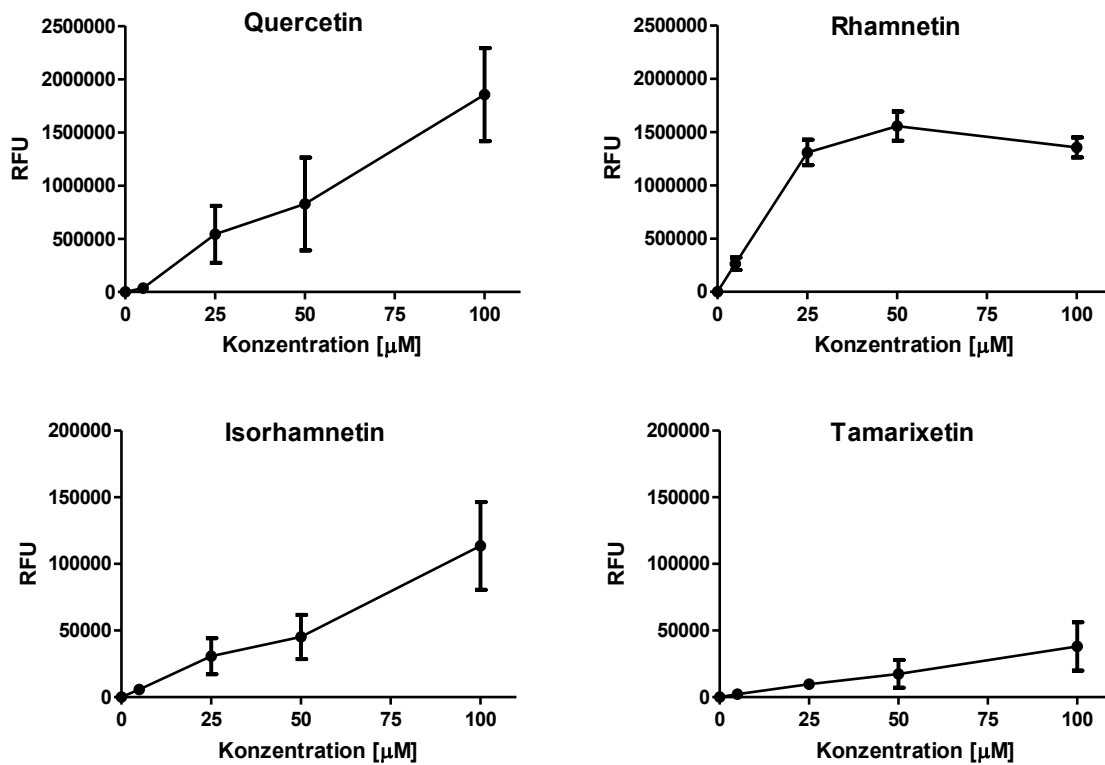


**Abbildung 4.41: Fluoreszenzspektren der Flavonoid-NSRA Komplexe**

Jeweils 50  $\mu\text{M}$  Quercetin-Derivate wurden mit 0,2% NSRA vermengt und spektrofluorimetrisch analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen Fluoreszenzspektren der einzelnen Flavonoide nach Komplexierung durch NSRA. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde bei fester Anregungswellenlänge (488 nm) in Abhängigkeit der Wellenlänge im Abstand von 2 nm aufgezeichnet ( $n=1$ ).

Je nach verwendetem Quercetin-Derivat ist in Abbildung 4.41 ein etwas anderes Emissionsmaximum erkennbar. Während Quercetin-NSRA und Rhamnetin-NSRA ihre Emissionsmaxima bei etwa 590-600 nm haben, sind die Emissionsmaxima von Isorhamnetin und Tamarixetin etwas nach links verschoben und liegen bei ca. 550 nm. Diese unterschiedlichen Absorptionsmaxima erklären die grüne Fluoreszenz bei Isorhamnetin und Tamarixetin und die gelbe Fluoreszenz bei Quercetin und Rhamnetin in Abbildung 4.40.

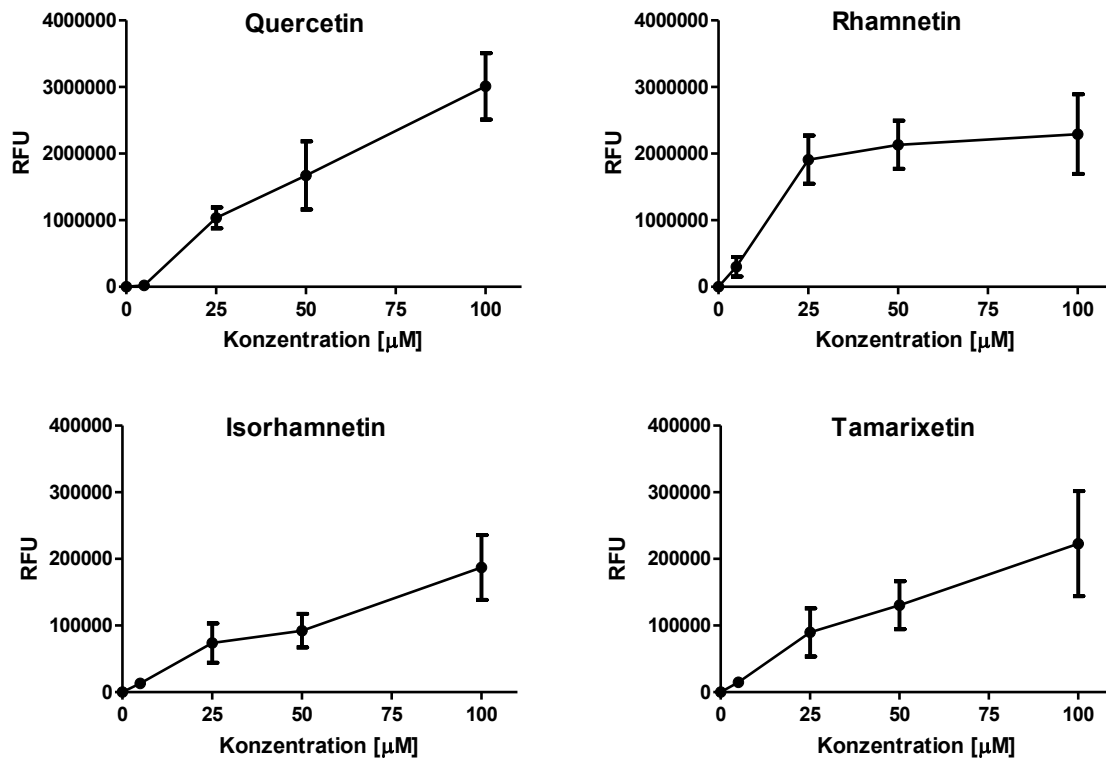
Zur Validierung der Methode der intrazellulären Detektion der Flavonoide mittels NSRA-Komplexierung am Durchflusszytometer wurden Hct116 und HepG2 Zellen mit steigenden Konzentrationen an Quercetin-Derivaten inkubiert. Abbildung 4.42 stellt die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit der Quercetin-Derivate nach Komplexierung mit NSRA in Hct116 Zellen dar. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU=relative fluorescence units) sind bei Quercetin und Rhamnetin etwa eine Zehnerpotenz höher als bei Isorhamnetin und Tamarixetin. Die  $R^2$ -Werte der linearen Regression liegen für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin zwischen 0,98 und 0,99. Bei Rhamnetin ist eine Konzentrationsabhängigkeit nur bis 25  $\mu\text{M}$  zu erkennen.



**Abbildung 4.42: Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden nach 24 h Anwuchszeit für 1 h mit Quercetin-Derivaten inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden) +/- SD (n=3).

Die entsprechenden Daten zur Konzentrationsabhängigkeit in HepG2 Zellen sind in Abbildung 4.43 dargestellt. Analog zu den Daten mit Hct116 Zellen sind die RFU-Werte für Quercetin und Rhamnetin deutlich höher als die von Isorhamnetin und Tamarixetin. Die  $R^2$ -Werte liegen für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin im Bereich von 0,97 und 0,98, für Rhamnetin bei 0,86. Somit ist bei Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin eine Konzentrationsabhängigkeit gegeben, jedoch nicht bei Rhamnetin.

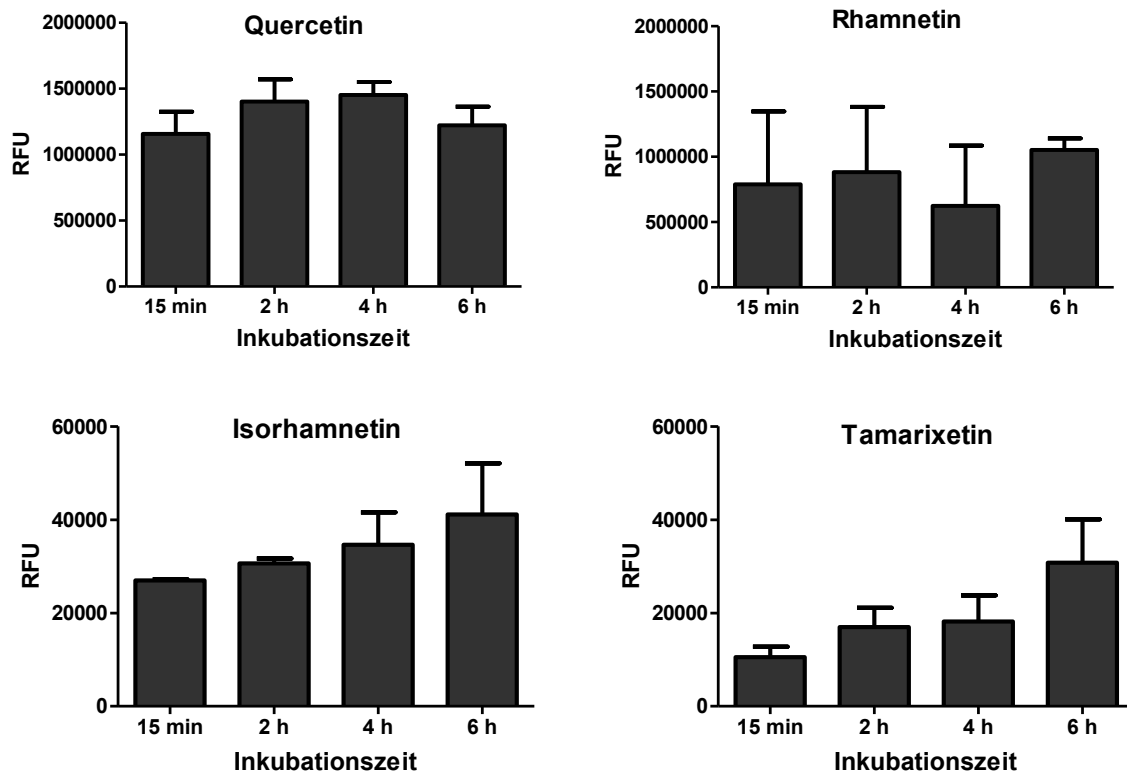


**Abbildung 4.43: Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden nach 48 h Anwachszeit für 1 h mit Quercetin-Derivaten inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD (n=3).

Nach Validierung der Konzentrationsabhängigkeit wurde mit dieser Methode eine Kinetik analog zu den Inkubationszeiten der HPLC-Aufnahmestudien gemessen. Für alle Experimente in Hct116 und HepG2 Zellen wurden 50  $\mu\text{M}$  Quercetin-Derivate verwendet.

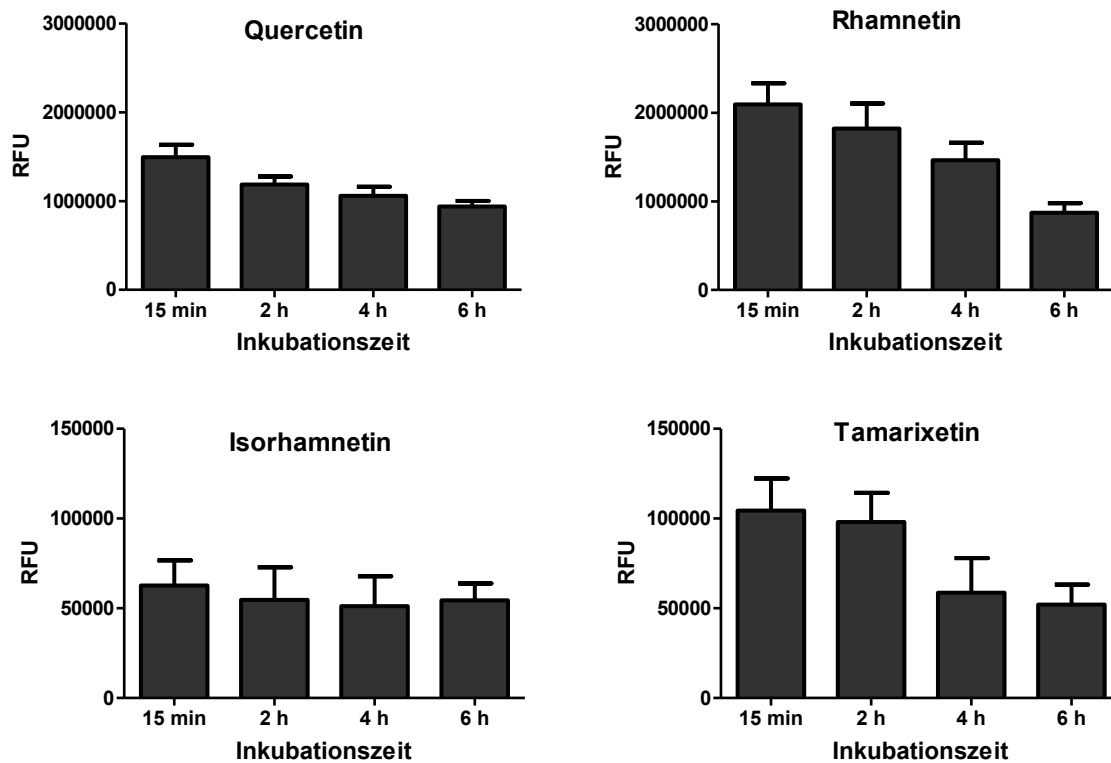




**Abbildung 4.44: Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden nach 24 h Anwachszeit für bis zu 6 h mit Quercetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD (n=4 für Quercetin, n=2 für Rhamnetin, Isorhamnetin und Tamarixetin).

Abbildung 4.44 zeigt die zeitliche Aufnahme der Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen nach Komplexierung mit NSRA. Während die Fluoreszenzwerte bei Quercetin und Rhamnetin nicht mit zunehmender Inkubationszeit ansteigen, ist bei Isorhamnetin und Tamarixetin der Trend einer Zunahme der intrazellulären Flavonoidmenge zu beobachten. Bei beiden Substanzen sind die Gehalte nach 6 h Inkubationszeit am höchsten. Dies könnte eine Akkumulation von Isorhamnetin und Tamarixetin in den Zellen nahe legen. Die RFU-Werte der beiden Experimente mit Rhamnetin weichen zu stark voneinander ab, daher ist eine Aussage bezüglich einer Akkumulation innerhalb der Zellen schwierig. Die mittlere Fluoreszenz des intrazellulären Quercetin-NSRA Komplexes bleibt über den gesamten Inkubationszeitraum auf einem konstanten Niveau, daher ist eine Akkumulation von Quercetin unwahrscheinlich.



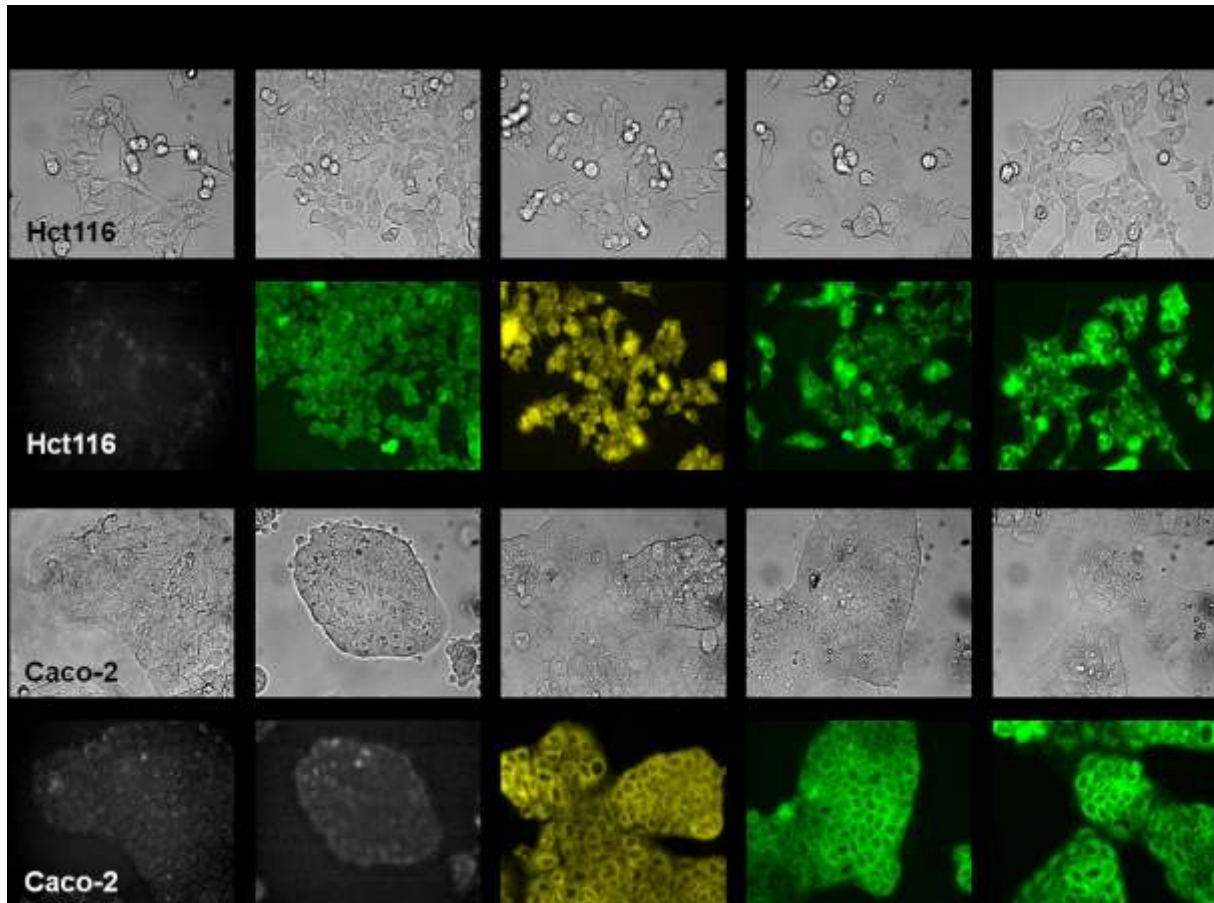
**Abbildung 4.45: Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden nach 48 h Anwachszeit für bis zu 6 h mit Quercetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung:488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ).

Zusätzlich zu den Hct116 Zellen wurde die Zeitabhängigkeit einer Inkubation mit Quercetin-Derivaten in HepG2 Zellen untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.45 dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Hct116 Zellen nimmt bei keinem der Quercetin-Derivate der intrazelluläre Gehalt mit der Inkubationszeit zu. Die höchsten intrazellulären Gehalte sind nach 15 min Inkubation mit Rhamnetin messbar. Diese nehmen jedoch kontinuierlich mit fortlaufender Inkubationszeit ab, sodass nach 6 h nur noch etwa die Hälfte des RFU-Wertes von 15 min nachweisbar ist. Dies trifft auch auf Tamarixetin zu, allerdings sind die RFU-Werte hier deutlich geringer als die von Rhamnetin. Bei Quercetin ist die Abnahme der intrazellulären Gehalte nicht so deutlich erkennbar wie bei Rhamnetin und Tamarixetin, jedoch sinken auch hier die RFU-Werte nach 6 h. Eine zeitabhängige Inkubation der HepG2 Zellen führt nicht zu einer Veränderung der intrazellulären Isorhamnetin-NSRA Fluoreszenz. Generell ist bei einer Inkubation der HepG2 Zellen mit 50  $\mu$ M Quercetin-Derivaten nicht von einer Akkumulation der Flavonoide in den Zellen auszugehen.

#### 4.1.3.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Myricetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung

Um die Verteilung der Flavonoide innerhalb der Zelle sichtbar zu machen, wurden die beiden Kolonkarzinomzelllinien Hct116 und Caco-2 für 1 h mit 50  $\mu$ M Myricetin-Derivaten inkubiert und anschließend für 5 min mit NSRA (0,2% NSRA in PBS) gefärbt.



**Abbildung 4.46: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Myricetin-Derivate in Hct116 und Caco-2 Zellen**

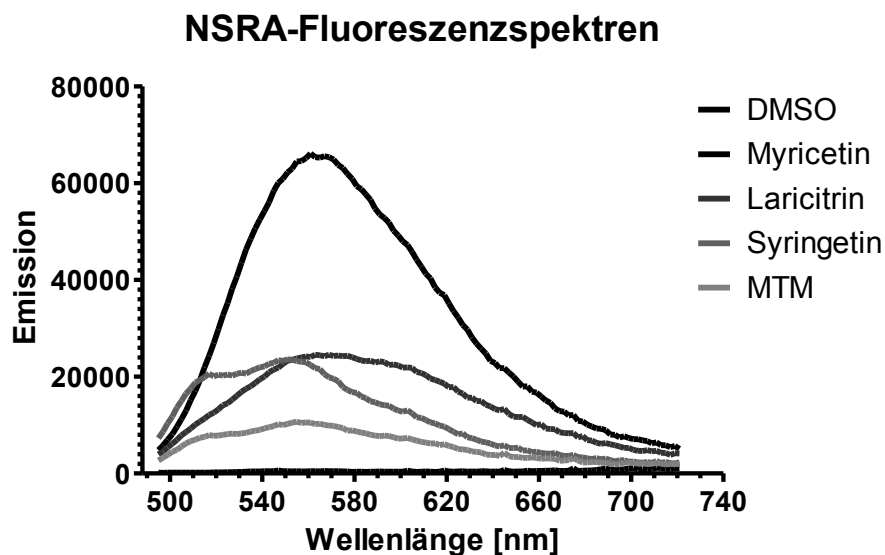
Hct116 und Caco-2 Zellen wurden nach 24 h bzw. 48 h Anwachzeit für 1 h mit Myricetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS für 5 min) wurde als Fluoreszenzverstärker eingesetzt, um die intrazelluläre Verteilung der Flavonoide im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Anregung 365 nm, Emission 420 nm). Dargestellt sind jeweils repräsentative Durchlichtbilder und die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen eines von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 4.46 sind jeweils repräsentative Bilder von Hct116 und Caco-2 Zellen, die für 1 h mit 50  $\mu$ M Myricetin-Derivaten inkubiert wurden, dargestellt. In beiden Kolonkarzinomzelllinien sind die verwendeten Myricetin-Derivate diffus im Zytosol verteilt. Eine Aufnahme in den Zellkern ist dabei nicht erkennbar. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen aus Abbildung 4.40, wo auch bei einer Inkubation mit Quercetin-Derivaten keine nukleäre Verteilung der Flavonoide zu beobachten ist. In Caco-2 Zellen ist hier keine Aufnahme von Myricetin nach 1 h Inkubation erkennbar. Dies bestätigt die negativen Ergebnisse der HPLC Aufnahmestudien von Myricetin in Caco-2 Zellen. Die

Fluoreszenzintensität der mit Myricetin inkubierten Hct116 Zellen ist deutlich geringer als die der anderen Myricetin-Derivate. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten wurden die Zellen nach Inkubation mit Myricetin-Derivaten und NSRA am Durchflusszytometer gemessen.

#### 4.1.3.4.4 Detektion der zellulären Aufnahme von Myricetin-Derivaten nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer

Vor der Durchflusszytometer-Analyse der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Komplexierung der Myricetin-Derivate mit NSRA wurden mit einem Spektrofluorimeter die Emissionen der NSRA-Flavonoid Komplexe aufgezeichnet. Dabei wurde die Anregungswellenlänge mit 488 nm an die des Durchflusszytometers angepasst. Die entsprechenden Fluoreszenzspektren der vier Myricetin-Derivate mit NSRA sind in Abbildung 4.47 dargestellt.

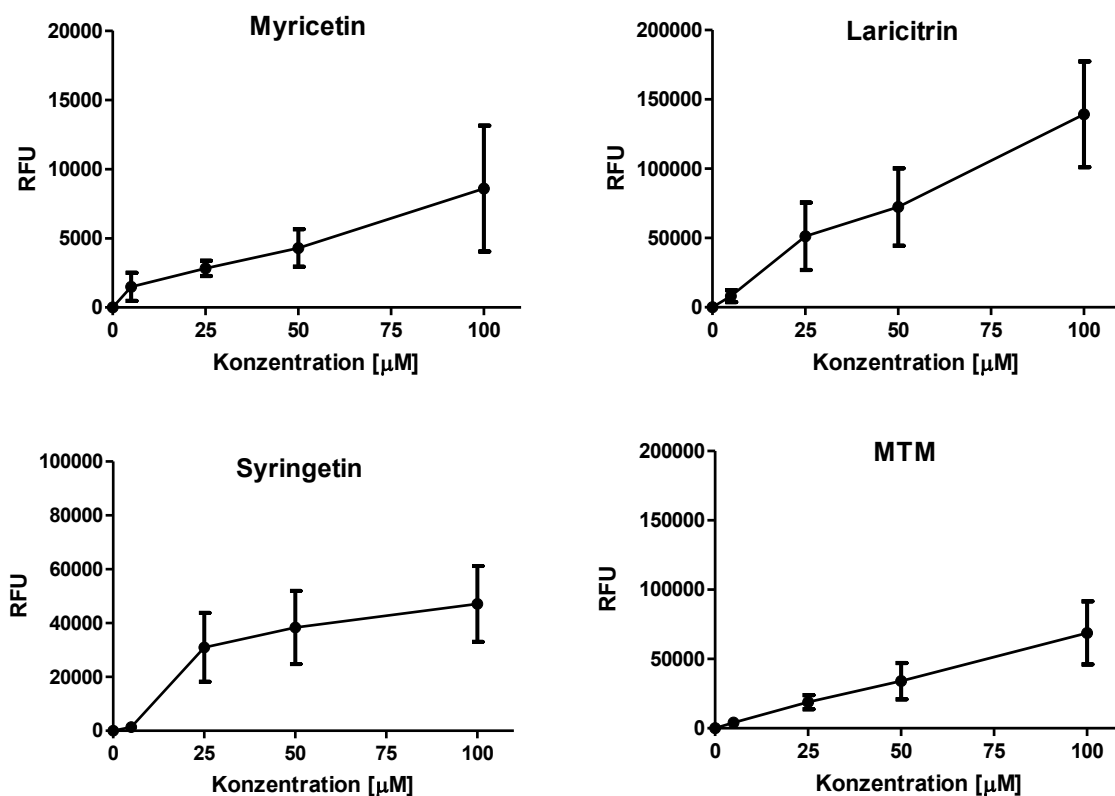


**Abbildung 4.47: Fluoreszenzspektren der Flavonoid-NSRA Komplexe**

Jeweils 50  $\mu\text{M}$  Myricetin-Derivate wurden mit 0,2% NSRA vermengt und spektrofluorimetrisch analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen Fluoreszenzspektren der einzelnen Flavonoide nach Komplexierung durch NSRA. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde bei fester Anregungswellenlänge (488 nm) in Abhängigkeit der Wellenlänge im Abstand von 2 nm aufgezeichnet ( $n=1$ ).

Je nach verwendetem Myricetin-Derivat ist in Abbildung 4.47 ein etwas anderes Emissionsmaximum erkennbar. Während Myricetin-NSRA, Syringetin-NSRA und MTM-NSRA ihre Emissionsmaxima bei etwa 550-560 nm haben, ist das Emissionsmaximum von Laricitrin etwas nach rechts verschoben und liegt bei ca. 580 nm. Diese unterschiedlichen Emissionsmaxima erklären die grüne Fluoreszenz bei Myricetin, Syringetin und MTM und die gelbe Fluoreszenz bei Laricitrin in Abbildung 4.46.

Analog zum Verfahren mit den Quercetin-Derivaten wurde zur Validierung der Methode der intrazellulären Detektion der Myricetin-Derivate mittels NSRA-Komplexierung am Durchflusszytometer zuerst eine Konzentrationsabhängigkeit gemessen. Dazu wurden Hct116 und HepG2 Zellen mit steigenden Konzentrationen an Myricetin-Derivaten inkubiert.

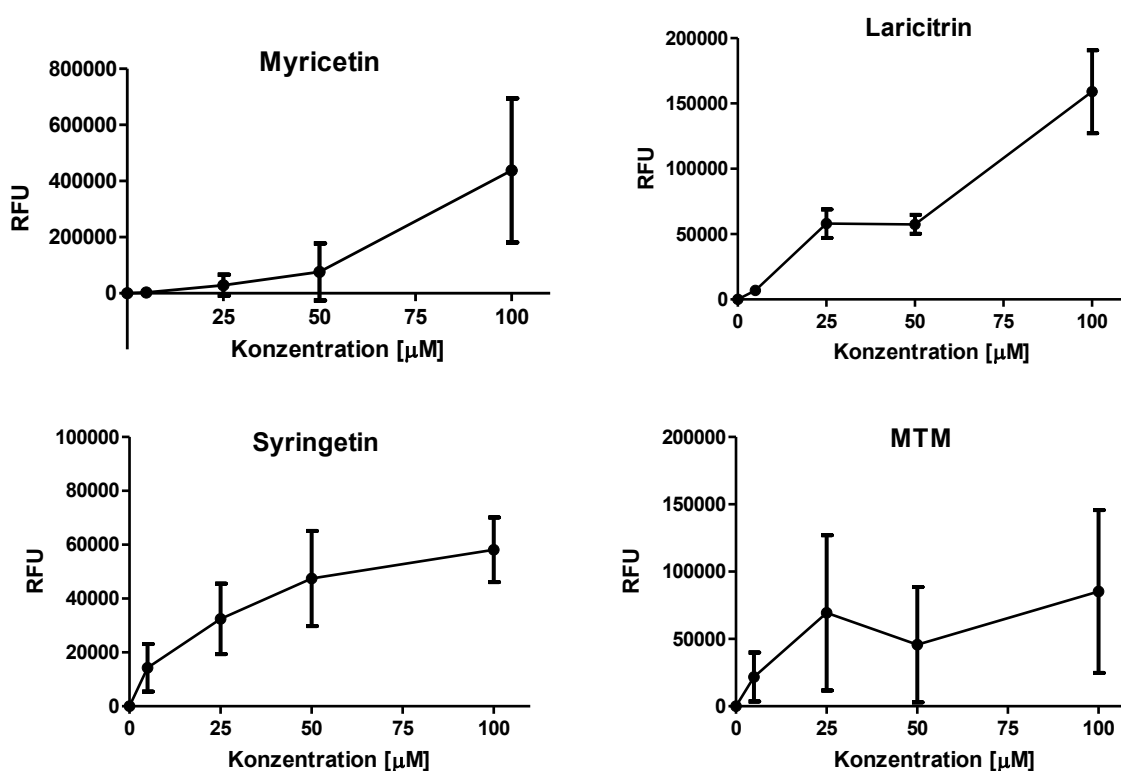


**Abbildung 4.48: Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden nach 24 h Anwachzeit für 1 h mit Myricetin-Derivaten inkubiert. Die Inkubation mit Myricetin betrug lediglich 15 min statt 1 h. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden) +/- SD (n=3).

Abbildung 4.48 stellt die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit der Myricetin-Derivate nach Komplexierung mit NSRA in Hct116 Zellen dar. Die RFU-Werte sind bei Laricitrin und MTM am höchsten. Die Komplexierung von NSRA mit Myricetin scheint nicht so stark zu sein, Myricetin zeigt die niedrigsten RFU-Werte. Anzumerken ist, dass die Inkubation mit Myricetin auf 15 min verkürzt wurde, da in Vorversuchen nach 15 min die höchsten RFU-Werte gemessen wurden (siehe auch Kinetik mit Myricetin in Abbildung 4.50). Die  $R^2$ -Werte der linearen Regression liegen für Myricetin, Laricitrin und MTM zwischen 0,98 und 0,99, nur bei Syringetin ist keine Linearität ( $R^2=0,80$ ) und somit auch keine Konzentrationsabhängigkeit gegeben.

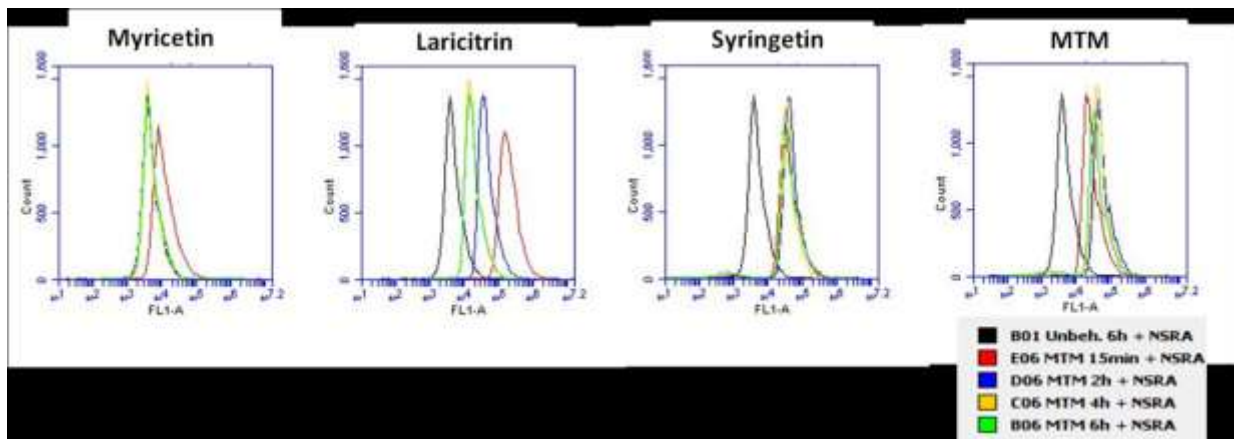
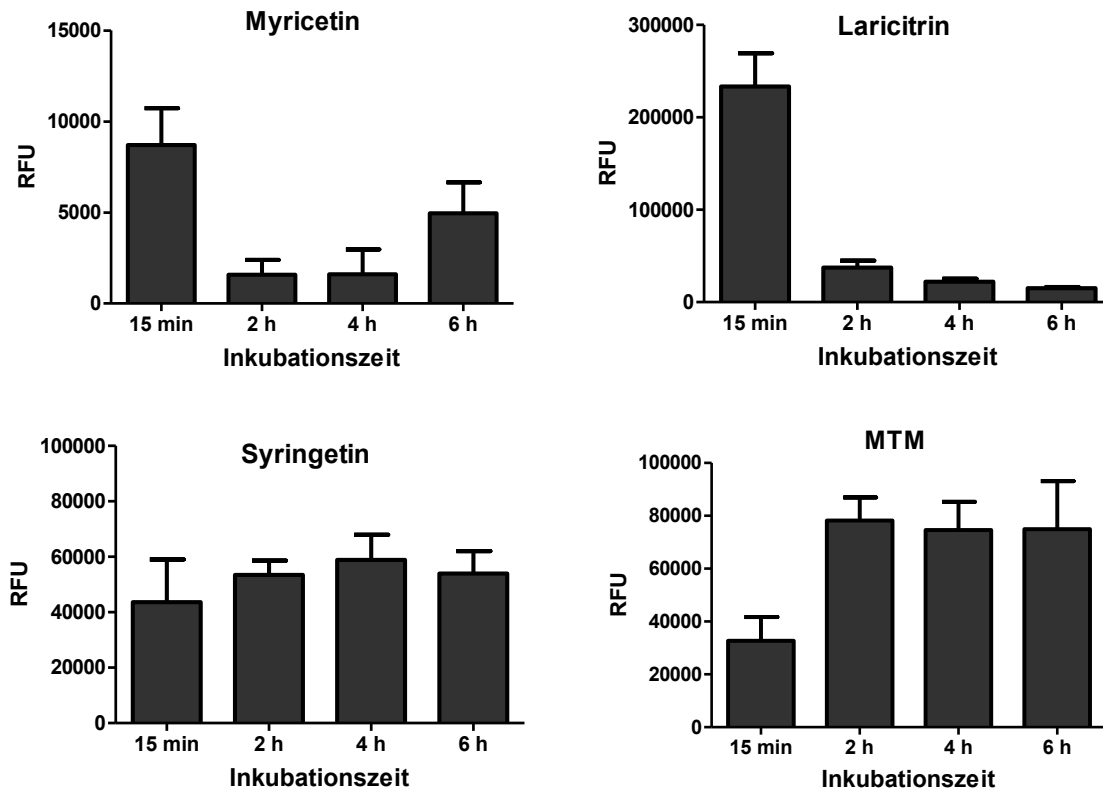
Die entsprechenden Daten zur Konzentrationsabhängigkeit in HepG2 Zellen sind in Abbildung 4.49 dargestellt. Die RFU-Werte sind im Gegensatz zu denen in Hct116 Zellen bei Myricetin am höchsten (auch hier betrug die Inkubationszeit mit Myricetin nur 15 min). Laricitrin und MTM zeigen höhere Werte als Syringetin. Generell sind die Abweichungen der Einzelexperimente bei Myricetin, Syringetin und MTM sehr groß, so dass keine Konzentrationsabhängigkeit gegeben ist. Dies bestätigen auch die  $R^2$ -Werte der linearen Regression, die für Myricetin bei 0,91 und bei Syringetin und MTM bei 0,86 und 0,68 liegen. Einzig für Laricitrin ist dieser Wert mit 0,96 so hoch, so dass man von einer Konzentrationsabhängigkeit ausgehen kann.



**Abbildung 4.49: Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden nach 48 h Anwachzeit für 1 h mit Myricetin-Derivaten inkubiert. Die Inkubation mit Myricetin betrug lediglich 15 min statt 1 h. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden) +/- SD (n=3).

Zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit wurde der zeitliche Verlauf einer Inkubation von Hct116 Zellen mit Myricetin-Derivaten (50 µM) und anschließender Komplexierung mit NSRA im Durchflusszytometer untersucht.

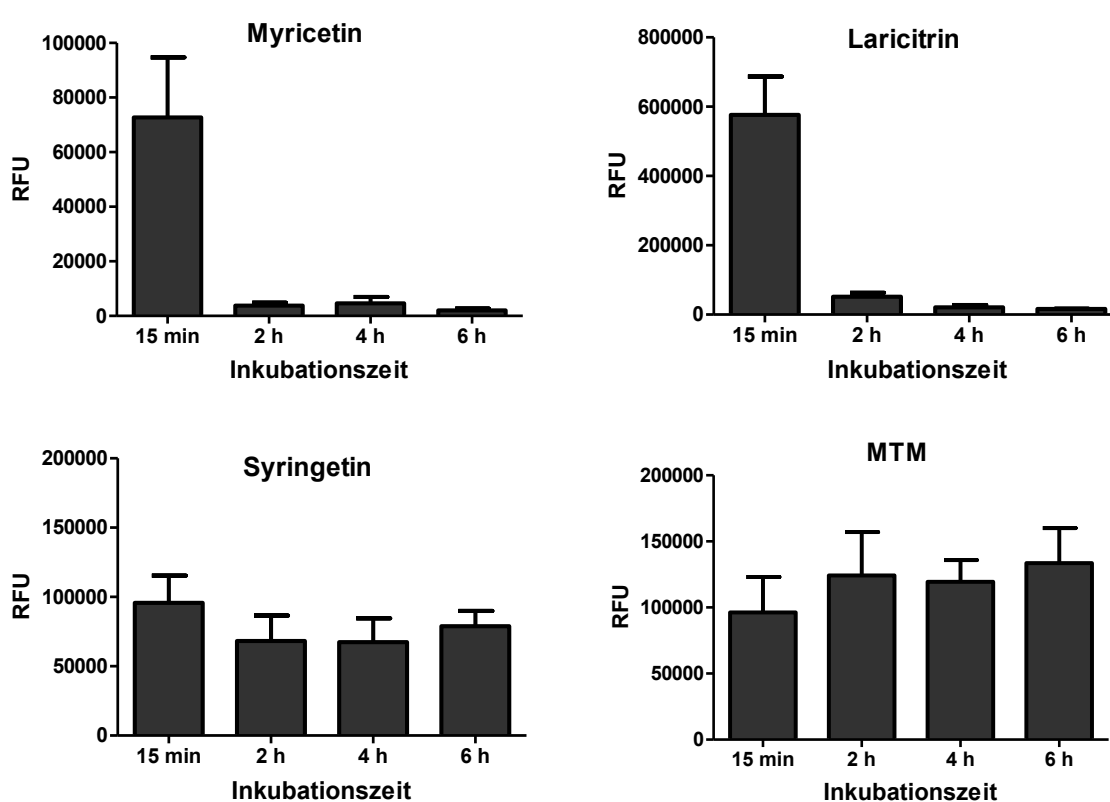


**Abbildung 4.50: Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden nach 24 h Anwachszeit für bis zu 6 h mit Myricetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, gerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD ( $n=3$ ). In der unteren Grafik sind die dazugehörigen Plots der Messung im Durchflusszytometer gezeigt. Die Legende ist exemplarisch für MTM dargestellt, trifft aber in dieser Form auch auf die anderen 3 Myricetin-Derivate zu [schwarz = unbehandelte Zellen + NSRA nach 6 h Inkubation, rot = 15 min, blau = 2 h, gelb = 4 h, grün = 6 h Inkubation].

Abbildung 4.50 zeigt die zeitliche Aufnahme der Myricetin-Derivate nach Komplexierung mit NSRA. Sowohl bei Myricetin als auch bei Laricitrin sind nach 15 min Inkubation die höchsten RFU-Werte messbar. Danach nimmt der intrazelluläre Gehalt der beiden Substanzen

deutlich ab. Bei Myricetin ist nach 6 h Inkubation ein Anstieg der Fluoreszenzwerte erkennbar (auf etwas mehr als die Hälfte des 15 min Wertes). Generell sind die Fluoreszenzwerte der Myricetin-NSRA Komplexe hier am niedrigsten. Die RFU-Werte nach Inkubation mit Syringetin ändern sich nur geringfügig mit zunehmender Inkubationszeit. Bei MTM sind die Fluoreszenzwerte des MTM-NSRA Komplexes nach 15 min am geringsten, nehmen bei 2 h um mehr als das doppelte zu und bleiben bis 6 h konstant auf diesem Niveau. Bei keinem der verwendeten Myricetin-Derivate ist anhand dieser Daten davon auszugehen, dass sie in den Zellen akkumulieren, da die Fluoreszenzwerte mit zunehmender Inkubationszeit nicht angestiegen sind (außer bei Myricetin nach 6 h).



**Abbildung 4.51: Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate nach NSRA-Komplexierung in HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden nach 48 h Anwuchszeit für bis zu 6 h mit Myricetin-Derivaten (50  $\mu$ M) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD (n=3).

Bei der Inkubation der HepG2 Zellen mit Myricetin-Derivaten und anschließender Komplexierung durch NSRA ergibt sich in Abbildung 4.51 ein ähnliches Bild wie zuvor in Hct116 Zellen. Sowohl bei Myricetin als auch bei Laricitrin sind die RFU-Werte nach 15 min am höchsten (ca. 72000 RFU bei Myricetin und ca. 570000 RFU bei Laricitrin). Zu späteren Zeitpunkten sind die Werte bei beiden Substanzen nur noch im Bereich unter 10000 RFU



(Myricetin) bzw. unter 100000 RFU (Laricitrin). Auch bei Syringetin ist der 15 min Wert am höchsten (ca. 100000 RFU), hier ist der Abfall mit zunehmender Inkubationszeit jedoch nicht so deutlich (auf etwa 70000 RFU). Die Fluoreszenzwerte sind bei MTM nach 15 min geringer als zu späteren Zeitpunkten. Zwischen einer Inkubationszeit von 2 h bis 6 h gibt es kaum Veränderungen der intrazellulären MTM-NSRA Fluoreszenz, so dass nicht von einer Akkumulation von MTM in den HepG2 Zellen auszugehen ist. Auch bei den drei anderen Myricetin-Derivaten gibt es keine Anzeichen hinsichtlich einer intrazellulären Akkumulation.

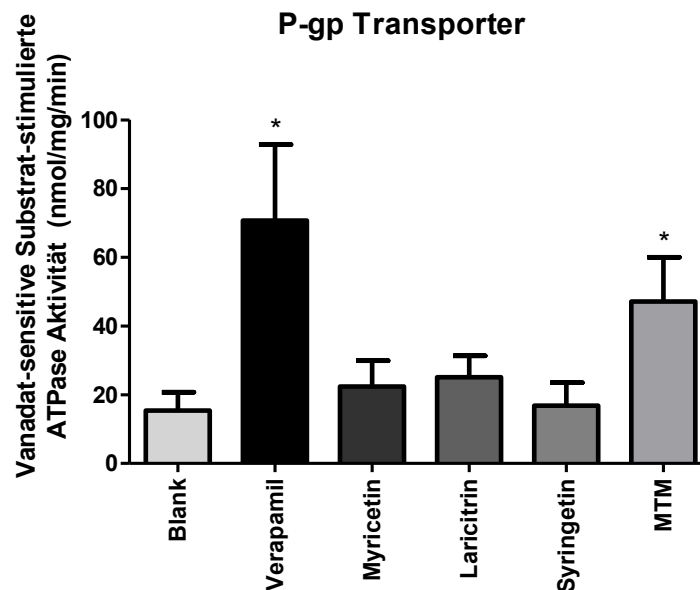
#### **4.1.3.5 Interaktion von Myricetin-Derivaten mit ABC Transportern**

Zur Untersuchung einer Interaktion von Myricetin-Derivaten mit den ABC Transportern P-gp und MRP2 wurde das „BD Gentest ATPase Assay Kit“ inklusive „BD Gentest ABC Transporter Membranen“ (humanes P-gp und humanes MRP2) verwendet. Hierbei wird die Freisetzung von anorganischem Phosphat durch die Substrat-stimulierte Hydrolyse von ATP gemessen. Die Modulation der ATP-Hydrolyse durch die verwendeten Myricetin-Derivate ist ein Anzeichen für ihre Interaktion mit dem entsprechenden Transporter. Eine Aktivierung der ATPase deutet somit auf eine aktiv transportierte Substanz hin. Beide untersuchten ABC Transporter sind auf der apikalen Seite von Enterozyten lokalisiert und hier als Effluxtransporter für den Transport von Xenobiotika aus den Zellen zurück ins Darmlumen verantwortlich.

Die Modulation der ATPase Aktivität durch die verwendeten Myricetin-Derivate wurde in zwei Ansätzen gemessen, mit und ohne Natrium-Orthovanadat (NaOV). NaOV ist bekannt als Inhibitor der ATPase Funktion der hier verwendeten ABC Transporter. Daher wurde für die Darstellung der Ergebnisse die ATPase Aktivität, die im Beisein von NaOV gemessen wurde und die nicht-P-gp-abhängige ATPase Aktivität darstellt, von der Aktivität, die ohne Vorhandesein von NaOV gemessen wurde, abgezogen. Somit kann die P-gp Aktivität als Vanadat-sensitive Substrat-stimulierte ATPase Aktivität dargestellt werden (siehe Abbildung 4.52). Zusätzlich dazu wurde für alle Myricetin-Derivate die Signal-to-noise-ratio (S/N) berechnet, die die Substrat-stimulierte ATPase Aktivität dividiert durch die basale Aktivität darstellt.

Eine Interaktion der Myricetin-Derivate sowie Verapamil als Positivkontrolle mit humanem P-gp ist in Abbildung 4.52 gezeigt. Verapamil erhöht die ATPase Aktivität des P-gp deutlich (70 nmol/mg/min) und kann somit als aktiv transportierte Substanz eingestuft werden. Ein Anstieg der ATPase Aktivität ist nach Inkubation mit 50  $\mu$ M Myricetin-Derivaten nur bei MTM (47 nmol/mg/min) zu erkennen. Weder Myricetin noch Laricitrin oder Syringetin bewirken eine Änderung der ATPase Aktivität und sind daher im Gegensatz zu MTM nicht als aktiv

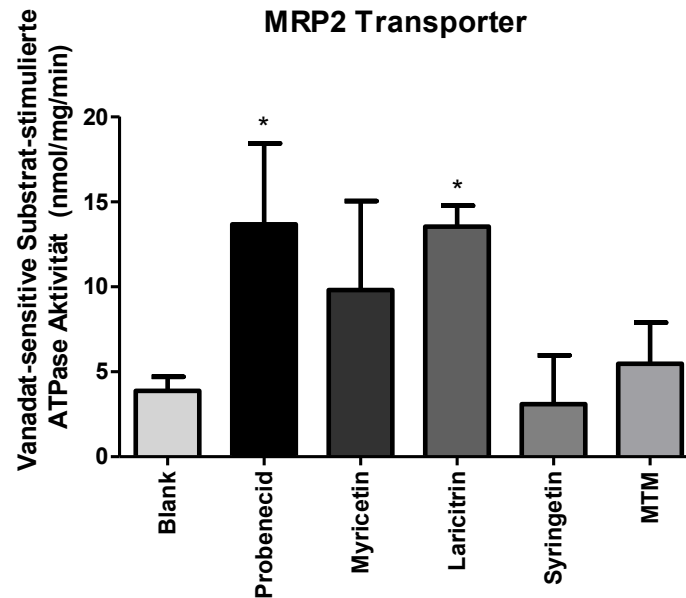
von P-gp transportierte Substrate anzusehen. Die berechneten S/N betragen für Verapamil 4,62, für Myricetin 1,45, für Laricitrin 1,68, für Syringetin 1,10 und für MTM 3,10.



**Abbildung 4.52: Interaktion von Myricetin-Derivaten mit dem humanen ABC Transporter P-gp**

Die ATPase Aktivität von humanem P-gp wurde nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten gemessen. Dazu wurden 1 mg/ml P-gp Membran mit jeweils 50  $\mu$ M Myricetin-Derivaten für 20 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente Verapamil (20  $\mu$ M). Mithilfe der Kalibrierung für Phosphat wurden die gemessenen Absorptionen (bei 800 nm) in die Vanadat-sensitive Substrat-stimulierte ATPase Aktivitäten (in nmol Phosphat/mg Membran-Protein/min) umgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3; p<0,05 vs. Kontrolle (Blank)).

Neben P-gp wurde der Effekt der Myricetin-Derivate auf die ATPase Aktivität des ABC Transporters MRP2 untersucht (siehe Abbildung 4.53). Als Positivkontrolle wurde Probenecid (1 mM) verwendet. Im Gegensatz zu P-gp moduliert MTM nicht die ATPase Aktivität des MRP2. Auch Syringetin scheint nicht mit MRP2 zu interagieren. Die Werte der Positivkontrolle Probenecid liegen bei ca. 13,6 nmol/mg/min, einen ähnlichen Wert zeigt auch Laricitrin (13,5 nmol/mg/min). Somit ist davon auszugehen, dass nicht nur Probenecid ein aktiv transportiertes Substrat des MRP2 Effluxtransporters ist, sondern auch Laricitrin. Die Werte für Myricetin weichen in den Einzelexperimenten stärker voneinander ab (Mittelwert 9,8 nmol/mg/min) und sind daher nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (Blank, Mittelwert 3,9 nmol/mg/min). Jedoch liegt auch bei Myricetin die Vermutung nahe, dass es aktiv von MRP2 transportiert werden kann. Die S/N, die die Substrat-stimulierte ATPase Aktivität dividiert durch die basale Aktivität (Blank) darstellen, betragen für Probenecid 3,55, für Myricetin 2,63, für Laricitrin 3,59, für Syringetin 0,77 und für MTM 1,42.

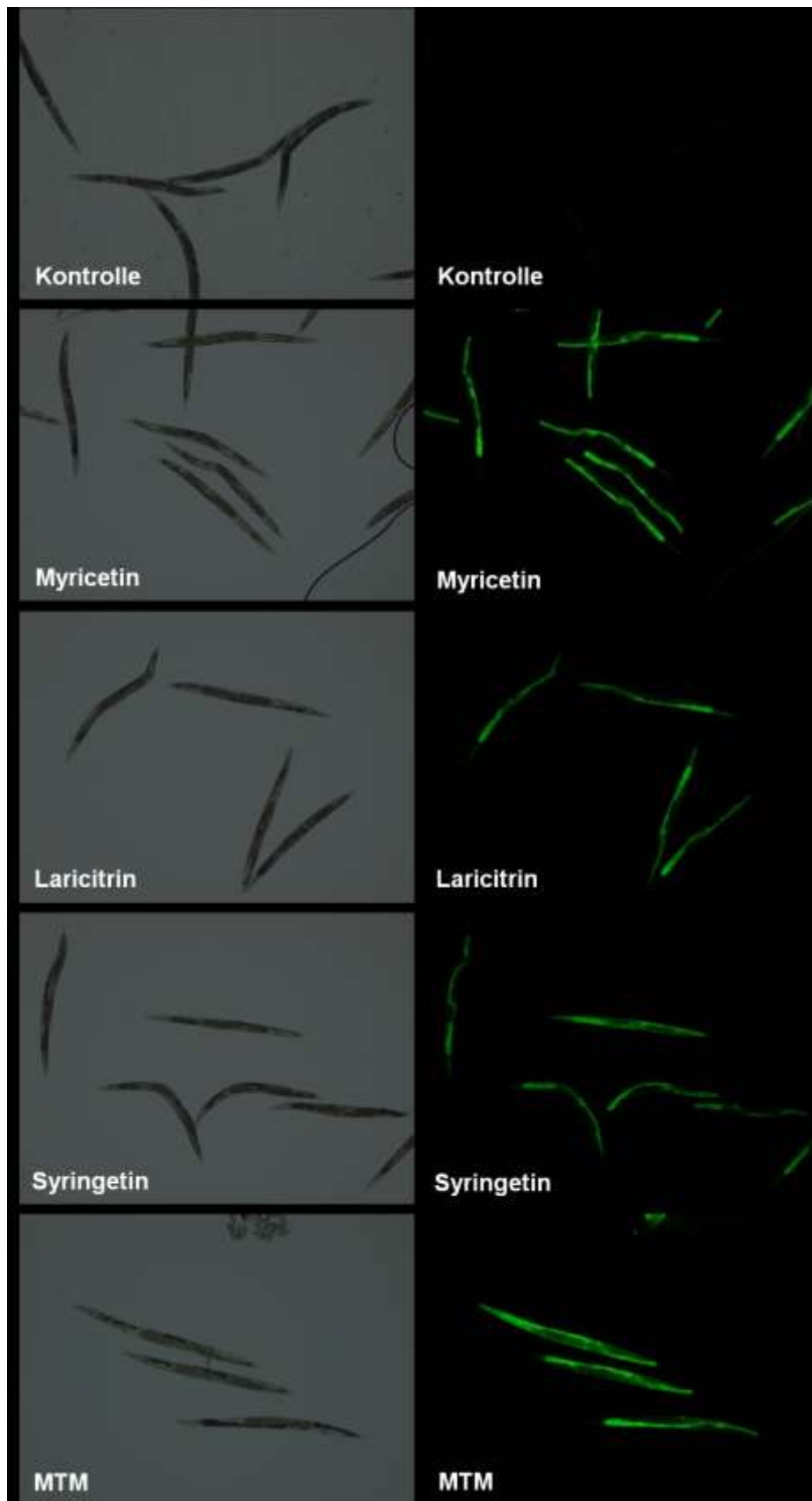


**Abbildung 4.53: Interaktion von Myricetin-Derivaten mit dem humanen ABC Transporter MRP2**

Die ATPase Aktivität von humanem MRP2 wurde nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten gemessen. Dazu wurden 1 mg/ml MRP2 Membran mit jeweils 50  $\mu$ M Myricetin-Derivaten für 40 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente Probenecid (1 mM). Mithilfe der Kalibrierung für Phosphat wurden die gemessenen Absorptionen (bei 800 nm) in die Vanadat-sensitive Substrat-stimulierte ATPase Aktivitäten (in nmol Phosphat/mg Membran-Protein/min) umgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

#### 4.1.4 Aufnahme von Myricetin-Derivaten in *C. elegans*

Zusätzlich zur Aufnahme der Myricetin-Derivate in verschiedene Kolonkarzinom- und Hepatomzellen wurde die Aufnahme dieser Flavonoide in den Nematoden *C. elegans* untersucht. Die Lokalisation der verwendeten Myricetin-Derivate in bestimmten Körperregionen des Nematoden wurde fluoreszenzmikroskopisch nach Komplexbildung mit NSRA analysiert. Dazu wurden die Würmer für 48 h mit 100  $\mu$ M Myricetin-Derivaten behandelt, anschließend für 2 h mit 0,2% NSRA inkubiert und dann auf Objektträgern fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die entsprechenden Bilder sind in Abbildung 4.54 dargestellt. Nach Behandlung mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle ist keine Fluoreszenz sichtbar. Nach Inkubation der wildtypischen Würmer mit 100  $\mu$ M Myricetin-Derivaten ist eine grüne Fluoreszenz sichtbar, resultierend aus der Komplexbildung der Flavonoide durch NSRA. Die Fluoreszenz trat hierbei primär im Darm des Nematoden auf. Da die fluoreszierenden Würmer nicht densitometrisch ausgewertet wurden, können keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität und somit in der Aufnahme bzw. der zellulären Gehalte der einzelnen Myricetin-Derivate konstatiert werden. Generell kann mit dieser Methode jedoch die Aufnahme der einzelnen Myricetin-Derivate in den Nematoden nachgewiesen und bestätigt werden.

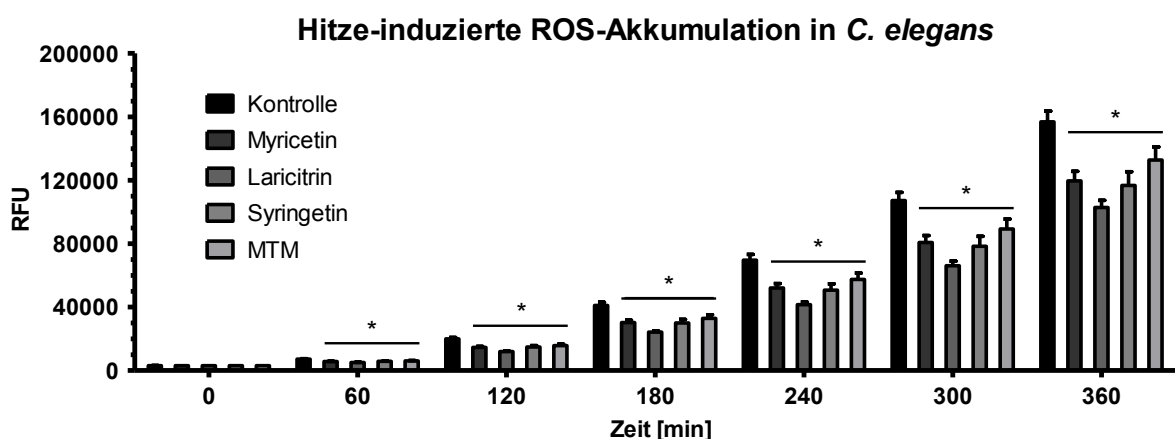


**Abbildung 4.54: Fluoreszenzmikroskopie der Myricetin-Derivate in *C. elegans***

Wildtypische L4 Larven wurden für 48 h mit Myricetin-Derivaten (100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. NSRA (0,2% für 2 h) wurde als Fluoreszenzverstärker eingesetzt, um die Lokalisation der Flavonoide im Wurm sichtbar zu machen (Anregung 460-495 nm, Emission 510-550 nm). Dargestellt sind jeweils repräsentative Durchlichtbilder (links, 20 ms Belichtungszeit) und die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen (rechts, 200 ms Belichtungszeit) eines von drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.5 Einfluss von Myricetin-Derivaten auf die Hitze-induzierte ROS-Akkumulation in *C. elegans*

Das antioxidative Potential der Myricetin-Derivate konnte bereits im TEAC Assay sowie im DCF Assay in Hct116 Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1.1.1 und 4.1.1.2). In weiterführenden Experimenten wurden die antioxidativen Eigenschaften auch im Modellorganismus *C. elegans* überprüft. Hierzu wurden wildtypische Würmer mit 100  $\mu\text{M}$  Myricetin-Derivaten für 48 h inkubiert. Die Generierung von oxidativem Stress erfolgte indirekt über Erzeugung von thermalem Stress. Durch Inkubation bei 37°C ist bei *C. elegans* ein Anstieg der DCF Fluoreszenz zu erkennen. Das Temperaturoptimum von *C. elegans* beträgt 18-20°C. In Abbildung 4.55 ist der Einfluss der Myricetin-Derivate auf die Hitze-induzierte Akkumulation von ROS dargestellt. Bereits nach 1 h Hitzestress wird in Nematoden, die vorher mit Myricetin-Derivaten inkubiert wurden, signifikant weniger DCF Fluoreszenz detektiert. Dieser Effekt wird mit zunehmender Zeit noch deutlicher. Nach 240 min Hitzestress haben Laricitrin-behandelte Tiere die niedrigsten Fluoreszenzwerte. Eine Inkubation mit Myricetin und Syringetin wirkt sich verglichen mit Kontrolltieren ebenfalls positiv auf die Reduktion der ROS-Akkumulation aus. Einen weniger prominenten Effekt zeigen MTM-behandelte Tiere, jedoch ist der Effekt auch hier statistisch signifikant. Zusammenfassend reduziert eine Inkubation mit Myricetin-Derivaten die durch Hitze-induzierte Akkumulation von ROS.



**Abbildung 4.55: Modulation der Hitze-induzierten ROS-Akkumulation in *C. elegans* durch Myricetin-Derivate**

Wildtypische L4 Larven wurden für 48 h mit Myricetin-Derivaten (100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Bildung von ROS wurde durch Hitze (37°C) induziert und mit der Fluoreszenzsonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  im Spektrofluorimeter (Anregung 485 nm, Emission 535 nm) quantifiziert. Pro Behandlung wurde je ein Tier in ein Well einer 384-Wellplatte (16 Tiere pro Experiment/pro Substanz) gemessen. Die Fluoreszenzintensität steigt dabei proportional zur Hitze-induzierten ROS-Akkumulation in den Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=64$  Tiere in 4 individuellen Experimenten mit jeweils 16 Tieren pro Flavonoid, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

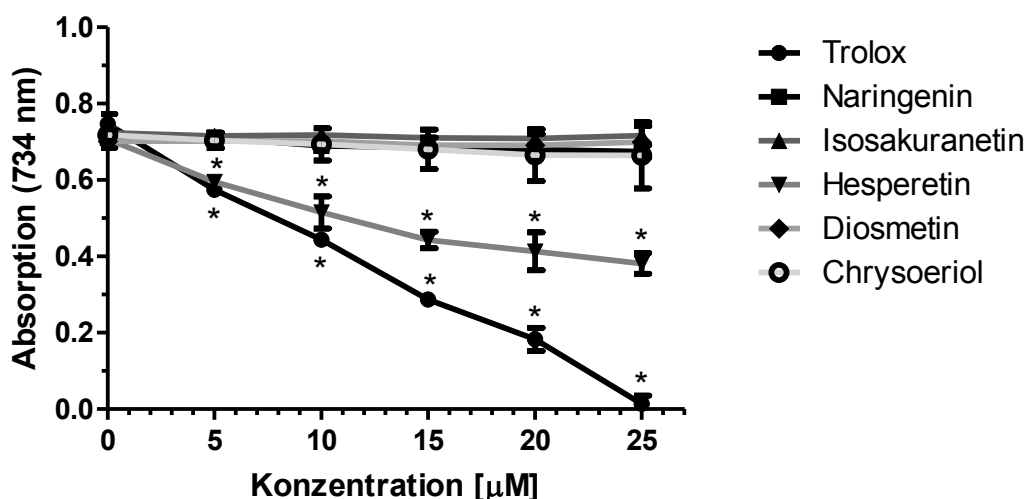
## 4.2 Zelluläre Effekte strukturverwandter Flavonoide

In diesem Kapitel werden die zellulären Eigenschaften strukturverwandter Flavonoide, genauer der Flavanone Naringenin, Isosakuranetin und Hesperetin sowie der Flavone Diosmetin und Chrysoeriol, gezeigt. Isosakuranetin stellt das im B-Ring methylierte Derivat von Naringenin dar. Hesperetin besitzt die gleiche Methylgruppe wie Isosakuranetin und zusätzlich eine Hydroxylgruppe an Position 3' im B-Ring. Diosmetin und Chrysoeriol stellen die methylierten Derivate von Luteolin dar und unterscheiden sich von den Flavanonen durch eine zusätzliche Doppelbindung im C-Ring. Im ersten Teil dieses Kapitels wird auf die antioxidativen Eigenschaften dieser Flavonoide im zellfreien System sowie in Hct116 Zellen eingegangen. Im weiteren Verlauf folgen Untersuchungen zur Toxizität und zur zellulären Aufnahme dieser Flavonoide in Kolonkarzinomzellen.

### 4.2.1 Antioxidative Eigenschaften strukturverwandter Flavonoide

#### 4.2.1.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von strukturverwandten Flavonoiden mittels TEAC Assay

Die antioxidative Kapazität der Flavanone Naringenin, Isosakuranetin und Hesperetin sowie der beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin wurde mithilfe des TEAC Assays bestimmt. Dabei wird die Entfärbung der radikalischen, blau-grünen ABTS-Lösung über die Zeit photometrisch bei 734 nm bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet.



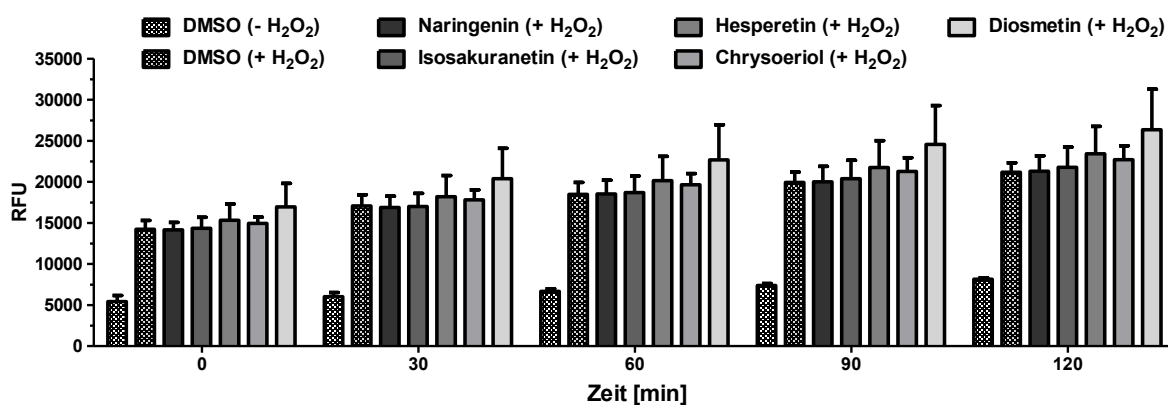
**Abbildung 4.56: Antioxidatives Potential strukturverwandter Flavonoide im TEAC-Assay**

Die Abnahme der Absorption der farbigen ABTS-Lösung wurde 2 min nach der Zugabe des jeweiligen Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 734 nm als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle).

Abbildung 4.56 zeigt das im TEAC Assay ermittelte antioxidative Potential der verwendeten Flavonoide in Relation zur Referenzsubstanz Trolox. Lediglich bei Hesperetin können radikalfangende Eigenschaften ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konstatiert werden. Diese sind jedoch bei allen untersuchten Konzentrationen schwächer als die von Trolox. Weder Naringenin und Isosakuranetin noch Diosmetin und Chrysoeriol zeigen in diesem Assay ein antioxidatives Potential.

#### 4.2.1.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von strukturverwandten Flavonoiden mittels DCF Assay

Die strukturverwandten Flavonoide wurden neben dem zellfreien TEAC Assay auch in Kolonkarzinomzellen mittels DCF Assay auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Zur Messung der intrazellulären ROS Konzentration in 96-Wellplatten wurde die Fluoreszenzsonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  verwendet. Um den Einfluss der Flavonoide auf die Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten ROS zu testen, wurden Hct116 Zellen für 4 h mit Flavonoiden vorbehandelt (50  $\mu\text{M}$ ), 30 min mit der Fluoreszenzsonde inkubiert und weitere 60 min mit 750  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gestresst. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte über 3 h bei 37°C im Spektrofluorimeter.



**Abbildung 4.57: Antioxidatives Potential strukturverwandter Flavonoide im DCF-Assay**

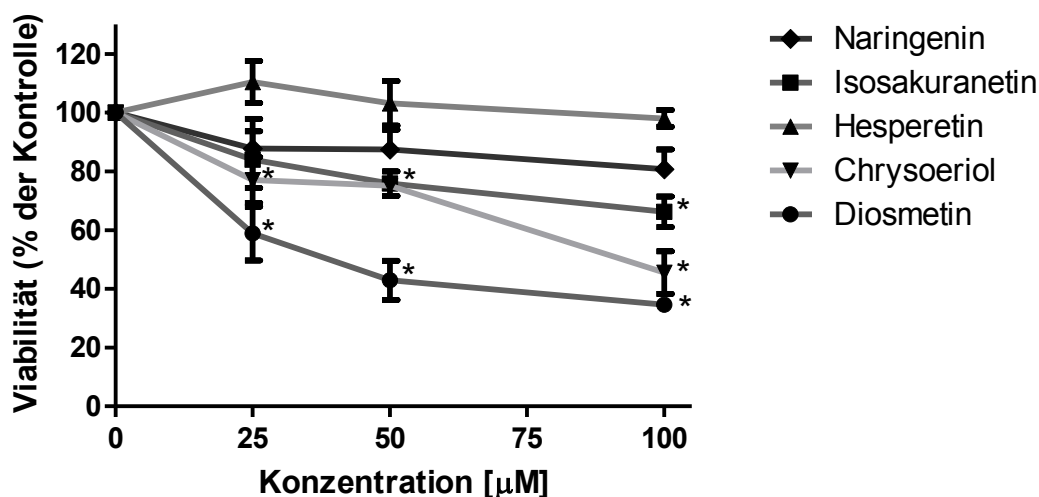
Hct116 Zellen wurden 4 h mit 50  $\mu\text{M}$  Flavonoiden vorinkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  als Fluoreszenzsonde (für 30 min) wurden die Zellen mit 750  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 1 h inkubiert, um so oxidativen Stress zu induzieren. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte fluorimetrisch in 96-Wellplatten (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Jeder Balken stellt die Mittelwerte von jeweils mit Flavonoid + DCF +  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Zellen  $\pm$  SD dar (n=3).

Wie aus Abbildung 4.57 hervorgeht, ist keines der getesteten Flavonoide in der Lage den durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  vermittelten Anstieg der intrazellulären ROS Konzentration zu senken. Eine 4 h Vorinkubation mit Naringenin, Isosakuranetin und Chrysoeriol hat keinen Effekt auf die ROS Konzentration. Auch das im TEAC Assay antioxidativ wirksame Flavanon Hesperetin zeigt in Hct116 Zellen im DCF Assay keine antioxidativen Eigenschaften. Nach Inkubation mit

Diosmetin sind die ROS Werte leicht erhöht gegenüber Kontrollzellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DCF inkubiert wurden.

#### 4.2.2 Zytotoxische Effekte von strukturverwandten Flavonoiden in verschiedenen Zelllinien

Zytotoxische Effekte der verwendeten Flavonoide wurden in der Kolonkarzinomzelllinie Hct116 nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht und sind in Abbildung 4.58 gezeigt.

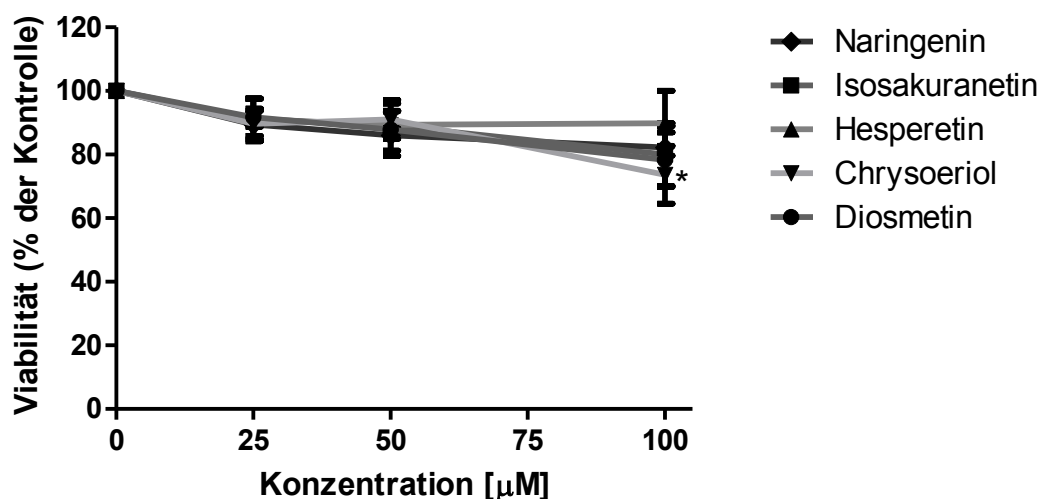


**Abbildung 4.58: Zytotoxizität strukturverwandter Flavonoide in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden für 24 h mit Flavonoiden inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde als Maß für die Viabilität der Zellen mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Von den Flavanonen zeigt nur Isosakuranetin (ab 50 µM) eine statistisch signifikante Toxizität. Nach 24 h Inkubation mit 100 µM liegt die Viabilität der Kolonkarzinomzellen bei etwa 70%. Naringenin und Hesperetin haben keinen Einfluss auf die Viabilität der Hct116 Zellen unter den untersuchten experimentellen Bedingungen. Im Gegensatz zu den Flavanonen wirken die beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin toxischer auf die Kolonkarzinomzellen. Diosmetin reduziert die Viabilität der Hct116 Zellen bereits ab 25 µM auf unter 60%. Bei einer Konzentration von 100 µM sind nur noch etwa 40% der Zellen viabel. Die Effekte von Diosmetin sind nicht so prominent wie die von Chrysoeriol, jedoch auch ab 25 µM statistisch signifikant. Nach 24 h Inkubation mit 100 µM Chrysoeriol ist die Viabilität der Zellen auf etwa die Hälfte reduziert. Generell sind die Effekte der verwendeten Flavonoide auf die Viabilität der verwendeten Kolonkarzinomzelllinie nur marginal. Naringenin, Hesperetin und Isosakuranetin liegen außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs.





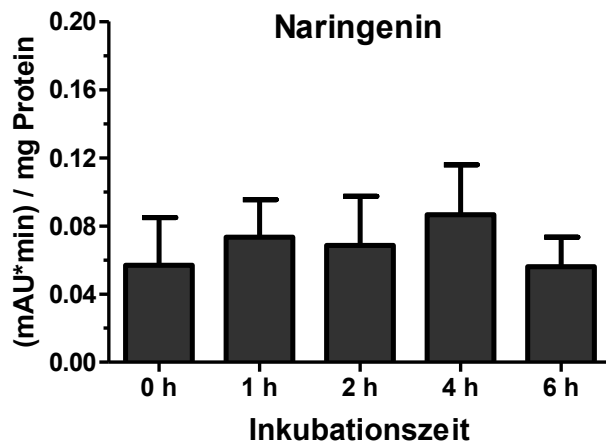
**Abbildung 4.59: Zytotoxizität strukturverwandter Flavonoide in H4IIE Zellen**

H4IIE Zellen wurden für 24 h mit 25, 50 und 100 µM Flavonoiden inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde als Maß für die Viabilität der Zellen mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

In Abbildung 4.59 sind die zytotoxischen Effekte der verwendeten Flavonoide in Hepatomzellen der Ratte (H4IIE) dargestellt. Nach 24 h Inkubationszeit ist nur Chrysoeriol (100 µM) dazu in der Lage die Viabilität signifikant zu reduzieren. Keine der anderen Substanzen zeigt im hier verwendeten Konzentrationsbereich signifikant toxische Effekte auf in H4IIE Zellen. Verglichen mit den Hct116 Zellen reagieren die H4IIE Zellen weniger sensitiv.

#### 4.2.3 Zelluläre Aufnahme von strukturverwandten Flavonoiden

Die Aufnahmestudien in Hct116 Kolonkarzinomzellen wurden mit jeweils 100 µM Naringenin, Isosakuranetin, Hesperetin, Chrysoeriol und Diosmetin durchgeführt. Da alle Experimente in konditioniertem Medium stattfanden, wurden die verwendeten Flavonoide durch Zugabe von 500 µM Ascorbinsäure stabilisiert. Die Ermittlung der intrazellulären Flavonoidmenge erfolgte mittels HPLC Analyse. Die verwendete Anlage verfügte über einen DAD und eine integrierte Spektrenbibliothek. Durch eine Messung von Standards des jeweiligen Flavonoids konnten die Peaks anhand ihrer Retentionszeit sowie ihres UV-Spektrums den entsprechenden Flavonoiden zugeordnet werden. Zusätzlich wurde bei jeder Probe der Proteingehalt des Zellpellets ermittelt, um die AUC (mAU\*min) der Peaks darauf zu beziehen.

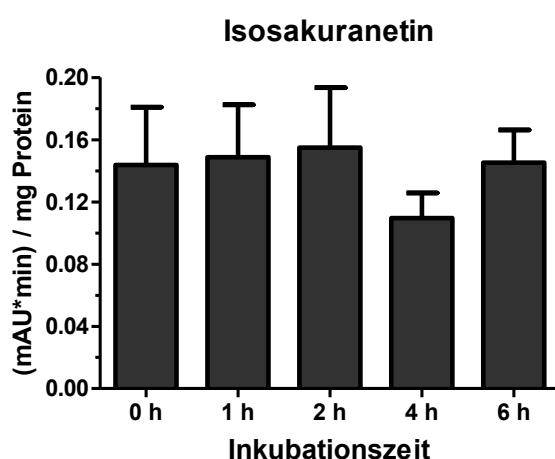


**Abbildung 4.60: Intrazelluläre Konzentration von Naringenin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M Naringenin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Naringenin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

In Abbildung 4.60 sind die Ergebnisse der Inkubation von Hct116 Zellen mit 100  $\mu$ M Naringenin dargestellt. Bereits nach 0 h (technisch bedingt hier eher 2-5 min Inkubationszeit) ist Naringenin intrazellulär detektierbar (ca. 0,06 (mAU\*min)/mg Protein). Generell sind die intrazellulären Gehalte von Naringenin sehr niedrig und nehmen über den getesteten Inkubationszeitraum nur geringfügig zu. Anhand dieser Werte ist nicht von einer Akkumulation von Naringenin in den Hct116 Zellen auszugehen.

Die intrazelluläre Aufnahme des Methylderivates von Naringenin, Isosakuranetin (100  $\mu$ M), ist in Abbildung 4.61 gezeigt. Bei einer Inkubationszeit von 0 h bis 2 h bleiben die intrazellulären Mengen von Isosakuranetin in etwa gleich (ca. 0,15 (mAU\*min)/mg Protein). Ein Vergleich mit dem unmethylierten Naringenin zeigt, dass die Methylierung bei Isosakuranetin eine höhere Aufnahme dieses Flavonoids in die Hct116 Zellen bedingt.

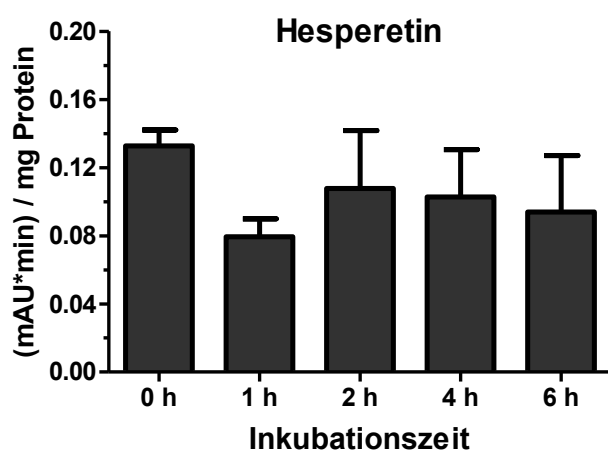


**Abbildung 4.61: Intrazelluläre Konzentration von Isosakuranetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M Isosakuranetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Isosakuranetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

Als drittes strukturverwandtes Flavonoid wurde Hesperetin verwendet, welches sich durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 3' des B-Ringes von Isosakuranetin unterscheidet. Die entsprechenden Ergebnisse der zellulären Aufnahme von 100  $\mu$ M

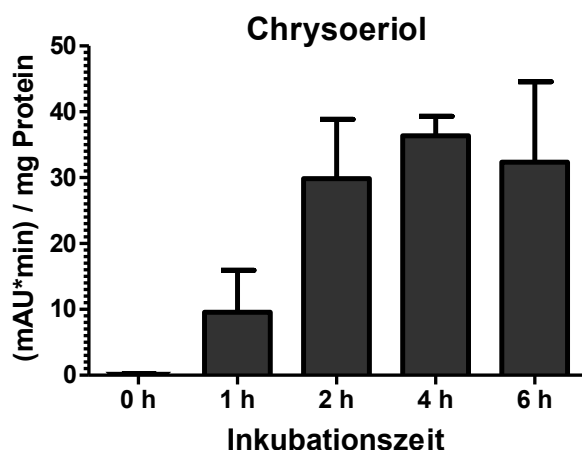
Hesperetin sind in Abbildung 4.62 dargestellt. Hesperetin wird schnell in die Zellen aufgenommen, was die relativ hohen intrazellulären Werte von ca. 1,3 (mAU\*min)/mg Protein nach 0 h belegen. Nach 1 h Inkubationszeit ist ein Abfall der intrazellulären Menge auf etwa 0,8 (mAU\*min)/mg Protein festzustellen, welche mit zunehmender Inkubationszeit wieder ansteigen.



**Abbildung 4.62: Intrazelluläre Konzentration von Hesperetin in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M Hesperetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Hesperetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Zusätzlich zu den drei Flavanonen wurden die beiden methylierten Flavone Chrysoeriol und Diosmetin hinsichtlich ihrer zellulären Aufnahme untersucht.

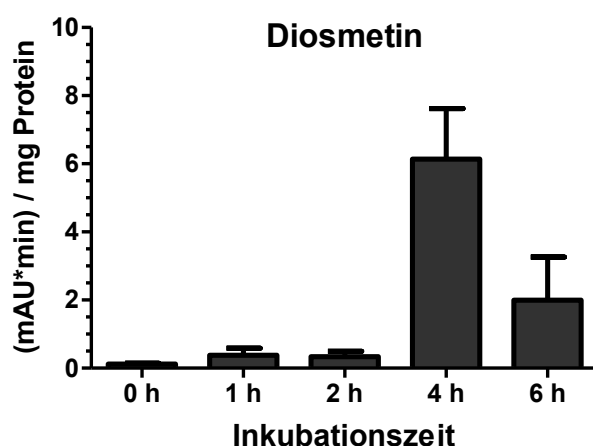


**Abbildung 4.63: Intrazelluläre Konzentration von Chrysoeriol in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M Chrysoeriol inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Chrysoeriol-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Die intrazelluläre Konzentration von Chrysoeriol (Abbildung 4.63) steigt bis 2 h Inkubationszeit an und erreicht dann ein Plateau. Generell sind die intrazellulären Gehalte an Chrysoeriol sehr hoch. Nach 1 h sind bereits etwa 10 (mAU\*min)/mg Protein in den Zellen detektierbar. Verglichen mit der Aufnahme der Flavanone sind die Werte deutlich höher. Auch bei einem Vergleich der intrazellulären Gehalte von Diosmetin (Abbildung 4.64), dem an Position 4' methylierten Flavon (Vergleich: Chrysoeriol besitzt die entsprechende Methylgruppe an Position 3'), sind die Gehalte von Chrysoeriol um ein Vielfaches höher.

Generell ist bei Chrysoeriol eine Akkumulation innerhalb der Zellen zu beobachten. Der zeitliche Verlauf der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Diosmetin ist in Abbildung 4.64 gezeigt. Nach 0 h bis 2 h sind nur geringe Mengen an Diosmetin (unter 0,5 (mAU\*min)/mg Protein) in den Zellen nachweisbar. Lediglich nach 4 h Inkubation sind hohe intrazelluläre Mengen (ca. 6,0 (mAU\*min)/mg Protein) detektierbar. Nach 6 h Inkubationszeit ist der intrazelluläre Gehalt zwar auf etwa 2,0 (mAU\*min)/mg Protein gesunken, liegt damit aber immer noch deutlich über den Mengen, die bis 2 h detektiert werden.



**Abbildung 4.64: Intrazelluläre Konzentration von Diosmetin in Hct116 Zellen**

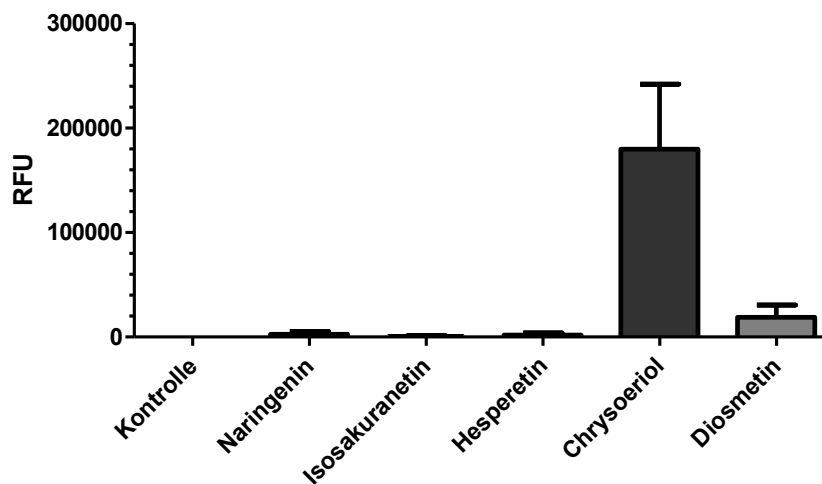
Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (60 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu\text{M}$  Diosmetin inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Diosmetin-Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).

#### 4.2.4 Detektion von strukturverwandten Flavonoiden nach NSRA-Komplexierung im Durchflusszytometer

Eine weitere Methode zur Detektion der zellulären Aufnahme der strukturverwandten Flavonoide bietet deren Komplexierung mit dem Fluoreszenzverstärker NSRA. Die Fluoreszenz der intrazellulären NSRA-Flavonoid-Komplexe kann schließlich im Durchflusszytometer analysiert werden. Dieser Ansatz wurde als einfache und schnelle Alternative zur HPLC gewählt, ist jedoch hinsichtlich der Genauigkeit der Bestimmung der intrazellulären Gehalte nicht so akkurat wie die HPLC. Zusätzlich ist diese Methode von der Struktur der Flavonoide und deren Fähigkeit mit NSRA Komplexe bilden zu können, abhängig. In Abbildung 4.65 sind die Ergebnisse einer einstündigen Inkubation von Hct116 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  strukturverwandten Flavonoiden und anschließender Komplexierung mit NSRA dargestellt. Die Messung der Flavonoid-NSRA Fluoreszenz der Hct116 Zellen erfolgte im Durchflusszytometer unmittelbar nach der Komplexierung mit NSRA.

Aus Abbildung 4.65 geht hervor, dass nur die beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin in der Lage sind einen fluoreszierenden Komplex mit NSRA zu bilden. Die drei verwendeten Flavanone zeigen nach Inkubation mit NSRA nur eine geringe Fluoreszenz, die kaum höher

ist als die NSRA-Hintergrundfluoreszenz der Kontrollzellen. Dies kann zum einen an der geringen Aufnahme in die Zellen, zum anderen aber auch an der Struktur der Flavanone liegen. Chrysoeriol hat mit Abstand die höchsten RFU-Werte (ca. 180000) gefolgt von Diosmetin (etwa 18000 RFU). Dies spiegelt auch die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.3 wider, bei denen bei Chrysoeriol die höchsten intrazellulären Gehalte in Hct116 Zellen detektierbar sind. Anzumerken ist hier jedoch, dass bei den Aufnahmestudien aus Kapitel 4.2.3 jeweils 100  $\mu\text{M}$  Flavonoide verwendet wurden.



**Abbildung 4.65: Intrazelluläre Konzentration strukturverwandter Flavonoide nach NSRA-Komplexierung in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden nach 24 h Anwachzeit für 1 h mit Flavonoiden (50  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. NSRA (0,2% in PBS) wurde als Fluoreszenzverstärker zur Detektion der intrazellulären Flavonoide im Durchflusszytometer eingesetzt (Anregung: 488 nm; Kanal 1: 530/30 nm). Nach 5 min Inkubation mit NSRA wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bis zur Messung auf Eis gelagert. Dargestellt sind mittleren Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden)  $\pm$  SD (n=3).

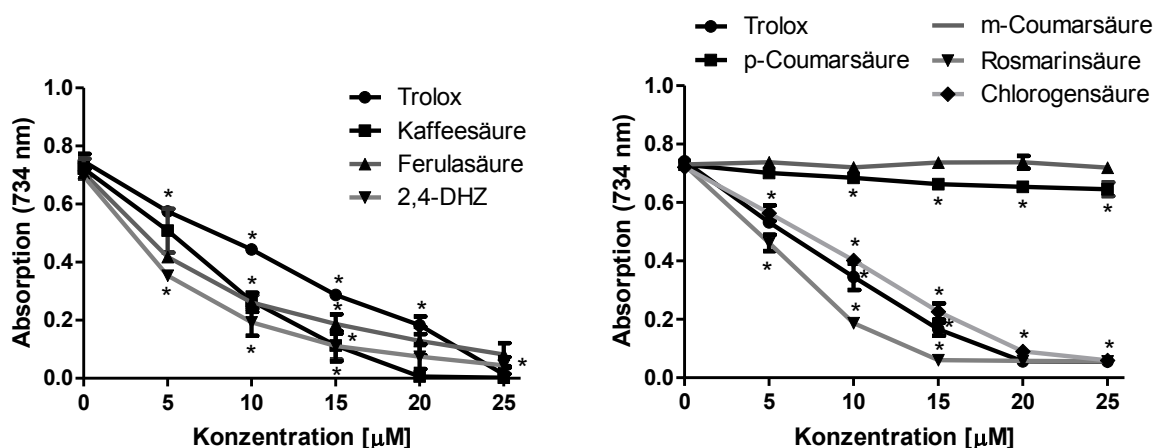
### 4.3 Zelluläre Effekte von Hydroxyzimtsäurederivaten

In diesem Kapitel werden die zellulären Eigenschaften verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate, genauer Kaffeesäure, Ferulasäure, 2,4-Dihydroxyzimtsäure (2,4-DHZ), m-Coumarsäure, p-Coumarsäure, Rosmarinsäure und Chlorogensäure, gezeigt. Diese Substanzklasse stellt den biosynthetischen Vorläufer der Flavonoide dar und wird in großen Mengen über die Nahrung aufgenommen. Hier ist vor allem die in Kaffee vorkommende Chlorogensäure zu nennen. Im ersten Teil dieses Kapitels wird auf die antioxidativen Eigenschaften der Hydroxyzimtsäurederivate im zellfreien System sowie in Hct116 Zellen eingegangen. Im weiteren Verlauf folgen Untersuchungen zur Toxizität und zellulären Aufnahme der Hydroxyzimtsäurederivate in Kolonkarzinomzellen.

#### 4.3.1 Antioxidative Eigenschaften von Hydroxyzimtsäurederivaten

##### 4.3.1.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Hydroxyzimtsäurederivaten mittels TEAC Assay

Die antioxidative Kapazität der Hydroxyzimtsäurederivate Kaffeesäure, Ferulasäure, 2,4-DHZ, m-Coumarsäure, p-Coumarsäure, Rosmarinsäure und Chlorogensäure wurde mithilfe des TEAC Assays bestimmt. Dabei wird die Entfärbung der radikalischen, blau-grünen ABTS-Lösung über die Zeit photometrisch bei 734 nm bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet.



**Abbildung 4.66: Antioxidatives Potential der Hydroxyzimtsäurederivate im TEAC-Assay.**

Die Abnahme der Absorption der farbigen ABTS-Lösung wurde 2 min nach der Zugabe des jeweiligen Hydroxyzimtsäurederivates als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 734 nm als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle).

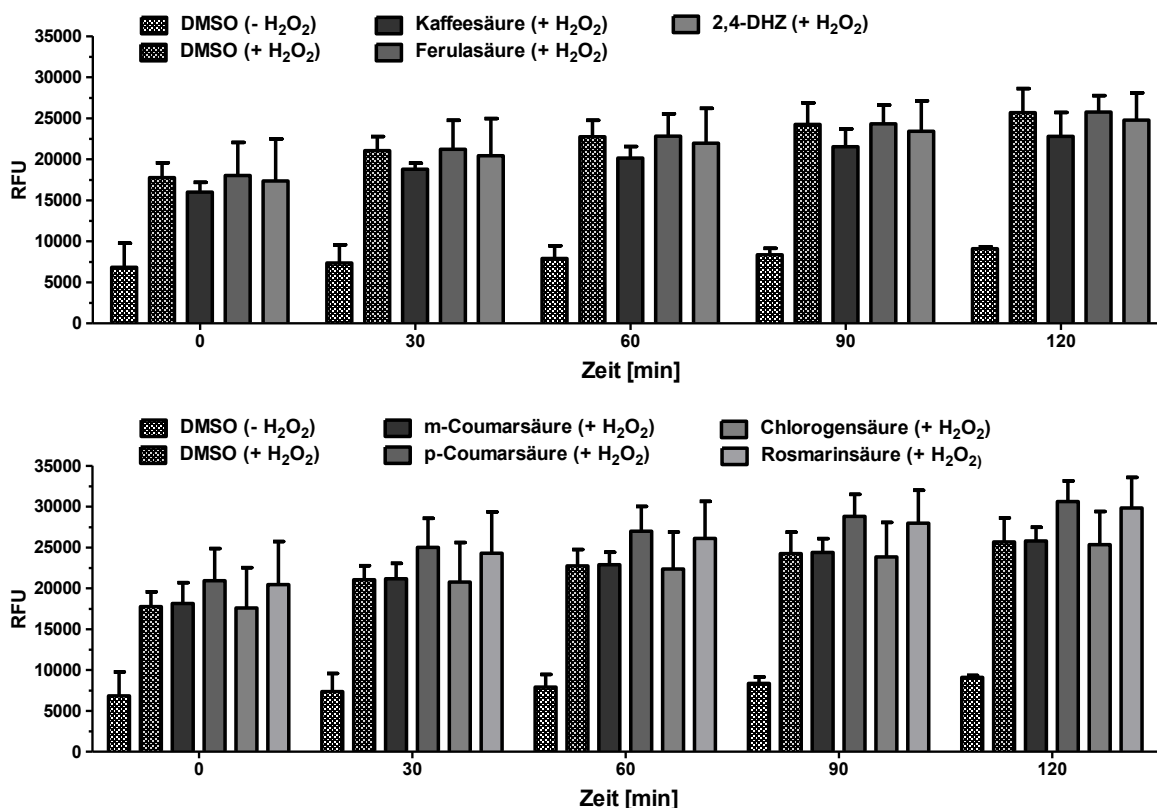
In Abbildung 4.66 ist das antioxidative Potential der Hydroxyzimtsäurederivate in Relation zur Referenzsubstanz Trolox (schwarze Linie) dargestellt. Sowohl Kaffeesäure als auch dessen methyliertes Derivat Ferulasäure zeigen eine hohe antioxidative Kapazität, die größer ist als die von Trolox. Das stärkste antioxidative Potential der unveresterten

Hydroxyzimtsäurederivate hat bis zu einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  2,4-DHZ. Das veresterte Derivat Rosmarinsäure besitzt ebenfalls eine sehr hohe antioxidative Kapazität, vergleichbar mit der von 2,4-DHZ. Auch die veresterte Chlorogensäure zeigt eine antioxidative Wirkung und entfärbt die radikalische ABTS Lösung bereits ab 5  $\mu\text{M}$ . Dieser Effekt ist jedoch weniger stark als der der Referenzsubstanz Trolox. Weder m-Coumarsäure noch p-Coumarsäure zeichnen sich im TEAC Assay durch ihre radikalfangenden Eigenschaften aus. Nur die p-Coumarsäure zeigt ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein geringes antioxidatives Potential im Vergleich zur Kontrolle

#### **4.3.1.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Hydroxyzimtsäurederivaten mittels DCF Assay**

Die Hydroxyzimtsäurederivate wurden zusätzlich zum zellfreien TEAC Assay auch in Kolonkarzinomzellen mittels DCF Assay auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Zur Messung der intrazellulären ROS Konzentration in 96-Wellplatten wurde die Fluoreszenzsonde  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  verwendet. Um den Einfluss der Hydroxyzimtsäurederivate auf die Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten ROS zu testen, wurden die Hct116 Zellen für 4 h mit Hydroxyzimtsäurederivaten vorbehandelt (100  $\mu\text{M}$ ), 30 min mit der Fluoreszenzsonde inkubiert und weitere 60 min mit 750  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gestresst. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte über 3 h bei 37°C.

Wie aus Abbildung 4.67 hervorgeht, führt eine Vorinkubation von Hct116 Zellen mit Hydroxyzimtsäuren nicht zu einem niedrigeren Level intrazellulärer ROS nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zwar wirkt sich Kaffeesäure leicht positiv darauf aus, sie senkt die Menge an intrazellulärem ROS jedoch nicht signifikant. Keines der anderen Hydroxyzimtsäurederivate hat einen Einfluss auf die ROS Konzentration in Hct116 Zellen. Generell können die im TEAC Assay gezeigten ausgeprägten radikalfangenden Eigenschaften der Hydroxyzimtsäurederivate mittels DCF Assay in Hct116 Zellen nicht bestätigt werden.



**Abbildung 4.67: Antioxidatives Potential von Hydroxycimtsäurederivaten im DCF-Assay**

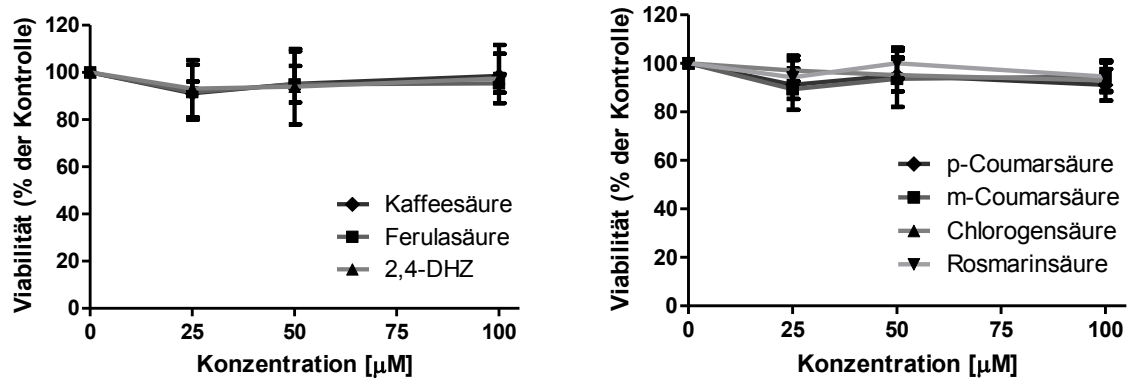
Hct116 Zellen wurden 4 h mit 100  $\mu\text{M}$  Hydroxycimtsäurederivaten vorinkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 30 min) wurden die Zellen mit 750  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h inkubiert, um so oxidativen Stress zu induzieren. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte fluorimetrisch in 96-Wellplatten (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Jeder Balken stellt den Mittelwert der DCF Fluoreszenz +/- SD dar (n=3).

#### 4.3.2 Zytotoxische Effekte von Hydroxycimtsäurederivaten in verschiedenen Zelllinien

Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der sieben Hydroxycimtsäurederivate erfolgte wie bei den zuvor verwendeten Flavonoiden mittels MTT Assay. Auch hier wurden Hct116 Kolonkarzinomzellen und H4IIE Hepatomzellen verwendet und für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert.

Eine 24 h Inkubation mit den verwendeten Hydroxycimtsäurederivaten führt zu keiner Reduktion der Zellviabilität der Kolonkarzinomzellen. Weder die freien Hydroxycimtsäurederivate noch die veresterten Derivate Chlorogensäure und Rosmarinsäure wirken toxisch auf die Zellen. Selbst bei Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  zeigt sich kein Effekt der Substanzen auf die Viabilität der Zellen.

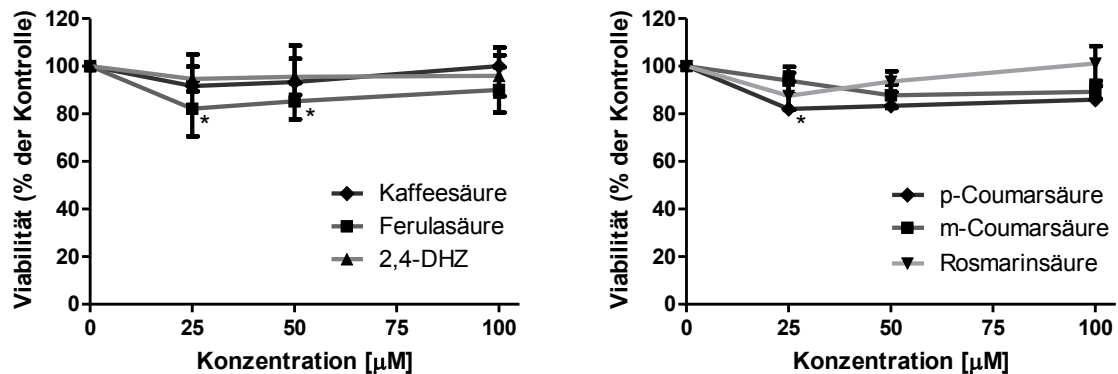




**Abbildung 4.68: Zytotoxizität von Hydroxyzimtsäurederivaten in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden für 24 h mit Hydroxyzimtsäurederivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde als Maß für die Viabilität der Zellen mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Toxizität der Hydroxyzimtsäurederivate in einer weiteren Zelllinie überprüft. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.69 gezeigt. Auch in der Hepatomzelllinie wirken die Hydroxyzimtsäurederivate nicht oder nur marginal toxisch. Lediglich Ferulasäure (25 und 50 µM) sowie p-Coumarsäure (25 µM) zeigen eine leichte Toxizität und reduzieren die Viabilität der H4IIE Zellen auf knapp unter 90%.



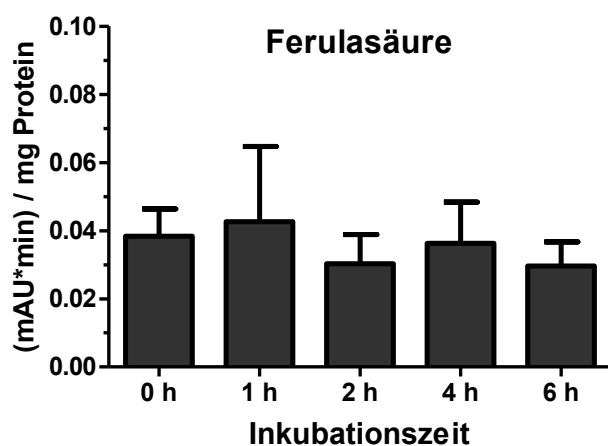
**Abbildung 4.69: Zytotoxizität von Hydroxyzimtsäurederivaten in H4IIE Zellen**

H4IIE Zellen wurden für 24 h mit Hydroxyzimtsäurederivaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde als Maß für die Viabilität der Zellen mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Bei allen anderen Hydroxyzimtsäurederivaten decken sich die MTT-Ergebnisse in H4IIE mit denen in Hct116 Zellen, bei denen kein Effekt auf die Viabilität konstatiert wurde. Somit ist unter den untersuchten experimentellen Bedingungen nicht von einer Zytotoxizität der verwendeten Hydroxyzimtsäurederivate im hier getesteten Konzentrationsbereich auszugehen.

### 4.3.3 Zelluläre Aufnahme von Hydroxyzimtsäurederivaten

Für die Aufnahmestudien in Hct116 Kolonkarzinomzellen wurden jeweils 100  $\mu\text{M}$  Kaffeesäure, Ferulasäure, 2,4-DHZ, m- und p-Coumarsäure, Chlorogensäure und Rosmarinsäure verwendet. Analog zur Aufnahme von Flavonoiden, wurden die Aufnahmestudien mit Hydroxyzimtsäurederivaten in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure durchgeführt. Die Ermittlung der intrazellulären Menge erfolgte mittels HPLC Analyse. Zusätzlich wurde bei jeder Probe der Proteingehalt des Zellpellets ermittelt, um die AUC ( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ) der Peaks darauf zu beziehen. In Vorversuchen wurde die Aufnahme von Hydroxyzimtsäurederivaten in 60 mm Zellkulturschalen (in Analogie zu den Experimenten mit Flavonoiden) durchgeführt. Da bei diesen Experimenten jedoch keine intrazellulären Hydroxyzimtsäurederivate detektiert werden konnten, wurde die Zellzahl durch Verwendung von 100 mm Zellkulturschalen erhöht. Der Nachweis der intrazellulär aufgenommenen Hydroxyzimtsäurederivate gestaltete sich dennoch schwierig. Weder bei Experimenten mit Kaffeesäure noch bei Aufnahmestudien mit den veresterten Derivaten Chlorogensäure und Rosmarinsäure konnten diese Substanzen intrazellulär in Hct116 Zellen detektiert werden. Somit werden in diesem Kapitel nur Ergebnisse zur zellulären Aufnahme von Ferulasäure, 2,4-DHZ sowie m- und p-Coumarsäure gezeigt. In weiterführenden Experimenten sollte die Aufnahme von Hydroxyzimtsäurederivaten im Durchflusszytometer durch Komplexierung mit NSRA nachgewiesen werden. Jedoch war keine der hier verwendeten Substanzen dazu in der Lage mit NSRA einen fluoreszierenden Komplex einzugehen, sodass eine Analyse weder im Durchflusszytometer noch fluoreszenzmikroskopisch möglich war.



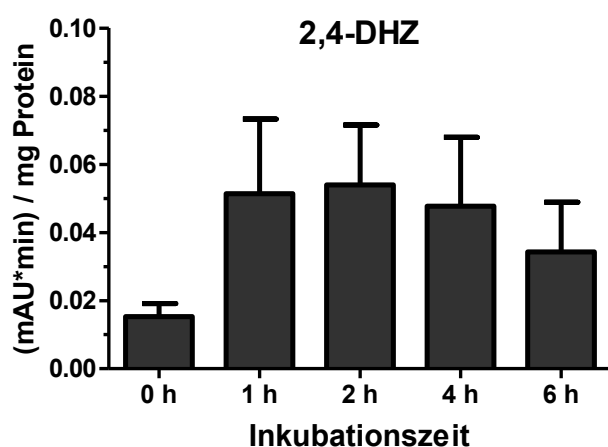
**Abbildung 4.70: Intrazelluläre Konzentration von Ferulasäure in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (100 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu\text{M}$  Ferulasäure inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte ( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ) der entsprechenden Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

In Abbildung 4.70 sind die intrazellulären Gehalte an Ferulasäure nach 0 h bis 6 h Inkubation der Hct116 Zellen dargestellt. Ähnlich wie bei den Aufnahmestudien mit Flavonoiden ist nach 0 h bereits intrazelluläre Ferulasäure detektierbar. Da die tatsächliche Inkubationszeit methodisch bedingt etwa 2 bis 5 min beträgt, könnten die intrazellulär detektierten Mengen auf eine rasche Diffusion der verwendeten Substanz in die Zellen oder ein Kleben an der

Plasmamembran zurückzuführen sein. Die intrazellulären Gehalte an Ferulasäure bewegen sich über den gesamten Inkubationszeitraum im Bereich von 0,03 bis 0,04 (mAU\*min)/mg Protein. Generell ist die Menge an Ferulasäure, die intrazellulär detektiert werden konnte, sehr niedrig.

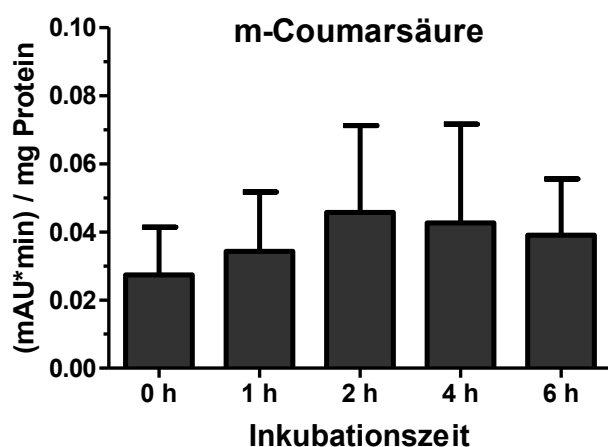
In Abbildung 4.71 sind die intrazellulären Gehalte in Hct116 Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M 2,4-DHZ gezeigt. Diese sind wie zuvor bei Ferulasäure sehr niedrig. Nach 1 h und 2 h Inkubationszeit sind mit etwa 0,05 (mAU\*min)/mg Protein die höchsten Gehalte an 2,4-DHZ detektierbar.



**Abbildung 4.71: Intrazelluläre Konzentration von 2,4-DHZ in Hct116 Zellen**

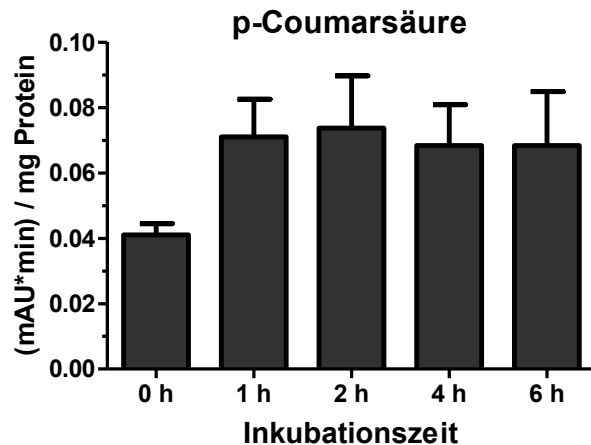
Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (100 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M 2,4-DHZ inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).

Die intrazellulären Gehalte an m-Coumarsäure (Abbildung 4.72) bewegen sich mit 0,03 bis 0,05 (mAU\*min)/mg Protein in einem ähnlichen Bereich wie die der beiden anderen Hydroxizimtsäurederivate. Im Gegensatz zu m-Coumarsäure sind die intrazellulären Gehalte an p-Coumarsäure in Hct116 Zellen deutlich höher (Abbildung 4.73). Nach 0 h Inkubationszeit befinden sich 0,04 (mAU\*min)/mg Protein p-Coumarsäure in den Zellen, dieser Gehalt steigt über den weiteren Inkubationszeitraum auf ca. 0,07 (mAU\*min)/mg Protein an und bleibt konstant auf diesem Niveau.



**Abbildung 4.72: Intrazelluläre Konzentration von m-Coumarsäure in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (100 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M m-Coumarsäure inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD (n=3).



**Abbildung 4.73: Intrazelluläre Konzentration von p-Coumarsäure in Hct116 Zellen**

Hct116 Zellen wurden 48 h nach der Aussaat (100 mm Zellkulturschalen) für bis zu 6 h mit 100  $\mu$ M p-Coumarsäure inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen geerntet, sonifiziert und der intrazelluläre Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die ermittelten AUC-Werte (mAU\*min) der entsprechenden Peaks wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Zellpellets normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3).

Zusammenfassend ist die zelluläre Aufnahme der Hydroxymitsäurederivate deutlich geringer als die der strukturverwandten Flavonoide (Kapitel 4.2.3) oder der Quercetin- und Myricetin-Derivate (Kapitel 4.1.3). Nach Inkubation der Hct116 Zellen mit 100  $\mu$ M Hydroxymitsäurederivaten liegen die intrazellulären Gehalte im Bereich von 0,02 bis 0,07 (mAU\*min)/mg Protein und sind bei allen vier Derivaten relativ ähnlich. Bei den strukturverwandten Flavonoiden ist eine größere Streuung der intrazellulären Mengen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Flavonoid feststellbar. Während die Gehalte von Naringenin in etwa mit denen der Hydroxymitsäurederivate vergleichbar sind, sind die Gehalte der methylierten Derivate Hesperetin und Isosakuranetin mit 0,08 bis 0,15 (mAU\*min)/mg Protein leicht höher. Die Flavone Diosmetin und Chrysoeriol scheinen am besten aufgenommen zu werden. Hier sind nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Substanz intrazelluläre Gehalte von bis zu 6 (mAU\*min)/mg Protein (für Diosmetin) und bis zu 35 (mAU\*min)/mg Protein (für Chrysoeriol) nachweisbar.

#### **4.4 Zelluläre Effekte strukturverwandter Isothiocyanate**

In diesem Kapitel werden die zellulären Effekte von vier strukturverwandten Isothiocyanaten in Hct116 Kolonkarzinomzellen und H4IIE Hepatomzellen betrachtet. Isothiocyanate sind die bioaktiven Hydrolyseprodukte der Glucosinolate, die vor allem in Kreuzblütlern vorkommen. Als Leitstruktur wurde in dieser Arbeit das Isothiocyanat Sulforaphan verwendet. Sulforaphan kommt in großen Mengen in Brokkoli vor und ist als Aktivator des Nrf2/ARE-Signalweges bekannt. Darüber hinaus sind in der Literatur antikanzerogene Eigenschaften von Sulforaphan beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden Sulforaphan und die strukturverwandten Derivate Berteroin, Erucin und Erysoin hinsichtlich ihrer Wirkung auf Kolonkarzinom- und Hepatomzellen untersucht. Bei den Hepatomzellen, die in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um stabil mit dem SEAP-Reporterkonstrukt transfizierte Rattenhepatomzellen (H4IIE-Seap; im Folgenden nur H4IIE genannt). Diese Zelllinie wurde von Frau Dr. Chovolou (Institut für Toxikologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) generiert und zur Verfügung gestellt. Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Ergebnisse zum (anti)oxidativen Potential dieser Substanzen gezeigt, im zweiten Teil folgen das zytotoxische Potential sowie die Modulation zellulärer Signalwege.

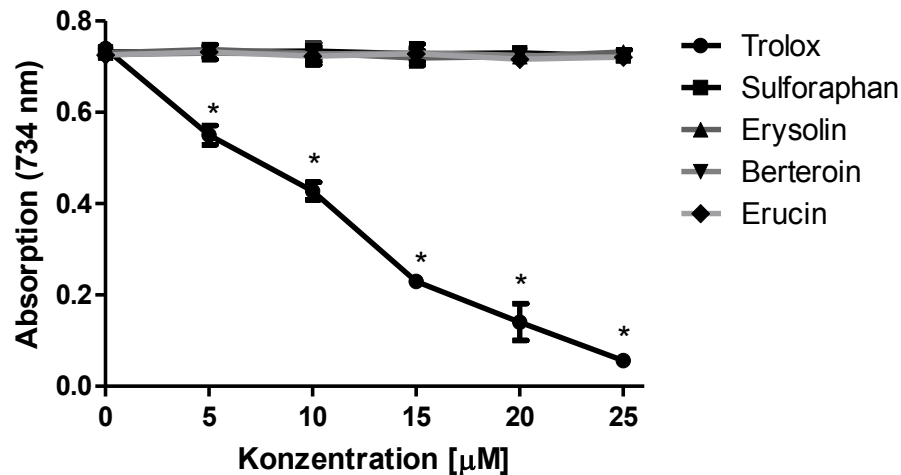
##### **4.4.1 Antioxidative Eigenschaften von Isothiocyanaten**

In diesem Kapitel werden analog zu Flavonoiden und Hydroxyzimtsäurederivaten die antioxidativen Eigenschaften der vier Isothiocyanate zuerst im zellfreien System bestimmt und anschließend in Kolonkarzinom- und Hepatomzellen überprüft. Zusätzlich wurde mit dem Modellorganismus *C. elegans* ein *in vivo* System verwendet, um den Einfluss der Isothiocyanate auf die Akkumulation von ROS in einem multizellulären Organismus zu untersuchen. Sulforaphan dient als Leitstruktur zur Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen hinsichtlich des Einflusses der Kettenlänge bzw. des Oxidationszustandes des Schwefels im Molekül. Dazu wurden die strukturverwandten Derivate Berteroin, Erucin und Erysoin ausgewählt.

###### **4.4.1.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Isothiocyanaten mittels TEAC**

###### **Assay**

Die antioxidative Kapazität von Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysoin wurde mithilfe des TEAC Assays bestimmt. Dabei wird die Entfärbung der radikalischen, blau-grünen ABTS-Lösung über die Zeit photometrisch bei 734 nm bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet.



**Abbildung 4.74: Antioxidatives Potential der Isothiocyanate im TEAC-Assay**

Die Abnahme der Absorption der farbigen ABTS-Lösung wurde 2 min nach der Zugabe des Flavonoids als Maß für die antioxidative Kapazität der Substanz bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde das synthetische Vitamin E Derivat Trolox verwendet. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 734 nm als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle).

Wie aus Abbildung 4.74 hervorgeht, zeigt keines der getesteten Isothiocyanate ein antioxidatives Potential. Weder Sulforaphan noch die Derivate Berteroin, Erucin und Erysoin wirken antioxidativ.

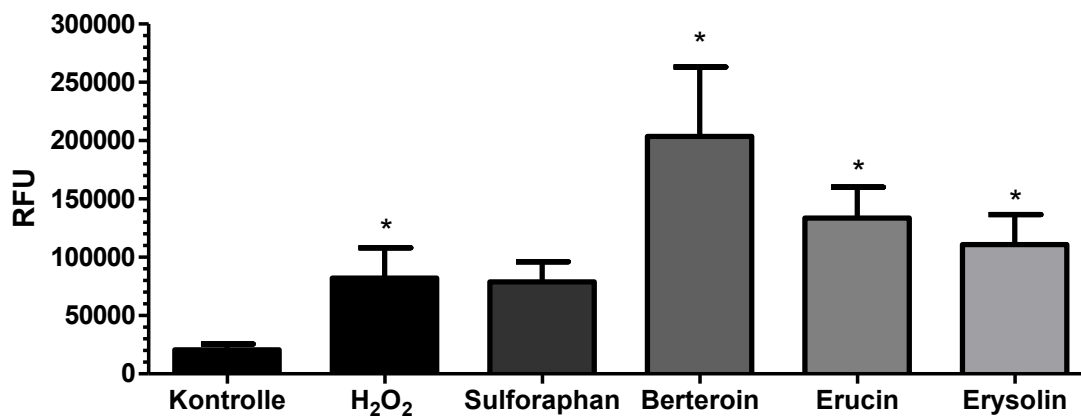
#### 4.4.1.2 Bestimmung der prooxidativen Eigenschaften von Isothiocyanaten mittels DCF Assay

In Vorversuchen führte eine Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten im DCF Assay nach Zugabe von  $H_2O_2$  zu einer erhöhten intrazellulären ROS Konzentration. Daher wurde in weiteren Experimenten in Hct116 und H4IIE Zellen sowie in *C. elegans* das prooxidative Potential der Isothiocyanate mittels DCF Assay (ohne Zugabe von  $H_2O_2$ ) untersucht.

Um den Einfluss der Isothiocyanate auf die intrazelluläre ROS Konzentration zu testen, wurden die Hct116 Zellen für 1 h mit Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysoin (25  $\mu$ M) vorbehandelt, dann 15 min mit der Fluoreszenzsonde inkubiert und unmittelbar danach am Durchflusszytometer analysiert. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration in H4IIE Zellen wurde im 96-Wellformat durchgeführt. Nach 2 h Inkubation mit Isothiocyanaten wurden die H4IIE Zellen für 30 min mit der Fluoreszenzsonde inkubiert. Die ROS-abhängige Fluoreszenz wurde fluorimetrisch bei 37°C über 2 h gemessen.

In Abbildung 4.75 ist der Effekt einer einstündigen Inkubation von Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten auf die intrazelluläre ROS Konzentration dargestellt. Als gut etablierte Positivkontrolle wurde  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M) verwendet. Berteroin, Erucin und Erysoin induzieren

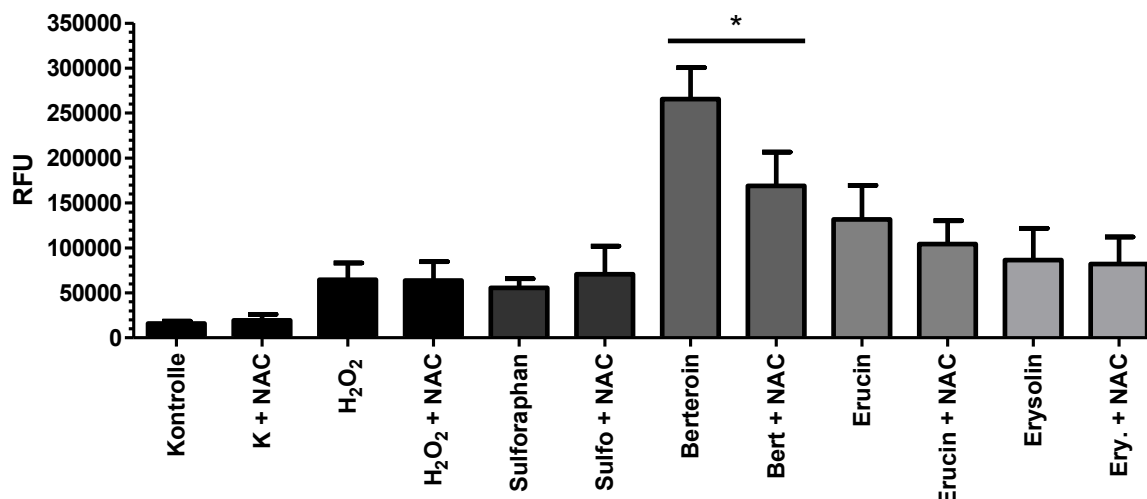
eine gesteigerte Produktion von ROS in den Kolonkarzinomzellen verglichen Kontrollzellen. Die höchsten intrazellulären ROS Werte sind nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Berteroin messbar (ca. 203000 RFU), gefolgt von Erucin (etwa 133000 RFU) und Erysolin (ca. 111000 RFU). Eine Behandlung mit Sulforaphan wirkt ebenfalls prooxidativ, führt aber nicht zu einer signifikanten Erhöhung des ROS Levels verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen.



**Abbildung 4.75: Prooxidatives Potential der Isothiocyanate im DCF-Assay**

Hct116 Zellen wurden für 1 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert, als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 15 min) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und geerntet. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte fluorimetrisch im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte der DCF Fluoreszenz +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob der prooxidative Effekt der verwendeten Isothiocyanate durch eine Inkubation mit Antioxidantien reversibel ist. Dazu wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt: zum einen wurden die Zellen mit dem Antioxidans für 1 h vorinkubiert, zum anderen fand eine Co-Inkubation mit Antioxidans und Isothiocyanaten statt. Als Antioxidans wurde für beide Experimente N-Acetylcystein (NAC) ausgewählt.

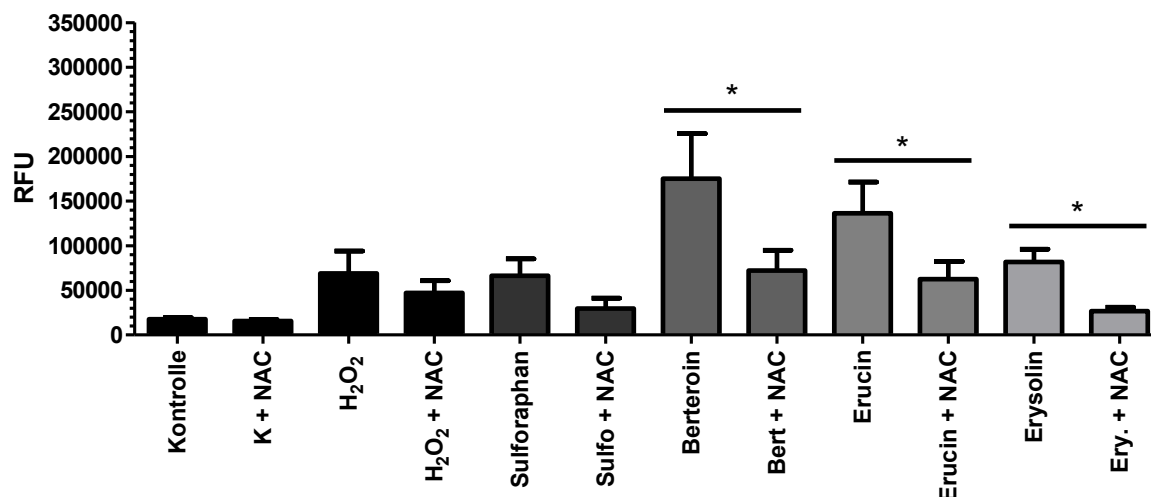


**Abbildung 4.76: Prooxidatives Potential der Isothiocyanate nach Vorinkubation mit N-Acetylcystein (DCF-Assay)**

Hct116 Zellen wurden für 1 h mit 500  $\mu$ M N-Acetylcystein vorinkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 15 min) erfolgte die Inkubation mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten für 1 h. Als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M) verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und geerntet. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Behandlung mit Substanz + DCF oder Substanz + DCF + NAC +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. jeweilige Inkubation mit NAC).

Die Ergebnisse einer einstündigen Vorinkubation mit NAC und anschließender Inkubation mit Isothiocyanaten sind in Abbildung 4.76 dargestellt. Eine signifikante Reduktion der intrazellulären ROS Konzentration durch eine Vorinkubation mit dem Antioxidans ist nur bei Berteroin zu erkennen. Bei Erucin ist eine Tendenz hinsichtlich einer geringeren ROS Akkumulation nach Vorinkubation mit NAC sichtbar. Weder bei der Positivkontrolle noch bei Sulforaphan und Erysoilin wirkt sich eine Vorinkubation mit dem Antioxidans NAC reduzierend auf die intrazelluläre ROS Konzentration aus. Daher wurde in einem weiteren Ansatz eine Co-Inkubation von NAC und Isothiocyanaten getestet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.77 dargestellt. Neben Berteroin zeigt auch die Co-Inkubation von Erucin und NAC signifikant niedrigere ROS Werte verglichen mit einer Inkubation ohne Antioxidans. Auch bei Co-Inkubation von Erysoilin und NAC ist nach 1 h signifikant weniger ROS in den Zellen vorhanden als nach alleiniger Inkubation mit Erysoilin. Zwar ist diese Tendenz auch bei Sulforaphan sowie der Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erkennbar, jedoch sind die Effekte hier nicht signifikant. Zusammenfassend sind die prooxidativen Effekte der Isothiocyanate und hier besonders von Berteroin hinsichtlich der intrazellulären Akkumulation von ROS durch Verwendung von Antioxidantien (NAC) weniger stark ausgeprägt.

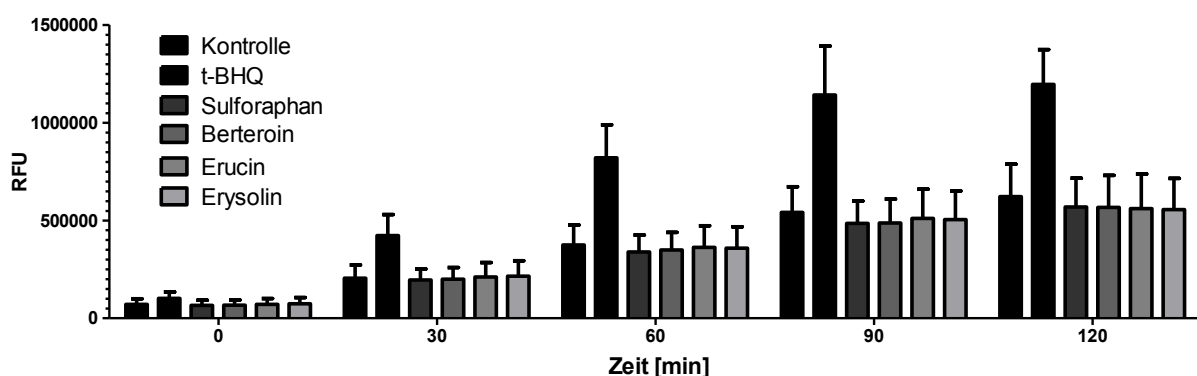




**Abbildung 4.77: Prooxidatives Potential der Isothiocyanate nach Co-Inkubation mit N-Acetylcystein (DCF-Assay)**

Hct116 Zellen wurden für 1 h mit 500  $\mu$ M N-Acetylcystein und 25  $\mu$ M Isothiocyanaten co-inkubiert. Als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M) verwendet. Nach Zugabe von 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 15 min) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und geerntet. Die Messung der intrazellulären ROS Konzentration erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Behandlung mit Substanz + DCF oder Substanz + DCF + NAC +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. jeweilige Inkubation mit NAC).

Neben dem Darm wurden die prooxidativen Effekte der verwendeten Isothiocyanate zusätzlich in der Leber untersucht. Hierzu wurden Hepatomzellen der Ratte verwendet. Die Auswirkung einer zweistündigen Inkubation mit Isothiocyanaten auf das ROS Level in H4IIE Zellen ist in Abbildung 4.78 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde hier 1 mM t-BHQ verwendet (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte in Vorversuchen keine Bildung von ROS in diesen Zellen).



**Abbildung 4.78: DCF Assay der Isothiocyanate im H4IIE Zellen**

H4IIE Zellen wurden für 2 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert, als Positivkontrolle wurde t-BHQ (1,0 mM) verwendet. Nach Zugabe von 25  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA als Fluoreszenzsonde (für 30 min) erfolgte die Messung der intrazellulären ROS Konzentration fluorimetrisch. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Behandlung mit Substanz + DCF +/- SD (n=3).

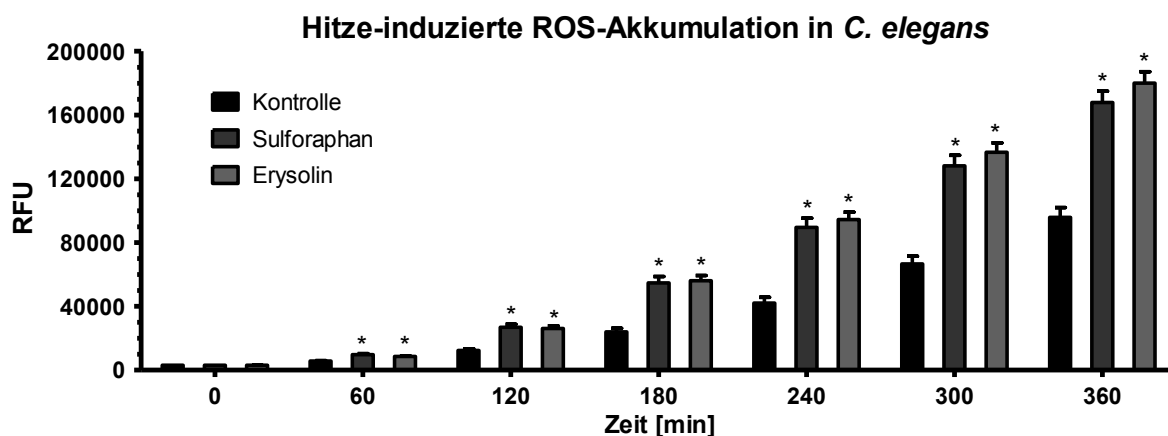
Keines der untersuchten Isothiocyanate wirkt in H4IIE Zellen unter den getesteten Bedingungen prooxidativ. Die gemessene DCF-Fluoreszenz ist nach zweistündiger Inkubation mit den Isothiocyanaten auf etwa dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Selbst Berteroin, welches in Hct116 Zellen eine starke Induktion der ROS Bildung verursacht, hat keinen Effekt auf das intrazelluläre ROS Level in H4IIE Zellen. Nur die Positivkontrolle t-BHQ, die als Redoxcycluser bekannt ist, wirkt prooxidativ und führt zur Akkumulation von ROS in den Hepatomzellen.

#### **4.4.1.3 Bestimmung der prooxidativen Eigenschaften von Isothiocyanaten in**

##### ***C. elegans***

Nachdem die prooxidativen Eigenschaften der vier Isothiocyanate in Hct116 und H4IIE Zellen untersucht wurden, folgten weitere Untersuchungen *in vivo*. Dazu wurde wie in Kapitel 4.1.5 für Myricetin-Derivate beschrieben ein DCF Assay mit dem Modellorganismus *C. elegans* durchgeführt. L4 Larven wurden für 48 h mit 100  $\mu$ M Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin inkubiert und nach einem Waschschrift in eine 384 Wellplatte überführt. Die Induktion von ROS geschah in diesem Experiment durch Hitzestress (37°C). In Abbildung 4.79 ist der Einfluss der Isothiocyanate auf die Hitze-induzierte Akkumulation von ROS in *C. elegans* dargestellt. Bereits nach 1 h zeigen Würmer, die mit Sulforaphan und Erysolin behandelt wurden, signifikant höhere ROS Werte als die Kontrolltiere. Über den untersuchten Zeitraum sind die gemessenen ROS Werte bei Sulforaphan und Erysolin etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle. Somit hat eine Inkubation mit Sulforaphan und Erysolin keinen protektiven Effekt hinsichtlich der Bildung von ROS in *C. elegans*, sondern bewirkt vielmehr eine verstärkte Bildung von ROS und hat somit eine prooxidative Wirkung.

Würmer, die mit 100  $\mu$ M Berteroin und Erucin inkubiert wurden, waren deutlich kleiner als Kontrolltiere oder solche, die mit Sulforaphan und Erysolin behandelt wurden. Zudem wirkten Erucin und Berteroin toxisch auf die Nematoden, so dass keine Experimente mit diesen Tieren möglich waren. Daher sind hier keine Daten zur ROS Akkumulation in Nematoden, die mit Berteroin oder Erucin inkubiert wurden, gezeigt.



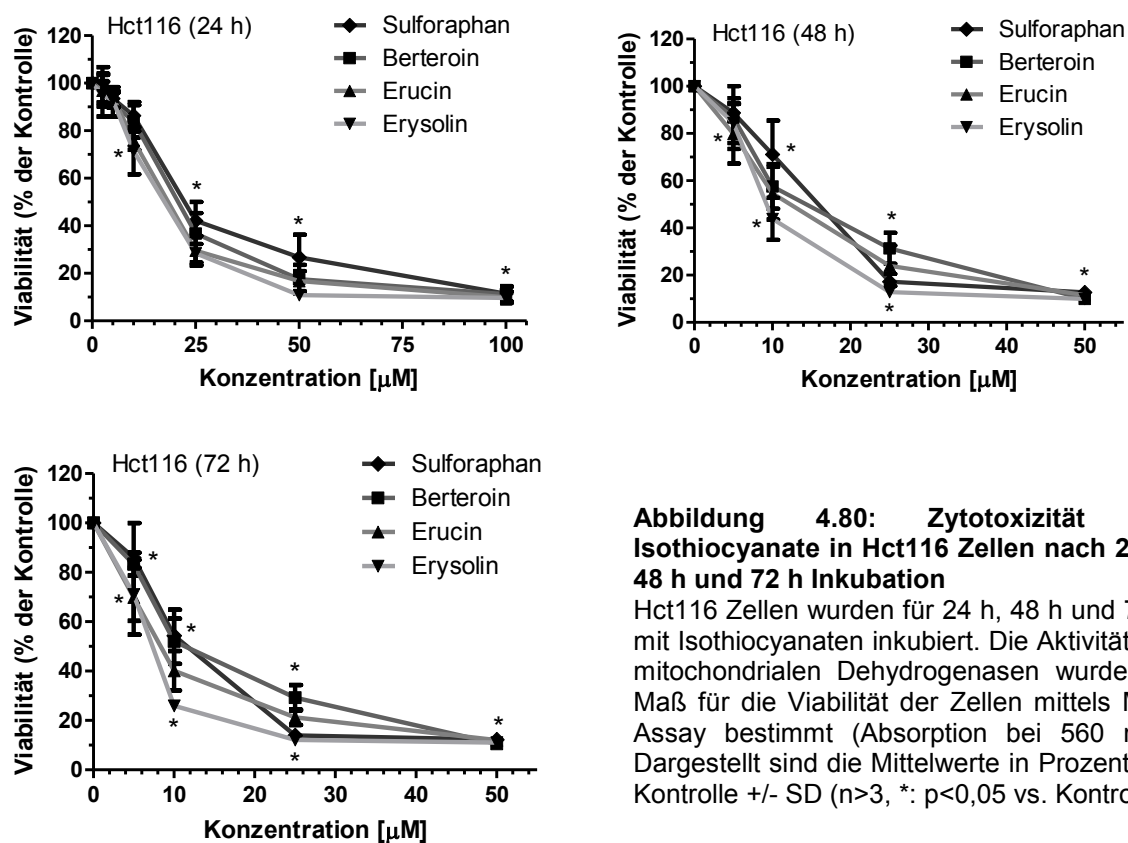
**Abbildung 4.79: Hitze-induzierte ROS-Akkumulation der Isothiocyanate in *C. elegans***

Wildtypische L4 Larven wurden für 48 h mit Isothiocyanaten (100  $\mu$ M) inkubiert. Die Bildung von ROS wurde durch Hitze (37°C) induziert und mit der Fluoreszenzsonde H<sub>2</sub>DCF-DA im Spektrofluorimeter (Anregung 485 nm, Emission 535 nm) quantifiziert. Pro Behandlung wurde je ein Tier in ein Well einer 384-Wellplatte (16 Tiere pro Experiment) gemessen. Die Fluoreszenzintensität steigt dabei proportional zur Hitze-induzierten ROS-Akkumulation in den Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=48 Tiere in 3 individuellen Experimenten, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

#### 4.4.2 Zytotoxische Effekte von Isothiocyanaten

Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der vier Isothiocyanate erfolgte mittels MTT Assay. Hierbei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Zellviabilität herangezogen. Die Wirkung der Isothiocyanate wurde auf Hct116 Kolonkarzinomzellen sowie auf H4IIE Hepatomzellen der Ratte untersucht.

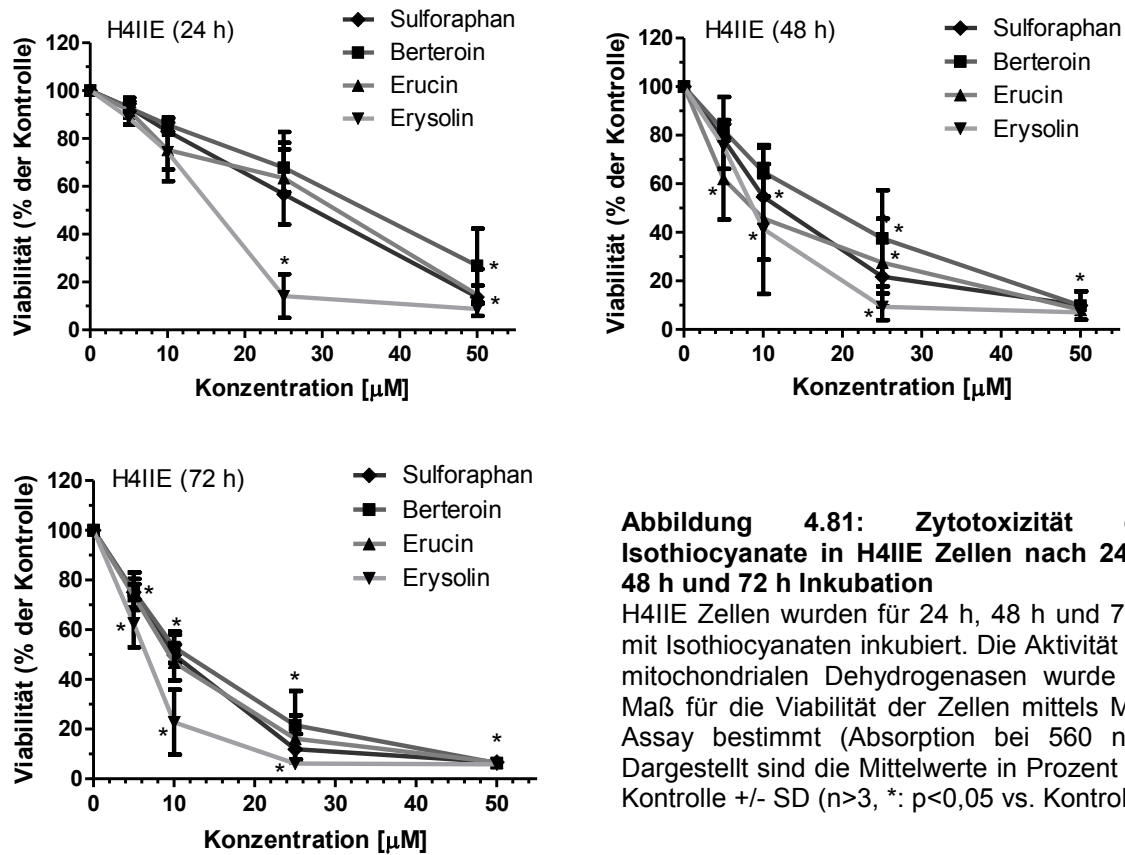
In Abbildung 4.80 ist die Zytotoxizität der Isothiocyanate in Hct116 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit dargestellt. Eine signifikante Reduktion der Viabilität der Zellen wird nach 24 h Inkubation mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten erreicht. Erysolin wirkt bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M signifikant toxisch auf die Kolonkarzinomzellen. Nach 48 h Inkubationszeit ist eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bei allen Isothiocyanaten ab 10  $\mu$ M sichtbar, bei Erucin und Erysolin tritt diese bereits ab 5  $\mu$ M auf. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h sorgt für eine Erhöhung der Toxizität der Isothiocyanate im unteren Mikromolarbereich. Hier reduzieren alle verwendeten Isothiocyanate die Viabilität der Hct116 Zellen bereits ab 5  $\mu$ M. Bei allen getesteten Inkubationszeitpunkten ist Erysolin das toxischste Derivat, gefolgt von Erucin. Sulforaphan wirkt bei Verwendung von Konzentrationen bis 10  $\mu$ M weniger toxisch als Berteroin, erst höhere Konzentrationen führen nach 48 h und 72 h zu einer stärkeren Reduktion der Zellviabilität verglichen mit Berteroin.



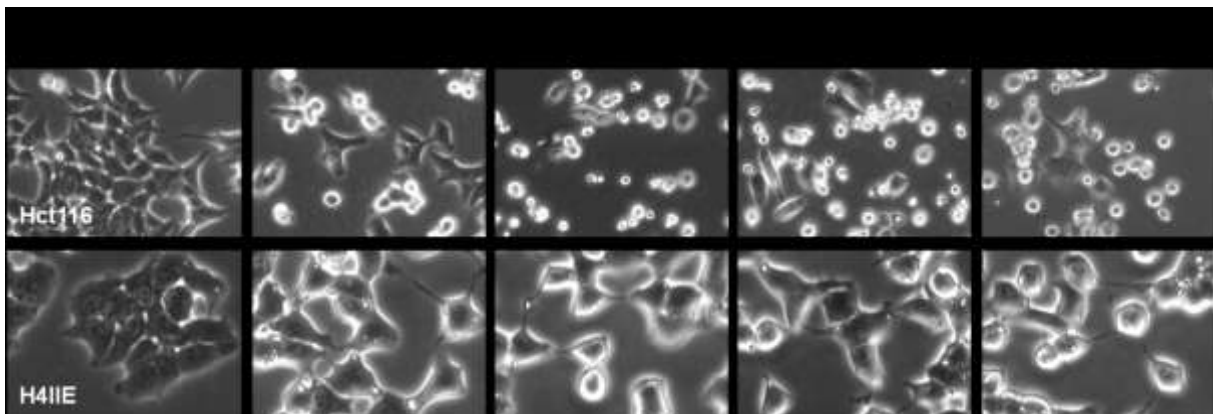
**Abbildung 4.80: Zytotoxizität der Isothiocyanate in Hct116 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation**

Hct116 Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit Isothiocyanaten inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde als Maß für die Viabilität der Zellen mittels MTT Assay bestimmt (Absorption bei 560 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle  $\pm$  SD ( $n > 3$ , \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

Abbildung 4.81 zeigt die Ergebnisse der Inkubation (24 h, 48 h und 72 h) von H4IIE Zellen mit Isothiocyanaten. Nach 24 h Inkubationszeit ist bei 25 µM Erysolin eine signifikante Reduktion der Zellviabilität erkennbar. Sulforaphan, Berteroin und Erucin wirken erst ab einer Konzentration von 50 µM signifikant toxisch. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führt bei Verwendung von 10 µM Sulforaphan, Erucin und Erysolin zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Berteroin hingegen wirkt erst ab einer Konzentration von 25 µM toxisch auf die H4IIE Zellen. Nach 72 h Inkubationszeit ist eine Reduktion der Viabilität durch Inkubation mit 10 µM Berteroin erkennbar. Die anderen drei Isothiocyanate wirken hier bereits ab 5 µM zytotoxisch. Ähnlich wie in Hct116 Zellen, ist Erysolin auch in H4IIE Zellen das am stärksten toxisch wirkende Derivat.



Einen Überblick über die morphologischen Veränderungen der beiden Zelllinien Hct116 und H4IIE nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) gibt die Abbildung 4.82.



**Abbildung 4.82: Veränderungen der Zellmorphologie von Hct116 und H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 und H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat auf 35 mm Zellkulturschalen für 24 h mit 25 µM Isothiocyanaten inkubiert. Anschließend wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch betrachtet (40x Objektiv) und mit einer Farbkamera dokumentiert (Axio Cam, Zeiss). Dargestellt sind repräsentative Bilder von Hct116 (obere Reihe) und H4IIE Zellen (untere Reihe) eines von drei unabhängigen Experimenten.

Hier ist ersichtlich, dass eine Inkubation mit Isothiocyanaten die Zerstörung der Zellverbände sowie ein Abrunden und Ablösen der Zellen bewirkt. Abgelöste und aufschwimmende Zellen sind vor allem bei Hct116 Zellen zu sehen. Eine Inkubation der H4IIE Zellen mit Isothiocyanaten führt primär zum Ablösen der Zellen aus den jeweiligen Zellverbänden. Hier sind im Gegensatz zu Hct116 Zellen weniger aufschwimmende Zellen erkennbar.

Eine Übersicht über die rechnerisch ermittelten  $EC_{50}$  Werte der Isothiocyanate in Hct116 und H4IIE Zellen zeigt die Tabelle 4.2. Mit steigender Inkubationszeit nimmt der  $EC_{50}$  Wert bei allen vier Isothiocyanaten ab, sodass nach 72 h die niedrigsten Werte zu verzeichnen sind (im Bereich von 10  $\mu$ M). Sowohl in Hct116 als auch in H4IIE Zellen sind die  $EC_{50}$  Werte bei Erysolin am niedrigsten und bei Sulforaphan und Berteroin am höchsten.

**Tabelle 4.2: Vergleiche der  $EC_{50}$  Werte in Hct116 und H4IIE Zellen nach Inkubation (für 24 h, 48 h und 72 h) mit Isothiocyanaten**

Die  $EC_{50}$  Werte der Isothiocyanate wurden rechnerisch für alle Inkubationszeitpunkte ermittelt und sind hier als  $\mu$ M-Werte zusammengefasst.

Hct116	24 h	48 h	72 h	H4IIE	24 h	48 h	72 h
<b>Sulforaphan</b>	17	13	11	<b>Sulforaphan</b>	37	17	11
<b>Berteroin</b>	18	13	11	<b>Berteroin</b>	31	30	11
<b>Erucin</b>	15	10	9	<b>Erucin</b>	26	22	9
<b>Erysolin</b>	15	9	7	<b>Erysolin</b>	13	13	8

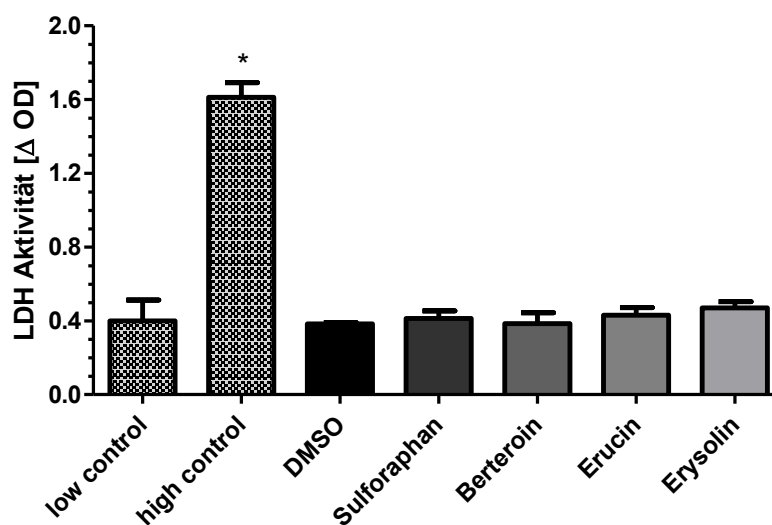
#### 4.4.3 Ermittlung der durch Isothiocyanate ausgelösten Art des Zelltodes

Nachdem in Abschnitt 4.4.2 die zytotoxischen Effekte der Isothiocyanate beschrieben wurden, folgen in diesem Kapitel vergleichende Untersuchungen bezüglich des molekularen Mechanismus des Zelltodes. Dabei werden verschiedene Endpunkte der Apoptose und Nekrose näher betrachtet.

##### 4.4.3.1 Induktion von Nekrose – Nachweis via LDH-Aktivität

Der Nachweis des nekrotischen Zelltodes nach Inkubation von Hct116 und H4IIE Zellen erfolgte durch das Enzym LDH im Überstand der Zellen (LDH Assay). Da LDH in intakten Zellen im Zytosol vorliegt, deutet ein Vorhandensein im Überstand der Zellen auf einen nekrotischen Zelltod hin. Dazu wurden beide Zelllinien für 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert, anschließend wurde die freigesetzte Menge an LDH gemessen.

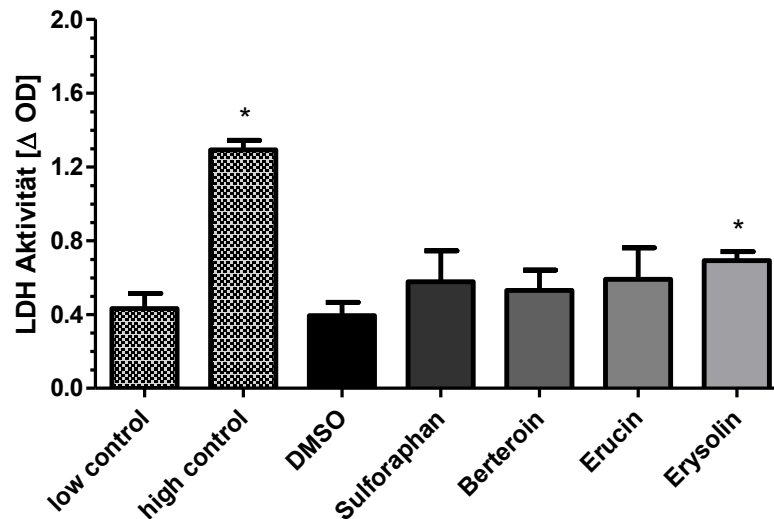
In Abbildung 4.83 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessung der LDH im Überstand der mit Isothiocyanaten inkubierten Hct116 Zellen dargestellt. Die Positivkontrolle („high control“) bewirkt eine Lyse der Zellen und somit die Freisetzung der LDH in das Zellkulturmedium. Nach 30 min liegt die maximale Menge an LDH bei der Positivkontrolle bei etwa 1,6. Die Negativkontrolle („low control“) zeigt lediglich eine LDH Aktivität von ca. 0,4. Eine Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten für 24 h bewirkt keine Induktion der LDH Aktivität, hier liegen alle Werte im Bereich der Negativkontrolle bzw. der DMSO-Kontrolle. Daher ist davon auszugehen, dass eine Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  zwar toxisch auf die Hct116 Zellen wirkt (siehe  $\text{EC}_{50}$  Werte in Tabelle 4.2), der nekrotische Zelltod beim Zelluntergang jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielt.



**Abbildung 4.83: Aktivität der LDH im Überstand von Hct116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert. Nach Zugabe der LDH-Reaktionslösung (50  $\mu\text{l}$ ) zu 50  $\mu\text{l}$  Mediumüberstand wurde der Anstieg der Absorption bei 490 nm gemessen. Zusätzlich wurden die minimal sowie maximal freisetzbaren Mengen an LDH bestimmt („low control“ sowie „high control“). Dargestellt ist die LDH-Aktivität nach 30 min  $\pm$  SD ( $n=4$ , \*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle (DMSO)).

Die LDH-Aktivität wurde zusätzlich in H4IIE Hepatomzellen nach 24 h Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten bestimmt (Abbildung 4.84). Eine Inkubation für 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten führt zu einer leicht gesteigerten, aber nicht signifikanten LDH-Aktivität bei Sulforaphan, Berteroin und Erucin. Bei Erysolin hingegen ist die Erhöhung der LDH-Aktivität signifikant gegenüber Kontrollzellen. Somit hat der nekrotische Zelltod, ausgelöst durch 24 h Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten, bei H4IIE Zellen (im Gegensatz zu Hct116 Zellen) einen gewissen Anteil am Untergang der Zellen. Um ein genaueres Bild hinsichtlich der Art des Zelltodes zu erhalten, wurden weitere Untersuchungen zu Apoptose und Nekrose durchgeführt.



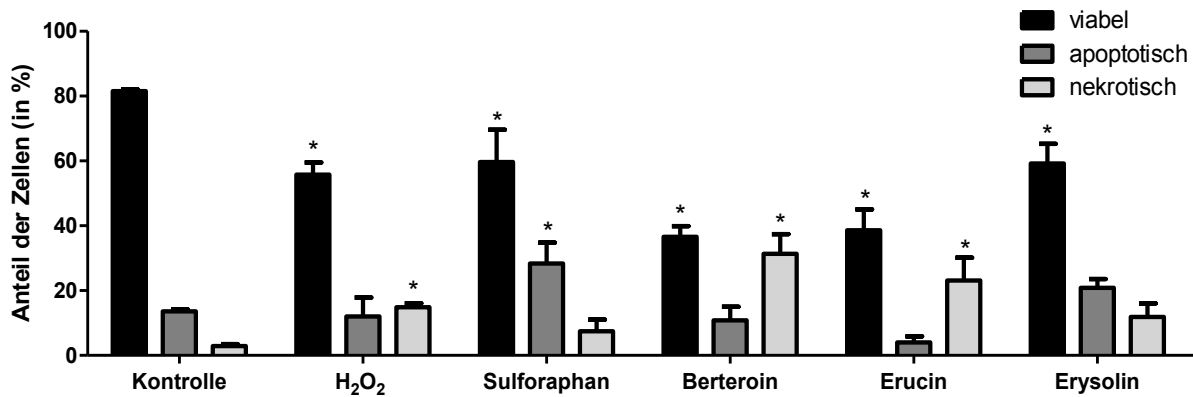
**Abbildung 4.84: Aktivität der LDH im Überstand von H4IIE Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

H4IIE Zellen wurden für 24 h anwachsen gelassen und dann für weitere 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert. Nach Zugabe der LDH-Reaktionslösung (50  $\mu\text{l}$ ) zu 50  $\mu\text{l}$  Mediumüberstand wurde der Anstieg der Absorption bei 490 nm bestimmt. Zusätzlich wurden die minimal sowie maximal freisetzbaren Mengen an LDH bestimmt („low control“ sowie „high control“). Dargestellt ist die LDH-Aktivität nach 30 min  $\pm$  SD (n=3, \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (DMSO)).

#### 4.4.3.2 Induktion von Apoptose und Nekrose – Nachweis via Annexin-V/PI Staining

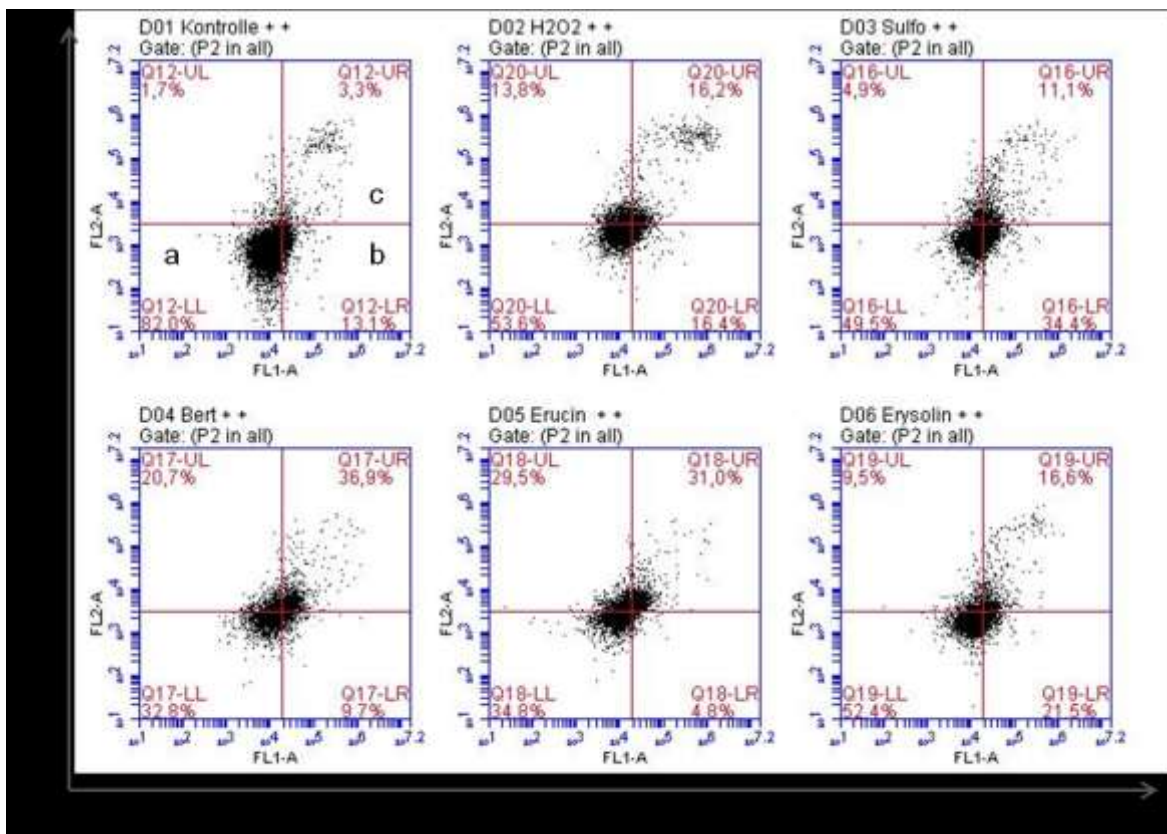
Die apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden durch Co-Färbung der Hct116 Zellen mit Annexin-V und PI quantifiziert. Dazu wurden Hct116 Zellen für 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert und anschließend zusammen mit dem Kulturmedium für die Messung im Durchflusszytometer entsprechend aufgearbeitet. In Abbildung 4.85 ist die prozentuale Verteilung der Hct116 Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten in viable, apoptotische und nekrotische Zellen dargestellt. Als Positivkontrolle wurde hier 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. Eine 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten bewirkt einen signifikanten Rückgang viabler Zellen im Vergleich zur Kontrolle und somit eine Zunahme an apoptotischen und nekrotischen Zellen. Nach Inkubation mit Sulforaphan und Erysolin sind nur noch etwa 60% der Zellen viabel, ca. 20-30% sind apoptotisch und 8-12% sind nekrotisch. Die stärkste Zunahme an apoptotischen Zellen ist bei Sulforaphan zu sehen (ca. 30%). Nekrotische Zellen sind vor allem nach einer Inkubation mit Berteroin detektierbar (etwa 32% Nekrosen), aber auch bei Erucin noch deutlich erkennbar (ca. 23% nekrotische Zellen). Dieser hohe Anteil an nekrotischen Zellen konnte im LDH Assay nicht nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.83). In Abbildung 4.86 sind repräsentative dot plots der Verteilung der Annexin-V/PI gefärbten Zellen gezeigt. Im unteren linken Quadranten (a) befinden sich die viablen Zellen, unten rechts (b) die apoptotischen Zellen, oben rechts (c) die nekrotischen Zellen.





**Abbildung 4.85: Nachweis apoptotischer und nekrotischer Hct116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M) verwendet. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und mit Annexin-V-FITC und PI inkubiert. Die Verteilung der Zellen (viabel, apoptotisch, nekrotisch) wurde mit einem Durchflusszytometer bestimmt (Kanal 1 (Annexin-V): 530/30 nm, Kanal 2 (PI): 585/40 nm). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. entsprechende Verteilung in der Kontrolle).

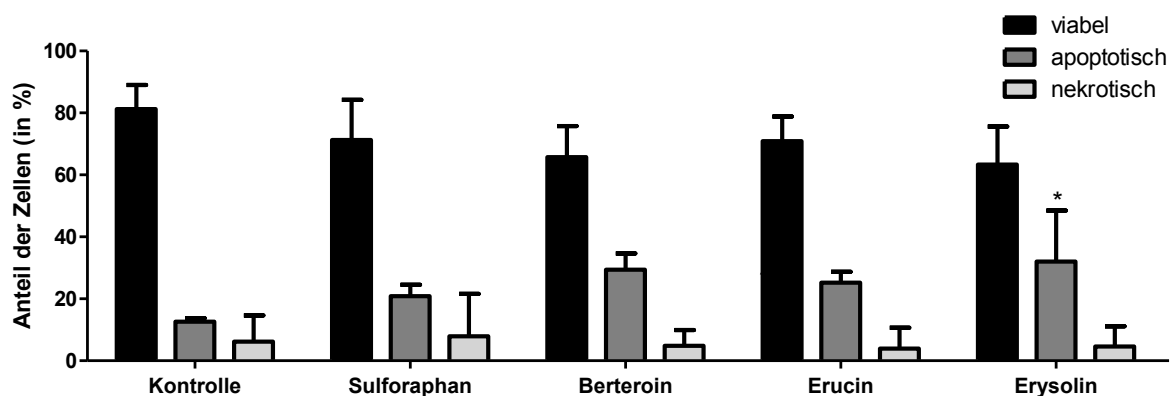


**Abbildung 4.86: Annexin-V/PI Staining apoptotischer und nekrotischer Hct116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden wie in Abbildung 4.85 beschrieben mit Annexin-V-FITC und PI inkubiert. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellen (a=viabel, b=apoptotisch, c=nekrotisch) in sogenannten dot plots.

#### 4.4.3.3 Induktion von Apoptose und Nekrose – Nachweis via Acridinorange/Ethidiumbromid Färbung

Zusätzlich zum Annexin-V/PI Staining sollte mit diesem Experiment die Verteilung von viablen, apoptotischen und nekrotischen Hct116 Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten bestimmt werden. Dazu wurden Hct116 Zellen für 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert, anschließend mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.87 dargestellt. Eine 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) bewirkt eine deutlich schwächere Verschiebung der viablen Zellen hin zu apoptotischen oder nekrotischen Zellen als in Abbildung 4.85 (Annexin-V/PI Staining). Nach Inkubation mit Erysolin sind hier noch gut 60% der Zellen viabel, bei Sulforaphan, Berteroin und Erucin sind es zwischen 65 und 70% der Zellen. Daher ist die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen deutlich niedriger als beim Annexin-V/PI Staining. Einzig nach Inkubation mit Erysolin sind signifikant mehr apoptotische Zellen vorhanden als in der Kontrolle. Außerdem ist die Anzahl der nekrotischen Zellen nach Inkubation mit den vier Isothiocyanaten mit etwa 5% hier sehr gering.



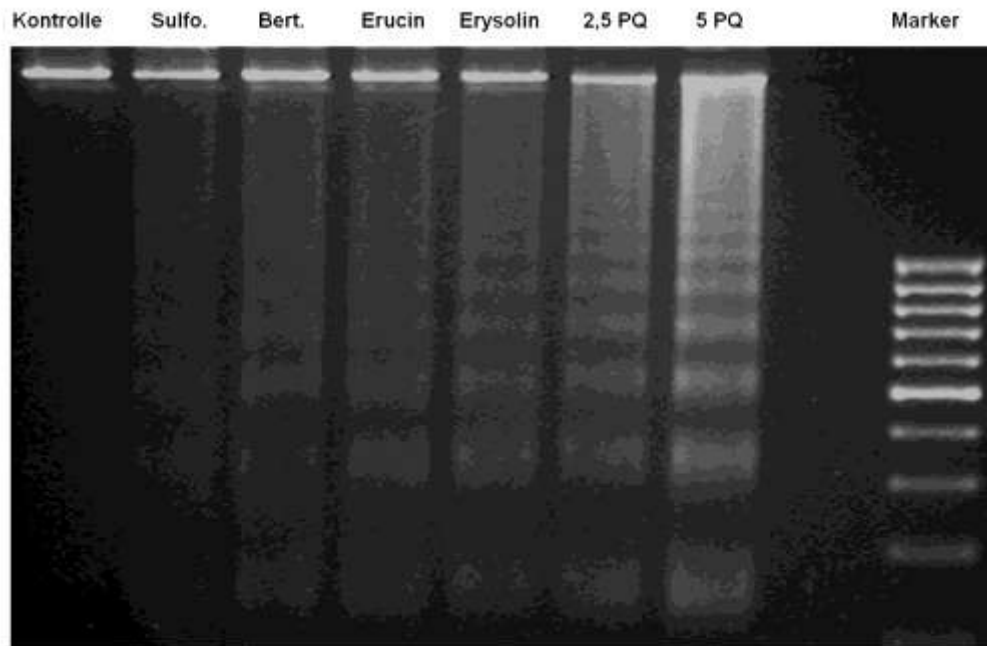
**Abbildung 4.87: Nachweis apoptotischer und nekrotischer Hct116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und mit Acridinorange und Ethidiumbromid inkubiert. Die Verteilung der Zellen (viabel, apoptotisch, nekrotisch) wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Kanal 2 (Acridinorange): Anregung 460-495 nm, Emission 510-550 nm; Kanal 3 (Ethidiumbromid): Anregung 530-550 nm, Emission 575-625 nm). Pro Behandlung wurden 50 Zellen gezählt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. entsprechende Verteilung in der Kontrolle).

#### 4.4.3.4 Induktion von Apoptose– Nachweis via DNA-Fragmentationsanalyse

Als Nachweis für apoptotischen Zelltod wurde eine DNA-Fragmentationsanalyse (DNA-Leiter) mit H4IIE Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die H4IIE Zellen für 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Ein repräsentatives Bild einer DNA-Leiter ist in Abbildung 4.88 gezeigt. Die Positivkontrolle Paraquat löst nach 24 h Inkubation in H4IIE Zellen Apoptose aus, was am Leitermuster deutlich erkennbar ist. In den mit DMSO behandelten Kontrollzellen ist keine Leiter sichtbar, somit ist die DNA dieser Zellen nicht durch

apoptotische Endonukleasen geschnitten worden. Nach Inkubation der H4IIE Zellen mit den vier Isothiocyanaten ist ähnlich wie bei der Positivkontrolle ein Leitermuster erkennbar. Dieses ist bei Sulforaphan schwächer ausgeprägt als bei Berteroin, Erucin und Erysolin. Die vorhandene DNA-Leiter kann als eindeutiger Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod, ausgelöst durch eine 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten, der H4IIE Zellen gewertet werden.



**Abbildung 4.88: DNA-Fragmentationsanalyse zum Nachweis apoptotischer H4IIE Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

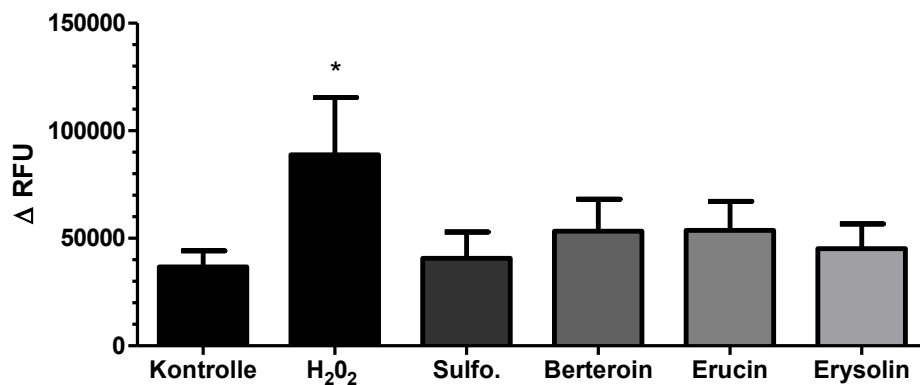
H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 mM Paraquat verwendet. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und die DNA isoliert. Die DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht. Pro Isothiocyanat-Probe wurden 7  $\mu$ g DNA verwendet, bei der Positivkontrolle wurden 2,5  $\mu$ g DNA (= „2,5 PQ“) und 5  $\mu$ g DNA (= „5 PQ“) aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurde ein 100 bp Marker eingesetzt.

Die bisherigen Experimente deuten hinsichtlich der Art des durch die vier Isothiocyanate ausgelösten Zelltodes primär auf Apoptose und zu einem geringeren Anteil auf Nekrose hin. Daher wird im Folgenden eine Beteiligung verschiedener Caspasen an der Isothiocyanat-induzierten Apoptose näher untersucht.

#### 4.4.3.5 Induktion von Apoptose durch Aktivierung von Caspasen

Eine Aktivierung der beiden Effektorcaspasen 3/7, die sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg erfolgen kann, wurde hier als Nachweis für den apoptotischen Zelltod verwendet. Dazu wurden Hct116 und H4IIE Zellen für 24 h mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) inkubiert und anschließend der Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität fluorimetrisch über 3 h ermittelt (Apo One Assay). In Abbildung 4.89 sind die Ergebnisse in

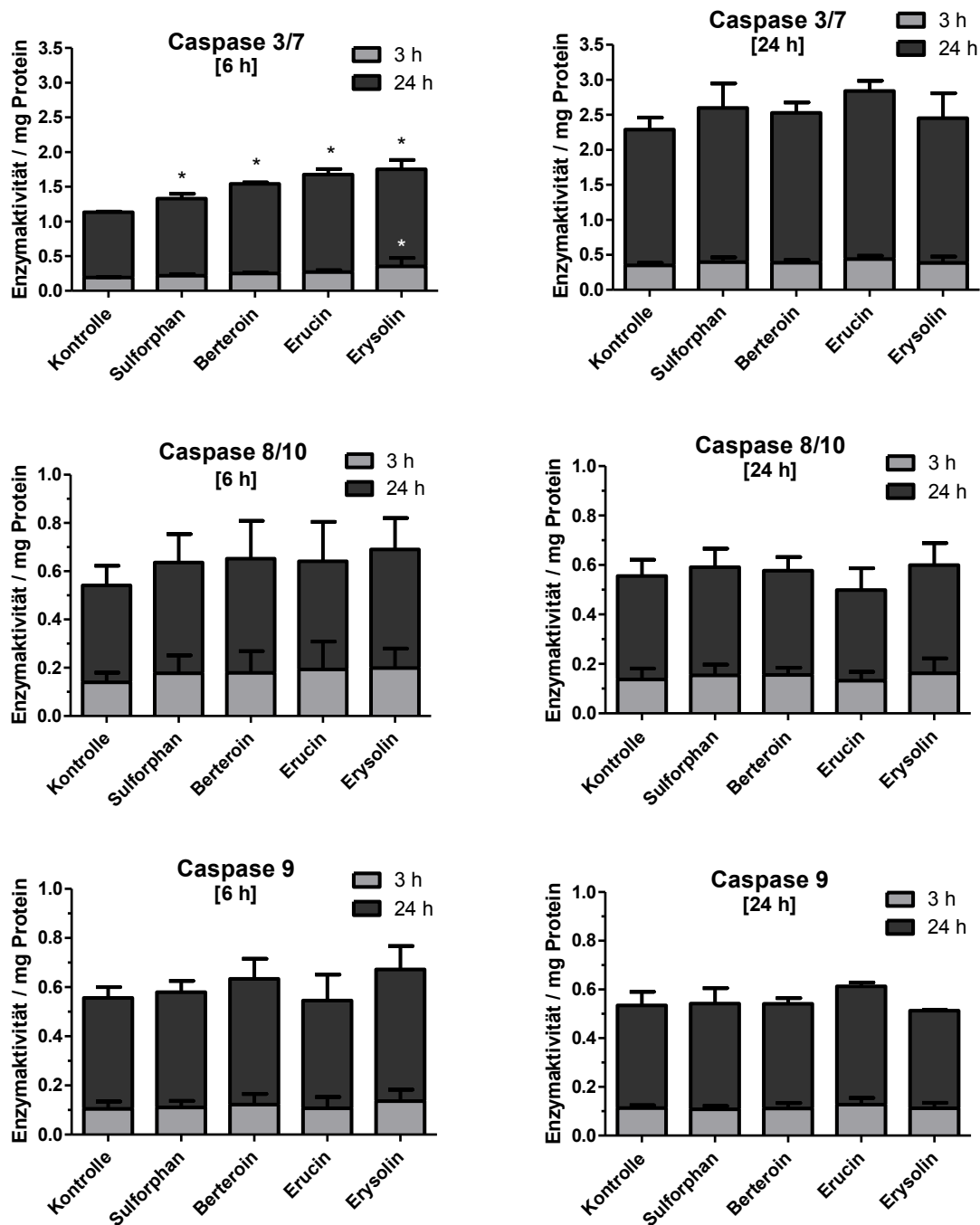
Hct116 Zellen dargestellt. Nach 24 h Inkubation zeigt nur die Positivkontrolle  $H_2O_2$  einen signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität. Eine leicht erhöhte Caspase 3/7-Aktivität ist nach Inkubation mit 25  $\mu M$  Berteroin und Erucin erkennbar, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant. Eine Inkubation mit Sulforaphan und Erysolin führt nicht zu einer gesteigerten Caspase 3/7-Aktivität, hier bewegen sich die  $\Delta$  RFU-Werte auf dem Niveau der Kontrolle.



**Abbildung 4.89: Caspase 3/7-Aktivität in Hct116 Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25  $\mu M$  Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) verwendet. Anschließend wurde die Caspase 3/7-Aktivität mithilfe des Apo One Assay Kits fluorimetrisch über 3 h bei 37°C bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz über 180 min +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Nachdem die Induktion der Caspasen mittels Apo One Assay für die Caspase 3/7-Aktivität gezeigt wurde, wurde der Einfluss der Isothiocyanate auch auf die Aktivität der Caspasen 8/10 und 9 sowie erneut der Caspase 3/7 mit einem weiteren Assay untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate der vorher für 6 h und 24 h inkubierten Hct116 und H4IIE Zellen verwendet. Um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten, wurde bei den Hct116 Zellen für die 24 h Inkubation nur eine Konzentration von 10  $\mu M$  Isothiocyanaten statt 25  $\mu M$  verwendet. Eine Konzentration von 25  $\mu M$  erwies sich in Vorversuchen bei Hct116 Zellen als zu toxisch (vgl. Tabelle 4.2  $EC_{50}$  Werte in Hct116 Zellen < 25  $\mu M$ ), bei H4IIE Zellen lag diese Konzentration für 24 h jedoch über den im MTT ermittelten  $EC_{50}$  Werten und wurde daher hier verwendet.



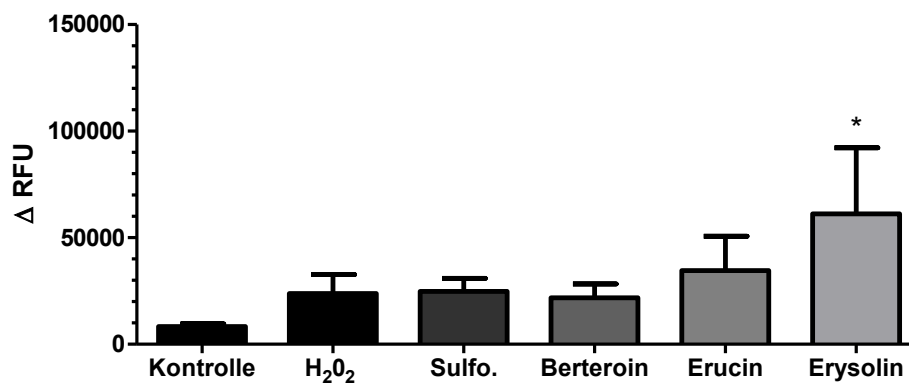
**Abbildung 4.90: Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 in Hct116 Zellen nach 6 h und 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 6 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten bzw. für 24 h mit 10  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Proteine. Durch Zugabe der entsprechenden Caspase-Peptidsubstrate, die von den hier untersuchten Caspasen spezifisch geschnitten werden, wurde die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 kolorimetrisch bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Caspase-Aktivität über 3 h bzw. 24 h normiert auf den Proteingehalt (in mg) +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Die Aktivierung der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 in Hct116 Zellen durch eine Inkubation mit Isothiocyanaten ist in Abbildung 4.90 dargestellt. Ein signifikanter Anstieg der Caspase-Aktivität ist in Hct116 Zellen nur bei Caspase 3/7 nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten zu erkennen. Hier bewirken alle vier Isothiocyanate eine Induktion der Caspase-Aktivität nach

24 h, bei Erysoin ist eine signifikant gesteigerte Caspase 3/7-Aktivität bereits nach 3 h zu erkennen. Nach 24 h Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten ist ebenfalls eine Tendenz hinsichtlich einer erhöhten Caspase-Aktivität zu sehen, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant. Weder bei Caspase 8/10 noch bei Caspase 9 bewirkt eine 6 h oder 24 h Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten einen signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivität. Nach 6 h Inkubation ist bei beiden Caspasen eine leichte, nicht signifikante Induktion der Caspase-Aktivität erkennbar, nach 24 h Inkubation bewegt sich die Enzymaktivität allerdings bei allen Isothiocyanate im Bereich der Kontrolle. Ein direkter Vergleich der Caspase-Aktivitäten nach 6 h und 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten ist hier aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen jedoch nicht möglich (25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanate bei 6 h Inkubation und 10  $\mu\text{M}$  Isothiocyanate bei 24 h Inkubation).

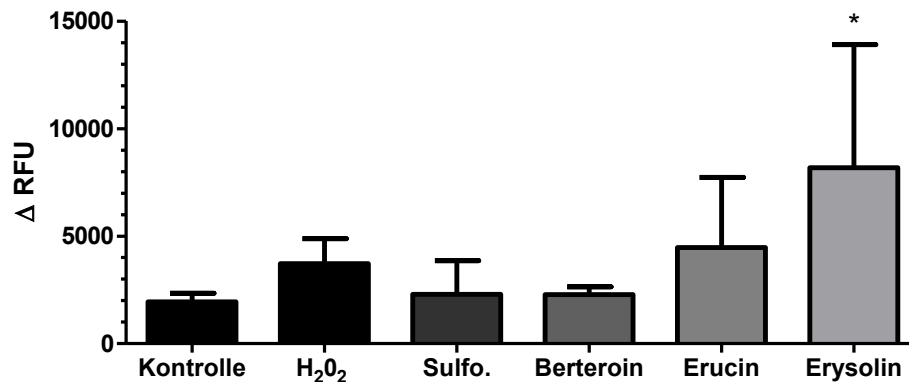
Die Ergebnisse der Caspase 3/7-Aktivität (Apo One Assay) in H4IIE Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten sind in Abbildung 4.91 dargestellt. Hier führt eine Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Erysoin zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität. Auch nach einer Inkubation mit Erucin ist eine leicht erhöhte Aktivität erkennbar, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant. Eine Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Positivkontrolle führt hier trotz Verwendung von 2 mM nicht zu einer gesteigerten Caspase 3/7-Aktivität und scheint somit in H4IIE Zellen keine Apoptose auszulösen.



**Abbildung 4.91: Caspase 3/7-Aktivität in H4IIE Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**  
H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM) verwendet. Anschließend wurde die Caspase 3/7-Aktivität mithilfe des Apo One Assay Kits fluorimetrisch über 3 h bei 37°C bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz über 180 min +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

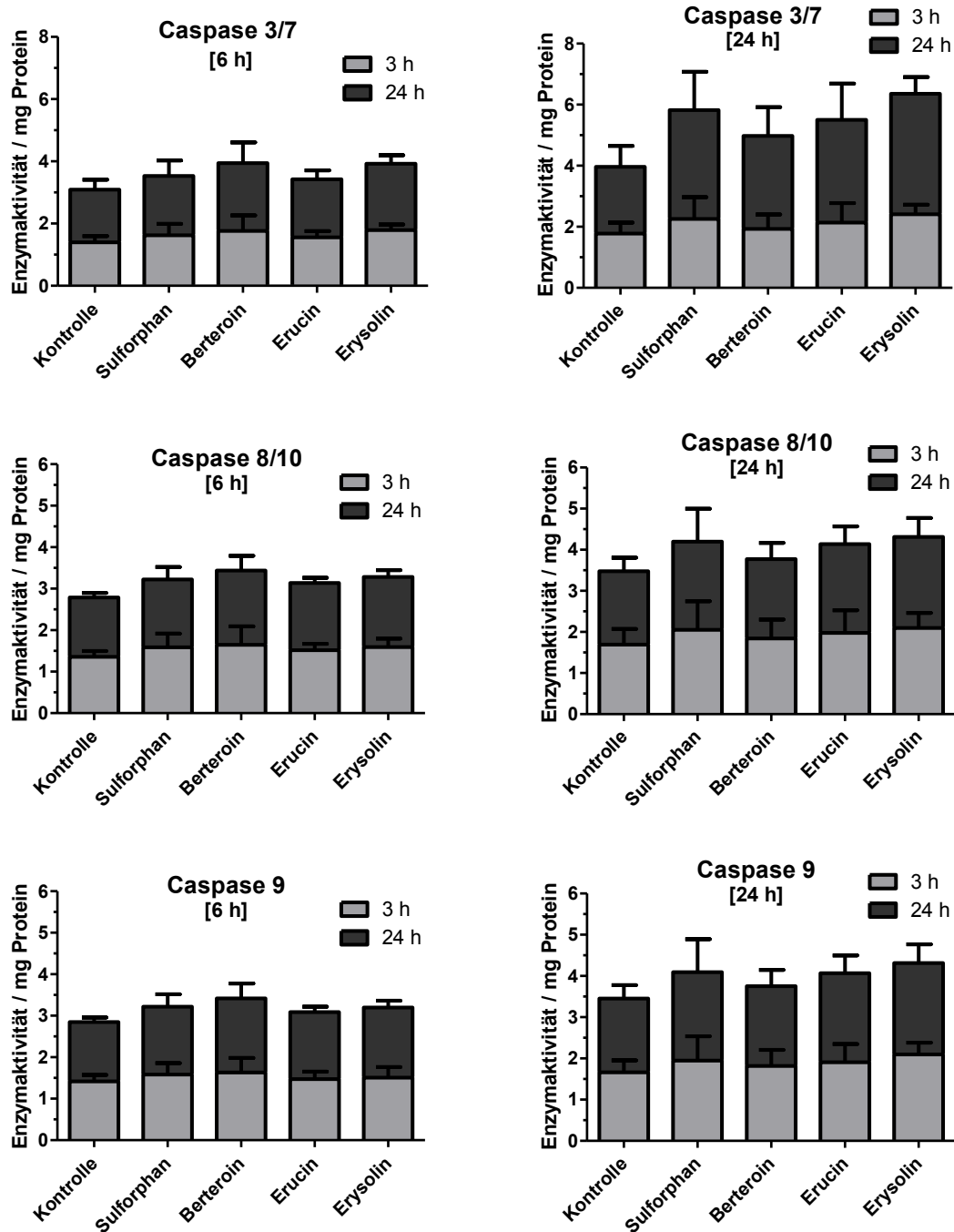
In einem weiteren Experiment wurde die Aktivierung der Caspase 3/7 (Apo One Assay) in H4IIE Zellen nach 6 h Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.92 gezeigt. Hier ergibt sich ein ähnliches Bild wie nach 24 h Inkubation, allerdings sind die  $\Delta$  RFU-Werte um ein Zehnfaches niedriger. Eine 6 h Inkubation mit Erysoin führt auch hier zu einer signifikanten Aktivierung der Caspase 3/7. Eine leicht

erhöhte (jedoch nicht signifikante) Aktivität ist auch nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Erucin sowie mit der Positivkontrolle erkennbar. Sulforaphan und Berteroin haben hier keinen Einfluss auf die Caspase 3/7-Aktivität.



**Abbildung 4.92: Caspase 3/7-Aktivität in H4IIE Zellen nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten**  
H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 6 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) verwendet. Anschließend wurde die Caspase 3/7-Aktivität mithilfe des Apo One Assay Kits fluorimetrisch über 3 h bei 37°C bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 535 nm). Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz über 180 min +/- SD (n=4, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

Ein ähnliches Bild wie in Hct116 Zellen ergibt sich für die Caspase-Aktivität in H4IIE Zellen, die zuvor für 6 h oder 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten geschädigt wurden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.93 dargestellt. Keine der hier untersuchten Caspasen (Caspase 3/7, 8/10 und 9) wird durch eine Inkubation mit Isothiocyanaten signifikant induziert. Bei Caspase 3/7, 8/10 und 9 ist sowohl bei Sulforaphan als auch bei Erysolin der Trend einer gesteigerten Aktivität nach 24 h Inkubation zu erkennen, bei Erucin und Berteroin ist dieser Trend deutlich schwächer. Nach 6 h Inkubation wird keine der untersuchten Caspasen induziert. Allenfalls nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Berteroin ist hier eine minimal höhere Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 verglichen mit der Kontrolle zu erkennen. Nach 24 h Inkubation ist dieser Trend jedoch nicht mehr vorhanden.



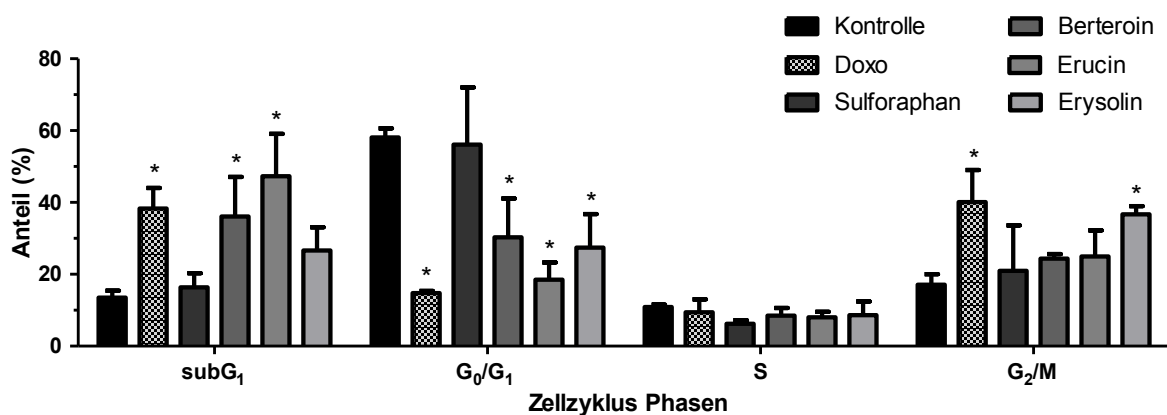
**Abbildung 4.93: Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 in H4IIE Zellen nach 6 h und 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten**

H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 6 h bzw. 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Proteine. Durch Zugabe der entsprechenden Caspase-Peptidsubstrate, die von den hier untersuchten Caspasen spezifisch geschnitten werden, wurde die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 kolorimetrisch bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der Caspase-Aktivität nach 3 h bzw. 24 h normiert auf den Proteingehalt (in mg)  $\pm$  SD (n=3).



#### 4.4.4 Einfluss von Isothiocyanaten auf die Phasen des Zellzyklus

Um einen Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Isothiocyanate auf die Phasen des Zellzyklus zu untersuchen, wurde mittels einer Zellzyklusanalyse der relative DNA Gehalt der Zellen in den Phasen subG<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M bestimmt. Somit konnte das zytostatische Potential der Isothiocyanate verglichen mit dem etablierten Zytostatikum Doxorubicin ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen für 24 h oder 48 h mit Isothiocyanaten (25 und 10 µM) bzw. mit 0,5-1,0 µM Doxorubicin inkubiert. Zusätzlich wurde das Kulturmedium in die Analyse mit einbezogen, wodurch auch apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten (als sogenannte subG<sub>1</sub>-Phase).

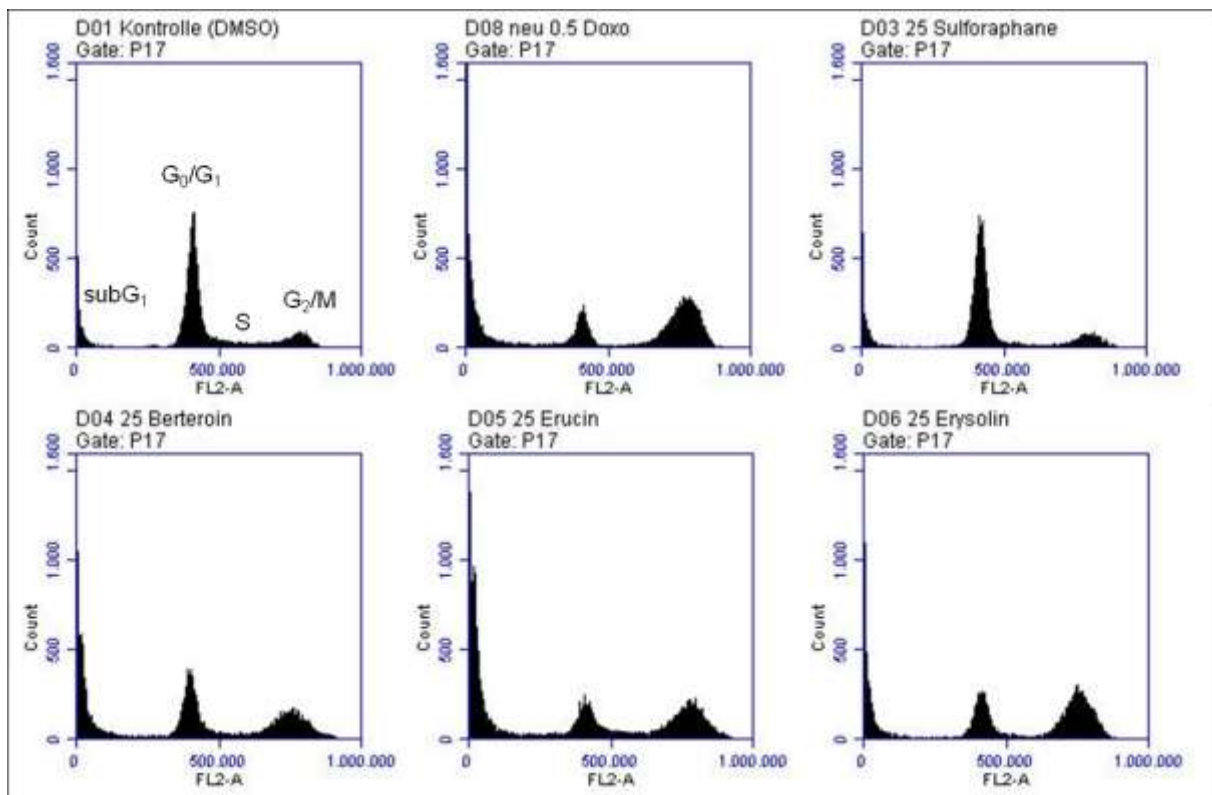


**Abbildung 4.94: Zellzyklusanalyse in Hct116 Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25 µM Isothiocyanaten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Doxorubicin (0,5 µM) verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und der DNA Gehalt in der jeweiligen Phase des Zellzyklus durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt (Kanal 2: 585/40 nm). Dargestellt ist die mittlere Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

In Abbildung 4.94 sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse in Hct116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten dargestellt. Von den nur mit DMSO inkubierten Kontrollzellen befindet sich der Hauptteil (ca. 60%) in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase und etwa 17% in der G<sub>2</sub>/M Phase. Der Anteil apoptotischer Zellen liegt hier bei knapp 14%. Eine Inkubation mit der Positivkontrolle Doxorubicin führt zu einer Verschiebung von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase hin zur G<sub>2</sub>/M Phase sowie zur subG<sub>1</sub> Phase. Somit induziert Doxorubicin nicht nur Apoptose (subG<sub>1</sub> Peak), sondern führt auch zu einem G<sub>2</sub>/M Arrest der Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit 25 µM Sulforaphan ist die Verteilung der Zellzyklusphasen ähnlich wie in Kontrollzellen. Berteroin hingegen führt zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der subG<sub>1</sub> Phase und zu einem niedrigeren Anteil in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase verglichen mit der Kontrolle. Auch eine Inkubation mit Erucin zeigt diese Effekte, hier sogar noch deutlicher als bei Berteroin. Eine Inkubation mit Erysolin bewirkt eine signifikante Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M Phase und eine Abnahme der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase. Analog zur Positivkontrolle Doxorubicin löst Erysolin somit einen G<sub>2</sub>/M Arrest in den Hct116 Zellen aus. Abbildung 4.95 zeigt die

Histogramme der Zellzyklusanalyse und gibt einen grafischen Überblick über die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus.

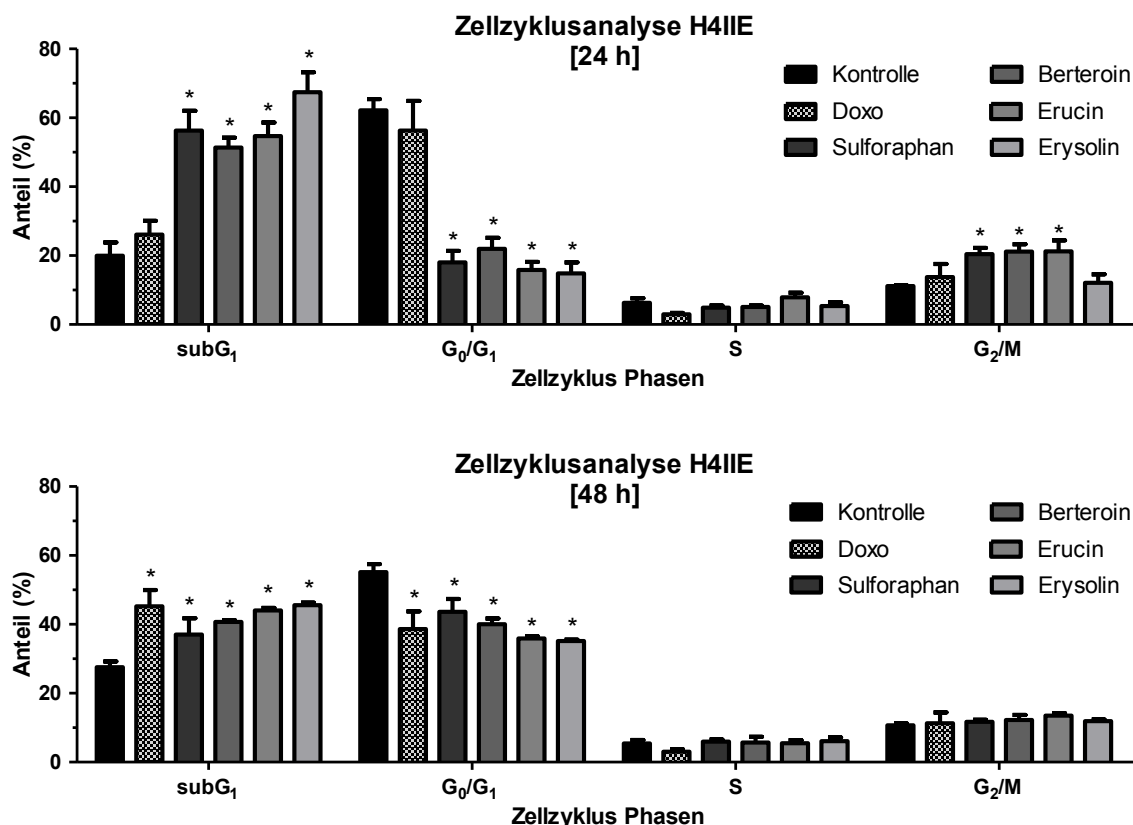


**Abbildung 4.95: Zellzyklusanalyse in Hct116 Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

Hct116 Zellen wurden für 24 h mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten inkubiert. Der DNA Gehalt in der jeweiligen Phase des Zellzyklus wurde durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme eines von drei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Experiment wurde die Verteilung der DNA in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) analysiert. Hier wurde neben einer 24 h Inkubation auch eine 48 h Inkubation untersucht. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 4.96 dargestellt. Nach 24 h Inkubation mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten ist eine signifikante Reduktion der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase zu erkennen, zugunsten einer Zunahme in der subG<sub>1</sub> Phase. Zusätzlich ist bei Sulforaphan, Berteroin und Erucin ein signifikant höherer Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M Phase (ca. 21%) verglichen mit der Kontrolle (etwa 11%). Bei Erysolin ist dieser Effekt nicht vorhanden, dafür ist hier mit ca. 67% der höchste Anteil an Zellen in der subG<sub>1</sub> Phase zu sehen. Die 24 h Inkubation mit der Positivkontrolle Doxorubicin zeigt keinen Einfluss auf den Zellzyklus, sondern bewegt sich in allen vier Phasen im Bereich der Kontrolle. Nach 48 h Inkubation mit Doxorubicin ist jedoch eine signifikante Zunahme der Zellen in der subG<sub>1</sub> Phase und gleichzeitig eine Reduktion der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase zu erkennen. Die G<sub>2</sub>/M Phase zeigt den gleichen Anteil an Zellen wie die Kontrolle, somit induziert Doxorubicin in H4IIE Zellen (im Gegensatz zu Hct116 Zellen) keinen G<sub>2</sub>/M Arrest.

Eine 48 h Inkubation mit den vier Isothiocyanaten (10  $\mu\text{M}$ ) bewirkt eine signifikante Zunahme der subG<sub>1</sub> Population und eine Abnahme der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase. Die nach 24 h Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin und Erucin vorhandene Zunahme der G<sub>2</sub>/M Phase ist nach 48 h Inkubation nicht mehr vorhanden.

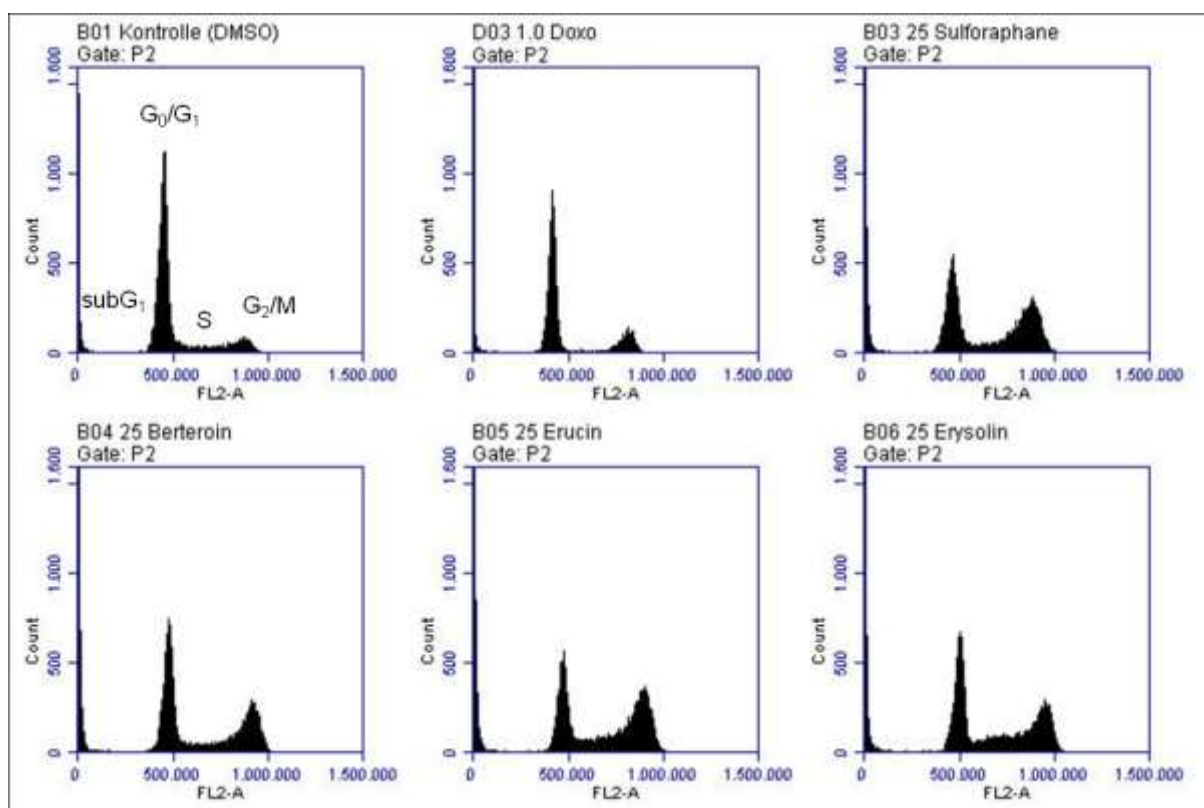


**Abbildung 4.96: Zellzyklusanalyse in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  (obere Grafik) bzw. 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten (untere Grafik) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Doxorubicin (1,0  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und der DNA Gehalt in der jeweiligen Phase des Zellzyklus durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt (Kanal 2: 585/40 nm). Dargestellt ist die mittlere Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus +/- SD (n=3, \*: p<0,05 vs. Kontrolle).

In Abbildung 4.97 sind repräsentative Histogramme einer 24 h Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten gezeigt. Hier ist eine deutliche Zunahme der G<sub>2</sub>/M Population und damit verbunden eine Abnahme der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Population nach Inkubation mit den Isothiocyanaten zu erkennen. Der in Abbildung 4.96 gezeigte signifikante Anstieg der Zellen in der subG<sub>1</sub> Phase ist in den Histogrammen nicht so deutlich erkennbar (linker Rand der jeweiligen Abbildung).

Neben der zytotoxischen Wirkung der Isothiocyanate bewirkt Erysolin in Hct116 Zellen auch einen G<sub>2</sub>/M Arrest. Nach 24 h Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin und Erucin ist dieser G<sub>2</sub>/M Arrest auch in H4IIE Zellen zu sehen.



**Abbildung 4.97: Zellzyklusanalyse in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

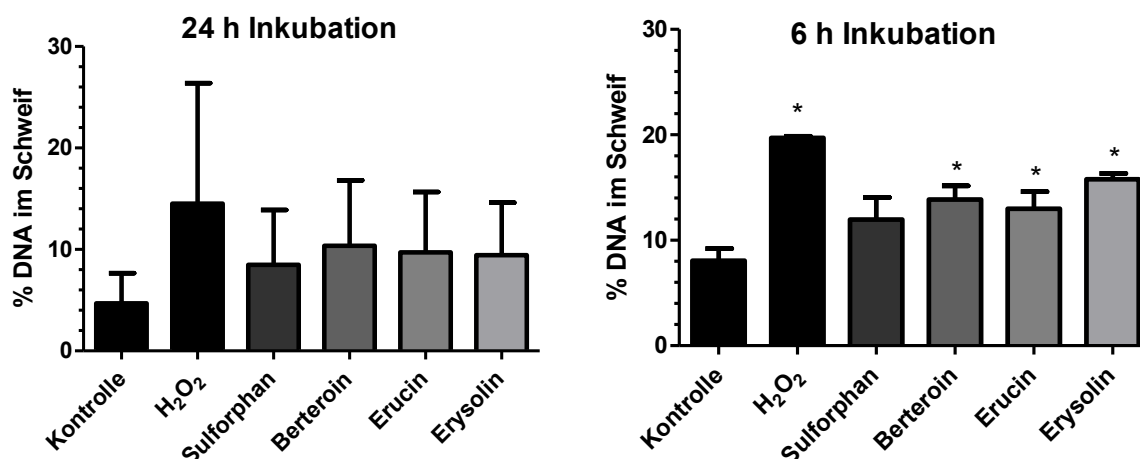
H4IIE Zellen für 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten inkubiert. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturmedium aufgearbeitet und der DNA Gehalt in der jeweiligen Phase des Zellzyklus durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme eines von drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.5 Bestimmung der genotoxischen Effekte von Isothiocyanaten

Ein möglicher Grund für den in Abschnitt 4.4.4 beobachteten Zellzyklusarrest durch Isothiocyanate können DNA Strangbrüche sein. Daher wurde das genotoxische Potential der verwendeten Isothiocyanate mittels alkalischem Comet Assay in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten untersucht. Dazu wurden die Zellen für 6 h und 24 h mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) als Positivkontrolle inkubiert.

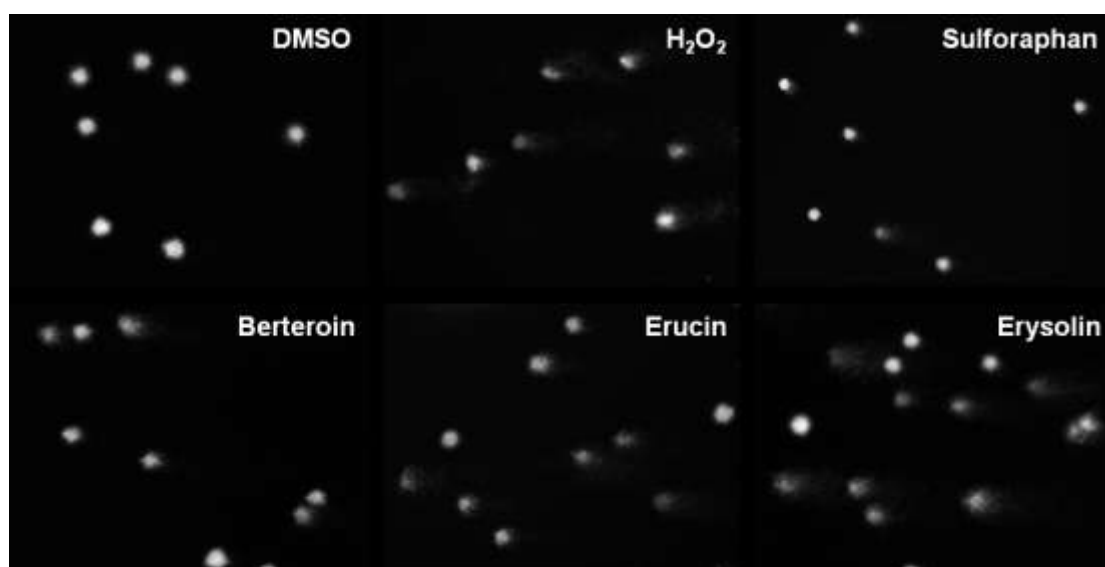
Nach 24 h Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Isothiocyanaten ist eine leichte, nicht signifikante Zunahme an DNA Strangbrüchen verglichen mit der DMSO Kontrolle zu erkennen (siehe Abbildung 4.98, links). Die Positivkontrolle  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert deutlich mehr DNA Strangbrüche als die Kontrolle, aufgrund der stark voneinander abweichenden Einzelexperimente ist hier jedoch keine signifikante Zunahme an Strangbrüchen zu erkennen. Dies gilt auch für die Inkubation mit Isothiocyanaten. In einem weiteren Experiment wurde die Inkubationszeit auf 6 h verkürzt, um etwaige DNA Reparaturmechanismen, die innerhalb der 24 h stattgefunden haben könnten, auszuschließen. Die entsprechenden Ergebnisse des Comet Assays nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten sind in Abbildung 4.98 (rechts) dargestellt. Hier ist eine

deutliche (signifikante) Zunahme an DNA Strangbrüchen nach Inkubation mit 1 mM  $H_2O_2$  erkennbar (ca. 20% DNA im Schweif bei  $H_2O_2$  vs. etwa 8% DNA im Schweif in der Kontrolle). Auch eine Inkubation mit Isothiocyanaten induziert die Bildung von Strangbrüchen. Während der Effekt bei Sulforaphan nicht signifikant ist, ist der Anteil an DNA im Schweif der Kometen nach Inkubation mit Berteroin, Erucin und Erysolin signifikant höher als bei der Kontrolle. Die größte Zunahme ist dabei nach Inkubation mit Erysolin zu erkennen (etwa 16% DNA im Schweif).



**Abbildung 4.98: Comet Assay in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten**

H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 24 h oder 6 h mit 25  $\mu$ M inkubiert. Als Positivkontrolle wurde  $H_2O_2$  (1 mM) verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturmedium aufgenommen und auf Objektträgern lysiert. Die 25 minütige Elektrophorese fand im Anschluss an die Denaturierung (25 min) unter alkalischen Bedingungen statt. Dargestellt ist der mittlere Anteil an DNA (in %) im Schweif +/- SD (n=4 (24 h) bzw. n=3 (6 h), \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).



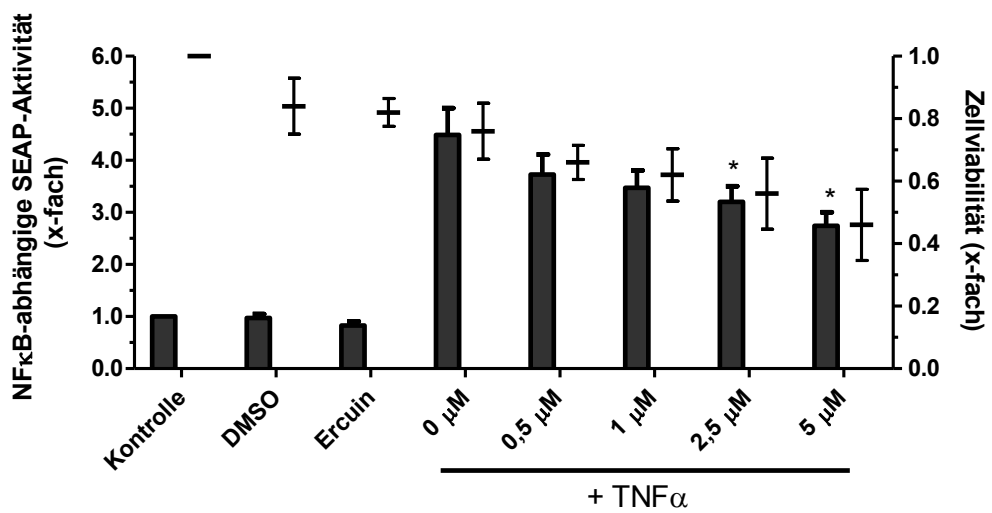
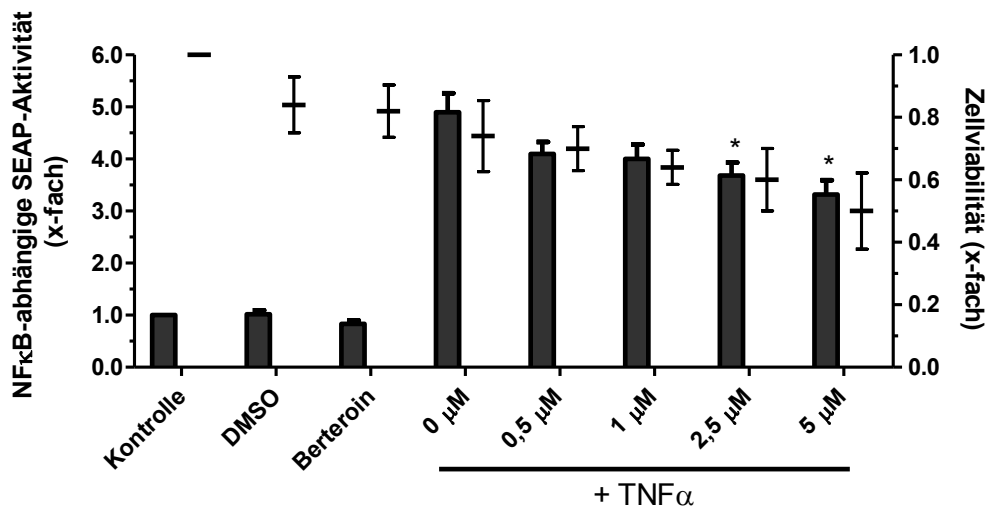
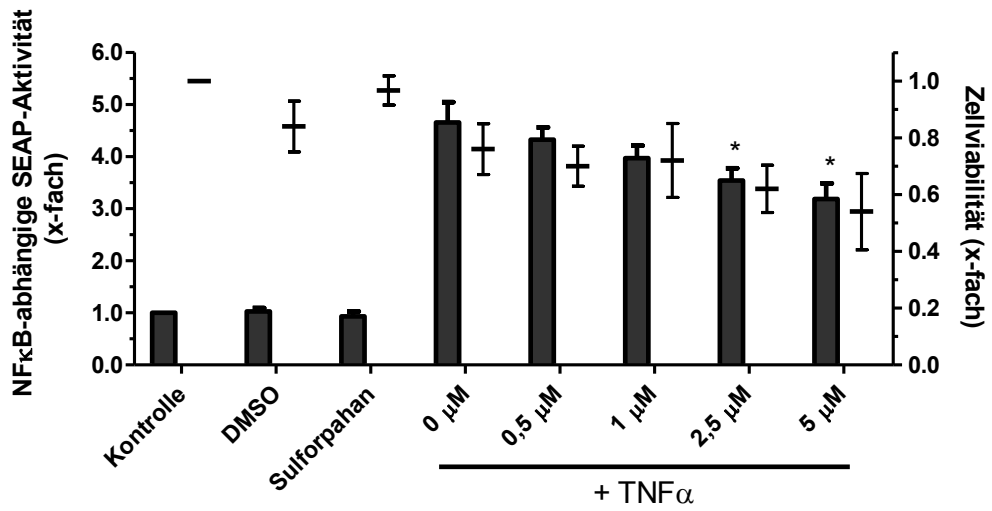
**Abbildung 4.99: Comet Assay in H4IIE Zellen nach 6 h Inkubation mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten**

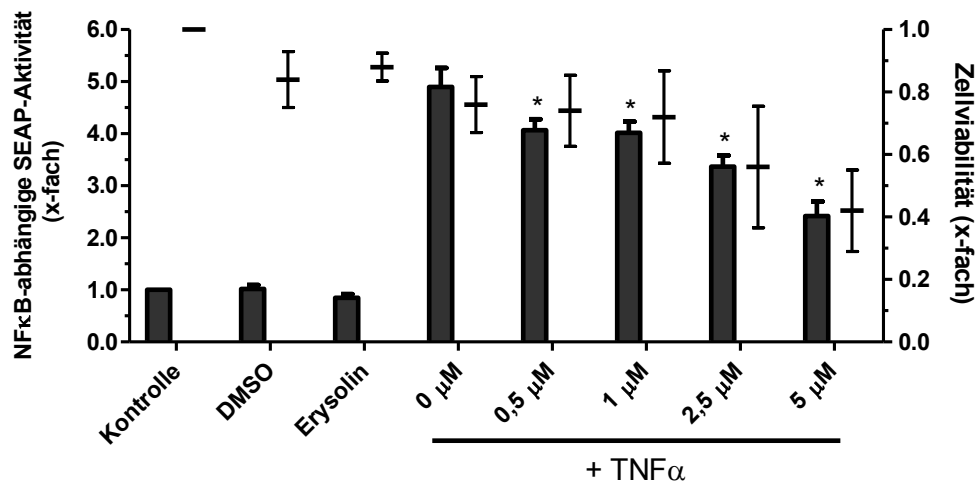
H4IIE Zellen wurden für 24 h anwachsen gelassen und dann für 6 h mit 25  $\mu$ M inkubiert. Als Positivkontrolle wurde  $H_2O_2$  (1 mM) verwendet. Zur Visualisierung der Kometen wurden die Zellen mit PI angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Anregung 530-550 nm, Emission 575-625 nm). Dargestellt sind repräsentative Bilder eines von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 4.99 sind repräsentative Bilder der Kometen nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten bzw. mit der Positivkontrolle  $H_2O_2$  gezeigt. Während die Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden (= Kontrollzellen) einen runden Zellkern ohne Schweif aufweisen, zeigen die mit  $H_2O_2$  behandelten Zellen deutliche Kometen. Auch nach einer Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin sind Zellen mit ausgeprägtem Schweif sichtbar. Somit kann für die vier verwendeten Isothiocyanate neben ihrem zytotoxischen auch ein geringes genotoxisches Potential (zumindest in H4IIE Hepatomzellen) konstatiert werden.

#### 4.4.6 Modulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch Isothiocyanate

Mithilfe eines Reporterassays wurde der Einfluss der Isothiocyanate auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in H4IIE Zellen untersucht. NF $\kappa$ B ist unter anderem an der Regulation von Proliferation, immunologischen und inflammatorischen Reaktionen, Zelldifferenzierung und Zelltod beteiligt. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann durch viele Stimuli geschehen, hierzu zählen neben oxidativem Stress auch Cytokine, Bakterien und Viren, UV-Strahlung, Zytostatika und andere. Unter anderem wegen seiner Beteiligung an der Regulation der Zellproliferation sowie durch seine Aktivierung durch oxidativen Stress wurde der Einfluss der vier Isothiocyanate auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors untersucht. Dazu wurden stabil mit dem Reporterassaykonstrukt pNF $\kappa$ B-SEAP transfizierte H4IIE Zellen für 1 h mit Isothiocyanaten vorinkubiert und anschließend mit TNF $\alpha$  co-inkubiert. Somit konnte der Einfluss der Isothiocyanate auf die basale und auf die durch TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-Aktivität untersucht werden. In Abbildung 4.100 sind die Ergebnisse des Reporterassays nach Inkubation mit Isothiocyanaten dargestellt. Eine Behandlung der H4IIE Zellen mit TNF $\alpha$  führt zu einer deutlichen Zunahme der NF $\kappa$ B-abhängigen SEAP-Aktivität (etwa 4,5 bis 5-fach verglichen mit der Kontrolle). Werden die Zellen mit Isothiocyanaten vorinkubiert, wird die durch TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-Aktivität deutlich reduziert. Bei Sulforaphan, Berteroin und Erucin bewirkt eine Inkubation mit 2,5  $\mu$ M eine signifikante Reduktion der NF $\kappa$ B-abhängigen SEAP-Aktivität. Den deutlichsten Effekt hinsichtlich der Inhibierung dieses Transkriptionsfaktors zeigt das Isothiocyanat Erysolin. Hier führt bereits eine Konzentration von 0,5  $\mu$ M Erysolin zu einer signifikanten Reduktion der NF $\kappa$ B-abhängigen SEAP-Aktivität. Nach einer Vorinkubation der H4IIE Zellen mit 5  $\mu$ M Erysolin ist die durch TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-Aktivität um die Hälfte reduziert.





**Abbildung 4.100: Einfluss von Isothiocyanaten auf die NFκB-abhängige SEAP-Aktivität**

H4IIE Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für 1 h mit 0,5 bis 5 μM Isothiocyanaten vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 24 h Co-Inkubation mit 4 ng/ml rekombinatem TNFα (aus der Ratte). Die NFκB-abhängige SEAP-Aktivität wurde im Überstand der Zellen nach Hitzeinaktivierung endogener Phosphatasen gemessen (Chemilumineszenz). Zusätzlich wurde mithilfe eines MTT Assays die Zellviabilität bestimmt. Dargestellt sind die mittlere NFκB-abhängige SEAP-Aktivität normiert auf die Kontrolle +/- SD sowie die Zellviabilität (normiert auf Kontrollzellen) +/- SD (n>3), \*: p<0,05 vs. TNFα.



## **5. Diskussion**

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine Ernährung, die reich an Obst und Gemüse ist, mit einer verringerten Inzidenz verschiedener degenerativer Erkrankungen sowie Krebs assoziiert ist (Übersichtsartikel von Scalbert und Manach 2000). Nicht zuletzt deshalb besteht ein gesteigertes Interesse an den in der Ernährung vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Die positiven Effekte hinsichtlich der Krankheitsprävention (speziell kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs) werden vor allem den in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden Flavonoiden und Phenolsäuren zugesprochen. Aufgrund ihrer chemopräventiven Eigenschaften rückten auch die Hydrolyseprodukte der Glucosinolate, die Isothiocyanate, in den Fokus. Dies erklärt den immer größer werdenden Markt an Polyphenolen (hier vor allem Flavonoide wie Quercetin) und Isothiocyanaten (vor allem Sulforaphan) als NEM (Espin et al. 2007) und „Functional Food“. Durch das natürliche Vorkommen dieser Substanzen in pflanzlichen Produkten könnten die NEM bei Verbrauchern den Anschein erwecken sie seien sicher (Poppenga 2001). Die Einnahme von hohen Dosen an Flavonoiden und Isothiocyanaten, wie sie in NEM vorkommen, ist bisher jedoch kaum untersucht und es gibt nur wenige Informationen bezüglich Produktsicherheit und Wirksamkeit dieser Substanzen.

Aus diesem Grund liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf verschiedenen Vertretern sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe wie Hydroxyzimtsäurederivaten, diversen Flavonoiden und Isothiocyanaten. Zunächst wurden die zellulären Wirkungen verschiedener dieser Verbindungen hinsichtlich antioxidativer und zytotoxischer Eigenschaften *in vitro* und im Modellorganismus *C. elegans* untersucht. Die intrazelluläre Aufnahme, die wichtig für die zellulären Effekte ist, wurde über einen weiten Konzentrationsbereich in Kolonkarzinomzellen (Hct116 und Caco-2) und Hepatomzellen (HepG2) sowie in *C. elegans* ermittelt. Die Substanzklasse der Isothiocyanate wurde zudem auf die der Zytotoxizität zugrunde liegenden molekularen Mechanismen (Apoptose, Nekrose, oxidativer Stress) sowie auf ihre Interaktion mit dem redoxsensitiven Transkriptionsfaktor NFκB hin untersucht.

### **5.1 Antioxidative Kapazität verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide**

Eine Wirkung der Polyphenole als direkte Antioxidantien ist aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit unter physiologischen Bedingungen eher unwahrscheinlich. Der Gastrointestinaltrakt könnte hier jedoch eine Ausnahme darstellen, da er mit vergleichsweise hohen Konzentrationen unmetabolisierter Polyphenole in Kontakt kommt (Fraga 2007; Galleano et al. 2010). Daher wurde das antioxidative Potential verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide in der vorliegenden Arbeit in Kolonkarzinomzellen

untersucht. Zuvor erfolgte die Bestimmung der antioxidativen Kapazität im zellfreien TEAC Assay.

Das antioxidative Potential der Phenolsäuren und hier im Speziellen der Hydroxymethylsäurederivate hängt von Anzahl und Position der am aromatischen Ring gebundenen Hydroxylgruppen, den Bindungsstellen und der Art des Substituenten ab (Rice-Evans et al. 1996; Sroka und Cisowski 2003). Ein Vorhandensein von Hydroxylgruppen in *ortho* und *para* Stellung verstärkt zusätzlich die antioxidative Kapazität der Phenolsäuren (Chimi et al. 1991). Die antioxidativen Eigenschaften der Hydroxymethylsäurederivate beruhen zudem auf der Seitenkette des aromatischen Rings, die spontan ein resonanzstabilisierendes Phenoxy-Radikal bildet (Übersichtsartikel von Watzl und Rechkemmer 2001a; Zhao und Moghadasian 2009).

Von den im TEAC Assay untersuchten Hydroxymethylsäurederivaten zeigten Kaffeesäure, Ferulasäure und 2,4-DHZ ein ausgeprägtes antioxidatives Potential. Auch die veresterten Derivate Chlorogensäure und Rosmarinsäure erwiesen sich als potente Antioxidantien. Lediglich m-Coumarsäure und p-Coumarsäure hatten keine bzw. nur eine geringe (p-Coumarsäure) Wirkung als Antioxidans, was durch Daten von Kikuzaki et al. (2002) bestätigt wird. Die 2,4-DHZ war im TEAC Assay das stärkste Antioxidans (bis zu einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$ ), was am Vorhandensein von Hydroxylgruppen in *ortho* und *para* Stellung liegen kann. Auch Kaffeesäure und Ferulasäure besitzen eine *para*-ständige Hydroxylgruppe und zusätzlich eine Hydroxylgruppe in *meta* Stellung, die bei Ferulasäure methyliert ist. Beide Phenolsäuren zeichneten sich im TEAC Assay durch ein hohes antioxidatives Potential aus, welches bei Kaffeesäure ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  deutlicher ausgeprägt war als bei Ferulasäure. Auch in der Studie von Kikuzaki et al. (2002) besaß Kaffeesäure eine höhere antioxidative Aktivität als Ferulasäure. Die nicht vorhandene antioxidative Kapazität von m-Coumarsäure kann am Fehlen einer zweiten Hydroxylgruppe liegen, die als Elektronendonator dient. Von den beiden veresterten Derivaten zeigte Rosmarinsäure im TEAC Assay ein höheres antioxidatives Potential als Chlorogensäure. Ein Vergleich der antioxidativen Eigenschaften von Kaffeesäure und deren veresterten Derivaten Chlorogensäure sowie Rosmarinsäure zeigte, dass Rosmarinsäure das höchste antioxidative Potential besaß gefolgt von Kaffeesäure und Chlorogensäure. Dieser Befund stimmt mit Daten aus der Literatur überein (Chen und Ho 1997; Cuvelier 1992; Gulcin 2012).

In einem weiterführenden Versuch wurde das antioxidative Potential der Hydroxymethylsäurederivate in Hct116 Kolonkarzinomzellen mittels DCF Assay überprüft. Eine Vorinkubation der Zellen mit Hydroxymethylsäurederivaten führte hier nicht zu einem niedrigeren Level an intrazellulären ROS nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Einzig nach Inkubation mit Kaffeesäure war der Trend einer leichten Reduktion des intrazellulären ROS Levels zu beobachten. In der Literatur konnte eine signifikante Reduktion der intrazellulären ROS

Konzentration durch eine Vorinkubation mit Kaffeesäure von Zambonin (2012) in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) sowie in einer humanen Leukämiezelllinie (HEL) gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für die hier auftretende Diskrepanz zwischen den im TEAC Assay beobachteten antioxidativen Eigenschaften der Hydroxymethylsäurederivate und der fehlenden Reduktion des intrazellulären ROS Levels kann an der sehr geringen Aufnahme der Phenolsäuren in die Hct116 Zellen liegen (siehe Abschnitt 5.3 zu Absorption und Metabolismus).

Das antioxidative Potential der Flavonoide ist ähnlich wie das der Phenolsäuren stark von ihrer chemischen Struktur abhängig. Dabei sind die wichtigsten Strukturmerkmale die 3',4'-Dihydroxystruktur des B-Ringes, die 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Oxo-Gruppe im C-Ring, das Vorhandensein einer 3-Hydroxylgruppe im C-Ring und eine 5-Hydroxylgruppe im A-Ring (Das und Pereira 1990; Rice-Evans et al. 1996). Die Hydroxylgruppen im B- und C-Ring verfügen über ein delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem und sind über die Abgabe eines H-Atoms und eines Elektrons an ein Radikal an der Bildung eines Semichinons, das weiter zum stabileren Chinon reagieren kann, beteiligt.

Unter den strukturverwandten Flavonoiden zeigte im TEAC Assay nur Hesperetin radikalfangende Eigenschaften, welche jedoch schwächer als die der Referenzsubstanz Trolox waren. Sowohl Naringenin und Isosakuranetin als auch die Flavonone Chrysoeriol und Diosmetin zeigten kein antioxidatives Potential. Bei Naringenin und Isosakuranetin fehlen sowohl die 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Oxo-Gruppe im C-Ring als auch die 3',4'-Dihydroxystruktur im B-Ring. Diese fehlenden Strukturmerkmale könnten das nicht vorhandene antioxidative Potential der beiden Flavanone erklären. Für die radikalfangenden Eigenschaften von Hesperetin im Vergleich zu Naringenin und Isosakuranetin kann die zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 3' des B-Rings verantwortlich sein. Die 3'-Hydroxylgruppe ist zwar auch in Diosmetin vorhanden, dieses Flavon zeigte im TEAC Assay jedoch kein antioxidatives Potential. Auch Chrysoeriol erwies sich nicht als potentes Antioxidans im TEAC Assay. Bei beiden Substanzen scheint sich eine Maskierung der Catechol-Funktion durch eine O-Methylierung negativ auf die antioxidative Kapazität auszuwirken. Im Vergleich dazu ist das strukturgleiche, nicht methylierte (=intakte Catechol-Funktion) Flavon Luteolin in der Literatur als wirksames Antioxidans beschrieben (Hanneken et al. 2006; Rice-Evans et al. 1996).

Neben den antioxidativen Eigenschaften im zellfreien System wurde der Einfluss einer Vorinkubation mit Naringenin, Isosakuranetin, Hesperetin, Chrysoeriol und Diosmetin auf die intrazelluläre ROS Konzentration nach Zugabe von  $H_2O_2$  in Hct116 Kolonkarzinomzellen untersucht. Die im TEAC Assay gezeigte antioxidative Kapazität von Hesperetin konnte im

DCF Assay nicht bestätigt werden. Hier bewirkte eine Vorinkubation der Hct116 Zellen mit Hesperetin keine Senkung des intrazellulären ROS Levels. Die anderen verwendeten Flavonoide zeigten ebenfalls keinen protektiven Effekt, was sich mit den Ergebnissen des TEAC Assays deckt. Als Grund für die fehlende Aktivität des Hesperetins kann eine geringe zelluläre Aufnahme des Flavonoids in die Hct116 Zellen vermutet werden (siehe Abschnitt 5.3 zu Absorption und Metabolismus).

Der Einfluss der Methylierung als eine Form der Biotransformation auf die antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden wurde exemplarisch anhand der Flavonole Quercetin und Myricetin untersucht. Dabei wurden die methylierten Quercetin-Derivate Isorhamnetin, Rhamnetin und Tamarixetin sowie die methylierten Myricetin-Derivate Laricitrin, Syringetin und MTM genauer betrachtet. Im zellfreien TEAC Assay zeigte Rhamnetin das stärkste antioxidative Potential gefolgt von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin. Da Quercetin alle oben genannten Strukturmerkmale (vor allem die Catechol-Funktion im B-Ring) besitzt, gilt es als ein sehr potentes Antioxidans (Rice-Evans et al. 1996). Innerhalb der Substanzklasse der Flavonoide ist Quercetin der potenteste Radikalfänger (hinsichtlich ROS) *in vitro* (Übersichtsartikel von Boots et al. 2008). Die hier ermittelte größere antioxidative Kapazität des Rhamnetins verglichen mit Quercetin zeigt, dass die Hydroxylgruppe an Position 7 des A-Rings, die bei Rhamnetin durch eine Methylierung maskiert ist, keinen entscheidenden Einfluss auf das antioxidative Potential der Flavonole hat. Im Gegensatz dazu sind die Hydroxylgruppen im B- und C-Ring von Quercetin wichtig für seine reduzierenden Eigenschaften (Lotito und Frei 2006). Isorhamnetin (3'-O-Methylquercetin) und Tamarixetin (4'-O-Methylquercetin) zeigten antioxidative Eigenschaften, die deutlich schwächer als die von Quercetin und Rhamnetin waren. Lotito et al. (2011) konnten zeigen, dass die 3'-O-Methylierung der Catechol-Funktion von Quercetin zwar die antioxidativen Eigenschaften reduziert (als „ferric reducing activity“ gemessen), aber nicht die anti-inflammatorischen Eigenschaften beeinflusst.

In weiterführenden Versuchen wurden die antioxidativen Eigenschaften der Quercetin-Derivate im DCF Assay in Hct116 Kolonkarzinomzellen nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überprüft. Hier zeigte sich, dass Quercetin die stärkste antioxidative Kapazität besaß und die intrazelluläre ROS Konzentration nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> annähernd auf Kontrollniveau reduzierte. Hanneken et al. (2006) konnten im DCF Assay in humanen Pigmentepithelzellen der Retina (ARPE-19) ebenfalls eine antioxidative Wirkung von Quercetin zeigen. Auch Isorhamnetin und Tamarixetin, deren Catechol-Funktion im B-Ring maskiert ist, waren in der Lage, die intrazelluläre ROS Konzentration signifikant zu senken, allerdings weniger gut als Quercetin. Auffallend ist, dass Rhamnetin nicht zu einer Reduktion der intrazellulären ROS Konzentration nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte, obwohl dieses Flavonol im TEAC Assay die

größte antioxidative Kapazität zeigte. Diese Diskrepanz zwischen zellfreiem TEAC Assay und DCF Assay in Hct116 Zellen kann verschiedene Ursachen haben. Dass Rhamnetin generell in die Hct116 Zellen aufgenommen wurde, konnte in den Aufnahmestudien (siehe Kapitel 4.1.3.1) nachgewiesen werden, somit kann eine nicht vorhandene zelluläre Aufnahme von Rhamnetin als Begründung ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit ist jedoch eine rasche Metabolisierung von Rhamnetin in Form von Glukuronidierung, Sulfatierung oder Methylierung nach dessen Aufnahme in die Zellen oder ein Export durch Effluxtransporter, sodass kaum freies Rhamnetin in den Zellen vorhanden ist. Eine andere Ursache könnte in einer möglichen Bindung von Rhamnetin an Zellbestandteile und somit einer Maskierung durch zelluläre Strukturen liegen. Auch in diesem Fall könnte die Konzentration an freiem Rhamnetin zu gering sein, um eine Reduktion der intrazellulären ROS Konzentration nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu bewirken.

Verglichen mit Quercetin besitzt Myricetin eine zusätzliche (*ortho*-ständige) Hydroxylgruppe im B-Ring, wodurch Myricetin basierend auf den oben postulierten Strukturmerkmalen ein größeres antioxidatives Potential besitzt. Die im TEAC Assay ermittelten radikalfangenden Eigenschaften der Myricetin-Derivate zeigen deutlich, dass Myricetin das größte antioxidative Potential aufwies. Mit zunehmendem Methylierungsgrad im B-Ring nahm die antioxidative Kapazität der Derivate ab. Das einfach methylierte Derivat Laricitrin war weniger antioxidativ wirksam als Myricetin, jedoch stärker als das zweifach im B-Ring methylierte Derivat Syringetin. Aufgrund des Vorhandenseins der 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit der 4-Oxo-Gruppe im C-Ring, der 3-Hydroxylgruppe im C-Ring und der 5-Hydroxylgruppe im A-Ring zeigten sowohl Laricitrin als auch Syringetin stärkere radikalfangende Eigenschaften als die Referenzsubstanz Trolox. Einzig der dreifach methylierte MTM besaß ein schwächeres antioxidatives Potential als Trolox, Syringetin und Laricitrin. Somit geht eine Maskierung der Catechol-Funktion im B-Ring durch Methylierung mit der Abnahme der antioxidativen Kapazität der untersuchten Myricetin-Derivate einher. Die im TEAC ermittelte größere antioxidative Kapazität von Myricetin verglichen mit Quercetin bestätigt die Wichtigkeit der Anzahl der Hydroxylgruppen im B-Ring (zur Delokalisierung der Elektronen über das Ringsystem) und ist in Einklang mit publizierten Ergebnissen (Cao et al. 1997; Furuno et al. 2002; Sim et al. 2007).

Analog zu den Untersuchungen mit Quercetin-Derivaten wurde das antioxidative Potential der Myricetin-Derivate im DCF Assay in Hct116 Zellen nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht. Hier zeigte Myricetin wie bereits zuvor im TEAC Assay die größten radikalfangenden Eigenschaften und reduzierte die intrazelluläre ROS Konzentration nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  um 50% verglichen mit der unbehandelten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kontrolle. Laricitrin und Syringetin waren ebenfalls dazu in der Lage die intrazelluläre ROS Konzentration nach  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe

signifikant zu senken, wenn auch etwas weniger potent als Myricetin. Keinen Effekt hinsichtlich eines verminderten intrazellulären ROS Levels bewirkte eine Inkubation mit dem dreifach methylierten MTM. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit dem im TEAC Assay ermittelten antioxidativen Potential der Myricetin-Derivate, so dass sich die Reihenfolge für die radikalfangenden Eigenschaften wie folgt ergibt: Myricetin > Laricitrin > Syringetin > [MTM]. Ein ähnliches antioxidatives Potential konnten Kim et al. (2006a) in humanen Monozyten (U937) sowohl für Myricetin als auch für Quercetin im DCF Assay nachweisen.

Ferner wurde das antioxidative Potential der Myricetin-Derivate im Modellorganismus *C. elegans* mittels DCF Assay überprüft. Die Generierung von oxidativem Stress erfolgte in *C. elegans* nicht wie im Zellkultursystem durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sondern über Erzeugung von thermalem Stress. Durch Inkubation bei 37°C ist bei *C. elegans* ein Anstieg der DCF-Fluoreszenz zu sehen (vgl. Temperaturoptimum von *C. elegans*: 18-20°C). Eine Behandlung der Nematoden mit Myricetin-Derivaten reduzierte die DCF Fluoreszenz signifikant über den gesamten Zeitraum der Messung (6 h) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Den stärksten Effekt hinsichtlich Absenkung der intrazellulären ROS Konzentration zeigten Tiere, die zuvor mit Laricitrin behandelt wurden. Die Inkubation mit Myricetin und Syringetin reduzierte die intrazelluläre ROS Konzentration auf etwa das gleiche Niveau. Auch eine Behandlung mit MTM führte zu einer geringeren DCF Fluoreszenz, jedoch weniger stark ausgeprägt als bei den anderen drei Derivaten. Auch hier stimmen die antioxidativen Eigenschaften der Myricetin-Derivate in etwa mit den Ergebnissen des TEAC und DCF Assays überein. Ein Unterschied zu den in *C. elegans* erzielten Ergebnissen ist jedoch, dass Myricetin im Modellorganismus ein geringeres antioxidatives Potential als Laricitrin zeigte. Die verringerte ROS Konzentration in *C. elegans* nach Behandlung mit Laricitrin verglichen mit Myricetin könnte auf eine bessere Aufnahme (höhere Bioverfügbarkeit) und eine größere Stabilität von Laricitrin gegenüber Biotransformationsreaktionen erklärt werden. Dass die vier Myricetin-Derivate von den Nematoden aufgenommen werden, konnte durch Komplexbildung mit NSRA nachgewiesen werden. Hierbei trat die Fluoreszenz des NSRA-Flavonoid-Komplexes primär im Darm der Würmer auf. Da jedoch keine densitometrische Auswertung der Würmer erfolgte, sind quantitative Aussagen zur Fluoreszenzintensität nicht möglich. Auch Grünz et al. (2012) konnten eine Aufnahme von Myricetin und anderen Flavonoiden in den Wurm mittels NSRA-Komplexbildung sowie per HPLC zeigen. Die mittels HPLC detektierten Flavonoide lagen in dieser Studie fast ausschließlich als konjugierte Metabolite vor, was zeigt, dass *C. elegans* über ausgeprägte Fähigkeiten zur Glukuronidierung und Sulfatierung von Flavonoiden besitzt. Dies wurde zuvor bereits von Surco-Laos et al. (2011) in Aufnahmestudien mit Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin in *C. elegans* gezeigt. Neben dem Auftreten von glykosylierten, sulfatierten und methylierten Phase II Metaboliten konnte auch eine Demethylierung der methylierten Derivate zur Ursprungssubstanz

Quercetin nachgewiesen werden. Zwar war die Aufnahme der methylierten Derivate Isorhamnetin und Tamarixetin in die Nematoden mehr als doppelt so hoch verglichen mit Quercetin, insgesamt war jedoch die detektierte Gesamtkonzentration von Quercetin und dessen Metaboliten größer. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass methylierte Flavonoide hinsichtlich der oralen Bioverfügbarkeit und zellulären Aufnahme unmethylierten Flavonoiden überlegen sind und in den Zellen akkumulieren können (Übersichtsartikel von Walle 2007; Wen und Walle 2006a). Zusätzlich weisen Literaturdaten auf eine größere metabolische Stabilität der methylierten Flavonoide hin, d.h. sie wurden weniger stark durch Phase II Enzyme metabolisiert (v.a. Glukuronidierung und Sulfatierung) als Flavonoide mit freien Hydroxylgruppen (Übersichtsartikel von Wen und Walle 2006). Im Vergleich zu Syringetin und MTM verfügt Laricitrin über eine intakte Catechol-Funktion im B-Ring, was eine mögliche Erklärung für die höhere antioxidative Kapazität von Laricitrin verglichen mit den anderen beiden Derivaten sein kann. Grünz et al. (2012) konnten ebenfalls eine antioxidative Wirkung von Myricetin (sowie Quercetin und Kaempferol) in *C. elegans* nachweisen. Dabei war Myricetin nicht nur in der Lage, mitochondriales ROS zu eliminieren, sondern schützte auch Proteine vor oxidativer Schädigung. Da Naringenin in dieser Studie nicht als Antioxidans wirksam war, vermuten die Autoren, dass die Hydroxylgruppe an Position 3 sowie die Doppelbindung im C-Ring für die antioxidative Wirkung der verwendeten Flavonoide in *C. elegans* wichtig sind. Durch das Vorhandensein der 3-OH Gruppe in Kombination mit der 2,3-Doppelbindung sind die entsprechenden Flavonoide (hier Myricetin und Quercetin) planar, wodurch eine bessere Delokalisierung der Elektronen und somit ein höheres antioxidatives Potential anzunehmen ist (van Acker et al. 1996). Zusätzlich scheint die Catechol-Funktion im B-Ring für die antioxidative Aktivität der Flavonoide in *C. elegans* von Bedeutung zu sein, da Myricetin und Quercetin mitochondriales ROS stärker reduzierten als Kaempferol (Grünz et al. 2012). Weitere Studien mit Flavonoiden in *C. elegans* konnten ebenfalls eine gesteigerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress nach Behandlung der Tiere mit Flavonoiden wie Quercetin oder Catechin konstatieren (Kampkötter et al. 2007; Saul et al. 2009; Zhang et al. 2009).

## **5.2 Zytotoxisches Potential verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide**

Das zytotoxische Potential der verwendeten Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide wurde über einen weiten Konzentrationsbereich (bis 100  $\mu\text{M}$ ) ermittelt, um eventuelle zytotoxische Effekte von anderen Eigenschaften (z.B. antioxidative Kapazität) dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe abgrenzen zu können. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf dem Darm als Gewebe des Erstkontaktes mit Nahrungsinhaltsstoffen lag, wurde die Toxizität der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide in Kolonkarzinomzellen (Hct116

und Caco-2) untersucht. Zusätzlich zu den verwendeten Darmzellen wurden Hepatomzellen (H4IIE und HepG2) analysiert, da bekannt ist, dass Flavonoide vor allem in der Leber stark biotransformiert werden.

Die untersuchten Hydroxyzimtsäurederivate zeigten keine Toxizität in Hct116 Kolonkarzinomzellen und in H4IIE Hepatomzellen. Diese Befunde stehen in Einklang mit der Literatur, in der gezeigt wurde, dass Hydroxyzimtsäuren nicht oder nur geringfügig toxisch sind (Hoskins 1984; Liu et al. 1995). Die fehlenden zytotoxischen Effekte von Hydroxyzimtsäurederivaten können unter anderem durch eine sehr geringe Aufnahme in die Zellen (siehe Abschnitt 5.3 zu Absorption und Metabolismus) begründet sein.

Zu den Strukturmerkmalen, die innerhalb der Substanzklasse der Flavonoide für eine erhöhte Toxizität verantwortlich sind, zählen unter anderem die 2,3 Doppelbindung im C-Ring, das Vorhandensein von Hydroxylgruppen an Position 3 und 6 sowie eine *ortho*-ständige Hydroxylgruppe im B-Ring (Chang et al. 2008). Die Position der Hydroxylgruppe hat einen starken Einfluss auf die Zytotoxizität: Eine Hydroxylgruppe an Position 5 soll z.B. zu einer geringeren Toxizität führen, wie Chang et al. (2008) anhand der  $EC_{50}$  Werte für Chrysin, Galangin und Quercetin in verschiedenen Kolonkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen zeigten.

Die strukturverwandten Flavonoide Naringenin, Isosakuranetin und Hesperetin zeigten in Hct116 Kolonkarzinomzellen ebenfalls nur eine geringe Toxizität. Während Naringenin und Hesperetin keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten, führte eine Inkubation mit Isosakuranetin (ab 50  $\mu$ M) zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität. Chang et al. (2008) konnten ebenfalls keine toxischen Effekte von Naringenin und Hesperetin in Kolonkarzinomzellen (LoVo und DLD-1) und Mammakarzinomzellen (MCF-7) feststellen. Die beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin bewirkten eine signifikante Reduktion der Viabilität nach 24 h Inkubation. Dabei war die Toxizität von Diosmetin ( $EC_{50}$  von ca. 50  $\mu$ M) deutlich höher als die von Chrysoeriol ( $EC_{50}$  von ca. 100  $\mu$ M). In der Literatur finden sich Daten zur Toxizität von Chrysoeriol und Diosmetin in humanen Leukämiezellen (HL-60), hier besaßen beide Substanzen einen  $EC_{50}$  Wert von etwa 28  $\mu$ M (Ninomiya et al. 2012). Die verringerte Viabilität nach Inkubation mit den Flavonen Chrysoeriol und Diosmetin verglichen mit den Flavanonen Naringenin, Isosakuranetin und Hesperetin lässt sich anhand der oben postulierten Strukturmerkmale durch das Vorhandensein der 2,3 Doppelbindung bei den Flavonen erklären. Zusätzlich besitzt Diosmetin die *ortho*-ständige Hydroxylgruppe im B-Ring, was zu einer höheren Toxizität verglichen mit Chrysoeriol führt.

Eine Untersuchung in H4IIE Hepatomzellen ergab keine signifikant toxischen Effekte der verwendeten Flavonoide (einzige Ausnahme: 100  $\mu$ M Chrysoeriol). Verglichen mit den Ergebnissen in Hct116 Kolonkarzinomzellen scheinen die H4IIE Zellen weniger sensitiv auf



eine Inkubation mit Flavonoide zu reagieren. Als mögliche Ursache könnten eine schlechtere Aufnahme der verwendeten Flavonoide in die H4IIE Zellen oder ein Efflux in Frage kommen. Auch eine Metabolisierung der Flavonoide in den Hepatomzellen wäre als Grund für die geringe Toxizität der Flavonoide denkbar. Da es sich bei H4IIE um Hepatomzellen der Ratte handelt, könnten auch Unterschiede in der Enzymausstattung für die geringere Sensitivität gegenüber den untersuchten Polyphenolen mit verantwortlich sein.

Um den Einfluss der Methylierung auf die Toxizität der Quercetin- und Myricetin-Derivate aufzuklären, wurden vergleichende Untersuchungen in drei Zelllinien (Hct116, Caco-2 und HepG2 Zellen) mit verschiedenen Inkubationszeitpunkten durchgeführt. Nach 24 h Inkubation der Hct116 Zellen erwies sich Tamarixetin als das toxischste aller Quercetin-Derivate und führte ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Quercetin und Isorhamnetin wirkten erst ab 100  $\mu\text{M}$  zytotoxisch und senkten wie auch Tamarixetin die Viabilität auf etwa 50% bis 60% der Kontrolle. Da es bei Rhamnetin zu Löslichkeitsproblemen bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kam, wurden hier keine Daten erhoben. Eine Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Rhamnetin hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Hct116 Zellen. Ein Grund für die höhere Toxizität von Tamarixetin könnte das Vorhandensein der *ortho* Hydroxylgruppe im B-Ring sein, welche bei Isorhamnetin durch eine Methylierung maskiert ist. Ein Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften von Quercetin und Isorhamnetin zeigt, dass die Methylierung im B-Ring die Toxizität erhöht. Zu diesem Ergebnis kamen auch Hibasami et al. (2005) nach Untersuchungen der wachstumshemmenden Eigenschaften in humanen Leukämiezellen (HL-60). Ein Vergleich der  $\text{EC}_{50}$  Werte in Hct116 Zellen mit entsprechenden Daten aus der Literatur zeigt divergierende Ergebnisse. Für Quercetin wurde in Hct116 Zellen nach 72 h Inkubation ein  $\text{EC}_{50}$  Wert von  $>100 \mu\text{M}$  berichtet (Li et al. 2009), für Isorhamnetin lag dieser Wert bei 224  $\mu\text{M}$  (24 h Inkubation) bzw. 72  $\mu\text{M}$  (48 h Inkubation) (Jaramillo et al. 2010). Die deutlich höheren  $\text{EC}_{50}$  Werte für Isorhamnetin (nach 24 h Inkubation) in der Literatur könnten auf unterschiedliche Bedingungen bei der Durchführung des MTT Assays zurückzuführen sein.

In Caco-2 Zellen war bis zu Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  keines der Quercetin-Derivate dazu in der Lage die Zellviabilität signifikant zu senken. Exemplarisch wurde die Zytotoxizität von Isorhamnetin und Rhamnetin in Hct116 Zellen und Caco-2 Zellen nach 48 h und 72 h Inkubationszeit untersucht. In Hct116 Zellen bewirkte die Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h eine Zunahme der Toxizität der beiden Quercetin-Derivate, so dass hier eine signifikante Reduktion der Viabilität bereits ab 25  $\mu\text{M}$  erzielt wurde. In Caco-2 Zellen bewirkte eine 48-stündige Inkubation mit Rhamnetin im Vergleich zu Isorhamnetin eine stärkere Reduktion der Zellviabilität. Die Langzeitinkubation bestätigt, dass die Caco-2 Zellen deutlich weniger sensitiv auf die untersuchten Quercetin-Derivate reagierten.

Die Toxizität der Myricetin-Derivate in Hct116 Zellen wurde nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit untersucht. Den stärksten Effekt zeigte nach allen Inkubationszeitpunkten Syringetin. Eine halbmaximale Reduktion der Viabilität wurde mit 50  $\mu\text{M}$  (24 h) bzw. 25  $\mu\text{M}$  (72 h) Syringetin bewirkt. Der dreifach methylierte MTM war nach 24 h und 48 h bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  toxischer als Laricitrin und Syringetin. Nach 72 h Inkubationszeit führten Myricetin und Laricitrin zu einer stärkeren Reduktion der Zellviabilität. Hier stellte sich ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (bei Syringetin bereits ab 25  $\mu\text{M}$ ) ein Plateau ein und die Viabilität der Hct116 Zellen nahm nicht weiter ab. In Caco-2 Kolonkarzinomzellen zeigte keines der untersuchten Myricetin-Derivate eine signifikante Toxizität nach 24 h und 48 h Inkubationszeit. Erst nach 72 h war eine signifikante Reduktion der Viabilität durch die Myricetin-Derivate (100  $\mu\text{M}$ , bei MTM bereits ab 50  $\mu\text{M}$ ) zu beobachten.

Zusätzlich zu Kolonkarzinomzellen wurden die zytotoxischen Eigenschaften der Myricetin-Derivate in HepG2 Hepatomzellen analysiert. Eine Inkubation der HepG2 Zellen mit Laricitrin (ab 50  $\mu\text{M}$ ) bewirkte erst nach 72 h eine signifikant reduzierte Viabilität. Nach 24 h Inkubationszeit war nur bei MTM (ab 50  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Toxizität zu beobachten. Diese verstärkte sich mit zunehmender Inkubationszeit, sodass nach 48 h bereits 25  $\mu\text{M}$  MTM zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität führten. Ähnlich wie in Caco-2 Zellen zeigte auch in den HepG2 Zellen MTM die stärkste Toxizität aller Myricetin-Derivate, die Zytotoxizität war in den Hepatomzellen jedoch stärker ausgeprägt. Während Syringetin die größte Reduktion der Viabilität in Hct116 Zellen bewirkte, war dieses Derivat sowohl in Caco-2 als auch in HepG2 Zellen deutlich weniger toxisch. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der Myricetin-Derivate in den untersuchten Zelllinien ist das Aufstellen von Struktur-Wirkungsbeziehungen hinsichtlich des Einflusses der Methylierung im B-Ring schwierig. Generell bewegte sich die Toxizität der methylierten Derivate auf einem ähnlichen Niveau. Einzige Ausnahmen waren die höhere Toxizität von Syringetin in Hct116 Zellen und von MTM in Caco-2 und HepG2 Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorhandensein von mindestens zwei Methylgruppen im B-Ring wie bei Syringetin die Toxizität erhöhen kann. Je nach untersuchter Zelllinie wird dieser Effekt durch das Vorhandensein einer weiteren Methylgruppe im B-Ring wie bei MTM verstärkt. Da Laricitrin in den hier getesteten Zelllinien i.d.R. eine geringere Reduktion der Zellviabilität verursachte, könnte neben der Anzahl der Methylgruppen auch deren Position von Bedeutung sein. So sorgte beispielsweise bei Syringetin und MTM das Vorhandensein einer Methylgruppe in *ortho* Stellung für eine erhöhte Zytotoxizität. Gomez-Alonso et al. (2012) untersuchten die Toxizität eines Rotweinextraktes bestehend aus Flavonolen (u.a. Quercetin- und Myricetin-Derivate), Flavan-3-olen und Hydroxyzimtsäuren sowie von Laricitrin und Syringetin in Caco-2 Zellen. Nach einer Inkubation mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Rotweinextrakt, Syringetin oder Laricitrin für 24 h war die Viabilität der Caco-2 Zellen in dieser Studie auf etwa 70% reduziert. Eine

Verlängerung der Inkubationszeit führte auch hier zu einer erhöhten Toxizität: Der  $EC_{50}$  Wert von Laricitrin bzw. Syringetin betrug  $50 \mu\text{M}$  nach 72 bzw. 48 h (Gomez-Alonso et al. 2012). Die Diskrepanz zwischen den Daten von Gomez-Alonso et al. und den in dieser Arbeit in Caco-2 Zellen gezeigten Insensitivität von Laricitrin und Syringetin in Caco-2 Zellen kann an der Verwendung unterschiedlicher Assays liegen: Während in dieser Arbeit die Zytotoxizität mittels MTT Assay bestimmt wurde, verwendeten Gomez-Alonso et al. den „Alamar Blau“ sowie den „Sulforhodamin B“ Assay zur Ermittlung der wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Eigenschaften der Flavonoide. Des Weiteren können Unterschiede innerhalb der verwendeten Caco-2 Klone, die generell recht heterogen sind, für die divergierende Empfindlichkeit auf Laricitrin und Syringetin verantwortlich sein. Für Myricetin ermittelten Chang et al. (2008) einen  $EC_{50}$  Wert von etwa  $50 \mu\text{M}$  in den beiden Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und LoVo. In den untersuchten Brustkrebszellen lag der  $EC_{50}$  Wert für Myricetin bei über  $100 \mu\text{M}$  (in MDA-MB-231 Zellen) bzw. Myricetin zeigte keine Zytotoxizität, so dass kein  $EC_{50}$  bestimmt werden konnte (in MCF-7 Zellen) (Chang et al. 2008). In einer anderen Studie von Kuntz et al. (1999) lag der  $EC_{50}$  Wert für Myricetin in Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation bei ca.  $90 \mu\text{M}$  und in HT-29 Kolonkarzinomzellen bei etwa  $50 \mu\text{M}$ . Diese Ergebnisse zeigen deutlich die unterschiedliche Sensitivität von Kolonkarzinomzellen auf Myricetin, die auch in der vorliegenden Arbeit konstatiert wurde (vgl. sensitivere Hct116 Zellen vs. unempfindlichere Caco-2 Zellen). Morales und Haza (2012) untersuchten die Toxizität von Myricetin in HepG2 Hepatomzellen und HL-60 Leukämiezellen: Hier zeigte Myricetin (bis  $200 \mu\text{M}$ ) nach Inkubationszeiten von bis zu 72 h keinen Effekt auf die Viabilität der HepG2 Zellen, führte aber in HL-60 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität nach 48 h und 72 h Inkubation. Zhang et al. (2011) berichten dagegen von  $EC_{50}$  Werten von Myricetin von ca. 96, 48 und  $36 \mu\text{M}$  nach 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation der HepG2 Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein  $EC_{50}$  Wert für Myricetin in HepG2 Zellen nur nach 72 h Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  erreicht werden.

### **5.3 Aufnahme und Metabolismus verschiedener Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide**

Die Datenlage bezüglich Aufnahme und Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen ist bisher überschaubar. Dies trifft insbesondere auf die Absorption von Hydroxyzimtsäurederivaten zu. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Aufnahme und der Metabolismus der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide in Hct116 Kolonkarzinomzellen untersucht. Exemplarisch wurden die intrazellulären Konzentrationen von Quercetin- und Myricetin-Derivaten auch in Caco-2 Kolonkarzinomzellen und HepG2 Hepatomzellen nachgewiesen. Zusätzlich fanden mit den Myricetin-Derivaten Untersuchungen in Hct116 Zellen bei  $4^{\circ}\text{C}$  statt, um Hinweise über die genauere

Art der zellulären Aufnahme (passiver vs. aktiver Transport) zu erhalten. Neben dem intrazellulären Nachweis der Polyphenole mittels HPLC erfolgte deren Detektion zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch und/oder durchflusszytometrisch nach Komplexbildung mit dem Fluoreszenzverstärker NSRA.

Im Zellkulturmedium kann es zu einer Autoxidation von Flavonoiden kommen, wodurch  $H_2O_2$  generiert wird (Übersichtsartikel von Halliwell 2008). In Vorarbeiten von Ruhl (2009) konnte gezeigt werden, dass durch eine Co-Inkubation mit dem Antioxidans Ascorbinsäure diese Degradation verringert wird. Zwar führt auch Ascorbinsäure zur Generierung von  $H_2O_2$  im Medium (DMEM), es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kombination von Polyphenolen und Ascorbinsäure die Menge an  $H_2O_2$  im Medium verglichen mit einer alleinigen Inkubation mit Ascorbinsäure oder Polyphenolen reduziert (Roques et al. 2002; Wee et al. 2003). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden alle Aufnahmestudien unter Verwendung von 0,5 mM Ascorbinsäure zur Stabilisierung der Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide durchgeführt.

Zur Detektion der intrazellulären Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate mussten die Versuchsbedingungen im Vergleich zu den Aufnahmestudien mit Flavonoiden modifiziert werden. So wurden die Zellzahl unter Verwendung von 100 mm Zellkulturschalen (statt 60 mm wie bei Flavonoiden) und die Konzentration der Hydroxyzimtsäurederivate (100  $\mu$ M) erhöht. Der Nachweis der intrazellulär aufgenommenen Hydroxyzimtsäurederivate gestaltete sich dennoch schwierig bzw. war nicht bei allen verwendeten Substanzen möglich.

Die intrazelluläre Menge der vier detektierten Hydroxyzimtsäurederivate lag in den Hct116 Zellen in einem ähnlichen Bereich. Bereits nach 2-5 Minuten Inkubationszeit („0 h-Wert“ in Abbildungen) waren Hydroxyzimtsäurederivate in den Zellen detektierbar. Die hier detektierten Mengen könnten daher auf eine rasche Diffusion der Substanzen in die Zellen zurückzuführen sein. Eine alternative Erklärung wäre eine Adsorption der Hydroxyzimtsäurederivate an die Plasmamembran. Die intrazellulären Gehalte bewegten sich sowohl bei 2,4-DHZ und Ferulasäure als auch bei p- und m-Coumarsiure über den gesamten Inkubationszeitraum (bis zu 6 h) in einem ähnlichen Bereich. Generell war die intrazellulär detektierte Menge an Hydroxyzimtsäurederivaten sehr niedrig. Zu keinem Inkubationszeitpunkt konnten Metabolite in Hct116 Zellen detektiert werden. Dennoch kann eine Metabolisierung der verwendeten Substanzen durch die Hct116 Zellen nicht ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Konzentration der einzelnen Metabolite (denkbar wären hier glukuronidierte, sulfatierte oder methylierte Hydroxyzimtsäurederivate) zu gering war. Eine andere Möglichkeit besteht im Export der Metabolite in das Inkubationsmedium.

Weder bei Experimenten mit Kaffeesäure noch bei Aufnahmestudien mit den veresterten Derivaten Chlorogensäure und Rosmarinsäure konnten diese Substanzen intrazellulär detektiert werden. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Substanzen wie Kaffeesäure aufgrund der negativen Ladung der Carboxylgruppe bei physiologischem pH nur schwer durch die Plasmamembran diffundieren können und so längere Inkubationszeiten benötigen, um ihre zellulären Effekte ausüben zu können (Kitsati et al. 2012). In einer anderen Studie konnte eine passive Diffusion von Hydroxyzimtsäuren in Kolonkarzinomzellen (Co-Kultur von Caco-2 und HT29-MTX Zellen) gezeigt werden (Poquet et al. 2008). Auch Konishi und Kobayashi (2004) sowie Konishi und Shimizu (2003) konnten eine Aufnahme bzw. einen Transport von Kaffeesäure und Chlorogensäure in Caco-2 Zellen zeigen. Im gleichen Zellmodell wiesen Kern et al. (2003) nicht nur die Aufnahme von Kaffeesäure in Caco-2 Zellen nach, sondern auch die Metabolisierung zu Ferulasäure und Isoferulasäure. Ferulasäure und Isoferulasäure wurden neben weiteren glukuronidierten und sulfatierten Konjugaten ebenfalls als Kaffeesäure-Metabolite in HepG2 Zellen identifiziert (Mateos et al. 2006). Zudem konnten diese Autoren eine (wenn auch geringe) Aufnahme von Chlorogensäure in die HepG2 Zellen nachweisen. Zhao et al. (2004) und Zhao und Moghadasian (Übersichtsartikel von 2008) vermuten als Aufnahmemechanismus für Ferulasäure eine passive Diffusion in die Zellen des Gastrointestinaltraktes, da sie eine Aufnahme in die Mukosa *in vitro* auch bei 0°C nachweisen konnten. Zusammenfassend scheint die Absorption der meisten Hydroxyzimtsäurederivate in die jeweils verwendeten Zellkulturmodelle mittels passiver Diffusion zu geschehen (Farrell et al. 2011 sowie Übersichtsartikel von Scalbert und Williamson 2000; Williamson et al. 2000). Vereinzelt wird auch eine Beteiligung des MCT Transporters an der Aufnahme dieser Substanzen in die Zellen (v.a. bei Caco-2 Zellen) diskutiert (Konishi und Kobayashi 2004; Konishi et al. 2003; Konishi und Shimizu 2003). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit sind die intrazellulär detektierten Gehalte der Hydroxyzimtsäurederivate in der Literatur oft sehr gering, so fanden beispielsweise Mateos et al. (2006) weniger als 0,5% der eingesetzten Menge an Kaffeesäure, Chlorogensäure oder Ferulasäure nach 2 h und 18 h Inkubation in HepG2 Zellen wieder.

Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen der Hydroxyzimtsäurederivate sind zum Teil wesentlich höher (im mM Bereich) als die in der vorliegenden Arbeit. Dies ist eine mögliche Erklärung, weshalb nicht alle Substanzen in der hier verwendeten Zelllinie detektiert werden konnten. Auch die Inkubationszeiten sind in der Literatur oft länger (z.T. 24 h) als die maximale Inkubationsdauer von 6 h, die in dieser Arbeit gewählt wurde. Zusätzlich wurde der pH Wert hier nicht überprüft, so dass keine Aussage über die Protonierung der Carboxylgruppe der jeweiligen Substanz getroffen werden kann, die jedoch für die Diffusion der Substanzen über die Plasmamembran wichtig ist. Anzunehmen ist

jedoch, dass die Hydroxyzimtsäurederivate unter den gewählten Versuchsbedingungen primär in der ionisierten (= deprotonierten) Form vorlagen, was ihre Diffusion erschwerte und die – sofern detektierbar – sehr niedrigen intrazellulären Gehalte erklären könnte.

Neben den Hydroxyzimtsäurederivaten wurden Aufnahmestudien mit strukturverwandten Flavonoiden (100  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Kolonkarzinomzellen durchgeführt. Dabei konnten alle verwendeten Substanzen intrazellulär detektiert werden. Es ergaben sich jedoch große Unterschiede zwischen den intrazellulären Gehalten der untersuchten Flavanone und der Flavone, welche wesentlich höher waren. Auch innerhalb der Klasse der Flavanone und Flavone wichen die ermittelten Mengen voneinander ab. Ein Vergleich zwischen Naringenin und dessen methylierten Derivat Isosakuranetin zeigt, dass die intrazellulären Gehalte von Isosakuranetin über den gesamten Inkubationszeitraum etwa doppelt so hoch waren wie die von Naringenin. Die intrazellulären Mengen an Hesperetin befanden sich zwischen denen von Naringenin und Isosakuranetin. Da die ermittelten Gehalte jedoch nicht mittels Kalibrierung normiert wurden, sondern nur auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen wurden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Dennoch scheint anhand dieser Daten eine Methylierung im B-Ring die intrazelluläre Konzentration der Flavonoide zu erhöhen. Der genaue Einfluss der Methylierung wird detailliert mit den Ergebnissen der Quercetin- und Myricetin-Derivate im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutiert. Da die intrazellulären Gehalte der untersuchten Flavanone über den gesamten Inkubationszeitraum auf etwa dem gleichen Niveau blieben, ist hier nicht von einer Akkumulation innerhalb der Zellen auszugehen. Verglichen mit den Flavanonen sind die intrazellulären Gehalte der Flavone Chrysoeriol und Diosmetin deutlich höher. Besonders Chrysoeriol wies sehr hohe intrazelluläre Gehalte auf, welche bis 2 h Inkubationszeit anstiegen und dann ein Plateau bildeten. Somit konnte auch eine Akkumulation von Chrysoeriol in den Hct116 Zellen gezeigt werden. Die intrazellulären Gehalte von Diosmetin waren nach 4 h um mehr als das Zehnfache und nach 6 h um das Vierfache erhöht verglichen mit Inkubationszeiten von bis zu 2 h. Die stark erhöhten Werte nach 4 h und 6 h, jedoch nicht nach 1 h oder 2 h waren unerwartet und könnten ein Artefakt darstellen. Eine Erklärung für die sehr hohen intrazellulären Gehalte von Chrysoeriol ab 2 h Inkubationszeit könnte ein Anheften des Flavonoids an der Membran der Zellen sein. Dieser Anteil an Chrysoeriol könnte trotz der Waschschriffe mit BSA angereichertem PBS nicht von den Zellen entfernt worden sein und somit fälschlicherweise als intrazelluläres Chrysoeriol detektiert worden sein.

Analog zu den Ergebnissen der Aufnahmestudien mit Hydroxyzimtsäurederivaten konnten auch bei den Experimenten mit den strukturverwandten Flavonoiden keine intrazellulären Metabolite detektiert werden. Ein effektiver Efflux der Metabolite in das Zellkulturmedium könnte ein möglicher Grund dafür sein. Alternativ könnte die Konzentration der

intrazellulären Metabolite zu gering gewesen sein, so dass ein Nachweis unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht möglich war. In der Literatur konnte in HepG2 Hepatomzellen eine Metabolisierung durch CYP Enzyme von Diosmetin zu Luteolin ab 12 h Inkubationszeit gezeigt werden (Androutsopoulos et al. 2009; Androutsopoulos und Spandidos 2012). Daher wäre eine weitere Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit nicht vorhandenen Metabolite eine zu kurze Inkubationszeit der Hct116 Zellen, um intrazellulär detektierbare Mengen an Metaboliten anzureichern.

Tian et al. (2009) untersuchten die Permeabilität von 36 Flavonoiden in Caco-2 Zellen im Transwell-System und kamen zu dem Ergebnis, dass die meisten Flavonoide per Diffusion in die Zellen aufgenommen werden. Diese Art der intrazellulären Aufnahme von Flavonoiden wurde zuvor schon von anderen Autoren bestätigt (Gee et al. 2000; Walgren et al. 1998). In dieser Studie von Tian et al. besaßen methylierte Flavonoid-Aglyka eine höhere Permeabilität als ihre korrespondierenden Flavonoid-Aglyka. Ein Vergleich der von Tian et al. (2009) ermittelten relativen Permeabilitätskoeffizienten (von apikal nach basolateral) zeigte einen höheren Wert für Hesperetin als für Naringenin. Befunde von Kobayashi und Konishi (2008) aus Caco-2 Monolayer Studien legen als Absorptionsmechanismus für Hesperetin und Naringenin neben der Diffusion einen Protonen-gekoppelten aktiven Transport nahe. In ihrer Studie war der Transport von Naringenin und Hesperetin von apikal nach basolateral höher, wenn der apikale pH Wert niedriger als der basolaterale war. Ein Vergleich der Absorptionsraten von Naringenin und Hesperetin in dieser Studie zeigte eine bessere Absorption von Naringenin in Caco-2 Zellen. Dieser Befund wurde in Humanstudien bestätigt, in denen die Plasmakonzentration nach Gabe von 50 mg Flavonoid-Aglykon bei Naringenin etwas höher war als bei Hesperetin (vgl. 0,50  $\mu\text{M}$  vs. 0,46  $\mu\text{M}$ ) (Gardana et al. 2007; Kanaze et al. 2007; Manach et al. 2005).

Die zelluläre Aufnahme der strukturverwandten Flavonoide wurde zusätzlich nach Komplexierung mit dem Fluoreszenzverstärker NSRA am Durchflusszytometer gemessen. Dieser Ansatz wurde als einfache und schnelle Alternative zur HPLC Messung gewählt, was eine erste Abschätzung von Effekten erlauben sollte (Screening). Von den untersuchten Flavonoiden waren nur die beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin dazu in der Lage einen fluoreszierenden Komplex mit NSRA zu bilden. Hierbei war die Fluoreszenzintensität des Chrysoeriol-NSRA Komplexes etwa zehnfach höher als die des Diosmetin-NSRA Komplexes. Weder Naringenin noch Isosakuranetin und Hesperetin zeigten nach Inkubation mit NSRA eine erhöhte Fluoreszenz. Die hohe Fluoreszenzintensität von Chrysoeriol verglichen mit den anderen Flavonoiden spiegelt die Daten der HPLC-Aufnahmestudien in Hct116 Zellen wider, bei denen Chrysoeriol die mit Abstand höchsten intrazellulären Gehalte aufwies.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen deutlich, dass bestimmte Strukturmerkmale für die Komplexbildung zwischen Flavonoiden und NSRA nötig sind. Grünz et al. (2012) untersuchten die zelluläre Aufnahme verschiedener Flavonoide in *C. elegans* mittels Komplexbildung mit NSRA. Hier war keine Detektion eines Naringenin-NSRA Komplexes möglich. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die 3-Hydroxylgruppe im C-Ring wichtig für die Komplexbildung ist. Diese Vermutung kann durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht bestätigt werden, da auch die beiden Flavone Chrysoeriol und Diosmetin einen Komplex mit NSRA bilden konnten. Strukturell unterscheiden sich Naringenin und Chrysoeriol nur durch das Vorhandensein der 2,3-Doppelbindung im C-Ring, eine 3-Hydroxylgruppe besitzen beide Flavonoide nicht. Daher scheint vor allem die 2,3-Doppelbindung für die Komplexbildung mit NSRA wichtig zu sein.

Neben den strukturverwandten Flavonoiden wurde die Aufnahme von Quercetin- und Myricetin-Derivaten in verschiedenen Kolonkarzinom- und Hepatomzellen untersucht. Die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit Myricetin-Derivaten wurden mittels Kalibrierungen auf den Gehalt an Flavonoiden normiert und anschließend auf den Proteingehalt bezogen, so dass die Ergebnisse als ng Flavonoid/mg Protein innerhalb der einzelnen Zelllinien besser vergleichbar waren. Nach der Inkubation mit einigen Quercetin- und Myricetin-Derivaten konnte das Auftreten eines zusätzlichen Peaks festgestellt werden. Die Identität dieser Metabolite sollte anschließend per LC-MS Analyse anhand des Fragmentationsmusters aufgeklärt werden. Aufgrund der sehr niedrigen Gehalte der Metabolite führte die LC-MS Analyse nicht zu eindeutigen Ergebnissen hinsichtlich der Art der Metabolite. Daher konnte eine Charakterisierung der detektierten Metabolite nur anhand der Retentionszeit sowie des UV-Spektrums erfolgen. Generell konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den detektierten Metaboliten um mögliche Zerfallsprodukte handelte, was jedoch aufgrund der UV-Spektren als eher unwahrscheinlich betrachtet wurde.

Die intrazellulären Gehalte von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin in Hct116 Kolonkarzinomzellen unterschieden sich zwischen 15 min und 1 h Inkubationszeit nicht. Lediglich bei Rhamnetin sind die intrazellulären Mengen nach 1 h signifikant höher. Da die AUC Werte der Flavonoid-Peaks nicht mittels Kalibrierung auf den Flavonoidgehalt normiert wurden, ist ein Vergleich zwischen den einzelnen Derivaten nicht direkt möglich. Die AUC Werte von Rhamnetin waren um etwa Faktor 10 höher als die von Isorhamnetin und Tamarixetin. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine schlechtere Absorption oder ein effektiver Export von Isorhamnetin und Tamarixetin. Zusätzlich traten nach Inkubation mit Rhamnetin zwei Metabolite mit Retentionszeiten von 22,8 min und 30,7 min auf (vgl. Retentionszeit von Rhamnetin: 28,2 min). Wie oben beschrieben konnte die genaue Identität dieser Metabolite aufgrund der zu geringen Konzentrationen nicht näher aufgeklärt werden.



Die Inkubation von HepG2 Hepatomzellen mit Quercetin-Derivaten lieferte ein ähnliches Bild. Die intrazellulären Gehalte waren bei Isorhamnetin und Tamarixetin nach 15 min und 1 h Inkubationszeit am niedrigsten. Wie in Hct116 Zellen waren auch in den HepG2 Zellen die intrazellulären Mengen an Quercetin höher als die von Isorhamnetin und Tamarixetin, jedoch deutlich niedriger als die von Rhamnetin. Generell unterschieden sich die Gehalte nach 15 min und 1 h Inkubationszeit nicht deutlich voneinander. Es konnten zusätzlich drei Rhamnetin-Metabolite detektiert werden, welche Retentionszeiten von 22,8 min, 24,9 min und 30,7 min besaßen. Ein Vergleich der Retentionszeiten sowie der UV-Spektren legt nahe, dass es sich bei zwei der drei um die gleichen Metabolite handelt, die auch in Hct116 Zellen detektiert wurden. Neben Rhamnetin führte eine Inkubation mit Tamarixetin nach 1 h zur Detektion zweier Metabolite mit Retentionszeiten von 23,5 min und 24,1 min, die beide polarer als die Ursprungssubstanz waren (Retentionszeit von Tamarixetin: 27,3 min). In der Literatur finden sich Daten zu Aufnahme und Metabolismus von Quercetin unter anderem in Fibroblasten. Hier war die Aufnahme von Isorhamnetin deutlich höher als die von Tamarixetin und Quercetin nach 2 h Inkubation, nach 18 h Inkubation zeigte jedoch Tamarixetin die höchsten intrazellulären Gehalte (Spencer et al. 2003). In Neuronen und Astrozyten waren die intrazellulären Mengen an Tamarixetin sowohl nach 2 h als auch nach 18 h Inkubationszeit höher als die von Isorhamnetin (Spencer et al. 2001). Nach Inkubation mit Quercetin waren die Gehalte deutlich geringer (ca. ein Viertel). Ein Vergleich der von Tian et al. (2009) ermittelten relativen Permeabilitätskoeffizienten (von apikal nach basolateral) zeigte einen höheren Wert für Tamarixetin als für Quercetin, die intrazelluläre Akkumulation in den Caco-2 Zellen war jedoch bei Quercetin etwas höher als bei Tamarixetin. Boulton et al. (1999) untersuchten die Aufnahme, den Metabolismus sowie die Elimination anhand von <sup>14</sup>C-markiertem Quercetin in HepG2 Zellen und konnten eine Akkumulation von Quercetin in den Zellen (etwa zehnfach höhere Gehalte) detektieren verglichen mit dem Kulturmedium. HepG2 Zellen metabolisierten Quercetin zu 3'-O-Methylquercetin (= Isorhamnetin) und eliminierten bzw. degradierten Quercetin zügig, so dass nach 8 h intrazellulär kein Quercetin mehr detektierbar war (Boulton et al. 1999). Neben Isorhamnetin konnten Kanazawa et al. (2006) in HepG2 Zellen auch Tamarixetin und weitere nicht näher beschriebene Glukuronid- und Sulfat-Konjugate detektieren. Isorhamnetin als Metabolit des Quercetins konnte neben weiteren Glukuronid- und Sulfatderivaten auch in mehreren Humanstudien nachgewiesen werden (Übersichtsartikel von Harwood et al. 2007; Manach et al. 2005).

Die Ergebnisse aus der Literatur konnten in der vorliegenden Arbeit in den verwendeten Kolonkarzinom- und Hepatomzellen nicht direkt bestätigt werden, da in beiden Zelllinien die intrazellulären Mengen an Isorhamnetin und Tamarixetin geringer waren als die von Quercetin. Einzig bei Rhamnetin schien eine Methylierung im A-Ring eine Erhöhung der

intrazellulären Konzentration zu bewirken. In beiden untersuchten Zelllinien waren die intrazellulären Gehalte von Rhamnetin um knapp das Zehnfache höher verglichen mit den anderen Derivaten. Nach Inkubation mit Quercetin konnten keine Metabolite detektiert werden, diese waren nur nach Inkubation mit Rhamnetin zu identifizieren.

Eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs einer Inkubation von Hct116 Zellen mit Tamarixetin zeigte bis zu einer Inkubationszeit von 6 h keine zelluläre Akkumulation dieses Derivates. Die intrazellulären Gehalte von Rhamnetin stiegen dagegen mit zunehmender Inkubationszeit an, so dass hier von einer Akkumulation innerhalb der Hct116 Zellen auszugehen ist. Zusätzlich waren zwei Metabolite detektierbar, die die gleichen Retentionszeiten von 22,8 min und 30,7 min wie bei der Kurzzeitinkubation besaßen. In einer weiteren Kolonkarzinomzelllinie (Caco-2 Zellen) stieg die intrazelluläre Rhamnetin Konzentration nach 1 h Inkubation nicht weiter an, sondern bildete bis 6 h ein Plateau. Auch hier konnte die Bildung zweier Metabolite detektiert werden (mit Retentionszeiten von 29,8 min und 30,7 min), deren Konzentration über den Verlauf der Inkubation leicht zunahm. In HepG2 Hepatomzellen trat die Plateau-Bildung erst nach 2 h Inkubation mit Rhamnetin auf. Zusätzlich wurden drei Metabolite mit Retentionszeiten von 24,9 min, 29,8 min und 30,7 min detektiert. Die intrazellulären Gehalte der beiden unpolaren Metabolite stiegen bis zu 6 h Inkubationszeit leicht an, der Gehalt des Metaboliten nach 24,9 min blieb dagegen unverändert und konnte nach 6 h nicht mehr detektiert werden. Ein Vergleich der intrazellulären Konzentration an Rhamnetin zeigt, dass die höchsten Werte in Hct116 Zellen vorkamen, in denen auch eine Akkumulation gezeigt werden konnte. Die geringsten intrazellulären Konzentrationen wurden in Caco-2 Zellen detektiert. Die Gehalte an Rhamnetin in HepG2 Zellen waren etwa doppelt so hoch wie in Caco-2 Zellen, aber deutlich geringer als in Hct116 Zellen. In der Literatur sind bisher keine Daten zur Aufnahme von Rhamnetin in verschiedene Zelllinien zu finden, so dass ein Vergleich der hier vorliegenden Daten mit anderen Studien nicht möglich ist.

Zusätzlich zur Detektion der intrazellulären Flavonoidgehalte mittels HPLC wurde eine Aufnahme der Quercetin-Derivate fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nach Komplexbildung mit NSRA nachgewiesen. Nach Inkubation der Hct116 Zellen mit Quercetin-Derivaten und NSRA zeigt das fluoreszenzmikroskopische Bild eine diffuse Verteilung der Flavonoide im Zytosol der Hct116 und Caco-2 Zellen, eine Aufnahme in den Zellkern war dabei nicht erkennbar. Vargo et al. (2006) wiesen mittels NSRA Komplexbildung die Aufnahme des Flavonoids Apigenin in Leukämiezellen (THP-1) nach und stellten eine Akkumulation von Apigenin nach 3 h und 12 h Inkubationszeit fest. Eine Doppelfärbung mit einem Mitochondrien-Farbstoff zeigte, dass kein Apigenin im Zellkern oder der

Plasmamembran vorhanden war, sondern eine Lokalisation in den Mitochondrien stattfand. In einer Studie von Walgren et al. (2000a) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (ohne Verwendung von NSRA) die Akkumulation von Quercetin sowohl im Zytosol als auch im Zellkern von Caco-2 Zellen gezeigt. Die Autofluoreszenz verschiedener Flavonoide wurde auch in einer Studie von Mukai et al. (2009) ausgenutzt, um deren intrazelluläre Verteilung in Hepatomzellen der Maus (Hepa-1c1c7) fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen. Hier akkumulierten die Flavonoide Kaempferol und Galangin im Kern der Hepatomzellen, so dass die Fluoreszenz dort viel stärker war als im Zytosol.

Für eine quantitative Aussage bezüglich der intrazellulären Gehalte der Quercetin-Derivate wurden die mit NSRA inkubierten Hct116 und HepG2 Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Sowohl bei Quercetin als auch bei Isorhamnetin und Tamarixetin war eine Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären Mengen an Flavonoid-NSRA Komplexen in den Zellen zu erkennen. Bei Rhamnetin war die Linearität in beiden Zelllinien nur bis 25  $\mu\text{M}$  gegeben, daher konnte für Rhamnetin keine Konzentrationsabhängigkeit im untersuchten Konzentrationsbereich konstatiert werden. Die höchsten Fluoreszenzwerte waren in beiden Zelllinien bei Quercetin zu erkennen. Auch bei den NSRA-Fluoreszenzspektren war das Emissionsmaximum bei Quercetin am höchsten. Analog zum niedrigen NSRA-Fluoreszenzspektrum bei Tamarixetin waren auch die ermittelten Fluoreszenzwerte in Hct116 und HepG2 Zellen am niedrigsten. Eine Kinetik der zellulären Aufnahme der Quercetin-Derivate wurde ebenfalls mittels Komplexbildung mit NSRA untersucht. Sowohl bei Quercetin als auch bei Rhamnetin waren in Hct116 Zellen keine Unterschiede in der NSRA-Flavonoid Fluoreszenz zwischen einer Kurzzeit- (15 min) und einer Langzeitinkubation (6 h) zu erkennen. Eine Langzeitinkubation mit Isorhamnetin und Tamarixetin führte dagegen in Hct116 Zellen zu einer Zunahme der NSRA-Fluoreszenz was gleichbedeutend mit einer Zunahme der intrazellulären Menge an Flavonoid ist. In HepG2 Zellen war diese Zunahme nicht zu erkennen. Hier führte eine Langzeitinkubation mit Rhamnetin und Tamarixetin zu einer Abnahme der NSRA-Fluoreszenz. Die intrazellulären Gehalte an Quercetin und Isorhamnetin in HepG2 änderten sich zwischen Kurz- und Langzeitinkubation kaum, hier war lediglich bei Quercetin der Trend einer geringeren NSRA-Fluoreszenz mit zunehmender Inkubationszeit zu erkennen. In der Literatur gibt es bisher nur eine vergleichbare Studie, in welcher NSRA zur Detektion intrazellulärer Flavonoide mittels Durchflusszytometrie verwendet wurde. Ernst et al. (2010) untersuchten die Aufnahme des Anthocyans Cyanidin in humane Keratinozyten (HaCaT) nach Komplexbildung mit NSRA im Durchflusszytometer. Die Kinetik Ergebnisse dieser Studie zeigten eine zeitabhängige Abnahme des intrazellulären Cyanidin Gehaltes, so dass nach 24 h Inkubation nur noch 17% der ursprünglich vorhandenen Menge nachweisbar war. Eine ähnliche Abnahme der

intrazellulären Konzentration an Flavonoiden konnte in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation von HepG2 Zellen mit Rhamnetin und Tamarixetin und anschließender Komplexierung mit NSRA festgestellt werden. Die HPLC Daten der Aufnahmeversuche in HepG2 bestätigen diese Abnahme der Rhamnetin Konzentration nicht direkt, hier war lediglich der Trend eines leicht erniedrigten Wertes nach 6 h Inkubation zu erkennen. Dennoch erweist sich die NSRA-Komplexierung zum Nachweis der intrazellulären Flavonoidgehalte mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie als einfache und Alternative zur Detektion mittels HPLC.

Neben den Quercetin-Derivaten wurde der Einfluss der Methylierung auf die zelluläre Aufnahme in Hct116, Caco-2 und HepG2 Zellen anhand von methylierten Myricetin-Derivaten untersucht. Um die Daten besser vergleichen zu können, wurden die ermittelten AUC Werte der Peakflächen in den jeweiligen Flavonoidgehalt umgerechnet und schließlich auf den Proteingehalt des Zellpellets normiert.

Die intrazellulären Gehalte der Myricetin-Derivate waren in Hct116 Zellen bei Myricetin und Laricitrin in etwa gleich und es bestand kein Unterschied zwischen einer Inkubation von 15 min und 1 h. Zusätzlich wurde nach Inkubation mit Myricetin und Laricitrin jeweils ein Metabolit detektiert, dieser besaß im Falle von Myricetin eine Retentionszeit von 17,5 min und bei Laricitrin eine Retentionszeit von 20,0 min. Beide Metabolite waren somit polarer als ihre Ausgangssubstanzen. Ihre Konzentration in den Zellen war jedoch zu gering für eine Analyse in der LC-MS, so dass die Aufklärung der genauen Identität dieser Metabolite nicht möglich war. Dies trifft auch auf alle weiteren Metabolite zu, die nach Inkubation der hier verwendeten Zelllinien mit Myricetin-Derivaten detektiert werden konnten. Im Vergleich zu Myricetin und dem einfach methylierten Laricitrin waren die intrazellulär detektierten Mengen von Syringetin und MTM nach 1 h Inkubationszeit etwa doppelt so hoch. Allerdings wurden hier keine Metabolite nachgewiesen. Ein ähnliches Bild ergab sich nach Inkubation einer weiteren Kolonkarzinomzelllinie mit Myricetin-Derivaten. Nach 1 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit Laricitrin konnten zwei Metabolite mit Retentionszeiten von 20,0 min und 27,5 min detektiert werden (vgl. Retentionszeit von Laricitrin: etwa 25,6 min). Ähnlich wie in Hct116 Zellen waren die intrazellulären Gehalte von Syringetin und MTM in Caco-2 Zellen höher als die von Laricitrin. Eine Aufnahme von Myricetin in Caco-2 Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch weitere Aufnahmestudien mit Myricetin in Caco-2 Zellen (Kinetik- und Transwell-Studien) bestätigt. In HepG2 Zellen nahmen die intrazellulären Gehalte der Myricetin-Derivate mit dem Grad der Methylierung zu. Myricetin und Laricitrin besaßen wie in Hct116 und Caco-2 Zellen die niedrigsten intrazellulären Gehalte, wurden jedoch zu jeweils zwei Metaboliten umgewandelt. Die Retentionszeiten der Myricetin Metabolite betragen 17,5 min und 25,0 min, die der Laricitrin Metabolite betragen in analogie

zu den Experimenten mit Caco-2 Zellen 20,0 min und 27,5 min. Die intrazellulären Mengen an Syringetin und MTM waren höher als die von Laricitrin und Myricetin. Zudem konnten hier nach 1 h Inkubation der HepG2 Zellen höhere intrazelluläre Konzentrationen detektiert werden als nach 15 min.

Um einen Einfluss aktiver Transportvorgänge zur Aufnahme der Myricetin-Derivate in die untersuchten Zelllinien zu untersuchen, wurden die Aufnahmestudien bei 4°C wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die intrazellulären Gehalte bei 4°C niedriger waren als bei 37°C, sich deutliche Unterschieden aber nur bei einigen Derivaten ergaben. Während eine Metabolisierung von Laricitrin und Myricetin in Hct116 Zellen auch noch bei 4°C stattfand, waren die intrazellulären Mengen an Myricetin, Syringetin und MTM in dieser Zelllinie nach beiden Inkubationszeitpunkten nur noch maximal halb so groß. Die Metabolisierung von Myricetin und Laricitrin bei 4°C war unerwartet und ist nur schwer erklärbar, da das Temperaturoptimum der Phase II Enzyme in der Regel im Bereich der Körpertemperatur liegt. Bei Laricitrin war die intrazelluläre Konzentration nur nach 15 min deutlich reduziert. Diese Daten legen eine Beteiligung aktiver Transportvorgänge an der Aufnahme der Myricetin-Derivate in die Hct116 Zellen nahe. In Caco-2 Zellen zeigte sich eine veränderte Aufnahme bei 4°C nur nach Inkubation mit Laricitrin (nur nach 15 min) und MTM (zu beiden Zeitpunkten). Eine Aufnahme von Myricetin in Caco-2 Zellen war weder bei 37°C noch bei 4°C nachweisbar. Auch in HepG2 Zellen führte eine Inkubation bei 4°C nur bei Laricitrin (nach 15 min) und MTM (nach 15 min und 1 h) zu deutlich niedrigeren intrazellulären Gehalten verglichen mit einer Inkubation bei 37°C. In allen drei untersuchten Zelllinien war die intrazelluläre Menge an MTM um mehr als die Hälfte reduziert, so dass bei diesem Flavonoid eine Regulation der intrazellulären Flavonoidkonzentration durch Transportproteine wahrscheinlich ist.

In weiterführenden Untersuchungen wurde daher der Einfluss der Myricetin-Derivate auf die beiden ABC Transporter P-gp und MRP2, die vor allem im Darm und in der Leber lokalisiert sind, untersucht. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war der Nachweis einer Aktivierung der ATPase Aktivität der beiden Transporter durch die Flavonoide möglich, was auf eine aktiv transportierte Substanz hindeutete. Verapamil als Positivkontrolle erhöhte die ATPase Aktivität von P-gp deutlich. Eine Inkubation mit Myricetin, Laricitrin und Syringetin bewirkte keine Änderung der ATPase Aktivität von P-gp, so dass alle drei Flavonoide nicht als mögliche P-gp Substrate infrage kamen. MTM war dagegen in der Lage die ATPase Aktivität von P-gp signifikant zu erhöhen. Daher ist eine Beteiligung von P-gp an der Regulation der intrazellulären MTM-Konzentration zu diskutieren. Nachdem MTM als Substrat von P-gp identifiziert wurde, wurde auch der Einfluss der Myricetin-Derivate auf den MRP2 Transporter untersucht. Hier bewirkten weder MTM noch Syringetin eine Erhöhung der ATPase Aktivität von MRP2. Bei Myricetin war der Trend einer gesteigerten ATPase

Aktivität zu erkennen, welche durch eine Inkubation mit Laricitrin signifikant erhöht war. Somit scheinen neben der Positivkontrolle Probenecid auch die beiden Flavonoide Laricitrin und Myricetin als Substrate von MRP2 zu fungieren. In der Literatur sind divergierende Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Flavonoiden auf verschiedene ABC Transporter wie P-gp und MRP2 zu finden. So fungiert beispielsweise Quercetin als Substrat von P-gp und MRP2 in Caco-2 Zellen (Walgren et al. 2000b; Wang et al. 2005). Daneben sind einige Flavonoide als P-gp Inhibitoren beschrieben worden, unter anderem die in dieser Arbeit verwendeten Flavanone Hesperetin und Naringenin (Übersichtsartikel von Morris und Zhang 2006). Für Myricetin zeigten van Zanden et al. (2005) in MRP2-transfizierten Nierenzellen des Hundes (MDCKII) eine inhibierende Wirkung auf MRP2 mit einem  $IC_{50}$  Wert von 22  $\mu$ M Myricetin. Weder für Quercetin und dessen Derivate Isorhamnetin und Tamarixetin, noch für Diosmetin und Chrysoeriol konnten die Autoren eine Inhibierung von MRP2 zeigen. Generell transportiert MRP2 nicht (nur) freie Flavonoid-Aglyka, sondern sorgt im Darm und in der Leber unter anderem für den Efflux konjugierter Flavonoide (Sulfat- und Glukuronsäure-Konjugate) (Übersichtsartikel von Alvarez et al. 2009). Aufgrund ihrer Beteiligung an der Elimination hydrophiler Konjugate in Galle oder Urin, werden die Aufnahme und Efflux Transporter als ein Grund (neben der intensiven Metabolisierung durch Phase II Enzyme) für die geringe orale Bioverfügbarkeit der Flavonoide angesehen (Silberberg et al. 2006).

Generell besteht die Möglichkeit, dass die beiden ABC Transporter den Efflux der Myricetin-Derivate (bei P-gp v.a. den Efflux von MTM und bei MRP2 den Efflux von Myricetin und Laricitrin) in Hct116, Caco-2 und HepG2 modulieren, dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter analysiert. Der genaue Einfluss von P-gp und MRP2 auf die Regulation der intrazellulären Konzentration der Myricetin-Derivate muss in weiterführenden Experimenten beispielsweise mittels Inhibierung oder knock down weiter untersucht werden .

In weiteren Aufnahmestudien wurde der zeitlich Verlauf der zellulären Akkumulation der Myricetin-Derivate betrachtet. Bei Myricetin zeigte sich kein Unterschied im intrazellulären Gehalt der Hct116 Zellen nach 1 h und 6 h Inkubationszeit. Bereits zum 0 h Zeitpunkt (methodisch bedingt entspricht dies einer Inkubationszeit von etwa 2-5 min) konnte ein Metabolit mit einer Retentionszeit von 17,5 min detektiert werden, dessen intrazellulärer Gehalt nach 1 h Inkubationszeit anstieg und bis 6 h ein Plateau bildete. Dieser Metabolit konnte neben einem weiteren Metaboliten (Retentionszeit von etwa 25,0 min) auch in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Myricetin detektiert werden. In beiden Zelllinien war nach 0 h kein Myricetin detektierbar. In HepG2 Zellen war die intrazelluläre Konzentration von Myricetin nach 1 h Inkubationszeit am höchsten und nahm dann kontinuierlich ab, so dass nach 6 h nur noch geringe Mengen detektierbar waren. Die Detektion von Myricetin oder entsprechenden Metaboliten war in Caco-2 Zellen nicht möglich. In der Literatur gibt es

jedoch Hinweise auf eine zelluläre Aufnahme von Myricetin in Caco-2 Zellen (Tian et al. 2009; Yokomizo und Moriwaki 2005a). Einige Autoren berichten von der Instabilität von Myricetin in Medium oder Puffer mit neutralem oder alkalischem pH Wert aufgrund von Autoxidation (Tian et al. 2009; Wesolowska et al. 2009; Yokomizo und Moriwaki 2005, 2006). Diese Instabilität kann in der vorliegenden Arbeit nicht als Ursache für die fehlende Aufnahme von Myricetin in Caco-2 Zellen gesehen werden, da der Nachweis von intrazellulärem Myricetin in Hct116 und HepG2 Zellen erbracht wurde.

Nach Inkubation der verwendeten Zelllinien konnten intrazelluläre Gehalte von Laricitrin nur in Hct116 Zellen detektiert werden. Weder in Caco-2 (hier nur bei einem von drei Experimenten) noch in HepG2 Zellen war intaktes Laricitrin nachweisbar. In beiden Zelllinien konnten dagegen zwei Metabolite mit einer Retentionszeit von 20,0 min und 27,5 min detektiert werden, deren intrazelluläre Konzentration über den gesamten Inkubationszeitraum auf etwa dem gleichen Niveau blieb. Auch in Hct116 Zellen war ein Metabolit nachweisbar (Retentionszeit 20,0 min), dessen intrazelluläre Konzentration höher war als die von Laricitrin. Ein Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren der in den verwendeten Zelllinien detektierten Metabolite gibt Hinweise darauf, dass es sich um die gleichen Metabolite handelte. Diese wurden bereits im Kurzzeitversuch (15 min und 1 h Inkubation) nachgewiesen. Die Kinetik der Inkubation mit Syringetin und MTM in den drei Zelllinien lieferte vergleichbare Ergebnisse zum Kurzzeitversuch. In Hct116 Zellen stieg die intrazelluläre Konzentration von Syringetin bis 4 h an und nahm dann leicht ab. Nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit Syringetin blieb der intrazelluläre Gehalt nach 6 h auf dem gleichen Niveau wie nach 1 h Inkubation. Dies legte eine Akkumulation von Syringetin in Hct116 nahe jedoch nicht in Caco-2 Zellen. In HepG2 Zellen konnte eine Metabolisierung von Syringetin ab 1 h Inkubation zu einem polareren Metaboliten (Retentionszeit: 25,3 min) detektiert werden. Die intrazellulären Mengen von Syringetin stiegen mit zunehmender Inkubationszeit an, so dass auch hier eine Akkumulation zu sehen war. Vergleicht man die intrazellulären Gehalte von Syringetin in den drei Zelllinien, so ergaben sich die höchsten Werte für Hct116 und die niedrigsten Werte für Caco-2 Zellen. Eine Inkubation mit dem dreifach methylierten Derivat MTM führte in allen drei Zelllinien zu einer intrazellulären Akkumulation. Verglichen mit den anderen Myricetin-Derivate waren die intrazellulären Gehalte sowohl in Hct116 und Caco-2 als auch in HepG2 Zellen deutlich höher. In Hct116 Zellen führte die Inkubation mit MTM ab 4 h Inkubationszeit zur Bildung eines Metaboliten mit einer Retentionszeit von 27,6 min, bei welchem es sich anhand von Retentionszeit und UV-Spektrum um Syringetin handeln könnte. Während die intrazellulären Mengen von MTM in Hct116 und HepG2 etwa gleich waren, war der Gehalt in Caco-2 Zellen um mehr als die Hälfte niedriger.

Anhand der Kinetik Ergebnisse in den drei untersuchten Zelllinien lässt sich deutlich der Einfluss einer Methylierung auf die intrazelluläre Konzentration der Myricetin-Derivate zeigen. Mit steigender Anzahl der Methylgruppen im B-Ring nahm die intrazelluläre Konzentration der Derivate zu. Damit ging eine Abnahme der Metabolisierung der Myricetin-Derivate einher. So waren die intrazellulären Gehalte von Myricetin und Laricitrin in alle drei Zelllinien niedriger als die von Syringetin und MTM, es konnten jedoch sowohl bei Myricetin als auch bei Laricitrin zusätzlich bis zu zwei Metabolite in den Zellen detektiert werden. Bei Syringetin und MTM, den Derivaten mit zwei bzw. drei Methylgruppen im B-Ring, wurden keine oder maximal ein Metabolit in einer der drei Zelllinien nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit Befunden aus der Literatur, dass methylierte Flavonoide eine höhere metabolische Stabilität besitzen und sich durch eine bessere Bioverfügbarkeit und somit eine größere Absorption im Darm auszeichnen (Übersichtsartikel von Walle 2007; Wen und Walle 2006). Die intensive Konjugation der freien Hydroxylgruppen durch Phase II Enzyme gilt als Hauptgrund für die geringe orale Bioverfügbarkeit der in der Nahrung vorkommenden Flavonoide und Polyphenole (Übersichtsartikel von Manach und Donovan 2004; Walle 2004; Williamson und Manach 2005). Daneben spielen hier bei einigen Polyphenolen auch Transporter eine Rolle (Hong et al. 2003; Vaidyanathan und Walle 2003; Walton et al. 2006). Bei methylierten Flavonoiden sind die freien Hydroxylgruppen jedoch teilweise durch Methylgruppen blockiert, wodurch sie nicht mehr für Konjugationsreaktionen zur Verfügung stehen. Dies resultiert in einer erhöhten metabolischen Stabilität der methylierten Flavonoide, sofern die oxidativen Demethylierungsreaktionen langsam genug ablaufen (Walle et al. 2007a). Wen und Walle (2006a) konnten diese These in humanen Leber S9-Fraktionen anhand von unmethylierten Flavonen (7-Hydroxyflavon, 7,4'-Dihydroxyflavon, Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) und Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon)) und den korrespondierenden methylierten Flavonen (7-Methoxyflavon, 7,4'-Dimethoxyflavon, 5,7-Dimethoxyflavon und 5,7,4'-Trimethoxyflavon) zeigen. Während die unmethylierten Flavone im S9 Inkubationsmedium nach spätestens 1 h nicht mehr nachweisbar waren, zeigten die methylierten Derivate eine deutlich höhere Stabilität und waren nach 1 h noch zu mehr als 80% nachweisbar. Auch in Permeationsstudien mit Caco-2 Zellen konnten diese Autoren eine höhere Permeationsrate (von apikal nach basolateral) für die methylierten Derivate zeigen. Dabei wurden die unmethylierten Derivate vor allem durch Sulfatkonjugation metabolisiert, signifikante Glukuronidierungsreaktionen konnten nur für Chrysin ermittelt werden (Wen und Walle 2006a). In einer Fütterungsstudie mit 5,7-Dimethoxyflavon und Chrysin (je 5 mg/kg) in Ratten konnte nur 5,7-Dimethoxyflavon im Plasma sowie in Leber, Lunge und Nieren detektiert werden (Walle et al. 2007b). Chrysin war weder im Plasma noch in Organen nachweisbar, konnte aber im Fäces 2 h nach der oralen Applikation detektiert werden. In weiteren Studien konnte eine erhöhte Zytotoxizität methylierter Flavonoide



verglichen mit den korrespondierenden hydroxylierten Flavonoiden in verschiedenen transformierten Zellen gezeigt werden (Manthey und Guthrie 2002; Pouget et al. 2001; Walle et al. 2007b). Somit scheint eine Methylierung nicht nur zu einer erhöhten metabolischen Stabilität beizutragen, sondern sie steigert zumindest in bestimmten Fällen die biologische Aktivität der Flavonoide (Walle et al. 2007a).

Zusätzlich zu den Kinetik Studien wurde die Aufnahme und der zelluläre Transport der Myricetin-Derivate im Caco-2 Transwell-System untersucht. Nach 1 h Inkubation konnte sowohl in den Caco-2 Zellen als auch im basolateralen Kompartiment Quercetin detektiert werden. Dabei betrug die basolateral detektierte Menge an Quercetin etwa ein Drittel des apikal nachgewiesenen Quercetin Gehaltes. Die intrazelluläre Konzentration an Quercetin war etwa doppelt so hoch wie die basolateral detektierte Menge. Zusätzlich konnten sowohl im apikalen und basolateralen Kompartiment als auch intrazellulär Metabolite detektiert werden. Die Retentionszeiten der Metabolite im Überstand betrug 23,6 min, die des Metaboliten in den Zellen lag bei 27,4 min. Hierbei könnte es sich um Isorhamnetin handeln, was ein Vergleich der Retentionszeiten und des UV-Spektrums nahe legt. Aufgrund der jeweils sehr geringen Konzentration an Metabolit war eine Aufklärung der genauen Identität nicht möglich. Nachdem in Experimenten mit Quercetin gezeigt werden konnte, dass die verwendeten Caco-2 Zellen zur Aufnahme und zum Export von Flavonoiden fähig waren und diese zusätzlich metabolisieren konnten, wurden weiterführende Transportstudien im Transwell-System mit Myricetin-Derivaten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die methylierten Derivate in die Caco-2 Zellen aufgenommen und ins basolaterale Kompartiment exportiert wurden, jedoch kein Myricetin intrazellulär oder basolateral detektiert werden konnte. Die intrazellulären Gehalte waren bei MTM am höchsten und bei Syringetin am niedrigsten. In Übereinstimmung mit den Daten war auch die im basolateralen Kompartiment detektierte Menge an Syringetin niedriger als die von Laricitrin und Syringetin. Der Flavonoidgehalt im apikalen Kompartiment nahm in folgender Reihenfolge ab: Syringetin > MTM > Laricitrin > Myricetin. Eine Metabolisierung der verwendeten Myricetin-Derivate war nicht erkennbar bzw. die Konzentration der Metabolite war zu gering um von der verwendeten HPLC Anlage detektiert werden zu können.

Analog zu den Quercetin-Derivaten wurde die Aufnahme der Myricetin-Derivate nach Komplexbildung mit NSRA fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung waren die Myricetin-Derivate nach 1 h Inkubation diffus im Zytosol verteilt. Eine Fluoreszenz der NSRA-Flavonoid Komplexe im Zellkern war dabei nicht erkennbar. Die NSRA-Myricetin Fluoreszenz war in Hct116 Zellen nur schwach und in Caco-2 Zellen so gut wie gar nicht sichtbar. Dies bestätigt die Ergebnisse der Aufnahmestudien in Caco-2 Zellen, in denen kein intrazelluläres Myricetin

detektiert werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die schwache Fluoreszenz in Hct116 Zellen könnte die Inkubationszeit von 1 h sein, welche – wie sich in der Analyse im Durchflusszytometer herausstellte – zu lang gewesen sein könnte. Eine diffuse Verteilung der Flavonoide im Zytosol war zuvor bereits bei den Quercetin-Derivaten gezeigt worden und wurde in diesem Zusammenhang ausführlich diskutiert.

Neben des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises der Aufnahme der Myricetin-Derivate wurden diese nach 1 h Inkubation und anschließender NSRA Komplexierung auch im Durchflusszytometer überprüft. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Aufnahme in Hct116 Zellen für Myricetin, Laricitrin und MTM, jedoch nicht für Syringetin gezeigt werden. In der Hepatomzelllinie HepG2 war eine Konzentrationsabhängigkeit lediglich bei Laricitrin zu beobachten. Bei Myricetin und Syringetin verlief die Aufnahme in die Zellen bis 50  $\mu\text{M}$  linear. Generell war in HepG2 eine größere Abweichung der Einzelexperimente zu erkennen, was zu der nicht vorhandenen Konzentrationsabhängigkeit beigetragen haben könnte. In weiterführenden Experimenten wurde der zeitliche Verlauf der zellulären Aufnahme der Myricetin-Derivate in beiden Zelllinien untersucht. Die niedrigste NSRA-Flavonoid Fluoreszenz wurde nach Inkubation der Hct116 Zellen mit Myricetin detektiert. Dies bestätigt die schwache Fluoreszenz von Myricetin in Hct116 bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung sowie die HPLC Daten. Nach 15 min Inkubation war die Fluoreszenz am höchsten, diese nahm bis 4 h Inkubation mit Myricetin ab und stieg nach 6 h wieder an (auf etwa die Hälfte des 15 min Wertes). Auch bei Laricitrin war die Fluoreszenz der intrazellulären NSRA-Laricitrin Komplexe nach 15 min am höchsten und nahm mit fortlaufender Inkubationszeit kontinuierlich ab, so dass nach 6 h nur noch geringe Mengen detektierbar waren. Bei Syringetin zeigte sich keine Veränderung der RFU zwischen der Kurzzeit- und der Langzeitinkubation. Eine Inkubation von Hct116 Zellen mit MTM führte nach 15 min zu einer geringeren Fluoreszenz als zu späteren Zeitpunkten. Sowohl bei Syringetin als auch bei MTM legen die NSRA Daten eine Akkumulation der Flavonoide in den Hct116 Zellen nahe und bestätigen somit die Ergebnisse der HPLC-Aufnahmestudien. Der zeitliche Verlauf der NSRA-Flavonoid Fluoreszenz in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Myricetin-Derivaten zeigte ein ähnliches Bild wie zuvor in Hct116 Zellen. Hier war die Fluoreszenz der NSRA-Myricetin und NSRA-Laricitrin Komplexe nach 15 min Inkubation am höchsten und nahm dann kontinuierlich ab. Verglichen mit Hct116 Zellen war die Fluoreszenzintensität in HepG2 Zellen bei Myricetin und Laricitrin nach 15 min um ein Vielfaches höher. Die intrazellulären Gehalte von Syringetin und MTM nach Komplexierung mit NSRA blieben über den gesamten Inkubationszeitraum auf dem gleichen Niveau, hier war keine signifikante Zu- oder Abnahme der NSRA-Flavonoid Fluoreszenz und somit des intrazellulären Flavonidgehaltes erkennbar. Die in den HPLC-Aufnahmestudien ermittelte

intrazelluläre Akkumulation von Syringetin und MTM in HepG2 war hier nicht so deutlich, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die intrazelluläre Detektion von Flavonoid durch Komplexbildung mit NSRA am Durchflusszytometer wurde in der Literatur bisher nur in einer vergleichbaren Studie von Ernst et al. (2010) beschrieben und stellt eine neuartige Methode zum einfachen und schnellen Nachweis intrazellulärer Flavonoidmengen dar.

#### **5.4 Zelluläre Effekte strukturverwandter Isothiocyanate**

Neben den Hydroxycinnamoyl- und Flavonoiden wurde in der vorliegenden Arbeit mit den Isothiocyanaten eine weitere Klasse sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf ihre Wirkung in Kolonkarzinom- und Hepatomzellen untersucht. Isothiocyanate sind die Hydrolyseprodukte der Glucosinolate, welche vor allem in Kreuzblütlern vorkommen. In epidemiologische Studien konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von Gemüse aus der Familie der Kreuzblütler und dem Krebsrisiko gezeigt werden (Ambrosone et al. 2004; Epplen et al. 2009; Lam et al. 2009; Steinbrecher et al. 2010). Dieser Effekt wird vor allem den Glucosinolaten bzw. deren bioaktiver Form, den Isothiocyanaten zugeschrieben. Daher wuchs in den letzten Jahren der Markt an Isothiocyanaten als NEM. Vor allem das in Brokkoli vorkommende Sulforaphan kommt dabei zum Teil in hohen Dosen zum Einsatz (Übersichtsartikel von Zhu et al. 2010). Obwohl bisher kaum Daten aus klinischen Studien zur pharmakologischen Wirkung von Sulforaphan bekannt sind und die Daten aus Tierversuchen nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, wird diese Substanz als NEM verwendet. Zudem konnte bis dato nicht hinreichend geklärt werden, ob eine erhöhte Zufuhr von Isothiocyanaten zu unerwünschten Effekten führt und somit ein gesundheitliches Risiko birgt (Übersichtsartikel von Fimognari et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Effekte vier strukturverwandter Isothiocyanate über einen weiten Konzentrationsbereich in Kolonkarzinom- und Hepatomzellen untersucht. Sulforaphan wurde als Leitsubstanz ausgewählt. Daneben kamen die insgesamt weniger gut untersuchten strukturverwandten Derivate Berteroin, Erucin und Erysolin zum Einsatz.

##### **5.4.1 Anti- und prooxidative Eigenschaften der Isothiocyanate**

Isothiocyanate sind vor allem als indirekte Antioxidantien wirksam und können einen Einfluss auf den Metabolismus von Xenobiotika und die Generierung von ROS haben (Fimognari et al. 2012). Als indirekte Antioxidantien induzieren Isothiocyanate antioxidative Enzyme (vor allem über den Nrf2/ARE-Signalweg) und führen so zu einer „Entgiftung“ freier Radikale (Dinkova-Kostova und Talalay 2008).

Zunächst wurde das antioxidative Potential der vier strukturverwandten Isothiocyanate mittels TEAC Assay überprüft. Hierbei zeigte sich, dass weder Sulforaphan noch Berteroin,

Erucin oder Erysolin radikalfangende Eigenschaften besaßen. Aufgrund der Struktur der Isothiocyanate war nicht von einer antioxidativen Kapazität auszugehen. Im Gegensatz zu Flavonoiden verfügen die untersuchten Isothiocyanate nicht über die nötigen strukturellen Merkmale für die Resonanzstabilisierung eines Elektrons über ein delocalisiertes  $\pi$ -Elektronen-System, was ihre Fähigkeit ROS direkt abzufangen und zu inaktivieren einschränkt.

Da die Isothiocyanate bekanntermaßen als indirekte Antioxidantien wirken, wurden in Vorversuchen in Hct116 Zellen mittels DCF Assay die antioxidativen Eigenschaften von Sulforaphan und Berteroin nach Zugabe von  $H_2O_2$  untersucht. Wie zuvor im TEAC Assay zeigten weder Sulforaphan noch Berteroin ein antioxidatives Potential, sondern führten sogar zu einer stärkeren DCF Fluoreszenz und somit zu einer höheren Konzentration an intrazellulärem ROS. Daher wurden die Isothiocyanate mittels DCF Assay in weiterführenden Experimenten auf ihr prooxidatives Potential in Hct116 und H4IIE Zellen untersucht. In H4IIE Zellen führte eine Inkubation mit Isothiocyanaten nicht zu einer Veränderung der intrazellulären ROS Konzentration. Alle vier Isothiocyanate steigerten jedoch die Bildung von ROS in Hct116 Kolonkarzinomzellen. Den stärksten Effekt zeigte hierbei Berteroin, gefolgt von Erucin und Erysolin. Eine Inkubation mit Sulforaphan (25  $\mu M$ ) führte zu einer schwächeren Induktion von ROS, die aber dennoch auf dem Niveau der Positivkontrolle  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) lag. Weiterführend wurde untersucht, ob der prooxidative Effekt der Isothiocyanate durch eine Inkubation mit dem Antioxidans NAC reversibel war. Eine Vorinkubation mit NAC für 1 h führte nur bei Berteroin zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären ROS Levels verglichen mit Berteroin (ohne NAC) inkubierten Hct116 Zellen. Bei Erucin war lediglich der Trend einer reduzierten ROS Konzentration nach Vorbehandlung mit NAC zu erkennen. Weder bei der Positivkontrolle  $H_2O_2$  noch bei Sulforaphan und Erysolin hatte die Vorinkubation mit NAC einen Effekt auf die ROS Konzentration. In einem weiteren Ansatz wurden die Hct116 Zellen für 1 h mit NAC und Isothiocyanaten co-inkubiert. Diese Co-Inkubation mit NAC reduzierte die intrazelluläre ROS Konzentration bei Berteroin, Erucin und Erysolin signifikant. Bei Sulforaphan und  $H_2O_2$  war der Trend einer geringeren Konzentration an ROS ersichtlich. In einer Studie mit Hct116 Kolonkarzinomzellen, der Zelllinie, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, konnten Kim et al. (2010) ebenfalls eine signifikant erhöhte intrazelluläre ROS Konzentration nach Inkubation mit Sulforaphan und Erysolin zeigen, bei Erucin war lediglich ein Trend erkennbar. Dabei zeigte Sulforaphan eine stärkere Induktion von ROS als Erysolin. Wurden die Zellen 2 h mit NAC vorbehandelt, war das ROS Level der mit Erysolin-inkubierten Zellen auf Kontrollniveau. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit ergeben sich einige Unterschiede. Bei Kim et al. betrug die Inkubationszeit mit den verwendeten Isothiocyanaten (12  $\mu M$ ) vor der ROS Messung 24 h und die Vorinkubation mit NAC 2 h statt wie hier jeweils 1 h. Den stärksten

prooxidativen Effekt zeigte in der Studie von Kim et al. Sulforaphan, Erucin war nicht signifikant prooxidativ. In der vorliegenden Arbeit wirkten alle drei Isothiocyanate signifikant prooxidativ und eine Inkubation mit Erucin bewirkte einen größeren Anstieg der ROS Konzentration als Erysoiin und Sulforaphan. Diese Unterschiede können zum einen auf die divergierenden Versuchsbedingungen zurückzuführen sein, zum anderen können sich die verwendeten Hct116 Klone hinsichtlich ihrer Sensitivität voneinander unterscheiden. Rose et al. (2003) untersuchten die prooxidativen Eigenschaften von Phenethyl-Isothiocyanat (PITC) und konnten eine Induktion von ROS in HepG2 Zellen nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  PITC zeigen. In humanen Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) führte eine Inkubation mit Benzyl-Isothiocyanat (BITC) ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit bereits nach 1 h Inkubation zu signifikant erhöhten ROS Werten (Xiao et al. 2006). Lamy et al. (2012) untersuchten die prooxidativen Eigenschaften von Erucin in primären Ovarialkarzinomzellen und konnten keine signifikant erhöhte intrazelluläre ROS Konzentration nach 1 h Inkubation feststellen. In humanen Leukämiezellen (THP-1) konnten Moon et al. (2009b) zeigen, dass eine Inkubation (3 h) mit Sulforaphan oder  $\text{TNF}\alpha$  die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration leicht erhöhte und eine Co-Inkubation mit Sulforaphan und  $\text{TNF}\alpha$  zu einer deutlichen Steigerung des ROS Levels führte, was durch eine Vorinkubation mit NAC signifikant reduziert werden konnte. Dass Sulforaphan zur intrazellulären Generierung von ROS führt, konnte zuvor bereits von Singh et al. (2005) in humanen Prostatakarzinomzellen (PC-3) gezeigt werden. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit war die intrazelluläre ROS Konzentration bei Singh et al. (2005) bereits nach 1 h Inkubation mit Sulforaphan signifikant erhöht, zudem war der Effekt dosisabhängig. Eine Vorinkubation mit NAC (für 2 h) reduzierte das intrazelluläre ROS Level der PC-3 Zellen annähernd auf Kontrollniveau. Weitere Arbeiten zu Sulforaphan in diversen (transformierten) Zelllinien bestätigen dessen Eigenschaft als ROS Induktor (u.a. Choi et al. 2008; Doudican et al. 2010; Kim et al. 2006b).

Zusammenfassend zeigen die Befunde aus der Literatur deutlich den prooxidativen Charakter der Isothiocyanate. Auf welche Art und Weise die Isothiocyanate die Induktion von ROS bewirken, konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden. Während einige Autoren vermuten, dass die  $\text{N}=\text{C}=\text{S}$  Gruppe spontan hydrolysiert werden könnte, was zur Entstehung von Wasserstoffperoxid und Superoxid führen würde (Murata et al. 2000), halten andere Autoren die Depletion des intrazellulären GSH Pools durch Konjugation elektrophiler Isothiocyanate mit intrazellulären Nucleophilen wie GSH für den Auslöser der erhöhten ROS Konzentration (Singh et al. 2004a; Steinkellner et al. 2001).

Nachdem die prooxidativen Eigenschaften der vier Isothiocyanate in Hct116 Zellen (nicht jedoch H4IIE Zellen) gezeigt wurden, folgten weitere Untersuchungen im Modellorganismus *C. elegans*. Hier zeigte sich, dass Berteroin und Erucin (je 100  $\mu\text{M}$ ) stark toxisch auf die Würmer wirkten und dass Nematoden, die mit den beiden Substanzen inkubiert wurden,

detulich kleiner waren als Kontrolltiere. Dieser unterwartete Effekt auf Wachstum und Morphologie der Nematoden wurde in unserer AG von Herrn Dipl.-Biol. Christian Büchter (Institut für Toxikologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) weiter untersucht. In Bezug auf das prooxidative Potential der Isothiocyanate wurden aufgrund dieses Effektes keine Experimente mit Berteroin und Erucin mehr durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Eine Behandlung von wildtypischen *C. elegans* mit Sulforaphan und Erysolin führte im DCF Assay, bei dem ROS durch thermalen Stress induziert wurden, zu einer verstärkten Bildung von ROS. Über den untersuchten Zeitraum war die gemessene DCF Fluoreszenz und somit die Konzentration an ROS in Sulforaphan und Erucin behandelten Tieren annähernd doppelt so hoch wie in Kontrolltieren. Nach bestem Wissen der Literatur sind wir die ersten, die einen prooxidativen Effekt der Isothiocyanate Sulforaphan und Erysolin in *C. elegans* nachweisen konnten. Hasegawa et al. (Hasegawa et al. 2010) konnten nach Inkubation von wildtypischen *C. elegans* mit Allyl-Isothiocyanat (AITC) (0,1 bis 1 mM) eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress feststellen, was die Autoren auf eine gesteigerte Expression der beiden Phase II Enzyme GST-4 und UGT-13 zurückführten. Höhere Konzentrationen an AITC (2 mM) wirkten toxisch auf die Nematoden und reduzierten deren Fertilität sowie Lebensspanne.

#### 5.4.2 Zytotoxische Eigenschaften der Isothiocyanate

Es ist beschrieben, dass die durch eine Inkubation mit Isothiocyanaten erhöhte ROS Konzentration an der Auslösung des apoptotischen Zelltodes beteiligt ist (u.a. Kim et al. 2010; Lamy et al. 2012; Moon et al. 2009b; Rose et al. 2003; Singh et al. 2005; Xiao et al. 2006). Um zu überprüfen, ob dies auch in dem hier verwendeten Modellsystem der Fall ist, wurde in weiterführenden Experimenten das zytotoxische Potential von Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Zelltodes in Hct116 und H4IIE Zellen untersucht.

In Hct116 Zellen bewirkte eine Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) für 24 h eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Nach einer Inkubationszeit von 48 h war bereits mit 10  $\mu$ M Isothiocyanaten eine signifikante Toxizität zu erkennen. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h führte zu einer Abnahme der Viabilität der Hct116 Zellen ab einer Isothiocyanat Konzentration von 5  $\mu$ M. Zu allen untersuchten Zeitpunkten war Erysolin das am stärksten toxisch wirkende Derivat, gefolgt von Erucin. Die Toxizität der Isothiocyanate ging mit morphologischen Veränderungen der Hct116 Zellen einher. Hier waren ein Abrunden der Zellen und die Zerstörung von Zellverbänden sowie ein Aufschwimmen der zugrunde gegangenen Zellen zu erkennen. Dies war besonders deutlich bei Erysolin behandelten Zellen zu erkennen. Die ermittelten  $EC_{50}$  Werte nach 24 h

Inkubation der Hct116 Zellen betrug für Sulforaphan 17  $\mu\text{M}$ , für Berteroin 18  $\mu\text{M}$  und für Erucin und Erysolin je 15  $\mu\text{M}$ . Nach 72 h Inkubation reduzierten sich die  $\text{EC}_{50}$  Werte auf 11  $\mu\text{M}$  (Sulforaphan und Berteroin), 9  $\mu\text{M}$  (Erucin) und 7  $\mu\text{M}$  (Erysolin). Kim et al. (2010) untersuchten die Toxizität verschiedener Isothiocyanate in Kolonkarzinomzellen (Hct116, LoVo, HT-29 und Caco-2) nach 72 h Inkubationszeit. In dieser Studie betrug die  $\text{EC}_{50}$  Werte in Hct116 Zellen für Sulforaphan 1,8  $\mu\text{M}$  (9,5  $\mu\text{M}$  in HT-29, 10,1  $\mu\text{M}$  in LoVo und 6,3  $\mu\text{M}$  in Caco-2) und für Erysolin 1,1  $\mu\text{M}$  (6,1  $\mu\text{M}$  in HT-29, 6,6  $\mu\text{M}$  in LoVo und 8,7  $\mu\text{M}$  in Caco-2). Die  $\text{EC}_{50}$  Werte für Erucin und Berteroin lagen in keiner der untersuchten Zelllinien unter 15  $\mu\text{M}$ . Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen die Autoren, dass Isothiocyanate mit oxidiertem Schwefel (z.B. Sulforaphan, Erysolin und Alyssin) stärker toxisch wirken als Derivate ohne oxidierten Schwefel (beispielsweise Berteroin und Erucin). Die Anzahl der C-Atome zwischen Schwefel und der Isothiocyanat-Gruppe spielt hinsichtlich der Proliferationshemmung nur eine untergeordnete Rolle (Kim et al. 2010). Verglichen mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten  $\text{EC}_{50}$  Werten in Hct116 Zellen liegen die ermittelten Werte von Kim et al. für Sulforaphan und Erysolin deutlich niedriger (11  $\mu\text{M}$  vs. 1,3  $\mu\text{M}$  für Sulforaphan und 7  $\mu\text{M}$  vs. 1,1  $\mu\text{M}$  für Erysolin). Diese Diskrepanz lässt sich ähnlich wie die zuvor im DCF Assay durch eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Hct116 Zellen sowie durch Unterschiede in der verwendeten Zellzahl und in der Durchführung des MTT Assays erklären.

Die Toxizität der Isothiocyanate in H4IIE Hepatomzellen war verglichen mit Hct116 Zellen deutlich geringer. Die  $\text{EC}_{50}$  Werte (24 h Inkubationszeit) lagen für Sulforaphan bei 37  $\mu\text{M}$ , für Berteroin bei 31  $\mu\text{M}$ , für Erucin bei 26  $\mu\text{M}$  und für Erysolin bei 13  $\mu\text{M}$ ; nach 72 h Inkubation reduzierten sich die  $\text{EC}_{50}$  Werte weiter auf 11  $\mu\text{M}$  (Sulforaphan und Berteroin), 9  $\mu\text{M}$  (Erucin) bzw. 8  $\mu\text{M}$  (Erysolin). Morphologisch zeigte sich die Toxizität der Isothiocyanate durch ein Abrunden der H4IIE Zellen und einen Verlust von Zell-Zell-Kontakten.

In der Literatur wurden in einer anderen Kolonkarzinomzelllinie, den Caco-2 Zellen leicht erhöhte  $\text{EC}_{50}$  Werte für Sulforaphan und Erucin berichtet: Während der  $\text{EC}_{50}$  Wert (24 h) für Sulforaphan laut Bonnesen et al. (2001) bei 55  $\mu\text{M}$  lag, wurden von Jakubikova et al. (2005a)  $\text{EC}_{50}$  Werte von 83  $\mu\text{M}$  und 72  $\mu\text{M}$  für Erucin berichtet. In primären Ovarialkarzinomzellen konnten Lamy et al. (2012) eine dosisabhängige Reduktion der Viabilität nach 24 h Inkubation mit Erucin zeigen. Der  $\text{EC}_{50}$  Wert lag in dieser Studie unter 20  $\mu\text{M}$ . Untersuchungen in humanen Blasenkrebszellen ergaben eine starke Abnahme der Viabilität nach 48 h Inkubation mit Sulforaphan und Erucin. Hierbei wirkte Sulforaphan stärker toxisch als Erucin, für beide Isothiocyanate wurden  $\text{EC}_{50}$  Werte von unter 10  $\mu\text{M}$  ermittelt (Abbaoui et al. 2012). Ähnlich niedrige  $\text{EC}_{50}$  Werte (<10  $\mu\text{M}$ ) wurden von Jakubikova et al. (2005b) in humanen Leukämiezellen (HL-60) für Sulforaphan und Erucin berichtet. Diese unterschiedlichen Daten zeigen, dass verschiedene Isothiocyanate die Proliferation von

Tumorzellen in einem niedrigen mikromolaren Bereich hemmen, die Potenz des toxischen Effektes ist jedoch stark vom jeweils verwendeten Zelltyp abhängig.

### **5.4.3 Vergleichende Untersuchungen zur Art des Zelltodes**

Nachdem das toxische Potential von Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin in Hct116 und H4IIE Zellen ermittelt wurde, folgten Untersuchungen bezüglich des molekularen Mechanismus des Zelltodes. Von den untersuchten Isothiocyanaten bewirkte keine der Substanzen eine Erhöhung der LDH Aktivität in Hct116 Zellen, als Marker für einen nekrotischen Zelltod. In H4IIE Zellen zeigten Sulforaphan, Berteroin und Erucin den Trend einer leicht gesteigerten LDH Aktivität, welche durch eine Inkubation mit Erysolin signifikant erhöht war. Verglichen mit der Positivkontrolle erwiesen sich die Effekte der Isothiocyanate jedoch als relativ gering, so dass davon auszugehen ist, dass der nekrotische Zelltod beim Zelluntergang nur eine untergeordnete Rolle spielte. Um dies zu bestätigen, wurde in weiteren Untersuchungen der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Co-Färbung mit Annexin-V und PI im Durchflusszytometer quantifiziert. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (82% Annexin-V- und PI-negative Zellen) nahm die Viabilität der mit Isothiocyanaten inkubierten Zellen deutlich ab (<50% Annexin-V- und PI-negative Zellen). Dies äußerte sich in einer Zunahme an apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen. Während nach einer Inkubation mit Sulforaphan und Erysolin ein Anstieg von apoptotischen Zellen zu beobachten war, führte eine Inkubation mit Berteroin und Erucin primär zum Anstieg nekrotischer Zellen. Die Zunahme an nekrotischen Zellen deckte sich nicht mit den Ergebnissen des LDH Assays, bei dem keine Induktion von Nekrose beobachtet wurde. Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz könnten in der experimentellen Aufarbeitung der Zellen zu sehen sein. Durch das Ablösen der adhären Hct116 Zellen könnte es bei einem hohen Anteil der Zellen zu einer Ruptur der Plasmamembran gekommen sein, so dass Annexin-V (und PI) in die Zellen gelangen und dort an PS binden konnte, was den hohen Prozentsatz Annexin-V-positiver sowie PI-positiver Zellen in der Kontrolle erklären würde. Ein weiterer Punkt ist die hier gewählte Inkubationszeit von 24 h, welche zum Nachweis (früher) apoptotischer Zellen zu lange gewesen sein könnte. Da Annexin-V an das PS auf der Außenseite der Membran bindet und diese Relokalisation, welche als „eat me“ Signal für Makrophagen dient, einen frühen Vorgang während der Apoptose darstellt, dient dieser Assay primär zum Nachweis früher Apoptosen. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen wäre es möglich, dass nur noch wenige früh-apoptotische Zellen vorhanden waren und die meisten Zellen bereits spät-apoptotisch bzw. nekrotisch waren. Dies würde den erwarteten hohen Anteil an nekrotischen Zellen nach 24 h Inkubation mit Berteroin und Erucin erklären.



Da die Ergebnisse der Untersuchungen am Durchflusszytometer aufgrund des Ablösens der Zellen nicht kohärent mit den übrigen Ergebnissen waren, wurde eine analoge Untersuchung bezüglich der Art des Zelltodes am Fluoreszenzmikroskop mittels Co-Färbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid durchgeführt. Während Acridinorange die Zellmembran passieren und in die DNA interkalieren kann, ist Ethidiumbromid nicht permeabel und kann nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen. Nach 24 h Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten war der Anteil an viablen Zellen nur wenig reduziert (auf maximal 60%). Damit einher ging eine Zunahme an apoptotischen und zum Teil an nekrotischen Zellen. Mit etwa 5% nekrotischen Zellen war dieser Anteil jedoch gering. Apoptotische Zellen wurden vor allem nach Inkubation mit Erysolin beobachtet (ca. 35%). Eine Inkubation mit Erucin und Berteroin zeigte den Trend eines erhöhten Anteils apoptotischer Zellen (>20%). Eine Limitation dieses Nachweises liegt ähnlich wie bei Annexin-V/PI in der Aufarbeitung der Zellen. Vor allem apoptotische Zellen, die sich aus dem Zellverband gelöst hatten und aufschwammen wurden mit dieser Methode nicht gut erfasst, was den relativ niedrigen Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen erklären würde.

Die bisherigen Ergebnisse deuteten primär darauf hin, dass eine Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin einen apoptotischen Zelltod auslöste und Nekrose dabei nur eine untergeordnete Rolle spielte. Daher wurde in weiteren Experimenten die Induktion von Apoptose untersucht. In H4IIE Zellen geschah dies mittels Nachweis oligonukleosomaler DNA-Fragmentation (DNA-Leiter). Nach 24 h Behandlung der H4IIE Zellen mit 25  $\mu$ M Isothiocyanaten war ein Leitermuster der DNA im Agarosegel deutlich erkennbar. Hierbei waren kaum Unterschiede in der Intensität der DNA Fragmentierung sichtbar, allein bei Sulforaphan war diese schwächer ausgeprägt. Daraufhin wurde in folgenden Experimenten eine Beteiligung von Caspasen an der Auslösung der Apoptose untersucht.

Nach 24 h Inkubation der Hct116 Zellen mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) war kein Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität zu beobachten. In H4IIE Zellen führte eine 24 h Inkubation mit Erysolin zu einer signifikant gesteigerten Caspase 3/7-Aktivität. Diese erhöhte Aktivität der Caspase 3/7 war bereits nach 6 h Inkubation mit Erysolin ersichtlich. Keines der anderen Isothiocyanate zeigte nach 6 h und 24 h Inkubationszeit einen Effekt auf die Caspase 3/7. Um die molekularen Mechanismen der Apoptose näher zu untersuchen, wurde zusätzlich die Aktivität der Caspasen 8/10 und 9 durch entsprechende Caspase-spezifische Substrate in Proteinlysaten von Hct116 und H4IIE Zellen nach Inkubation mit Isothiocyanaten untersucht. Hierbei war eine gesteigerte Aktivität der Caspase 3/7 lediglich in Hct116 Zellen nach 6 h Inkubation mit den vier Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) zu erkennen. Weder bei Caspase 8/10 noch bei Caspase 9 führte eine Inkubation von Hct116 Zellen für 6 h oder 24 h zu einer Erhöhung

der Aktivität. Die Proteinlysate der H4IIE Zellen lieferten ein ähnliches Ergebnis. Hier führte eine Inkubation mit Isothiocyanaten für 6 h und 24 h nicht zu einer gesteigerten Aktivität der drei untersuchten Caspasen. Trotz des positiven Ergebnisses der Caspase 3/7-Aktivierung durch Erysolin im Apo One Assay konnte keine erhöhte Aktivität der Caspase 3/7 im Assay der Proteinlysate konstatiert werden (nach 24 h war lediglich ein Trend erkennbar). Bei Hct116 Zellen könnte die fehlende Aktivierung der Caspasen an einer zu geringen Schädigung der Zellen durch 10  $\mu$ M Isothiocyanate gelegen haben. Eine Beteiligung von Caspasen an der Apoptose kann durch die Ergebnisse des Apo One Assays sowie des Caspase Assays nicht eindeutig bestätigt werden. Da weder eine Aktivierung der Caspase 8/10 noch der Caspase 9 beobachtet werden konnte, können keine Aussagen getroffen werden, über welchen Weg die Apoptose vermittelt wurde (extrinsischer vs. intrinsischer). Hierzu müssten weitere Untersuchungen der Caspase-Aktivität sowie weitere Experimente auf Proteinebene (z.B. Nachweis von Bcl-Proteinen, (Pro)Caspase 8/10 und (Pro)Caspase 9, Messungen des Cytochrom C Efflux) Hinweise auf eine Beteiligung des intrinsischen Signalwegs an der Isothiocyanat-induzierten Apoptose geben.

In der Literatur konnten Kim et al. (2010) in Hct116 Zellen zeigen, dass Erysolin und Sulforaphan (jedoch nicht Erucin) Apoptose über eine Aktivierung der Caspase 8 und somit über den extrinsischen Signalweg auslösten. Eine Vorinkubation mit einem Caspase 8 Inhibitor verhinderte die durch Erysolin induzierte Apoptose vollständig. Eine Aktivierung der Caspase 9 konnte durch keines der verwendeten Isothiocyanate beobachtet werden. Zudem berichten die Autoren, dass die Inkubation von Hct116 Zellen mit 12  $\mu$ M Erysolin und Sulforaphan (jedoch nicht mit Erucin) eine Fragmentation der DNA auslöste. Da eine Vorbehandlung mit Antioxidantien die Apoptose signifikant reduzierte, schlossen diese Autoren, dass die Induktion von ROS durch Erysolin eine entscheidende Rolle an der Auslösung des apoptotischen Zelltodes hatte. Die unterschiedliche Fähigkeit der untersuchten Isothiocyanate Apoptose auszulösen führten die Autoren unter anderem auf ihre Variabilität in der ROS Induktion zurück. Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit scheint die Induktion der intrazellulären ROS Konzentration ein wahrscheinlicher Auslöser der Apoptose zu sein, jedoch korrelierte das prooxidative Potential von Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin hier nicht so deutlich mit der Fähigkeit Apoptose auszulösen. Im DCF Assay zeigte Berteroin die höchste Fluoreszenz, in den verschiedenen Apoptose Nachweisen führten jedoch Erucin und Erysolin zu einer stärkeren Induktion der Apoptose in Hct116 Zellen. Lediglich bei Sulforaphan zeigte sich die positive Korrelation zwischen prooxidativem Potential und der Induktion von Apoptose, da Sulforaphan jeweils den geringsten Effekt zeigte. Während die Apoptose-induzierende Wirkung von Sulforaphan bereits in vielen humanen Krebszelllinien gezeigt wurde (u.a. Chiao et al. 2002; Gamet-Payraastre et al. 2000; Juge et al. 2007; Park et al. 2007; Pham et al. 2004; Pledgie-Tracy et

al. 2007; Zhang et al. 2003), sind die Isothiocyanate Erucin, Berteroin und Erysolin bisher weniger gut charakterisiert. Jakubikova et al. (2005a) untersuchten den Einfluss von Sulforaphan und Erucin in Caco-2 Zellen und stellten mittels Annexin-V/PI Staining eine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Erucin und 100  $\mu\text{M}$  Sulforaphan fest. Niedrigere Konzentrationen an Erucin und Sulforaphan (25  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$ ) bewirkten nur eine minimale Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte das Apoptose-induzierende Potential verschiedener Isothiocyanate zudem in humanen Leukämiezellen (HL-60) (Jakubikova et al. 2005b). Sie beschrieben die Effektivität der untersuchten Isothiocyanate hinsichtlich der Dissipation des Membranpotentials der Mitochondrien sowie der Auslösung von Apoptose wie folgt: BITC = PEITC > Erucin = Iberin > AITC > Sulforaphan. In primären Ovarialkarzinomzellen konnten Lamy et al. (2012) zeigen, dass 25  $\mu\text{M}$  Erucin (und 10  $\mu\text{M}$  BITC) Apoptose auslösten.

Die Effekte der vier Isothiocyanate auf die Proliferation der Zellen wurde durch die Verteilung der Hct116 und H4IIE Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus untersucht. Gleichzeitig diente die Zellzyklusanalyse als Apoptosenachweis (subG<sub>1</sub> Peak). Der Hauptteil der Kontrollzellen (60%) befand sich dabei in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase und etwa 17% in der G<sub>2</sub>/M Phase. Der Anteil an apoptotischen Zellen (subG<sub>1</sub>) lag bei 14%. Dieser hohe Anteil an apoptotischen Zellen kann zum einen durch die experimentelle Aufarbeitung begründet gewesen sein und zum anderen daran gelegen haben, dass die 24 h Inkubation in konditioniertem Medium stattfand, in dem sich zum Zeitpunkt der Inkubation bereits apoptotische Zellen (z.B. Zellen, die beim Ausplattieren geschädigt wurden oder nicht an der Zellkulturschale anhafteten) befunden hatten. Eine Inkubation mit Sulforaphan führte zu keiner Verschiebung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen verglichen mit der Kontrolle. Berteroin und besonders Erucin bewirkten einen starken Anstieg der Zellen in der subG<sub>1</sub> Phase bei gleichzeitiger Abnahme der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Fraktion. Diese Reduktion war auch nach Inkubation mit Erysolin erkennbar, hier ging sie jedoch mit einer Zunahme der G<sub>2</sub>/M Fraktion statt mit einer subG<sub>1</sub> Fraktion einher. Dieser G<sub>2</sub>/M Anstieg war mit dem des als Positivkontrolle verwendeten Zytostatikums Doxorubicin vergleichbar und wurde so in der Literatur bisher nicht beschrieben. Zwar analysierten auch Kim et al. (2010) die Verteilung von Hct116 Zellen nach Inkubation mit Erysolin und Erucin, sie berichteten jedoch nur von einer Zunahme der subG<sub>1</sub> Population durch Erysolin (jedoch nicht durch Erucin), nicht aber von einem Einfluss auf die weitere Verteilung der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>/M Phase. In Hct116 Zellen konnten Singh et al. (2004a) nach 48 h Inkubation mit Sulforaphan (20  $\mu\text{M}$ ) einen Anstieg der G<sub>2</sub>/M Population um etwa 20% verglichen mit Kontrollzellen zeigen. Dieser Anstieg war in der vorliegenden Arbeit nicht zu beobachten, allerdings betrug die Inkuabtionszeit der Hct116 Zellen hier nur 24 h.

In H4IIE Zellen nahm die subG<sub>1</sub> Fraktion nach 24 h Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin bei allen vier Isothiocyanaten signifikant zu (>50%). Dies ging mit einer Abnahme der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Population auf unter 20% einher (vgl. Kontrollzellen ca. 60%). Eine 24 h Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin und Erucin führte zudem zu einer signifikanten Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>/M Phase. Im Gegensatz zu Hct116 Zellen konnte hier kein G<sub>2</sub>/M Arrest durch Erysolin beobachtet werden. Eine Inkubation mit Doxorubicin als Positivkontrolle hatte keinen Effekt auf die Verteilung der Zellen in den vier Phasen verglichen mit der Kontrolle. Um auszuschließen, dass die gewählte Inkubationszeit von 24 h zu kurz war, um Effekte von Doxorubicin festzustellen, wurde eine Zellzyklusanalyse nach 48 h Inkubation durchgeführt. Zwar war hier nicht der erwartete G<sub>2</sub>/M Arrest durch Doxorubicin zu sehen, die subG<sub>1</sub> Population nahm jedoch deutlich zu (zugunsten einer Abnahme der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Fraktion). Als mögliche Ursache für das Ausbleiben des G<sub>2</sub>/M Arrestes kann eine zu geringe effektive Konzentration an Doxorubicin (1 µM) gesehen werden. Nach 48 h Inkubation (10 µM) der H4IIE Zellen mit Isothiocyanaten war die subG<sub>1</sub> Population bei allen vier Substanzen weniger deutlich erhöht als nach 24 h Inkubation (25 µM). Ähnlich wie zuvor bei Hct116 Zellen war auch bei den H4IIE Zellen der Anteil an apoptotischen Zellen (subG<sub>1</sub>) in der Kontrolle sehr hoch. Dies ist vermutlich auf die experimentelle Aufarbeitung zurückzuführen.

In der Literatur finden sich einige Hinweise auf einen durch Isothiocyanate induzierten G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> oder G<sub>2</sub>/M Arrest in verschiedenen Krebszelllinien. Lamy et al. (2012) zeigten eine Zunahme von humanen primären Ovarialkarzinomzellen in der G<sub>2</sub>/M Phase nach 48 h Inkubation mit Erucin. Ein G<sub>2</sub>/M Arrest durch Erucin konnte zudem in Caco-2 Zellen von Jakubikova et al. (2005a) nachgewiesen werden. Sowohl Erucin als auch Sulforaphan induzierten einen Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M Phase in humanen Blasenkrebszellen (Abbaoui et al. 2012). Die beste Datenlage hinsichtlich der Auslösung eines G<sub>2</sub>/M Arrestes existieren für die Leitsubstanz Sulforaphan (u.a. Fimognari et al. 2002; Gamet-Payrastre et al. 2000; Jakubikova et al. 2005; Pappa et al. 2007; Singh et al. 2004; Tang und Zhang 2004; Zhang et al. 2003).

Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse der Zellzyklusanalyse eine signifikante Zunahme von apoptotischen Hct116 Zellen (subG<sub>1</sub> Population) durch Inkubation mit Berteroin und Erucin sowie ein G<sub>2</sub>/M Arrest durch Erysolin gezeigt werden. In H4IIE Zellen führten alle vier Isothiocyanate zu einer signifikant erhöhten subG<sub>1</sub> Fraktion, zusätzlich bewirkte eine Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin und Erucin einen G<sub>2</sub>/M Arrest.

Da DNA Strangbrüche als mögliche Ursache für den hier festgestellten Zellzyklusarrest potentiell in Frage kamen, wurde in weiteren Experimenten das genotoxische Potential der Isothiocyanate in H4IIE Zellen untersucht. Nach 6 h Inkubation zeigte sich bei der

Positivkontrolle eine deutliche Zunahme an DNA im Schweif, ein klares Anzeichen geschädigter DNA. DNA Strangbrüche wurden auch durch eine Inkubation der H4IIE Zellen mit Berteroin, Erucin und Erysolin erzeugt, jedoch weniger stark als bei der Positivkontrolle. Im Comet Assay zeigte sich nach 24 h Inkubation mit den Isothiocyanaten (25  $\mu\text{M}$ ) jedoch keine Zunahme der DNA im Schweif als Parameter für den Grad der DNA Schädigung. Auch bei der Positivkontrolle  $\text{H}_2\text{O}_2$  waren zu diesem Zeitpunkt keine DNA Strangbrüche detektierbar, was als Hinweis auf eine schnelle DNA Reparatur gewertet werden kann. In der Literatur finden sich bisher nur wenige Daten zum genotoxischen Potential der hier untersuchten Isothiocyanate. Lamy et al. (2008) berichten von schützenden Eigenschaften von Erucin und Erysolin in HepG2 Zellen, in denen beide Isothiocyanate die durch Benzo[a]pyren induzierten DNA Schäden um 40% (Erucin) bzw. 50% (Erysolin) reduzierten. Die gleichen Autoren berichten jedoch in einer weiteren Studie, dass sowohl Erucin als auch Berteroin abhängig von der verwendeten Konzentration neben antigenotoxischen Eigenschaften (bei Konzentrationen von  $\leq 1,0 \mu\text{M}$ ) auch ein genotoxisches Potential (bei Konzentrationen von 3-30  $\mu\text{M}$ ) besaßen (Lamy et al. 2009). In humanen T-Lymphozyten führte Erucin nicht zur Bildung von Mikrokernen und verfügte somit nicht über genotoxische Eigenschaften (Fimognari et al. 2005a). In weiteren Studien mit T-Lymphozyten zeigte eine Verwendung von Sulforaphan bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Genotoxizität (Fimognari et al. 2005; Sestili et al. 2010). Ein signifikanter DNA Schaden war in einer Studie von Sestili et al. (2010) durch eine Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Sulforaphan erkennbar, zudem war hier die Bildung von ROS kausal mit der Entstehung von DNA Schäden verbunden. Rudolf und Cervinka (2011) berichten von einer erhöhten Expression von phosphoryliertem ( $\gamma$ )H2A.X, einem allgemeinen Marker für DNA Schäden, durch eine 48 h Exposition von Hct116 Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Sulforaphan.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Isothiocyanate auf den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in H4IIE Zellen mit einem Reporterassay (SEAP Assay) untersucht. NF $\kappa$ B ist unter anderem an der Regulation der Zellproliferation beteiligt und nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation pro- und antiapoptotischer Signale ein. Eine Behandlung der H4IIE Zellen mit TNF $\alpha$ , einem potenten Aktivator von NF $\kappa$ B, führte zu einer deutlichen Zunahme der NF $\kappa$ B-abhängigen SEAP-Aktivität (etwa 4,5 bis 5-fach verglichen mit der Kontrolle). Eine Vorinkubation der Zellen mit 2,5  $\mu\text{M}$  Sulforaphan, Berteroin oder Erucin bewirkte eine signifikante Reduktion der TNF $\alpha$ -induzierten NF $\kappa$ B-Aktivität. Den deutlichsten Effekt hinsichtlich der Inhibierung dieses Transkriptionsfaktors zeigte Erysolin. Hier führte bereits eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Erysolin zu einer signifikanten Reduktion der TNF $\alpha$ -induzierten NF $\kappa$ B-abhängigen SEAP-Aktivität, welche mit 5  $\mu\text{M}$  Erysolin um die Hälfte reduziert war. Der dosisabhängige inhibitorische Effekt von Erysolin auf die Aktivität

des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Für Sulforaphan konnte dagegen in einigen Zelllinien eine Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivität gezeigt werden. Joeng et al. (2004) untersuchten verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe hinsichtlich einer Modulation der NF $\kappa$ B-Aktivität in Kolonkarzinomzellen (HT-29) und stellten eine signifikant reduzierte LPS-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivität durch Sulforaphan (10  $\mu$ M) fest. In Prostatakarzinomzellen (PC-3) fanden Xu et al. (2005) eine verminderte NF $\kappa$ B-Aktivität durch die Inhibierung der I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung und Degradation sowie durch eine Abnahme der nukleären Translokation der p65 Untereinheit nach Inkubation mit Sulforaphan. Den gleichen Effekt zeigten Moon et al. (2009b) in humanen Leukämiezellen (THP-1, HL-60, U937 und K562) nach Inkubation mit Sulforaphan (5  $\mu$ M). Diese Autoren fanden zudem zweifach erhöhte ROS Werte sowie eine Induktion von Apoptose durch eine Co-Inkubation von Sulforaphan und TNF $\alpha$ . Anhand dieser Daten schlossen Moon et al., dass die durch Sulforaphan und TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose durch ROS Akkumulation und Unterdrückung der NF $\kappa$ B-Aktivität vermittelt wird. In einigen Krebszellen wie denen des Kolons, der Brust und der Leber wurde eine konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B festgestellt (Übersichtsartikel von Baud und Karin 2009). Diese Fehlregulation von NF $\kappa$ B steht durch die Regulation von Genen, die mit Proliferation, Angiogenese, Metastasierung, Tumorpromotion, Inflammation und Inhibierung von Apoptose assoziiert sind, mit allen sechs Charakteristika (‘hallmarks’) von Krebs (Übersichtsartikel von Hanahan und Weinberg 2000) in Verbindung (Übersichtsartikel von Baud und Karin 2009). Somit stellt die in dieser Arbeit beobachtete Inhibierung der NF $\kappa$ B-Aktivität durch Sulforaphan, Berteroin, Erucin und Erysolin möglicherweise einen wichtigen Mechanismus der chemopräventiven Eigenschaften der verwendeten Isothiocyanate dar. Weitere Studien sind jedoch nötig, um die genauen modulatorischen Mechanismen zwischen dem beobachteten Anstieg der intrazellulären ROS Konzentration, der Induktion von Apoptose, dem G<sub>2</sub>/M Arrest und dem Einfluss auf die NF $\kappa$ B-abhängige Signaltransduktion zu verstehen.

## **6. Zusammenfassung**

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine obst- und gemüsereiche Ernährung mit einer verringerten Rate bestimmter Krebsarten assoziiert ist. In dieser Arbeit wurden daher in Kolonkarzinom- und Hepatomzellen zelluläre Effekte verschiedener Klassen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonoide und Isothiocyanate) untersucht. Im zellfreien System zeigten ausgesuchte Verbindungen aus der Klasse der Hydroxyzimtsäurederivate ein ausgeprägtes antioxidatives Potential. Diese antioxidativen Eigenschaften konnten jedoch im zellulären System nicht bestätigt werden (DCF-Assay). Die Bestimmung der intrazellulären Gehalte von Hydroxyzimtsäurederivaten in Hct116 Zellen ergab nur sehr niedrige Werte, was eine Erklärung für das Fehlen der antioxidativen Effekte im zellulären System wäre. Im Gegensatz hierzu werden Flavonoide im Allgemeinen besser aufgenommen und auch metabolisiert. Methylierte Derivate der Flavonoide Quercetin und Myricetin wurden verwendet, um den Einfluss der Methylierung auf das antioxidative Potential, die Toxizität und die zelluläre Aufnahme zu untersuchen. Eine Methylierung der Hydroxylgruppe im B-Ring reduzierte die antioxidative Kapazität der untersuchten Flavonoid-Derivate. Antioxidative Effekte der Myricetin-Derivate konnten auch im Modellorganismus *C. elegans* gezeigt werden, jedoch war hier keine Reduktion der Wirkung durch die Methylierung festzustellen. Der Einfluss der Methylierung auf die Toxizität war ebenfalls nicht eindeutig: Zwar waren sowohl die methylierten Quercetin-Derivate als auch die Myricetin-Derivate toxischer als die Ausgangssubstanzen, die jeweilige Toxizität der Derivate variierte jedoch zwischen Hepatom- und Kolonkarzinomzellen. Eine erste Abschätzung der intrazellulären Konzentration sowie der subzellulären Lokalisation der Flavonoide wurde durch Komplexierung mit dem Fluoreszenzverstärker NSRA nachgewiesen, weiterführende Untersuchungen wurden mittels HPLC durchgeführt. Die intrazellulären Gehalte der Myricetin-Derivate stiegen mit zunehmender Methylierung im B-Ring an, in Bezug auf die Metabolisierung wurde hingegen eher bei Myricetin und Laricitrin die Bildung von Metaboliten festgestellt. Untersuchungen bei 4°C legten z.B. für Myricetin-Trimethylether eine Beteiligung aktiver Transportprozesse an der zellulären Aufnahme nahe. Es konnte gezeigt werden, dass Myricetin-Trimethylether ein Substrat des ABC Transporters P-gp darstellt, wohingegen Laricitrin und Myricetin Substrate von MRP2 sind. Als weitere Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe wurden Isothiocyanate untersucht. Im Gegensatz zu den vorher dargestellten Substanzklassen bewirkten die Substanzen im DCF Assay eine Erhöhung der intrazellulären ROS Konzentration. Die prooxidativen Effekte der Substanzen konnten durch eine zusätzliche Inkubation mit N-Acetylcystein reduziert werden. Die Isothiocyanate zeigten die am stärksten ausgeprägte Toxizität aller untersuchten Substanzen mit EC<sub>50</sub> Werten im unteren mikromolaren Bereich. In Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Zytotoxizität konnte gezeigt werden, dass hierbei hauptsächlich apoptotische Prozesse (Caspase 3/7 Aktivierung) eine Rolle spielen. Zudem löste Erysolin einen G<sub>2</sub>/M Arrest in Hct116 Zellen aus, eine 24 h Inkubation mit Sulforaphan, Berteroin und Erucin arretierte H4IIE Zellen in der G<sub>2</sub>/M Phase. Die Isothiocyanate bewirkten zudem schon in geringen Konzentrationen eine Inhibition der TNF $\alpha$ -stimulierten NF $\kappa$ B-Aktivität. Die hier gezeigte Beeinflussung spezifischer zellulärer Funktionen kann als Erklärungsmöglichkeit der chemopräventiven Eigenschaften von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen herangezogen werden.

## **6. Summary**

Epidemiological studies have shown an association between a diet rich in fruits and vegetables and a reduced risk for certain types of cancer. Thus, we investigated cellular effects of selected classes of secondary plant compounds (e.g., hydroxycinnamic acid derivatives, flavonoids and isothiocyanates) in coloncarcinoma and hepatoma cell lines. Hydroxycinnamic acid derivatives showed a strong antioxidant capacity in a cell free system but, however, not in cultured cells (DCF assay). The intracellular amounts of hydroxycinnamic acid derivatives in Hct116 cells measured by HPLC were quite low, thus, being a possible explanation for the missing antioxidative capacity in these cells. The absorption of flavonoids was higher compared to the hydroxycinnamic acid derivatives and these compounds were further metabolized by the cells. In order to investigate the influence of the hydroxylation of the B-ring with respect to antioxidative capacity, toxicity and cellular uptake we used methylated quercetin- and myricetin-derivatives. We found that methylation of the B-ring reduced the antioxidative capacity of the derivatives. Antioxidative effects of the methylated myricetin-derivatives could also be shown in the model organism *C. elegans*, however, no effect of the methylation was observed. The influence of the methylation on toxicity was dependent on the cell line and was higher for the methylated derivatives compared to their non-methylated counterparts. We used the fluorescence enhancer NSRA as well as HPLC based methods to analyze the intracellular amount and the localization of these flavonoids. The intracellular concentration increased with an increasing number of methyl groups in the B-ring. Metabolization of the flavonoids could only be observed for myricetin and laricitrin but not for the higher methylated derivatives syringetin and myricetin-trimethylether. By performing experiments at 4°C we could show that myricetin-trimethylether might be absorbed actively. Furthermore, myricetin-trimethylether could be a substrate of the ABC transporter P-gp, while myricetin and laricitrin were shown to be substrates of the MRP2 transporter. Another class of secondary plant compounds - isothiocyanates - caused an increase in the intracellular amount of ROS. This prooxidant effect could be reversed by combined incubation with N-acetylcysteine. Moreover, the isothiocyanates showed the strongest cytotoxic effect of all compounds analyzed in this work with EC<sub>50</sub> values in the low micromolar range. By investigating the molecular mechanism of cell death we could show that apoptosis (e.g. by Caspase 3/7 activation) was the main cause of cell death. Erysoin further induced a cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>/M phase in Hct116 cells, sulforaphan, berteroin and erucin induced the same arrest in H4IIE cells. By using low amounts of isothiocyanates we were able to show a reduction of the TNF $\alpha$ -dependent NF $\kappa$ B activation in H4IIE cells. In conclusion, secondary plant compounds were able to modulate specific cellular functions which might be a possible explanation for their chemopreventive properties.



## **7. Literaturverzeichnis**

(1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.

Abbaoui, B., Riedl, K.M., Ralston, R.A., Thomas-Ahner, J.M., Schwartz, S.J., Clinton, S.K. and Mortazavi, A. (2012) Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: Characterization, metabolism, and interconversion. *Mol Nutr Food Res* 56, 1675-1687.

Abbas, S. and Wink, M. (2009) Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med* 75, 216-221.

Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigne, C. and Remesy, C. (2002) The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr* 132, 1962-1968.

Alvarez, A.I., Real, R., Perez, M., Mendoza, G., Prieto, J.G. and Merino, G. (2009) Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* 99, 598-617.

Ambrosone, C.B., McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Zhang, Y. and Shields, P.G. (2004) Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr* 134, 1134-1138.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7915-7922.

Androutsopoulos, V., Wilsher, N., Arroo, R.R. and Potter, G.A. (2009) Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. *Cancer Lett* 274, 54-60.

Androutsopoulos, V.P. and Spandidos, D.A. (2012) The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *J Nutr Biochem*.

Arts, I.C. and Hollman, P.C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81, 317S-325S.

Artursson, P., Ungell, A.L. and Lofroth, J.E. (1993) Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res* 10, 1123-1129.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Aura, A.M., O'Leary, K.A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimia, R., Nuutila, A.M., Oksman-Caldentey, K.M. and Poutanen, K. (2002) Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* 50, 1725-1730.

Azar, M., Verette, E. and Brun, S. (1987) Identification of Some Phenolic Compounds in Bilberry Juice *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Food Science* 52, 1255-1257.

Barnhart, B.C., Alappat, E.C. and Peter, M.E. (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.

Baud, V. and Karin, M. (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8, 33-40.

Bell, J.R., Donovan, J.L., Wong, R., Waterhouse, A.L., German, J.B., Walzem, R.L. and Kasim-Karakas, S.E. (2000) (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 71, 103-108.

- Bertl, E., Bartsch, H. and Gerhauser, C. (2006) Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 5, 575-585.
- Bertram, C. and Hass, R. (2008) Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem* 389, 211-220.
- Boersma, A.W., Nooter, K., Oostrum, R.G. and Stoter, G. (1996) Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry* 24, 123-130.
- Bonnesen, C., Eggleston, I.M. and Hayes, J.D. (2001) Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* 61, 6120-6130.
- Boots, A.W., Haenen, G.R. and Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585, 325-337.
- Bosch, T.M., Meijerman, I., Beijnen, J.H. and Schellens, J.H. (2006) Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet* 45, 253-285.
- Boulton, D.W., Walle, U.K. and Walle, T. (1999) Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol* 51, 353-359.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Burow, S. and Valet, G. (1987) Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). *Eur J Cell Biol* 43, 128-133.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22, 749-760.
- Cermak, R. (2008) Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 17-35.
- Chabane, M.N., Ahmad, A.A., Peluso, J., Muller, C.D. and Ubeaud-Séquier, G. (2009) Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61, 1473-1483.
- Chang, H., Mi, M., Ling, W., Zhu, J., Zhang, Q., Wei, N., Zhou, Y., Tang, Y. and Yuan, J. (2008) Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro. *Arch Pharm Res* 31, 1137-1144.
- Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D. and Kong, A.N. (2000) Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 23, 605-612.
- Chen, J.H. and Ho, C.-T. (1997) Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2374-2378.
- Chesson, A., Provan, G.J., Russell, W.R., Scobbie, L., Richardson, A.J. and Stewart, C. (1999) Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 373-378.
- Cheung, K.L. and Kong, A.N. (2010) Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J* 12, 87-97.

- Chiao, J.W., Chung, F.L., Kancherla, R., Ahmed, T., Mittelman, A. and Conaway, C.C. (2002) Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 20, 631-636.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P. and Rahmani, M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68, 307-312.
- Choi, W.Y., Choi, B.T., Lee, W.H. and Choi, Y.H. (2008) Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biomed Pharmacother* 62, 637-644.
- Chung, F.L., Jiao, D., Getahun, S.M. and Yu, M.C. (1998) A urinary biomarker for uptake of dietary isothiocyanates in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 7, 103-108.
- Cipollini, D., Stevenson, R., Enright, S., Eyles, A. and Bonello, P. (2008) Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. *J Chem Ecol* 34, 144-152.
- Circu, M.L. and Aw, T.Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48, 749-762.
- Clarke, J.D., Dashwood, R.H. and Ho, E. (2008) Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* 269, 291-304.
- Clifford, M.N. (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1033-1043.
- Clifford, M.N. (2004) Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med* 70, 1103-1114.
- Cohen, J.J. (1993) Apoptosis. *Immunol Today* 14, 126-130.
- Corcoran, M.P., McKay, D.L. and Blumberg, J.B. (2012) Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr* 31, 176-189.
- Cremin, P., Kasim-Karakas, S. and Waterhouse, A.L. (2001) LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 49, 1747-1750.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. and Remesy, C. (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277, G120-126.
- Cuvelier, M.E. (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 324.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scaccocchio, B. and Masella, R. (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* 11, 1321-1342.
- Das, N. and Pereira, T. (1990) Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67, 255-258.
- Das, N.P. (1971) Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem Pharmacol* 20, 3435-3445.
- Day, A.J., Bao, Y., Morgan, M.R. and Williamson, G. (2000b) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 29, 1234-1243.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R. and Williamson, G. (2000a) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468, 166-170.

- Degterev, A., Boyce, M. and Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Dinkova-Kostova, A.T. and Kostov, R.V. (2012) Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med* 18, 337-347.
- Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. (1999) Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20, 911-914.
- Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1, S128-138.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W. and Vina-Ribes, J. (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 80 Suppl 1, S77-112.
- Doudican, N.A., Bowling, B. and Orlow, S.J. (2010) Enhancement of arsenic trioxide cytotoxicity by dietary isothiocyanates in human leukemic cells via a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Leuk Res* 34, 229-234.
- Duncan, A.J., Rabot, S. and Nugon-Baudon, L. (1997) Urinary Mercapturic Acids as Markers for the Determination of Isothiocyanate Release from Glucosinolates in Rats Fed a Cauliflower Diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 214-220.
- Egert, S. and Rimbach, G. (2011) Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Adv Nutr* 2, 8-14.
- Egner, P.A., Chen, J.G., Wang, J.B., Wu, Y., Sun, Y., Lu, J.H., Zhu, J., Zhang, Y.H., Chen, Y.S., Friesen, M.D., Jacobson, L.P., Munoz, A., Ng, D., Qian, G.S., Zhu, Y.R., Chen, T.Y., Botting, N.P., Zhang, Q., Fahey, J.W., Talalay, P., Groopman, J.D. and Kensler, T.W. (2011) Bioavailability of Sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 384-395.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. and et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-1174.
- Epplein, M., Wilkens, L.R., Tiirikainen, M., Dyba, M., Chung, F.L., Goodman, M.T., Murphy, S.P., Henderson, B.E., Kolonel, L.N. and Le Marchand, L. (2009) Urinary isothiocyanates; glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms; and risk of colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 314-320.
- Erdman, J.W., Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowes, J. (2007) Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 137, 718S-737S.
- Ernst, I.M., Wagner, A.E., Lipinski, S., Skrbek, S., Ruefer, C.E., Desel, C. and Rimbach, G. (2010) Cellular uptake, stability, visualization by 'Naturstoff reagent A', and multidrug resistance protein 1 gene-regulatory activity of cyanidin in human keratinocytes. *Pharmacol Res* 61, 253-258.
- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T. and Tomas-Barberan, F.A. (2007) Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 68, 2986-3008.
- Fahey, J.W. and Talalay, P. (1999) Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 37, 973-979.
- Fahey, J.W., Zhang, Y. and Talalay, P. (1997) Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10367-10372.

- Farrell, T.L., Dew, T.P., Poquet, L., Hanson, P. and Williamson, G. (2011) Absorption and metabolism of chlorogenic acids in cultured gastric epithelial monolayers. *Drug Metab Dispos* 39, 2338-2346.
- Ferguson, P.J., Kurowska, E., Freeman, D.J., Chambers, A.F. and Koropatnick, D.J. (2004) A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr* 134, 1529-1535.
- Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P. (2005b) Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environ Mol Mutagen* 46, 260-267.
- Fimognari, C., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P. (2005a) Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 582, 1-10.
- Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P. (2002) Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* 23, 581-586.
- Fimognari, C., Turrini, E., Ferruzzi, L., Lenzi, M. and Hrelia, P. (2012) Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat Res* 750, 107-131.
- Finch, C.E. and Ruvkun, G. (2001) The genetics of aging. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 435-462.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fogh, J., Fogh, J.M. and Orfeo, T. (1977b) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
- Fogh, J., Wright, W.C. and Loveless, J.D. (1977a) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Foo, R.S., Mani, K. and Kitsis, R.N. (2005) Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115, 565-571.
- Forsmark, P., Aberg, F., Norling, B., Nordenbrand, K., Dallner, G. and Ernster, L. (1991) Inhibition of lipid peroxidation by ubiquinol in submitochondrial particles in the absence of vitamin E. *FEBS Lett* 285, 39-43.
- Fraga, C.G. (2007) Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life* 59, 308-315.
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V. and Oteiza, P.I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31, 435-445.
- Frejnagel, S. and Wroblewska, M. (2010) Comparative effect of green tea, chokeberry and honeysuckle polyphenols on nutrients and mineral absorption and digestibility in rats. *Ann Nutr Metab* 56, 163-169.
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. (2002) The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol Pharm Bull* 25, 19-23.
- Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. and Fraga, C.G. (2010) Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys* 501, 23-30.
- Gamet-Payrastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J. and Terce, F. (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60, 1426-1433.

- Gao, X., Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. (2001) Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15221-15226.
- Gardana, C., Guarnieri, S., Riso, P., Simonetti, P. and Porrini, M. (2007) Flavanone plasma pharmacokinetics from blood orange juice in human subjects. *Br J Nutr* 98, 165-172.
- Gasper, A.V., Al-Janobi, A., Smith, J.A., Bacon, J.R., Fortun, P., Atherton, C., Taylor, M.A., Hawkey, C.J., Barrett, D.A. and Mithen, R.F. (2005) Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin Nutr* 82, 1283-1291.
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G. and Johnson, I.T. (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130, 2765-2771.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J. and Los, M. (2009) Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* 46, 497-510.
- Gillett, C.E. and Barnes, D.M. (1998) Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 51, 310-316.
- Girenavar, B., Poulouse, S.M., Jayaprakasha, G.K., Bhat, N.G. and Patil, B.S. (2006) Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP 1B1 isoenzymes. *Bioorg Med Chem* 14, 2606-2612.
- Gomez-Alonso, S., Collins, V.J., Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G. and Spencer, J.P.E. (2012) Inhibition of colon adenocarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to a G2/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression. *Food Chemistry* 130, 493-500.
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S.E., Daniel, H. and Spanier, B. (2012) Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech Ageing Dev* 133, 1-10.
- Gulcin, I. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86, 345-391.
- Hagenbuch, B. and Meier, P.J. (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447, 653-665.
- Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476, 107-112.
- Halliwell, B. and Cross, C.E. (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10, 5-12.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanneken, A., Lin, F.F., Johnson, J. and Maher, P. (2006) Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 3164-3177.
- Harborne, J.B. (1994) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M. and Lines, T.C. (2007) A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 45, 2179-2205.
- Hasegawa, K., Miwa, S., Tsutsumiuchi, K. and Miwa, J. (2010) Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. *PLoS One* 5, e9267.

- Hayes, J.D., Kelleher, M.O. and Eggleston, I.M. (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 47 Suppl 2, 73-88.
- Hegedus, C., Szakacs, G., Homolya, L., Orban, T.I., Telbisz, A., Jani, M. and Sarkadi, B. (2009) Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 47-56.
- Herr, I. and Büchler, M.W. (2010) Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat Rev* 36, 377-383.
- Hibasami, H., Mitani, A., Katsuzaki, H., Imai, K., Yoshioka, K. and Komiya, T. (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, 805-809.
- Holst, B. and Williamson, G. (2004) A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* 21, 425-447.
- Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P. and Roos, D. (1995) Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85, 532-540.
- Hong, J., Lambert, J.D., Lee, S.H., Sinko, P.J. and Yang, C.S. (2003) Involvement of multidrug resistance-associated proteins in regulating cellular levels of (-)-epigallocatechin-3-gallate and its methyl metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 222-227.
- Hoskins, J.A. (1984) The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. *J Appl Toxicol* 4, 283-292.
- Hu, M.L. (2011) Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J* 34, 449-460.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G. and Artursson, P. (2007) Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* 2, 2111-2119.
- Hurrell, R.F., Reddy, M. and Cook, J.D. (1999) Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr* 81, 289-295.
- Jakubikova, J., Bao, Y. and Sedlak, J. (2005b) Isothiocyanates induce cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial potential depolarization in HL-60 and multidrug-resistant cell lines. *Anticancer Res* 25, 3375-3386.
- Jakubikova, J., Sedlak, J., Mithen, R. and Bao, Y. (2005a) Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 69, 1543-1552.
- Jaramillo, S., Lopez, S., Varela, L.M., Rodriguez-Arcos, R., Jimenez, A., Abia, R., Guillen, R. and Muriana, F.J. (2010) The Flavonol Isorhamnetin Exhibits Cytotoxic Effects on Human Colon Cancer Cells. *J Agric Food Chem*.
- Jeong, W.S., Kim, I.W., Hu, R. and Kong, A.N. (2004) Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharm Res* 21, 661-670.
- Johnson, T.E., Henderson, S., Murakami, S., de Castro, E., de Castro, S.H., Cypser, J., Rikke, B., Tedesco, P. and Link, C. (2002) Longevity genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* also mediate increased resistance to stress and prevent disease. *J Inherit Metab Dis* 25, 197-206.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M.G. (1994) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116, 4846-4851.
- Juge, N., Mithen, R.F. and Traka, M. (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* 64, 1105-1127.

- Kampkötter, A., Nkwonkam, C.G., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W. and Kahl, R. (2007) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234, 113-123.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P. and Watjen, W. (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149, 314-323.
- Kanazawa, K., Uehara, M., Yanagitani, H. and Hashimoto, T. (2006) Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 455, 197-203.
- Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Georganakis, M. and Niopas, I. (2007) Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr* 61, 472-477.
- Kern, S.M., Bennett, R.N., Needs, P.W., Mellon, F.A., Kroon, P.A. and Garcia-Conesa, M.T. (2003) Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 51, 7884-7891.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kiang, T.K., Ensom, M.H. and Chang, T.K. (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106, 97-132.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. and Taniguchi, H. (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 50, 2161-2168.
- Kim, H., Kim, E.H., Eom, Y.W., Kim, W.H., Kwon, T.K., Lee, S.J. and Choi, K.S. (2006b) Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of DR5. *Cancer Res* 66, 1740-1750.
- Kim, J.D., Liu, L., Guo, W. and Meydani, M. (2006a) Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J Nutr Biochem* 17, 165-176.
- Kim, M.J., Kim, S.H. and Lim, S.J. (2010) Comparison of the apoptosis-inducing capability of sulforaphane analogues in human colon cancer cells. *Anticancer Res* 30, 3611-3619.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588.
- Kitsati, N., Fokas, D., Ouzouni, M.D., Mantzaris, M.D., Barbouti, A. and Galaris, D. (2012) Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *J Agric Food Chem* 60, 7873-7879.
- Klaassen, C.D., Casarett, L.J. and Doull, J. (2008) *Casarett & Doull's toxicology : the basic science of poisons*, McGraw-Hill Med. , New York.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J. and Mitchell-Olds, T. (2005) The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Curr Opin Plant Biol* 8, 264-271.
- Knowles, B.B., Howe, C.C. and Aden, D.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Kobayashi, M. and Yamamoto, M. (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46, 113-140.
- Kobayashi, S. and Konishi, Y. (2008) Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 23-29.



- Koepsell, H. and Endou, H. (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 447, 666-676.
- Konishi, Y. and Kobayashi, S. (2004) Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 52, 2518-2526.
- Konishi, Y. and Shimizu, M. (2003) Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 856-862.
- Konishi, Y., Hitomi, Y., Yoshida, M. and Yoshioka, E. (2005) Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 53, 4740-4746.
- Konishi, Y., Kobayashi, S. and Shimizu, M. (2003) Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 2317-2324.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619-642.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C. and Williamson, G. (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80, 15-21.
- Kuhnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24, 117-191.
- Kuhnle, G., Spencer, J.P., Schroeter, H., Shenoy, B., Debnam, E.S., Srari, S.K., Rice-Evans, C. and Hahn, U. (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 507-512.
- Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 38, 133-142.
- Lam, T.K., Gallicchio, L., Lindsley, K., Shiels, M., Hammond, E., Tao, X.G., Chen, L., Robinson, K.A., Caulfield, L.E., Herman, J.G., Guallar, E. and Alberg, A.J. (2009) Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 184-195.
- Lamy, E., Crossmann, C., Saeed, A., Schreiner, P.R., Kotke, M. and Mersch-Sundermann, V. (2009) Three structurally homologous isothiocyanates exert "Janus" characteristics in human HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen* 50, 164-170.
- Lamy, E., Oey, D., Eissmann, F., Herz, C., Munstedt, K., Tinneberg, H.R. and Mersch-Sundermann, V. (2012) Erucin and Benzyl Isothiocyanate Suppress Growth of Late Stage Primary Human Ovarian Carcinoma Cells and Telomerase Activity In Vitro. *Phytother Res*.
- Lamy, E., Schroder, J., Paulus, S., Brenk, P., Stahl, T. and Mersch-Sundermann, V. (2008) Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food Chem Toxicol* 46, 2415-2421.
- Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M.L., Giuliano, G., Merlo Pich, M., Paolucci, U., Parenti Castelli, G. and Ventura, B. (2002) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 959, 199-213.
- Lesser, S., Cermak, R. and Wolfram, S. (2004) Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr* 134, 1508-1511.
- Lewis, J.A. and Fleming, J.T. (1995) Basic culture methods. *Methods Cell Biol* 48, 3-29.
- Li, L., Henry, G.E. and Seeram, N.P. (2009) Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *J Agric Food Chem* 57, 7282-7287.
- Liu, L., Hudgins, W.R., Shack, S., Yin, M.Q. and Samid, D. (1995) Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *Int J Cancer* 62, 345-350.

- Lotito, S.B. and Frei, B. (2006) Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J Biol Chem* 281, 37102-37110.
- Lotito, S.B., Zhang, W.J., Yang, C.S., Crozier, A. and Frei, B. (2011) Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 51, 454-463.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Manach, C. and Donovan, J.L. (2004) Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 38, 771-785.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. and Remesy, C. (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426, 331-336.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.
- Manthey, J.A. and Guthrie, N. (2002) Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J Agric Food Chem* 50, 5837-5843.
- Mateos, R., Goya, L. and Bravo, L. (2006) Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem* 54, 8724-8732.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
- Mennicke, W.H., Görler, K. and Krumbiegel, G. (1983) Metabolism of some naturally occurring isothiocyanates in the rat. *Xenobiotica* 13, 203-207.
- Mennicke, W.H., Görler, K., Krumbiegel, G., Lorenz, D. and Rittmann, N. (1988) Studies on the metabolism and excretion of benzyl isothiocyanate in man. *Xenobiotica* 18, 441-447.
- Messina, M. and Redmond, G. (2006) Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid* 16, 249-258.
- Michaud, D.S., Spiegelman, D., Clinton, S.K., Rimm, E.B., Willett, W.C. and Giovannucci, E.L. (1999) Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *J Natl Cancer Inst* 91, 605-613.
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V. and Pellegrini, N. (2008) Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J Agric Food Chem* 56, 139-147.
- Mitsunaga, Y., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., Ohtani, H. and Sawada, Y. (2000) Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol* 395, 193-201.
- Moon, D.-O., Kim, M.-O., Kang, S.-H., Choi, Y.H. and Kim, G.-Y. (2009a) Sulforaphane suppresses TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Letters* 274, 132-142.

- Moon, D.O., Kim, M.O., Kang, S.H., Choi, Y.H. and Kim, G.Y. (2009b) Sulforaphane suppresses TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett* 274, 132-142.
- Moon, Y.J., Wang, X. and Morris, M.E. (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20, 187-210.
- Morales, P. and Haza, A.I. (2012) Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J Appl Toxicol* 32, 986-993.
- Morris, M.E. and Zhang, S. (2006) Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci* 78, 2116-2130.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mukai, R., Shirai, Y., Saito, N., Yoshida, K. and Ashida, H. (2009) Subcellular localization of flavonol aglycone in hepatocytes visualized by confocal laser scanning fluorescence microscope. *Cytotechnology* 59, 177-182.
- Murata, M., Yamashita, N., Inoue, S. and Kawanishi, S. (2000) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radic Biol Med* 28, 797-805.
- Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A. and Fogliano, V. (2004) Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J Agric Food Chem* 52, 6526-6531.
- Neu, R. (1957) Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als Reagenzien für den Nachweis von Oxyphenyl-benzo- $\gamma$ -pyronen. *Naturwissenschaften* 44, 181-182.
- Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Ninomiya, M., Nishida, K., Tanaka, K., Watanabe, K. and Koketsu, M. (2012) Structure-activity relationship studies of 5,7-dihydroxyflavones as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL-60 cells. *J Nat Med*.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C. and Katan, M.B. (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131, 66-71.
- Orhan, D.D., Ozcelik, B., Ozgen, S. and Ergun, F. (2009) Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res* 165, 496-504.
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.P., Macia, A. and Motilva, M.J. (2009) Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem* 57, 5743-5749.
- Pappa, G., Bartsch, H. and Gerhauser, C. (2007) Biphasic modulation of cell proliferation by sulforaphane at physiologically relevant exposure times in a human colon cancer cell line. *Mol Nutr Food Res* 51, 977-984.
- Park, S.Y., Kim, G.Y., Bae, S.J., Yoo, Y.H. and Choi, Y.H. (2007) Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncol Rep* 18, 181-187.
- Perez-Jimenez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Diaz-Rubio, M.E., Garcia-Diz, L., Goni, I. and Saura-Calixto, F. (2009) Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum Nutr* 64, 102-107.

Perkins, N.D. and Gilmore, T.D. (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13, 759-772.

Pham, N.A., Jacobberger, J.W., Schimmer, A.D., Cao, P., Gronda, M. and Hedley, D.W. (2004) The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol Cancer Ther* 3, 1239-1248.

Pledge-Tracy, A., Sobolewski, M.D. and Davidson, N.E. (2007) Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 6, 1013-1021.

Poppenga, R.H. (2001) Risks associated with the use of herbs and other dietary supplements. *Vet Clin North Am Equine Pract* 17, 455-477, vi-vii.

Poquet, L., Clifford, M.N. and Williamson, G. (2008) Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab Dispos* 36, 190-197.

Porrini, M. and Riso, P. (2008) Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18, 647-650.

Pouget, C., Lauthier, F., Simon, A., Fagnere, C., Basly, J.P., Delage, C. and Chulia, A.J. (2001) Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 3095-3097.

Prasain, J.K., Carlson, S.H. and Wyss, J.M. (2010) Flavonoids and age-related disease: risk, benefits and critical windows. *Maturitas* 66, 163-171.

Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T. and Kroymann, J. (2002) Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11223-11228.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237.

Record, I.R., McInerney, J.K. and Dreosti, I.E. (1996) Black tea, green tea, and tea polyphenols. Effects on trace element status in weanling rats. *Biol Trace Elem Res* 53, 27-43.

Rendic, S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34, 83-448.

Reuber, M.D. (1961) A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J Natl Cancer Inst* 26, 891-899.

Rice-Evans, C. and Burdon, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid research* 32, 71-110.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.

Robbins, R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 51, 2866-2887.

Roques, S.C., Landrault, N., Teissedre, P.L., Laurent, C., Besancon, P., Rouane, J.M. and Caporiccio, B. (2002) Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid. *Free Radic Res* 36, 593-599.

Rose, P., Faulkner, K., Williamson, G. and Mithen, R. (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 21, 1983-1988.

- Rose, P., Whiteman, M., Huang, S.H., Halliwell, B. and Ong, C.N. (2003) beta-Phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci* 60, 1489-1503.
- Ross, J.A. and Kasum, C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22, 19-34.
- Rozema, J., Bjorn, L.O., Bornman, J.F., Gaberscik, A., Hader, D.P., Trost, T., Germ, M., Klisch, M., Groniger, A., Sinha, R.P., Lebert, M., He, Y.Y., Buffoni-Hall, R., de Bakker, N.V., van de Staaïj, J. and Meijkamp, B.B. (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, 2-12.
- Rudolf, E. and Cervinka, M. (2011) Sulforaphane induces cytotoxicity and lysosome- and mitochondria-dependent cell death in colon cancer cells with deleted p53. *Toxicol In Vitro* 25, 1302-1309.
- Ruhl, S. (2009) Aufnahme und Metabolismus von Flavonoiden in Zellkultursystemen und im Rattenmodell. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Rust, C. and Gores, G.J. (2000) Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 108, 567-574.
- Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P. and Winston, M. (2006) Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: a summary of a statement for professionals from the american heart association nutrition committee. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1689-1692.
- Sauer, H., Wartenberg, M. and Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11, 173-186.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R. and Steinberg, C.E. (2008) Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev* 129, 611-613.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Sturzenbaum, S.R. and Steinberg, C.E. (2009) Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mech Ageing Dev* 130, 477-486.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. and Remesy, C. (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56, 276-282.
- Schierenberg, E. and Cassada, R. (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans* — ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biologie in unserer Zeit* 16, 1-7.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K. and Urbatsch, I.L. (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett* 377, 285-289.
- Sestili, P., Paolillo, M., Lenzi, M., Colombo, E., Vallorani, L., Casadei, L., Martinelli, C. and Fimognari, C. (2010) Sulforaphane induces DNA single strand breaks in cultured human cells. *Mutat Res* 689, 65-73.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T. and Misra, A. (2006) Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog* 22, 186-198.
- Shahidi, F. (1997) Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications, AOCS Press, Champaign.
- Shapiro, T.A., Fahey, J.W., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Stephenson, K.K., Wade, K.L., Ye, L. and Talalay, P. (2006) Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer* 55, 53-62.

- Shapiro, T.A., Fahey, J.W., Wade, K.L., Stephenson, K.K. and Talalay, P. (1998) Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 1091-1100.
- Shirai, M., Kawai, Y., Yamanishi, R., Kinoshita, T., Chuman, H. and Terao, J. (2006) Effect of a conjugated quercetin metabolite, quercetin 3-glucuronide, on lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells. *Free Radic Res* 40, 1047-1053.
- Shishu, Singla, A.K. and Kaur, I.P. (2003) Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulphoraphane--an isothiocyanate isolated from radish. *Planta Med* 69, 184-186.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295.
- Silberberg, M., Morand, C., Mathevon, T., Besson, C., Manach, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2006) The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr* 45, 88-96.
- Silva, A.R., Pinheiro, A.M., Souza, C.S., Freitas, S.R., Vasconcellos, V., Freire, S.M., Velozo, E.S., Tardy, M., El-Bacha, R.S., Costa, M.F. and Costa, S.L. (2008) The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biol Toxicol* 24, 75-86.
- Sim, G.S., Lee, B.C., Cho, H.S., Lee, J.W., Kim, J.H., Lee, D.H., Pyo, H.B., Moon, D.C., Oh, K.W., Yun, Y.P. and Hong, J.T. (2007) Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch Pharm Res* 30, 290-298.
- Singh, A.V., Xiao, D., Lew, K.L., Dhir, R. and Singh, S.V. (2004b) Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* 25, 83-90.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Singh, S.V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A.V., Lew, K.L., Srivastava, S.K., Kamath, R., Brown, K.D., Zhang, L. and Baskaran, R. (2004a) Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem* 279, 25813-25822.
- Singh, S.V., Srivastava, S.K., Choi, S., Lew, K.L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S.C., Johnson, C.S., Trump, D.L., Lee, Y.J., Xiao, H. and Herman-Antosiewicz, A. (2005) Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280, 19911-19924.
- Sonderby, I.E., Geu-Flores, F. and Halkier, B.A. (2010) Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 15, 283-290.
- Spencer, J.P., Kuhnle, G.G., Williams, R.J. and Rice-Evans, C. (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J* 372, 173-181.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Crossthwaithe, A.J., Kuhnle, G., Williams, R.J. and Rice-Evans, C. (2001) Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 31, 1139-1146.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 41, 753-758.
- Steinbrecher, A. and Linseisen, J. (2009) Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study. *Ann Nutr Metab* 54, 87-96.

- Steinbrecher, A., Rohrmann, S., Timofeeva, M., Risch, A., Jansen, E. and Linseisen, J. (2010) Dietary glucosinolate intake, polymorphisms in selected biotransformation enzymes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 135-143.
- Steinkellner, H., Rabot, S., Freywald, C., Nobis, E., Scharf, G., Chabicovsky, M., Knasmüller, S. and Kassie, F. (2001) Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res* 480-481, 285-297.
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gomez-Orte, E., Gonzalez-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga, C. and Duenas, M. (2011) Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct* 2, 445-456.
- Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C. and Sarkadi, B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13, 379-393.
- Talalay, P., Batzinger, R.P., Benson, A.M., Bueding, E. and Cha, Y.-N. (1979) Biochemical studies on the mechanisms by which dietary antioxidants suppress mutagenic activity. *Advances in Enzyme Regulation* 17, 23-36.
- Tang, L. and Zhang, Y. (2004) Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. *J Nutr* 134, 2004-2010.
- Tang, L., Singh, R., Liu, Z. and Hu, M. (2009) Structure and concentration changes affect characterization of UGT isoform-specific metabolism of isoflavones. *Mol Pharm* 6, 1466-1482.
- Tang, L., Ye, L., Singh, R., Wu, B., Lv, C., Zhao, J., Liu, Z. and Hu, M. (2010a) Use of glucuronidation fingerprinting to describe and predict mono- and dihydroxyflavone metabolism by recombinant UGT isoforms and human intestinal and liver microsomes. *Mol Pharm* 7, 664-679.
- Tang, L., Zirpoli, G.R., Guru, K., Moysich, K.B., Zhang, Y., Ambrosone, C.B. and McCann, S.E. (2008) Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 938-944.
- Tang, L., Zirpoli, G.R., Guru, K., Moysich, K.B., Zhang, Y., Ambrosone, C.B. and McCann, S.E. (2010b) Intake of cruciferous vegetables modifies bladder cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 1806-1811.
- Temme, E.H. and Van Hoydonck, P.G. (2002) Tea consumption and iron status. *Eur J Clin Nutr* 56, 379-386.
- Tian, X.J., Yang, X.W., Yang, X. and Wang, K. (2009) Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int J Pharm* 367, 58-64.
- Traka, M.H. and Mithen, R.F. (2011) Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. *Plant Cell* 23, 2483-2497.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Vaidyanathan, J.B. and Walle, T. (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, 745-752.
- van Acker, S.A., de Groot, M.J., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Donne-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W.J. and Bast, A. (1996) A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 9, 1305-1312.
- Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31, 214-223.

- Van Houten, B., Woshner, V. and Santos, J.H. (2006) Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 5, 145-152.
- van Zanden, J.J., Wortelboer, H.M., Bijlsma, S., Punt, A., Usta, M., Bladeren, P.J., Rietjens, I.M. and Cnubben, N.H. (2005) Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem Pharmacol* 69, 699-708.
- Vargo, M.A., Voss, O.H., Poustka, F., Cardounel, A.J., Grotewold, E. and Doseff, A.I. (2006) Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 72, 681-692.
- Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Jr., Lindenmayer, G.E. and Walle, T. (2000b) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 830-836.
- Walgren, R.A., Lin, J.T., Kinne, R.K. and Walle, T. (2000a) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 837-843.
- Walgren, R.A., Walle, U.K. and Walle, T. (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 55, 1721-1727.
- Walle, T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36, 829-837.
- Walle, T. (2007a) Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol* 17, 354-362.
- Walle, T. (2007b) Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. *Mol Pharm* 4, 826-832.
- Walle, T., Eaton, E.A. and Walle, U.K. (1995) Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenosulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 50, 731-734.
- Walle, T., Ta, N., Kawamori, T., Wen, X., Tsuji, P.A. and Walle, U.K. (2007b) Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones. *Biochem Pharmacol* 73, 1288-1296.
- Walle, T., Wen, X. and Walle, U.K. (2007a) Improving metabolic stability of cancer chemoprotective polyphenols. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3, 379-388.
- Walton, M.C., McGhie, T.K., Reynolds, G.W. and Hendriks, W.H. (2006) The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro. *J Agric Food Chem* 54, 4913-4920.
- Wang, L.Q. and James, M.O. (2006) Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr Drug Metab* 7, 83-104.
- Wang, Y., Cao, J. and Zeng, S. (2005) Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. *J Pharm Pharmacol* 57, 751-758.
- Watzl, B. and Rechkemmer, G. (2001a) Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* 48.
- Watzl, B. and Rechkemmer, G. (2001b) Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48.
- Wee, L.M., Long, L.H., Whiteman, M. and Halliwell, B. (2003) Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radic Res* 37, 1123-1130.
- Wen, X. and Walle, T. (2006a) Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab Dispos* 34, 1786-1792.



- Wen, X. and Walle, T. (2006b) Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica* 36, 387-397.
- Wesolowska, O., Hendrich, A.B., Laniapietrzak, B., Wisniewski, J., Molnar, J., Ocsovszki, I. and Michalak, K. (2009) Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1 transport activity by flavonoids. *Cell Mol Biol Lett* 14, 199-221.
- Williamson, G. and Manach, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81, 243S-255S.
- Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K. and Terao, J. (2005) In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic Res* 39, 457-469.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W. and Couteau, D. (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans* 28, 16-22.
- Wojnowski, L. and Kamdem, L.K. (2006) Clinical implications of CYP3A polymorphisms. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 171-182.
- Wolffram, S., Weber, T., Grenacher, B. and Scharrer, E. (1995) A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr* 125, 1300-1308.
- Wood, A.W., Smith, D.S., Chang, R.L., Huang, M.T. and Conney, A.H. (1986) Effects of flavonoids on the metabolism of xenobiotics. *Prog Clin Biol Res* 213, 195-210.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.
- Wu, X.J. and Hua, X. (2007) Targeting ROS: selective killing of cancer cells by a cruciferous vegetable derived pro-oxidant compound. *Cancer Biol Ther* 6, 646-647.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Xiao, D., Vogel, V. and Singh, S.V. (2006) Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol Cancer Ther* 5, 2931-2945.
- Xu, C., Shen, G., Chen, C., Gelinias, C. and Kong, A.N. (2005) Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene* 24, 4486-4495.
- Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D., Kuo, M.C. and Schantz, S.P. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 351-354.
- Ye, L., Dinkova-Kostova, A.T., Wade, K.L., Zhang, Y., Shapiro, T.A. and Talalay, P. (2002) Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 316, 43-53.
- Yokomizo, A. and Moriwaki, M. (2005a) Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 1774-1776.
- Yokomizo, A. and Moriwaki, M. (2005b) Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 693-699.
- Yokomizo, A. and Moriwaki, M. (2006) Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1317-1324.

- Zambonin, L., Caliceti, C., Vieceli Dalla Sega, F., Fiorentini, D., Hrelia, S., Landi, L. and Prata, C. (2012) Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 839298.
- Zhang, L., Jie, G., Zhang, J. and Zhao, B. (2009) Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radic Biol Med* 46, 414-421.
- Zhang, X.H., Zou, Z.Q., Xu, C.W., Shen, Y.Z. and Li, D. (2011) Myricetin induces G2/M phase arrest in HepG2 cells by inhibiting the activity of the cyclin B/Cdc2 complex. *Mol Med Report* 4, 273-277.
- Zhang, Y., Tang, L. and Gonzalez, V. (2003) Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2, 1045-1052.
- Zhao, Z. and Moghadasian, M. (2009) Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews* 9, 133-145.
- Zhao, Z. and Moghadasian, M.H. (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* 109, 691-702.
- Zhao, Z., Egashira, Y. and Sanada, H. (2004) Ferulic Acid Is Quickly Absorbed from Rat Stomach as the Free Form and Then Conjugated Mainly in Liver. *The Journal of Nutrition* 134, 3083-3088.
- Zhu, N., Soendergaard, M., Jeffery, E.H. and Lai, R.H. (2010) The impact of loss of myrosinase on the bioactivity of broccoli products in F344 rats. *J Agric Food Chem* 58, 1558-1563.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

**8. Abkürzungsverzeichnis**

2,4-DHZ	2,4-Dihydroxyzimtsäure	MDR	<i>multidrug resistance</i>
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	MEM	<i>Modified Eagle medium</i>
AITC	Allyl-Isothiocyanat	MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein2</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	MS	Massenspektrometrie
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>	MTM	Myricetin-Trimethylether
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ARE	<i>antioxidant responsive element</i>	NAC	N-Acetylcystein
AUC	Area under the curve	NAD(P)H	Nicotinamid-Adennukleotid-Phosphat
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>	NAT	N-Acetyltransferase
BITC	Benzyl-Isothiocyanat	NEM	Nahrungsergänzungsmittel
bp	Basenpaar	NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
BSA	Rinderserumalbumin	NGM	<i>Nematode Growthmedia</i>
CAD	<i>coronary artery disease</i>	NQO1	NAD(P)H:chinon Oxidoreduktase
CAD	Caspase-aktivierte DNase	Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid related factor 2</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>	NSRA	Naturstoffreagenz A
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>	OAT	<i>organic anion transporter</i>
CKI	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i>	OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase	OCNT	<i>organic cation/carnitine transporter</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>	OCT	<i>organic cation transporter</i>
COX	Cyclooxygenase	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen	P-gp	P-glycoprotein
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein	PI	Propidiumiodid
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>	PITC	Phenethyl-Isothiocyanat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	PS	Phosphatidylserin
DMSO	Dimethylsulfoxid	RFU	<i>relative fluorescent units</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNAi	RNA vermittelte Interferenz
DTT	Dithiothreitol	RNase	Ribonuklease
EC <sub>50</sub>	<i>effective concentration (50%)</i>	RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
EGCG	Epigallocatechingallat	RP	<i>reversed phase</i>
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>	S/N	<i>signal-to-noise-ratio</i>
et al.	<i>et altera</i> (und andere)	SAR	<i>structure activity relationship</i>
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>	SD	<i>standard deviation</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	SEAP	Sekretierte embryonale alkalische Phosphatase
GSH	Glutathion	SEM	<i>standard error of the mean</i>
GSSG	Glutathiondisulfid	SOD	Superoxid Dismutase
GST	Glutathion-S-transferase	SULT	Sulfotransferase
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat	TBE	Tris-Borat-EDTA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	tBHQ	tert-Butylhydrochinon
HO-1	Hämoxxygenase 1	TE	Tris-EDTA
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
HPLC-DAD	HPLC mit Dioden Array Detektor	TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
HPLC-ESI-MS	HPLC mit Massendetektor	TNFR1	TNF Rezeptor 1
HPLC-UV	HPLC mit UV-Detektor	TNFα	<i>Tumor necrosis Factor alpha</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
LPH	Laktase Phlorizin Hydrolase	UGT	Uridindiphosphat-Glukuronosyltransferase
Lsg.	Lösung	UV	Ultraviolett
LY	Lucifer Yellow	V	Volt
MCT	Monocarboxylat Transporter	W	Watt

**9. Anhang****Tabellen der Originaldaten****Tabelle 1: Antioxidatives Potential methylierter Quercetin-Derivate im TEAC Assay**

TEAC	Trolox						Quercetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.677	0.572	0.472	0.362	0.243	0.070	0.700	0.395	0.113	0.047	0.041	0.039
V 2 [OD]	0.707	0.564	0.498	0.434	0.286	0.182	0.707	0.349	0.182	0.075	0.061	0.059
V 3 [OD]	0.716	0.551	0.424	0.327	0.251	0.141	0.724	0.399	0.136	0.085	0.064	0.060
MW	<b>0.700</b>	<b>0.562</b>	<b>0.465</b>	<b>0.374</b>	<b>0.260</b>	<b>0.131</b>	<b>0.710</b>	<b>0.381</b>	<b>0.144</b>	<b>0.069</b>	<b>0.056</b>	<b>0.053</b>
	Isorhamnetin						Rhamnetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.706	0.529	0.400	0.251	0.106	0.001	0.740	0.277	0.093	0.011	0.005	0.004
V 2 [OD]	0.698	0.525	0.373	0.248	0.106	0.002	0.711	0.271	0.092	0.018	0.007	0.006
V 3 [OD]	0.716	0.542	0.407	0.254	0.104	0.004	0.700	0.296	0.097	0.035	0.008	0.006
MW	<b>0.707</b>	<b>0.532</b>	<b>0.393</b>	<b>0.251</b>	<b>0.105</b>	<b>0.002</b>	<b>0.717</b>	<b>0.281</b>	<b>0.094</b>	<b>0.021</b>	<b>0.007</b>	<b>0.005</b>
	Tamarixetin											
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25						
V 1 [OD]	0.729	0.522	0.392	0.265	0.116	0.004						
V 2 [OD]	0.700	0.524	0.372	0.248	0.110	0.003						
V 3 [OD]	0.713	0.531	0.382	0.248	0.138	0.006						
MW	<b>0.714</b>	<b>0.526</b>	<b>0.382</b>	<b>0.254</b>	<b>0.121</b>	<b>0.004</b>						

**Tabelle 2: Antioxidatives Potential methylierter Myricetin-Derivate im TEAC Assay**

TEAC	Trolox						Myricetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.677	0.572	0.472	0.362	0.243	0.070	0.725	0.233	0.001	0.001	0.001	0.001
V 2 [OD]	0.707	0.564	0.498	0.434	0.286	0.182	0.719	0.234	0.004	0.002	0.003	0.002
V 3 [OD]	0.716	0.551	0.424	0.327	0.251	0.141	0.739	0.218	0.002	0.002	0.002	0.002
MW	<b>0.700</b>	<b>0.562</b>	<b>0.465</b>	<b>0.374</b>	<b>0.260</b>	<b>0.131</b>	<b>0.728</b>	<b>0.228</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
	Laricitrin						Syringetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.744	0.423	0.229	0.097	0.013	0.006	0.720	0.534	0.383	0.346	0.076	0.000
V 2 [OD]	0.730	0.398	0.198	0.111	0.048	0.008	0.718	0.47	0.445	0.213	0.007	0.001
V 3 [OD]	0.690	0.417	0.222	0.101	0.009	0.007	0.690	0.537	0.453	0.208	0.047	0.002
MW	<b>0.721</b>	<b>0.413</b>	<b>0.216</b>	<b>0.103</b>	<b>0.023</b>	<b>0.007</b>	<b>0.709</b>	<b>0.514</b>	<b>0.427</b>	<b>0.256</b>	<b>0.043</b>	<b>0.001</b>
	MTM											
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25						
V 1 [OD]	0.726	0.637	0.538	0.485	0.392	0.334						
V 2 [OD]	0.719	0.635	0.542	0.493	0.398	0.342						
V 3 [OD]	0.719	0.637	0.566	0.481	0.355	0.322						
MW	<b>0.721</b>	<b>0.636</b>	<b>0.549</b>	<b>0.486</b>	<b>0.382</b>	<b>0.333</b>						

**Tabelle 3:** Antioxidatives Potential methylierter Quercetin-Derivate (50  $\mu$ M) in Hct116 Zellen (DCF Assay).

[RFU]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF	unbehandelt + DCF	Quercetin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +DCF	Isorham. + H <sub>2</sub> O +DCF	Tamarixetin +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +DCF	Rhamnetin +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +DCF	25 Rham. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +DCF
V 1	76060	8204	22018				
V 2	33083	5980	11372				
V 3	44920	11158	16047				
V 1	22896	5528		12144	14836		
V 2	39134	5182		17654	24652		
V 3	50814	7019		27221	29492		
V 4	77006	6310		43442	57376		
V 1	24915	5150				23076	21000
V 2	27905	5501				20748	19038
V 3	14761	4333				23230	18868
V 4	16569	5132				24201	20975
<b>MW</b>	<b>38915</b>	<b>6318</b>	<b>16479</b>	<b>25115</b>	<b>31589</b>	<b>22814</b>	<b>19970</b>

[RFU]	DMSO	unbehandelt	Quercetin+ DCF	Isorham. + DCF	Tamarixetin DCF	Rhamnetin DCF	25 Rham. + DCF
V 1	4415	5125	6248				
V 2	3264	3560	5495				
V 3	5831	5908	6378				
V 1	7177	7369		6405	5783		
V 2	3590	3810		6373	5598		
V 3	3726	4414		8303	7157		
V 4	3751	4348		8705	7426		
V 1	3970	5212				12653	8668
V 2	3843	3915				11729	8389
V 3	3482	3578				12127	8226
V 4	4589	3963				16405	10613

**Tabelle 4:** Antioxidatives Potential methylierter Myricetin-Derivate (50  $\mu$ M) in Hct116 Zellen (DCF Assay)

[RFU]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF	unbehandelt + DCF	Myr + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF	Lar + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF	Syr + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF	MTM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF
V 1	76060	8204	22780			
V 2	33083	5980	15558			
V 3	44920	11158	27618			
V 1	20016	4791		13791	14244	
V 2	44051	69 08		22552	31953	
V 3	52299	5724		26851	28750	
V 4	34023	4837		16585	28566	
V 1	12302	5150				13895
V 2	14713	5501				12777
V 3	9104	4333				9305
<b>MW</b>	<b>34057</b>	<b>6258</b>	<b>21985</b>	<b>19945</b>	<b>25878</b>	<b>11992</b>

[RFU]	DMSO	unbehandelt	Myr + DCF	Lar + DCF	Syr + DCF	MTM + DCF
V 1	4415	5125	9187			
V 2	3264	3560	4823			
V 3	5831	5908	5431			
V 1	3988	3945		5415	6332	
V 2	4620	4699		8905	6143	
V 3	5050	4677		7801	10074	
V 4	6113	5917		5415	9074	
V 1	3843	3915				9496
V 2	3482	3578				6416
V 3	4589	3963				4598

Tabelle 5: Zytotoxizität methylierter Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Quercetin				Isorhamnetin				Rhamnetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.557	0.611	0.562	0.392	0.557	0.543	0.432	0.177	0.557	0.469	0.414	
V 2 [OD]	0.655	0.593	0.604	0.272	0.655	0.575	0.451	0.274	0.655	0.570	0.648	
V 3 [OD]	0.459	0.523	0.506	0.209	0.459	0.521	0.448	0.272	0.459	0.440	0.466	
MW [OD]	<b>0.557</b>	<b>0.576</b>	<b>0.557</b>	<b>0.291</b>	<b>0.557</b>	<b>0.546</b>	<b>0.444</b>	<b>0.241</b>	<b>0.557</b>	<b>0.493</b>	<b>0.509</b>	
	Tamarixetin											
$\mu\text{M}$	0	25	50	100								
V 1 [OD]	0.557	0.431	0.295	0.216								
V 2 [OD]	0.655	0.504	0.345	0.231								
V 3 [OD]	0.459	0.469	0.336	0.245								
MW [OD]	<b>0.557</b>	<b>0.468</b>	<b>0.325</b>	<b>0.231</b>								

Tabelle 6: Zytotoxizität methylierter Quercetin-Derivate in Caco-2 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Quercetin				Isorhamnetin				Rhamnetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.842	0.934	0.879	0.886	0.842	0.949	0.958	0.629	0.842	0.869	0.593	0.741
V 2 [OD]	0.799	0.983	0.932	0.928	0.799	0.983	0.946	0.724	0.799	0.883	0.645	0.718
V 3 [OD]	0.767	0.897	0.932	0.906	0.767	0.964	0.889	0.806	0.767	0.730	0.744	0.678
MW [OD]	<b>0.803</b>	<b>0.938</b>	<b>0.914</b>	<b>0.907</b>	<b>0.803</b>	<b>0.965</b>	<b>0.931</b>	<b>0.720</b>	<b>0.803</b>	<b>0.827</b>	<b>0.661</b>	<b>0.713</b>
	Tamarixetin											
$\mu\text{M}$	0	25	50	100								
V 1 [OD]	0.842	0.810	0.826	0.619								
V 2 [OD]	0.799	0.861	0.852	0.747								
V 3 [OD]	0.767	0.999	0.976	0.808								
MW [OD]	<b>0.803</b>	<b>0.890</b>	<b>0.885</b>	<b>0.725</b>								

Tabelle 7: Zytotoxizität methylierter Quercetin-Derivate in Hct116 Zellen (48 h + 72 h Inkubation) im MTT Assay

MTT (48 h)	Isorhamnetin				Rhamnetin		
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50
V 1 [OD]	1.127	0.911	0.691	0.406	1.127	0.867	0.724
V 2 [OD]	1.068	0.892	0.768	0.480	1.068	0.871	0.565
V 3 [OD]	1.012	0.845	0.723	0.405	1.012	0.789	0.517
V 4 [OD]	1.072	0.721	0.691	0.417	1.072	0.811	0.549
MW [OD]	<b>1.070</b>	<b>0.842</b>	<b>0.718</b>	<b>0.427</b>	<b>1.070</b>	<b>0.835</b>	<b>0.589</b>

MTT (72 h)	Isorhamentin				Rhamnetin		
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50
V 1 [OD]	1.070	0.811	0.611	0.291	1.070	0.754	0.436
V 2 [OD]	1.086	0.878	0.411	0.779	1.086	0.887	0.709
V 3 [OD]	0.717	0.363	0.294	0.103	0.717	0.487	0.213
V 4 [OD]	0.996	0.685	0.533	0.164	0.996	0.743	0.404
MW [OD]	<b>0.967</b>	<b>0.684</b>	<b>0.462</b>	<b>0.334</b>	<b>0.967</b>	<b>0.718</b>	<b>0.441</b>

Tabelle 8: Zytotoxizität methylierter Quercetin- Derivate in Caco-2 Zellen (48 h + 72 h Inkubation) im MTT Assay

MTT (48 h)	Isorhamentin				Rhamnetin		
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50
V 1 [OD]	0.928	1.018	0.953	0.841	0.928	0.772	0.782
V 2 [OD]	0.925	0.993	0.975	0.616	0.925	0.706	0.748
V 3 [OD]	1.037	1.007	1.010	0.852	1.037	0.816	0.808
V 4 [OD]	0.759	0.819	0.938	0.871	0.759	0.757	0.689
MW [OD]	<b>0.874</b>	<b>0.924</b>	<b>0.958</b>	<b>0.813</b>	<b>0.874</b>	<b>0.757</b>	<b>0.749</b>

MTT (72 h)	Isorhamentin				Rhamnetin		
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50
V 1 [OD]	0.690	0.857	0.644	0.498	0.690	0.610	0.544
V 2 [OD]	0.707	0.610	0.544	0.547	0.707	0.857	0.644
V 3 [OD]	0.676	0.803	0.894	0.536	0.676	0.525	0.365
V 4 [OD]	0.688	0.832	0.961	0.553	0.688	0.813	0.410
MW [OD]	<b>0.690</b>	<b>0.776</b>	<b>0.761</b>	<b>0.534</b>	<b>0.690</b>	<b>0.701</b>	<b>0.491</b>

Tabelle 9: Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Hct116 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.018	0.95	0.81	0.316	1.018	0.935	0.815	0.332	1.018	0.904	0.356	0.219
V 2 [OD]	0.974	0.932	0.879	0.577	0.974	0.931	0.903	0.655	0.974	0.831	0.378	0.099
V 3 [OD]	0.855	0.823	0.716	0.555	0.855	0.79	0.794	0.671				
V 4 [OD]	0.920	0.857	0.852	0.540	0.920	0.88	0.872	0.599	0.920	0.850	0.647	0.170
MW [OD]	<b>0.942</b>	<b>0.891</b>	<b>0.814</b>	<b>0.497</b>	<b>0.942</b>	<b>0.884</b>	<b>0.846</b>	<b>0.564</b>	<b>0.971</b>	<b>0.862</b>	<b>0.460</b>	<b>0.163</b>
	<b>MTM</b>											
$\mu\text{M}$	0	25	50	100								
V 1 [OD]	1.018	0.943	0.721	0.638								
V 2 [OD]	0.974	0.937	0.787	0.634								
V 3 [OD]	0.855	0.778	0.682	0.517								
V 4 [OD]	0.920	0.67	0.828	0.668								
MW [OD]	<b>0.942</b>	<b>0.832</b>	<b>0.755</b>	<b>0.614</b>								

Tabelle 10: Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Hct116 Zellen (48 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.127	1.059	0.895	0.237	1.127	1.069	0.916	0.384				
V 2 [OD]	1.068	0.938	0.670	0.093	1.068	0.92	0.746	0.123	1.068	0.695	0.172	0.098
V 3 [OD]	1.012	0.937	0.682	0.105	1.012	0.832	0.724	0.127	1.012	0.720	0.106	0.092
V 4 [OD]	1.072	0.928	0.554	0.090	1.072	0.877	0.768	0.114	1.072	0.663	0.117	0.088
V 5 [OD]	1.120	0.964	0.840	0.319	1.120	0.977	0.902	0.374	1.120	0.992	0.553	0.183
MW [OD]	<b>1.080</b>	<b>0.965</b>	<b>0.728</b>	<b>0.169</b>	<b>1.080</b>	<b>0.935</b>	<b>0.811</b>	<b>0.224</b>	<b>1.068</b>	<b>0.768</b>	<b>0.237</b>	<b>0.115</b>

	MTM			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.127	0.806	0.632	0.549
V 2 [OD]	1.068	0.818	0.587	0.493
V 3 [OD]	1.012	0.739	0.546	0.477
V 4 [OD]	1.072	0.66	0.581	0.490
V 5 [OD]	1.120	0.841	0.658	0.570
MW [OD]	<b>1.080</b>	<b>0.773</b>	<b>0.601</b>	<b>0.516</b>

Tabelle 11: Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Hct116 Zellen (72 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.070	0.565	0.144	0.097	1.070	0.598	0.144	0.121	0.996	0.137	0.101	0.109
V 2 [OD]	1.086	0.521	0.131	0.093	1.086	0.535	0.140	0.103	1.086	0.092	0.094	0.088
V 3 [OD]	0.717	0.305	0.088	0.079	0.717	0.279	0.094	0.102	0.717	0.109	0.081	0.088
V 4 [OD]	0.996	0.283	0.093	0.086	0.996	0.281	0.096	0.110				
MW [OD]	<b>0.967</b>	<b>0.419</b>	<b>0.114</b>	<b>0.089</b>	<b>0.967</b>	<b>0.423</b>	<b>0.119</b>	<b>0.109</b>	<b>0.933</b>	<b>0.113</b>	<b>0.092</b>	<b>0.095</b>
	MTM											
$\mu\text{M}$	0	25	50	100								
V 1 [OD]	1.070	0.708	0.407	0.367								
V 2 [OD]	1.086	0.753	0.419	0.340								
V 3 [OD]	0.717	0.408	0.269	0.330								
V 4 [OD]	0.996	0.648	0.300	0.325								
MW [OD]	<b>0.967</b>	<b>0.629</b>	<b>0.349</b>	<b>0.341</b>								

Tabelle 12: Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Caco-2 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.987	0.994	0.890	0.860	0.987	0.937	0.866	0.853	0.987	0.947	0.821	0.701
V 2 [OD]	1.250	1.118	1.234	1.087	1.250	1.200	1.151	1.130				
V 3 [OD]	1.284	1.031	1.057	0.945	1.284	1.112	1.129	1.084	1.284	1.196	1.085	1.178
V 4 [OD]	1.176	1.076	1.059	0.920	1.176	1.068	1.076	1.016	1.176	1.125	1.093	1.175
MW [OD]	<b>1.174</b>	<b>1.055</b>	<b>1.060</b>	<b>0.953</b>	<b>1.174</b>	<b>1.079</b>	<b>1.055</b>	<b>1.021</b>	<b>1.149</b>	<b>1.089</b>	<b>1.000</b>	<b>1.018</b>
	MTM											
$\mu\text{M}$	0	25	50	100								
V 1 [OD]	0.987	0.850	0.786	0.751								
V 2 [OD]	1.250	1.112	1.072	1.017								
V 3 [OD]	1.284	0.893	0.900	0.921								
V 4 [OD]	1.176	0.983	0.932	0.855								
MW [OD]	<b>1.174</b>	<b>0.960</b>	<b>0.923</b>	<b>0.886</b>								

Tabelle 13: Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Caco-2 Zellen (48 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				MTM			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.928	0.830	0.803	0.726	0.928	0.802	0.858	0.862	0.928	0.831	0.780	0.803
V 2 [OD]	0.925	0.851	0.751	0.836	0.925	0.654	0.867	0.871	0.925	0.812	0.735	0.654
V 3 [OD]	1.037	0.917	0.869	0.785	1.037	0.948	0.983	0.784	1.037	0.881	0.794	0.762
V 4 [OD]	0.759	0.732	0.754	0.678	0.759	0.747	0.845	0.779	0.759	0.660	0.659	0.600
V 5 [OD]	0.723	0.727	0.699	0.672	0.723	0.750	0.794	0.774	0.723	0.666	0.682	0.761
MW [OD]	<b>0.874</b>	<b>0.811</b>	<b>0.775</b>	<b>0.739</b>	<b>0.874</b>	<b>0.780</b>	<b>0.869</b>	<b>0.814</b>	<b>0.874</b>	<b>0.770</b>	<b>0.730</b>	<b>0.716</b>



**Tabelle 14:** Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in Caco-2 Zellen (72 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				MTM			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.690	0.804	0.800	0.547	0.690	0.791	0.917	0.487	0.690	0.593	0.525	0.469
V 2 [OD]	0.707	0.791	0.917	0.487	0.707	0.593	0.525	0.469	0.707	0.825	0.535	0.266
V 3 [OD]	0.676	0.687	0.757	0.519	0.676	0.736	0.891	0.585	0.676	0.574	0.351	0.441
V 4 [OD]	0.899	0.783	0.754	0.449	0.899	0.835	0.827	0.232	0.899	0.745	0.579	0.403
V 5 [OD]	0.688	0.815	0.669	0.301	0.688	0.857	0.828	0.487	0.688	0.467	0.469	0.402
MW [OD]	<b>0.732</b>	<b>0.776</b>	<b>0.779</b>	<b>0.461</b>	<b>0.732</b>	<b>0.762</b>	<b>0.798</b>	<b>0.452</b>	<b>0.732</b>	<b>0.641</b>	<b>0.492</b>	<b>0.396</b>

**Tabelle 15:** Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in HepG2 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.015	1.138	1.031	1.011	1.015	1.174	1.118	1.101	1.015	1.149	1.126	0.926
V 2 [OD]	1.066	1.145	1.182	1.201	1.066	1.138	1.127	1.207	1.066	1.182	1.200	1.164
V 3 [OD]	0.969	1.031	0.778	0.874	0.969	0.977	0.962	0.802	0.969	1.070	0.962	0.643
V 4 [OD]	1.063	0.918	0.964	0.933	1.063	1.034	0.962	0.928	1.063	1.040	0.935	0.858
MW [OD]	<b>1.029</b>	<b>1.058</b>	<b>0.989</b>	<b>1.005</b>	<b>1.029</b>	<b>1.081</b>	<b>1.042</b>	<b>1.010</b>	<b>1.029</b>	<b>1.110</b>	<b>1.056</b>	<b>0.898</b>
	MTM											
μM	0	25	50	100								
V 1 [OD]	1.015	0.982	0.811	0.708								
V 2 [OD]	1.066	0.988	0.554	0.597								
V 3 [OD]	0.969	0.773	0.828	0.628								
V 4 [OD]	1.063	0.808	0.718	0.599								
MW [OD]	<b>1.029</b>	<b>0.888</b>	<b>0.728</b>	<b>0.633</b>								

**Tabelle 16:** Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in HepG2 Zellen (48 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.991	0.854	0.806	0.709	0.991	0.964	0.951	0.923	0.991	0.926	0.818	0.570
V 2 [OD]	0.752	0.691	0.654	0.492	0.752	0.735	0.709	0.598	0.752	0.684	0.519	0.207
V 3 [OD]	1.124	0.717	0.789	0.706	1.124	1.022	0.879	0.833	1.124	0.954	0.927	0.650
V 4 [OD]	1.047	0.866	0.793	0.678	1.047	0.958	0.708	0.744	1.047	0.887	0.852	0.379
MW [OD]	<b>0.978</b>	<b>0.782</b>	<b>0.761</b>	<b>0.646</b>	<b>0.978</b>	<b>0.920</b>	<b>0.812</b>	<b>0.775</b>	<b>0.978</b>	<b>0.863</b>	<b>0.779</b>	<b>0.452</b>
	MTM											
μM	0	25	50	100								
V 1 [OD]	0.991	0.521	0.416	0.401								
V 2 [OD]	0.752	0.395	0.294	0.375								
V 3 [OD]	1.124	0.500	0.469	0.467								
V 4 [OD]	1.047	0.485	0.363	0.484								
MW [OD]	<b>0.978</b>	<b>0.475</b>	<b>0.386</b>	<b>0.432</b>								

**Tabelle 17:** Zytotoxizität methylierter Myricetin- Derivate in HepG2 Zellen (72 h Inkubation) im MTT Assay

MTT	Myricetin				Laricitrin				Syringetin			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.008	0.831	0.658	0.462	1.008	0.927	0.816	0.644	1.203	0.878	0.569	0.193
V 2 [OD]	1.203	0.915	0.666	0.442	1.203	0.903	0.773	0.571	1.173	0.926	0.498	0.115
V 3 [OD]	1.173	0.965	0.714	0.523	1.173	1.017	0.769	0.459	1.255	1.132	0.943	0.531
V 4 [OD]	1.255	0.920	0.836	0.581	1.255	1.140	1.029	0.780				
MW [OD]	<b>1.160</b>	<b>0.908</b>	<b>0.718</b>	<b>0.502</b>	<b>1.160</b>	<b>0.997</b>	<b>0.847</b>	<b>0.614</b>	<b>1.211</b>	<b>0.979</b>	<b>0.670</b>	<b>0.280</b>

	MTM			
$\mu\text{M}$	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.008	0.433	0.253	0.273
V 2 [OD]	1.203	0.579	0.320	0.322
V 3 [OD]	1.173	0.616	0.302	0.375
MW [OD]	1.128	0.543	0.292	0.324

**Tabelle 18:** Rohdaten zur Ermittlung der Kalibrierung; die Kalibrierungen wurden mit Konzentrationen von 2.5 bis 75  $\mu\text{M}$  errechnet.

Myricetin	$y = 0.0447x - 0.465$ und $R^2 = 0.999$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	31.82	63.65	127.30	318.24	636.48	954.72
V 1 [mAU*min]	0.977	2.295	4.877	12.958	27.451	40.713
V 2 [mAU*min]	1.267	2.623	5.285	14.124	28.778	43.727
MW [mAU*min]	1.122	2.459	5.081	13.541	28.1145	42.22

Laricitrin	$y = 0.0483x - 0.877$ und $R^2 = 0.999$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	33.23	66.45	132.90	332.26	664.52	996.78
V 1 [mAU*min]	1.138	2.536	5.293	14.247	29.714	49.929
V 2 [mAU*min]	1.281	2.636	5.524	14.965	31.511	45.797
MW [mAU*min]	1.210	2.586	5.409	14.606	30.613	47.863

Syringetin	$y = 0.0538x - 0.573$ und $R^2 = 0.999$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	34.63	69.26	138.52	346.29	692.58	1038.87
V 1 [mAU*min]	1.731	3.264	6.862	18.435	36.591	55.406
V 2 [mAU*min]	1.367	2.88	6.414	17.883	36.502	55.345
MW [mAU*min]	1.549	3.072	6.638	18.159	36.547	55.376

MTM	$y = 0.0360x - 0.079$ und $R^2 = 0.998$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	36.03	72.06	144.12	360.31	720.62	1080.93
V 1 [mAU*min]	1.262	2.694	5.419	12.648	24.969	39.495
V 2 [mAU*min]						
MW [mAU*min]	1.262	2.694	5.419	12.648	24.969	39.495

**Tabelle 19:** Rohdaten zur Ermittlung der Kalibrierung; die Kalibrierungen wurden mit Konzentrationen von 2.5 bis 75  $\mu\text{M}$  errechnet. Die errechneten Kalibrierungsgeraden sind der ersten Spalte der jeweiligen Tabelle zu entnehmen. Die Daten wurden mit HPLC 2 (Merck-Hitachi) ermittelt.

Myricetin	$y = 1609.8x + 37060$ und $R^2 = 0.997$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	31.82	63.65	127.30	318.24	636.48	954.72
V 1 [mAU*min]	44740	85120	166720	531440	980680	1463120
V 2 [mAU*min]	n.d.	156480	389180	660520	1126500	1660260
V 3 [mAU*min]	86000	127640	224400	522640	1043600	1563700
MW [mAU*min]	44740	120800	277950	595980	1053590	1561690

Laricitrin	$y = 1332.6x - 32363$ und $R^2 = 0.998$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	33.23	66.45	132.90	332.26	664.52	996.78
V 1 [mAU*min]	45680	94760	183760	447040	967200	1318980
V 2 [mAU*min]	61047	157440	238360	510840	951200	1345283
MW [mAU*min]	53364	126100	211060	478940	959200	1332132

Syringetin	$y = 1972.6x - 10326$ und $R^2 = 0.998$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	34.63	69.26	138.52	346.29	692.58	1038.87
V 1 [mAU*min]	66200	134240	273480	643760	1283980	1942480
V 2 [mAU*min]	72700	134420	265740	874440	1402720	2183120
MW [mAU*min]	69450	134330	269610	759100	1343350	2062800

MTM	$y = 1328.6x - 4386.5$ und $R^2 = 0.999$					
in $\mu\text{M}$	2.5	5	10	25	50	75
in ng	36.03	72.06	144.12	360.31	720.62	1080.93
V 1 [mAU*min]	49900	96260	182080	465000	952320	1435400
V 2 [mAU*min]	50240	82720	169640	568920	894520	1470680
MW [mAU*min]	49900	96260	182080	465000	952320	1435400

**Tabelle 20:** Intrazellulärer Gehalt an Quercetin-Derivaten in Hct116 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Rhamnetin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Quercetin	13.85	12.41	<b>1.116</b>	Quercetin	12.74	12.88	<b>0.989</b>
Isorhamnetin	2.87	12.29	<b>0.234</b>	Isorhamnetin	2.40	14.88	<b>0.161</b>
Rhamnetin	28.58	13.90	<b>2.057</b>	Rhamnetin	61.78	13.09	<b>4.719</b>
Tamarixetin	5.12	13.15	<b>0.389</b>	Tamarixetin	4.36	13.43	<b>0.325</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Quercetin	4.53	7.50	<b>0.604</b>	Quercetin	8.46	6.07	<b>1.394</b>
Isorhamnetin	0.66	7.78	<b>0.084</b>	Isorhamnetin	0.79	6.46	<b>0.122</b>
Rhamnetin	14.49	7.31	<b>1.983</b>	Rhamnetin	63.96	7.08	<b>9.038</b>
Tamarixetin	1.35	5.91	<b>0.228</b>	Tamarixetin	1.68	5.68	<b>0.296</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Quercetin	9.06	6.93	<b>1.308</b>	Quercetin	5.56	7.21	<b>0.771</b>
Isorhamnetin	1.03	7.64	<b>0.135</b>	Isorhamnetin	2.41	5.27	<b>0.458</b>
Rhamnetin	21.07	7.92	<b>2.660</b>	Rhamnetin	72.05	7.54	<b>9.552</b>
Tamarixetin	1.92	8.34	<b>0.230</b>	Tamarixetin	2.65	8.25	<b>0.322</b>
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Quercetin	7.48	3.35	<b>2.235</b>	Quercetin	5.36	7.31	<b>0.734</b>
Isorhamnetin	0.88	7.43	<b>0.119</b>	Isorhamnetin	n.d		<b>n.d.</b>
Rhamnetin	30.02	7.06	<b>4.254</b>	Rhamnetin	84.06	6.26	<b>13.432</b>
Tamarixetin	1.75	5.23	<b>0.335</b>	Tamarixetin	2.92	5.13	<b>0.569</b>

15 min Inkubation Metabolit I	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Metabolit I	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rhamnetin	1.17	13.90	0.084	Rhamnetin	1.00	13.09	0.076
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rhamnetin	0.86	7.31	0.118	Rhamnetin	1.73	7.08	0.244
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rhamnetin	1.18	7.92	0.149	Rhamnetin	1.43	7.54	0.189
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Rhamnetin	3.85	7.06	0.546	Rhamnetin	4.54	6.26	0.725

15 min Inkubation Metabolit II	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Metabolit II	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rhamnetin	n.d.		n.d.	Rhamnetin	1.03	13.09	0.079
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rhamnetin	n.d.		n.d.	Rhamnetin	n.d.		n.d.
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rhamnetin	n.d.		n.d.	Rhamnetin	1.42	7.54	0.188
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Rhamnetin	n.d.		n.d.	Rhamnetin	0.86	6.26	0.138

**Tabelle 21:** Intrazellulärer Gehalt an Quercetin-Derivaten in HepG2 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Rhamnetin- bzw. Tamarixetin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Quercetin	6.84	7.78	<b>0.878</b>	Quercetin	8.91	7.33	<b>1.215</b>
Isorhamnetin	2.14	8.53	<b>0.250</b>	Isorhamnetin	2.83	5.89	<b>0.480</b>
Rhamnetin	20.55	8.03	<b>2.560</b>	Rhamnetin	35.65	7.63	<b>4.671</b>
Tamarixetin	4.72	8.68	<b>0.544</b>	Tamarixetin	6.29	7.03	<b>0.895</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Quercetin	11.15	7.63	<b>1.461</b>	Quercetin	12.50	8.88	<b>1.408</b>
Isorhamnetin	2.12	10.12	<b>0.210</b>	Isorhamnetin	1.86	8.28	<b>0.224</b>
Rhamnetin	31.31	8.73	<b>3.588</b>	Rhamnetin	48.66	7.38	<b>6.590</b>
Tamarixetin	6.99	9.87	<b>0.708</b>	Tamarixetin	6.72	9.32	<b>0.721</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Quercetin	4.87	5.23	<b>0.931</b>	Quercetin	4.83	4.86	<b>0.992</b>
Isorhamnetin	2.95	5.97	<b>0.494</b>	Isorhamnetin	2.88	5.92	<b>0.486</b>
Rhamnetin	17.07	8.77	<b>1.947</b>	Rhamnetin	20.19	7.15	<b>2.825</b>
Tamarixetin	3.25	7.98	<b>0.407</b>	Tamarixetin	3.32	6.78	<b>0.490</b>
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Quercetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Quercetin	n.d.		<b>n.d.</b>
Isorhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Isorhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>
Rhamnetin	31.44	3.48	<b>9.038</b>	Rhamnetin	79.31	5.51	<b>14.397</b>
Tamarixetin	5.98	6.34	<b>0.943</b>	Tamarixetin	6.29	5.65	<b>1.113</b>

15 min Inkubation Metabolit I	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Metabolit I	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rhamnetin	0.78	8.03	<b>0.097</b>	Rhamnetin	0.94	7.63	<b>0.124</b>
Tamarixetin				Tamarixetin	0.53	7.03	<b>0.075</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>
Tamarixetin				Tamarixetin	0.65	9.32	<b>0.069</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rhamnetin	1.95	8.77	<b>0.223</b>	Rhamnetin	1.47	7.15	<b>0.205</b>
Tamarixetin				Tamarixetin	0.63	6.78	<b>0.092</b>
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Rhamnetin	1.07	3.48	<b>0.309</b>	Rhamnetin	0.84	5.51	<b>0.152</b>
Tamarixetin				Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>

15 min Inkubation Metabolit II	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Metabolit II	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rhamnetin	0.54	8.03	<b>0.067</b>	Rhamnetin	0.93	7.63	<b>0.121</b>
Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Tamarixetin	0.55	7.03	<b>0.078</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	1.22	7.38	<b>0.165</b>
Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Tamarixetin	0.59	9.32	<b>0.063</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rhamnetin	0.83	8.77	<b>0.095</b>	Rhamnetin	1.03	7.15	<b>0.145</b>
Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Tamarixetin	0.70	6.78	<b>0.104</b>
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	0.69	5.51	<b>0.126</b>
Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Tamarixetin	n.d.		<b>n.d.</b>

15 min Inkubation Metabolit III	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	1 h Inkubation Metabolit III	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	2.71	7.63	<b>0.355</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	3.43	7.38	<b>0.464</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	1.13	7.15	<b>0.158</b>
<b>Versuch 4</b>				<b>Versuch 4</b>			
Rhamnetin	n.d.		<b>n.d.</b>	Rhamnetin	4.50	5.51	<b>0.817</b>

**Tabelle 22:** Intrazellulärer Gehalt an Isorhamnetin in Hct116 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Isorhamnetin-Metabolite dargestellt.

Hct116	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116 Metabolite	AUC [mAU*min]	Proteingehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Isorham. 0 h	3.14	10.08	<b>0.311</b>	Isorham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Isorham. 1 h	87.00	7.52	<b>11.569</b>	Isorham. 1 h	2.04	7.52	<b>0.272</b>
Isorham. 2 h	121.64	8.31	<b>14.633</b>	Isorham. 2 h	2.63	8.31	<b>0.317</b>
Isorham. 4 h	181.73	8.13	<b>22.364</b>	Isorham. 4 h	3.04	8.13	<b>0.374</b>
Isorham. 6 h	282.29	9.06	<b>31.164</b>	Isorham. 6 h	3.95	9.06	<b>0.436</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Isorham. 0 h	3.29	9.52	<b>0.345</b>	Isorham. 0 h	n.d.		
Isorham. 1 h	58.65	7.85	<b>7.475</b>	Isorham. 1 h	1.24	7.85	<b>0.158</b>
Isorham. 2 h	81.11	6.54	<b>12.400</b>	Isorham. 2 h	1.04	6.54	<b>0.159</b>
Isorham. 4 h	192.92	6.80	<b>28.383</b>	Isorham. 4 h	2.54	6.80	<b>0.374</b>
Isorham. 6 h	248.32	7.01	<b>35.439</b>	Isorham. 6 h	2.90	7.01	<b>0.414</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Isorham. 0 h	3.73	10.08	<b>0.370</b>	Isorham. 0 h	n.d.		
Isorham. 1 h	110.43	11.90	<b>9.278</b>	Isorham. 1 h	2.67	11.90	<b>0.224</b>
Isorham. 2 h	135.27	9.10	<b>14.857</b>	Isorham. 2 h	2.68	9.10	<b>0.294</b>
Isorham. 4 h	239.90	9.43	<b>25.437</b>	Isorham. 4 h	3.91	9.43	<b>0.415</b>
Isorham. 6 h	217.63	8.41	<b>25.891</b>	Isorham. 6 h	2.34	8.41	<b>0.278</b>
				<b>Hct116 Metabolite</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>Proteingehalt [mg]</b>	<b>AUC/mg Protein</b>
				<b>Versuch 1</b>			
				Isorham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
				Isorham. 1 h	0.56	7.52	<b>0.074</b>
				Isorham. 2 h	0.72	8.31	<b>0.086</b>
				Isorham. 4 h	0.89	8.13	<b>0.109</b>
				Isorham. 6 h	1.30	9.06	<b>0.144</b>

<b>Versuch 2</b>			
Isorham. 0 h	n.d.		
Isorham. 1 h	n.d.	7.85	<b>n.d.</b>
Isorham. 2 h	n.d.	6.54	<b>n.d.</b>
Isorham. 4 h	0.85	6.80	<b>0.124</b>
Isorham. 6 h	0.90	7.01	<b>0.128</b>
<b>Versuch 3</b>			
Isorham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Isorham. 1 h	0.74	11.90	<b>0.062</b>
Isorham. 2 h	0.71	9.10	<b>0.078</b>
Isorham. 4 h	1.18	9.43	<b>0.125</b>
Isorham. 6 h	0.72	8.41	<b>0.085</b>

**Tabelle 23:** Intrazellulärer Gehalt an Tamarixetin in Hct116 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert.

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Tamarix. 0 h	2.65	7.88	<b>0.337</b>				
Tamarix. 1 h	3.21	8.52	<b>0.376</b>				
Tamarix. 2 h	4.31	8.47	<b>0.509</b>				
Tamarix. 4 h	4.36	7.54	<b>0.578</b>				
Tamarix. 6 h	3.56	7.19	<b>0.495</b>				
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Tamarix. 0 h	3.70	9.36	<b>0.395</b>				
Tamarix. 1 h	4.13	8.33	<b>0.496</b>				
Tamarix. 2 h	4.58	7.93	<b>0.578</b>				
Tamarix. 4 h	3.23	7.39	<b>0.437</b>				
Tamarix. 6 h	3.50	6.94	<b>0.504</b>				
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Tamarix. 0 h	6.77	8.42	<b>0.803</b>				
Tamarix. 1 h	8.57	9.02	<b>0.950</b>				
Tamarix. 2 h	7.54	10.05	<b>0.750</b>				
Tamarix. 4 h	5.60	7.09	<b>0.790</b>				
Tamarix. 6 h	4.29	10.00	<b>0.429</b>				

**Tabelle 24:** Intrazellulärer Gehalt an Rhamnetin in Hct116 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Rhamnetin-Metabolite dargestellt.

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	7.14	8.53	<b>0.838</b>	Rham. 0 h	1.36	8.53	<b>0.159</b>
Rham. 1 h	72.72	8.48	<b>8.575</b>	Rham. 1 h	2.51	8.48	<b>0.296</b>
Rham. 2 h	129.29	9.47	<b>13.655</b>	Rham. 2 h	3.05	9.47	<b>0.322</b>
Rham. 4 h	150.43	7.49	<b>20.077</b>	Rham. 4 h	1.71	7.49	<b>0.228</b>
Rham. 6 h	122.14	8.35	<b>14.635</b>	Rham. 6 h	1.65	8.35	<b>0.198</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	2.02	9.53	<b>0.212</b>	Rham. 0 h	0.88	9.53	<b>0.092</b>
Rham. 1 h	81.27	7.95	<b>10.228</b>	Rham. 1 h	2.95	7.95	<b>0.371</b>
Rham. 2 h	140.81	9.03	<b>15.593</b>	Rham. 2 h	2.41	9.03	<b>0.267</b>
Rham. 4 h	149.16	9.21	<b>16.193</b>	Rham. 4 h	2.88	9.21	<b>0.312</b>
Rham. 6 h	136.92	8.58	<b>15.960</b>	Rham. 6 h	1.56	8.58	<b>0.182</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	8.52	8.84	<b>0.963</b>	Rham. 0 h	1.30	8.84	<b>0.147</b>
Rham. 1 h	65.23	7.39	<b>8.828</b>	Rham. 1 h	1.51	7.39	<b>0.204</b>
Rham. 2 h	95.91	7.83	<b>12.256</b>	Rham. 2 h	1.97	7.83	<b>0.252</b>
Rham. 4 h	117.70	7.63	<b>15.423</b>	Rham. 4 h	1.34	7.63	<b>0.175</b>
Rham. 6 h	186.15	7.52	<b>24.766</b>	Rham. 6 h	1.89	6.52	<b>0.289</b>

Hct116 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein- gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	n.d.	8.48	n.d.
Rham. 2 h	n.d.	9.47	n.d.
Rham. 4 h	5.24	7.49	0.699
Rham. 6 h	1.96	8.35	0.235
<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	1.41	7.95	0.177
Rham. 2 h	2.12	9.03	0.235
Rham. 4 h	3.21	9.21	0.349
Rham. 6 h	4.03	8.58	0.470
<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	0.92	7.39	0.124
Rham. 2 h	1.67	7.83	0.213
Rham. 4 h	3.13	7.63	0.410
Rham. 6 h	4.79	6.52	0.736

**Tabelle 25:** Intrazellulärer Gehalt an Rhamnetin in Caco-2 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Rhamnetin-Metabolite dargestellt.

Caco-2	AUC [mAU*min]	Protein- gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Caco-2 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein- gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	20.50	12.48	<b>1.643</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	43.23	11.41	<b>3.787</b>	Rham. 1 h	4.29	11.41	<b>0.376</b>
Rham. 2 h	50.39	12.89	<b>3.909</b>	Rham. 2 h	7.30	12.89	<b>0.566</b>
Rham. 4 h	43.89	11.51	<b>3.814</b>	Rham. 4 h	12.36	11.51	<b>1.074</b>
Rham. 6 h	41.14	12.98	<b>3.169</b>	Rham. 6 h	16.03	12.98	<b>1.234</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	11.56	13.26	<b>0.872</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	25.81	12.98	<b>1.988</b>	Rham. 1 h	1.13	12.98	<b>0.087</b>
Rham. 2 h	42.63	13.03	<b>3.272</b>	Rham. 2 h	3.04	13.03	<b>0.233</b>
Rham. 4 h	48.53	11.37	<b>4.269</b>	Rham. 4 h	5.07	11.37	<b>0.446</b>
Rham. 6 h	46.91	13.26	<b>3.538</b>	Rham. 6 h	7.00	13.26	<b>0.528</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	15.50	12.48	<b>1.242</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	38.77	11.40	<b>3.402</b>	Rham. 1 h	1.55	11.40	<b>0.136</b>
Rham. 2 h	43.14	10.22	<b>4.222</b>	Rham. 2 h	2.70	10.22	<b>0.264</b>
Rham. 4 h	46.77	11.30	<b>4.138</b>	Rham. 4 h	4.40	11.30	<b>0.390</b>
Rham. 6 h	42.28	10.97	<b>3.853</b>	Rham. 6 h	5.97	10.97	<b>0.544</b>

Caco-2 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein- gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	n.d.		n.d.
Rham. 2 h	n.d.		n.d.
Rham. 4 h	n.d.		n.d.
Rham. 6 h	n.d.		n.d.
<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	1.47	12.98	0.113
Rham. 2 h	3.90	13.03	0.299
Rham. 4 h	6.74	11.37	0.593
Rham. 6 h	9.82	13.26	0.740

<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	n.d.		n.d.
Rham. 1 h	1.60	11.40	0.140
Rham. 2 h	3.19	10.22	0.312
Rham. 4 h	5.17	11.30	0.457
Rham. 6 h	7.72	10.97	0.704

**Tabelle 26:** Intrazellulärer Gehalt an Rhamnetin in HepG2 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert. In einer weiteren Tabelle sind die Metabolite als Rhamnetin-Metabolite dargestellt.

HepG2	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	HepG2 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	7.92	10.53	<b>0.752</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	37.98	9.26	<b>4.100</b>	Rham. 1 h	1.03	9.26	<b>0.111</b>
Rham. 2 h	73.78	9.40	<b>7.846</b>	Rham. 2 h	1.44	9.40	<b>0.153</b>
Rham. 4 h	57.12	10.34	<b>5.523</b>	Rham. 4 h	0.61	10.34	<b>0.059</b>
Rham. 6 h	46.74	9.26	<b>5.045</b>	Rham. 6 h	n.d.		<b>n.d.</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	13.17	13.14	<b>1.002</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	38.67	9.51	<b>4.065</b>	Rham. 1 h	1.17	9.51	<b>0.123</b>
Rham. 2 h	57.56	6.59	<b>8.733</b>	Rham. 2 h	1.33	6.59	<b>0.201</b>
Rham. 4 h	87.25	7.82	<b>11.163</b>	Rham. 4 h	0.62	7.82	<b>0.079</b>
Rham. 6 h	48.28	7.39	<b>6.531</b>	Rham. 6 h	n.d.		<b>n.d.</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	n.d.	5.18	<b>n.d.</b>	Rham. 0 h	n.d.		<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	74.95	9.44	<b>7.941</b>	Rham. 1 h	0.81	9.44	<b>0.086</b>
Rham. 2 h	144.14	9.84	<b>14.645</b>	Rham. 2 h	0.96	9.84	<b>0.098</b>
Rham. 4 h	124.45	9.96	<b>12.498</b>	Rham. 4 h	0.76	9.96	<b>0.076</b>
Rham. 6 h	112.29	9.09	<b>12.356</b>	Rham. 6 h	n.d.		<b>n.d.</b>

HepG2 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	HepG2 Metabolite	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Rham. 0 h	0.62	10.53	<b>0.058</b>	Rham. 0 h	0.76	10.53	<b>0.072</b>
Rham. 1 h	1.77	9.26	<b>0.191</b>	Rham. 1 h	2.43	9.26	<b>0.262</b>
Rham. 2 h	2.99	9.40	<b>0.318</b>	Rham. 2 h	3.77	9.40	<b>0.401</b>
Rham. 4 h	3.98	10.34	<b>0.385</b>	Rham. 4 h	5.70	10.34	<b>0.551</b>
Rham. 6 h	4.42	9.26	<b>0.477</b>	Rham. 6 h	7.04	9.26	<b>0.760</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Rham. 0 h	0.68	13.14	<b>0.052</b>	Rham. 0 h	0.87	13.14	<b>0.067</b>
Rham. 1 h	1.61	9.51	<b>0.169</b>	Rham. 1 h	2.22	9.51	<b>0.233</b>
Rham. 2 h	2.26	6.59	<b>0.343</b>	Rham. 2 h	3.10	6.59	<b>0.471</b>
Rham. 4 h	3.94	7.82	<b>0.504</b>	Rham. 4 h	5.82	7.82	<b>0.745</b>
Rham. 6 h	4.49	7.39	<b>0.607</b>	Rham. 6 h	7.52	7.39	<b>1.017</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Rham. 0 h	0.50	5.18	<b>0.097</b>	Rham. 0 h	n.d.	5.18	<b>n.d.</b>
Rham. 1 h	3.64	9.44	<b>0.386</b>	Rham. 1 h	n.d.	9.44	<b>n.d.</b>
Rham. 2 h	9.01	9.84	<b>0.915</b>	Rham. 2 h	n.d.	9.84	<b>n.d.</b>
Rham. 4 h	10.49	9.96	<b>1.053</b>	Rham. 4 h	n.d.	9.96	<b>n.d.</b>
Rham. 6 h	12.62	9.09	<b>1.388</b>	Rham. 6 h	n.d.	9.09	<b>n.d.</b>



**Tabelle 27:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in Hct116 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Myricetin- bzw. Laricitrin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	4.48	110.64	4425	10975	<b>0.403</b>
Laricitrin	4.41	109.55	4382	10975	<b>0.399</b>
Syringetin	9.246	182.51	7301	8435	<b>0.865</b>
MTM	7.489	210.21	8408	8209	<b>1.024</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	6.76	161.62	6465	9751	<b>0.663</b>
Laricitrin	5.12	124.14	4966	9408	<b>0.528</b>
Syringetin	8.934	176.71	7069	9388	<b>0.753</b>
MTM	9.108	255.18	10207	9297	<b>1.098</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	5.21	126.85	5074	8755	<b>0.580</b>
Laricitrin	7.04	163.83	6553	10900	<b>0.601</b>
Syringetin	2.991	66.25	2650	8569	<b>0.309</b>
MTM	4.476	126.52	5061	7869	<b>0.643</b>

15 min Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	4.05	100.93	4037.05	10975	<b>0.368</b>
Laricitrin	8.515	194.45	7778.14	10975	<b>0.709</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	6.89	164.51	6580.22	9751	<b>0.675</b>
Laricitrin	2.375	67.33	2693.25	9408	<b>0.286</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	2.46	65.49	2619.60	8755	<b>0.299</b>
Laricitrin	6.188	146.28	5851.01	10900	<b>0.537</b>

1 h Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	7.925	187.70	7508.19	9297	<b>0.808</b>
Laricitrin	5.970	141.76	5670.48	8980	<b>0.631</b>
Syringetin	20.711	395.62	15824.68	9615	<b>1.646</b>
MTM	10.772	301.41	12056.22	8889	<b>1.356</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	6.052	145.80	5832.13	11111	<b>0.525</b>
Laricitrin	2.685	73.75	2949.98	7963	<b>0.370</b>
Syringetin	16.648	320.10	12803.87	11156	<b>1.148</b>
MTM	12.456	348.18	13927.33	9796	<b>1.422</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	6.839	163.41	6536.38	8429	<b>0.775</b>
Laricitrin	3.093	82.20	3287.87	8662	<b>0.380</b>
Syringetin	13.575	262.98	10519.11	9828	<b>1.070</b>
MTM	7.714	216.46	8658.44	8615	<b>1.005</b>

1 h Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	3.04	78.38	3135.03	9297	<b>0.337</b>
Laricitrin	6.921	161.45	6458.05	8980	<b>0.719</b>

<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	6.87	164.10	6564.12	11111	<b>0.591</b>
Laricitrin	1.969	58.93	2357.02	7963	<b>0.296</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	1.67	47.82	1912.66	8429	<b>0.227</b>
Laricitrin	4.769	116.90	4675.86	8662	<b>0.540</b>

**Tabelle 28:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in Caco-2 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Laricitrin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation Caco-2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			10127	<b>0.000</b>
Laricitrin	2.177	63.23	2529.28	9978	<b>0.253</b>
Syringetin	9.024	178.39	7135.46	10477	<b>0.681</b>
MTM	8.839	247.71	9908.44	9828	<b>1.008</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	n.d.			12424	<b>0.000</b>
Laricitrin	3.828	97.41	3896.56	11226	<b>0.347</b>
Syringetin	6.902	138.94	5557.77	11526	<b>0.482</b>
MTM	10.162	284.46	11378.44	11975	<b>0.950</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	n.d.			12844	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.618	51.66	2066.34	15211	<b>0.136</b>
Syringetin	9.249	182.57	7302.75	12218	<b>0.598</b>
MTM	10.168	284.63	11385.11	14776	<b>0.771</b>

15 min Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Laricitrin	2.950	79.24	3169.44	9978	<b>0.318</b>
<b>Versuch 2</b>					
Laricitrin	7.055	164.23	6569.03	11226	<b>0.585</b>
<b>Versuch 3</b>					
Laricitrin	4.333	107.87	4314.78	15211	<b>0.284</b>

1 h Inkubation Caco-2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			10876	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.665	52.63	2105.26	8579	<b>0.245</b>
Syringetin	5.390	110.84	4433.61	9678	<b>0.458</b>
MTM	8.989	251.88	10075.11	8529	<b>1.181</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	n.d.			12824	<b>0.000</b>
Laricitrin	3.477	90.15	3605.88	10177	<b>0.354</b>
Syringetin	4.379	92.05	3681.93	11176	<b>0.329</b>
MTM	7.971	223.60	8944.00	10677	<b>0.838</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	n.d.			12707	<b>0.000</b>
Laricitrin	2.416	68.18	2727.20	12925	<b>0.211</b>
Syringetin	9.496	187.16	7486.39	14395	<b>0.520</b>
MTM	15.147	422.93	16917.33	12327	<b>1.372</b>

1 h Inkubation Metabolite I	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Laricitrin	2.583	71.64	2865.51	8579	<b>0.334</b>
<b>Versuch 2</b>					
Laricitrin	5.945	141.24	5649.77	10177	<b>0.555</b>
<b>Versuch 3</b>					
Laricitrin	4.481	110.93	4437.35	12925	<b>0.343</b>

1 h Inkubation Metabolite II	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Laricitrin	2.583	71.64	2865.51	8579	<b>0.334</b>
<b>Versuch 2</b>					
Laricitrin	5.945	141.24	5649.77	10177	<b>0.555</b>
<b>Versuch 3</b>					
Laricitrin	4.481	110.93	4437.35	12925	<b>0.343</b>

**Tabelle 29:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in HepG2 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Myricetin- bzw. Laricitrin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	3.236	82.81	3312.21	19183	<b>0.173</b>
Laricitrin	5.366	129.26	5170.27	19499	<b>0.265</b>
Syringetin	7.897	157.44	6297.55	15863	<b>0.397</b>
MTM	15.894	443.68	17747.33	27246	<b>0.651</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	3.734	93.95	3757.85	16179	<b>0.232</b>
Laricitrin	10.747	240.66	9626.58	15916	<b>0.605</b>
Syringetin	7.304	146.42	5856.65	14967	<b>0.391</b>
MTM	17.429	486.32	19452.89	15599	<b>1.247</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	1.212	37.53	1501.03	12490	<b>0.120</b>
Laricitrin	3.827	97.39	3895.73	13959	<b>0.279</b>
Syringetin	8.734	173.00	6919.85	12381	<b>0.559</b>
MTM	14.339	400.49	16019.56	13905	<b>1.152</b>

15 min Inkubation Metabolite I	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	6.735	161.08	6443.31	19183	<b>0.336</b>
Laricitrin	7.415	171.68	6867.16	19499	<b>0.352</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	1.678	47.95	1918.03	16179	<b>0.119</b>
Laricitrin	1.649	52.30	2092.01	15916	<b>0.131</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	3.077	79.25	3169.93	12490	<b>0.254</b>
Laricitrin	4.310	107.39	4295.73	13959	<b>0.308</b>

15 min Inkubation Metabolite II	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			19183	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.399	47.12	1884.97	19499	<b>0.097</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	0.87	29.94	1197.67	16179	<b>0.074</b>
Laricitrin	1.161	42.20	1687.87	15916	<b>0.106</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	0.72	26.56	1062.55	12490	<b>0.085</b>
Laricitrin	0.974	38.33	1533.00	13959	<b>0.110</b>

1 h Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	4.208	104.55	4182.01	18498	<b>0.226</b>
Laricitrin	4.533	112.01	4480.41	20711	<b>0.216</b>
Syringetin	19.740	377.57	15102.75	18393	<b>0.821</b>
MTM	21.112	588.63	23545.11	13544	<b>1.738</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	7.999	189.36	7574.41	16970	<b>0.446</b>
Laricitrin	11.504	256.34	10253.50	14914	<b>0.687</b>
Syringetin	27.450	520.88	20835.09	15705	<b>1.327</b>
MTM	31.033	864.21	34568.44	15758	<b>2.194</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	4.418	109.25	4369.93	13687	<b>0.319</b>
Laricitrin	4.255	106.25	4250.19	13905	<b>0.306</b>
Syringetin	13.942	269.80	10791.97	12653	<b>0.853</b>
MTM	20.488	571.29	22851.78	12327	<b>1.854</b>

1 h Inkubation Metabolite I	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	6.902	164.82	6592.75	18498	<b>0.356</b>
Laricitrin	5.960	141.55	5662.19	20711	<b>0.273</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	0.771	27.66	1106.40	16970	<b>0.065</b>
Laricitrin	1.426	47.68	1907.33	14914	<b>0.128</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	4.049	100.99	4039.73	13687	<b>0.295</b>
Laricitrin	4.235	105.84	4233.62	13905	<b>0.304</b>

1 h Inkubation Metabolite II	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	0.672	25.45	1017.81	18498	<b>0.055</b>
Laricitrin	2.112	61.89	2475.45	20711	<b>0.120</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	0.794	28.17	1126.98	16970	<b>0.066</b>
Laricitrin	2.681	73.67	2946.67	14914	<b>0.198</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	0.694	25.94	1037.49	13687	<b>0.076</b>
Laricitrin	1.858	56.63	2265.09	13905	<b>0.163</b>

**Tabelle 30:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in Hct116 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation bei 4°C. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. Versuch 3 wurde mit HPLC 2 (Merck-Hitachi) gemessen. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Myricetin- und Laricitrin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	0.00			5785	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.036	39.61	1584.35	7908	<b>0.200</b>
Syringetin	3.493	75.58	3023.20	5278	<b>0.573</b>
MTM	1.507	44.04	1761.78	5785	<b>0.305</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	0.00			8977	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.578	50.83	2033.21	8195	<b>0.248</b>
Syringetin	3.159	69.37	2774.87	7544	<b>0.368</b>
MTM	2.956	84.29	3371.78	7023	<b>0.480</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	81980	27.90	1116.16	10932	<b>0.102</b>
Laricitrin	165580	99.97	3998.71	12133	<b>0.330</b>
Syringetin	114940	53.03	2121.34	11216	<b>0.189</b>
MTM	141320	103.07	4122.64	10616	<b>0.388</b>

15 min Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			5785	<b>0.000</b>
Laricitrin	3.112	82.59	3303.60	7908	<b>0.418</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	2.613	68.87	2754.72	8977	<b>0.307</b>
Laricitrin	6.364	149.92	5996.77	8195	<b>0.732</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	70500	20.77	830.91	10932	<b>0.076</b>
Laricitrin	58040	19.27	770.73	12133	<b>0.064</b>

1 h Inkubation Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			6385	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.054	39.98	1599.25	6939	<b>0.230</b>
Syringetin	7.881	157.14	6285.65	6570	<b>0.957</b>
MTM	1.194	35.35	1414.00	5785	<b>0.244</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	0.807	28.47	1138.61	8326	<b>0.137</b>
Laricitrin	2.012	59.82	2392.63	7066	<b>0.339</b>
Syringetin	5.371	110.49	4419.48	7805	<b>0.566</b>
MTM	2.923	83.38	3335.11	7457	<b>0.447</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	198360	100.20	4007.95	11058	<b>0.362</b>
Laricitrin	220320	141.05	5641.81	10869	<b>0.519</b>
Syringetin	162920	77.36	3094.27	11058	<b>0.280</b>
MTM	32280	20.99	839.79	10047	<b>0.084</b>

1 h Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	1.174	36.68	1467.02	6385	<b>0.230</b>
Laricitrin	2.916	78.53	3141.28	6939	<b>0.453</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	4.678	115.06	4602.60	8326	<b>0.553</b>
Laricitrin	5.993	142.24	5689.52	7066	<b>0.805</b>
<b>Versuch 3</b>					
Myricetin	81760	27.77	1110.70	11058	<b>0.100</b>
Laricitrin	69880	28.15	1126.13	10869	<b>0.104</b>

**Tabelle 31:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in Caco-2 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation bei 4°C. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. Beide Versuche wurden mit HPLC 2 (Merck-Hitachi) gemessen.

15 min Inkubation Caco-2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			9490	<b>0.000</b>
Laricitrin	54920	16.93	677.08	12061	<b>0.056</b>
Syringetin	244040	118.48	4739.21	11528	<b>0.411</b>
MTM	187820	138.07	5522.61	11261	<b>0.490</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	n.d.			13928	<b>0.000</b>
Laricitrin	80720	36.29	1451.51	9090	<b>0.160</b>
Syringetin	230320	111.52	4461.00	11185	<b>0.399</b>
MTM	165000	120.89	4835.57	10690	<b>0.452</b>

1 h Inkubation Caco-2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			12518	<b>0.000</b>
Laricitrin	129360	72.79	2911.51	9718	<b>0.300</b>
Syringetin	273560	133.45	5337.81	9928	<b>0.538</b>
MTM	188600	138.65	5546.09	10347	<b>0.536</b>
<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	n.d.			12366	<b>0.000</b>
Laricitrin	83100	38.07	1522.95	8823	<b>0.173</b>
Syringetin	247600	120.28	4811.40	11947	<b>0.403</b>
MTM	143760	104.90	4196.10	11261	<b>0.373</b>

**Tabelle 32:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin-Derivaten in HepG2 Zellen nach 15 min und 1 h Inkubation bei 4°C. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Laricitrin-Metabolite dargestellt.

15 min Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			8947	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.766	54.72	2188.90	9135	<b>0.240</b>
Syringetin	3.63	78.13	3125.06	7345	<b>0.425</b>
MTM	5.851	164.71	6588.44	8193	<b>0.804</b>

<b>Versuch 2</b>					
Myricetin	n.d.			7031	<b>0.000</b>
Laricitrin	0.764	33.98	1359.09	7585	<b>0.179</b>
Syringetin	3.051	67.36	2694.57	7723	<b>0.349</b>
MTM	3.953	111.99	4479.56	8185	<b>0.547</b>

15 min Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Laricitrin	3.066	81.64	3265.51	9135	<b>0.357</b>
<b>Versuch 2</b>					
Laricitrin	1.780	55.01	2200.50	7585	<b>0.290</b>

1 h Inkubation HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Myricetin	n.d.			7251	<b>0.000</b>
Laricitrin	2.24	64.54	2581.45	8052	<b>0.321</b>
Syringetin	9.88	194.30	7771.90	7062	<b>1.100</b>
MTM	6.056	170.41	6816.22	8476	<b>0.804</b>
<b>Versuch 2</b>			0.00		
Myricetin	n.d.		0.00	7354	<b>0.000</b>
Laricitrin	1.838	56.21	2248.53	7585	<b>0.296</b>
Syringetin	4.693	97.88	3915.39	6385	<b>0.613</b>
MTM	3.834	108.68	4347.33	7077	<b>0.614</b>

1 h Inkubation Metabolite	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
Laricitrin	3.936	99.65	3986.00	8052	<b>0.495</b>
<b>Versuch 2</b>					
Laricitrin	2.563	71.22	2848.94	7585	<b>0.376</b>

**Tabelle 33:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin in Hct116 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Myricetin-Metabolite dargestellt.

MYRICETIN Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			18026	<b>n.d.</b>
1 h	9.84	230.52	9220.94	15910	<b>0.580</b>
2 h	8.18	193.41	7736.38	16487	<b>0.469</b>
4 h	3.36	85.49	3419.60	18795	<b>0.182</b>
6 h	7.71	182.83	7313.11	15462	<b>0.473</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			8988	<b>n.d.</b>
1 h	6.20	149.11	5964.56	9128	<b>0.653</b>
2 h	7.59	180.30	7211.99	8336	<b>0.865</b>
4 h	6.07	146.21	5848.23	6378	<b>0.917</b>
6 h	4.13	102.69	4107.74	7683	<b>0.535</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			8382	<b>n.d.</b>
1 h	6.792	162.36	6494.32	10527	<b>0.617</b>
2 h	6.819	162.96	6518.48	9408	<b>0.693</b>
4 h	6.94	165.67	6626.76	8709	<b>0.761</b>
6 h	5.408	131.40	5255.84	11040	<b>0.476</b>

<b>Versuch 4</b>					
0 h				8382	n.d.
1 h	2.17	59.05	2361.88	9465	<b>0.250</b>
2 h	4.54	111.96	4478.21	8146	<b>0.550</b>
4 h	5.15	125.53	5021.39	7251	<b>0.693</b>
6 h	3.70	93.23	3729.22	9559	<b>0.390</b>

<b>MYRICETIN Metabolit</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			18026	
1 h	n.d.			15910	
2 h	n.d.			16487	
4 h	n.d.			18795	
6 h	n.d.			15462	
<b>Versuch 2</b>					
0 h	0.61	24.08	963.22	8988.34	<b>0.107</b>
1 h	2.00	55.11	2204.38	9128.21	<b>0.241</b>
2 h	2.23	60.34	2413.78	8335.66	<b>0.290</b>
4 h	1.00	32.74	1309.53	6377.62	<b>0.205</b>
6 h	n.d.			7682.98	<b>0.000</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			8382.28	<b>0.000</b>
1 h	2.852	74.21	2968.59	10526.81	<b>0.282</b>
2 h	3.15	80.88	3235.26	9407.93	<b>0.344</b>
4 h	0.879	30.08	1203.04	8708.62	<b>0.138</b>
6 h	8.842	208.22	8328.77	11039.63	<b>0.754</b>
<b>Versuch 4</b>					
0 h	n.d.			8382	<b>0.000</b>
1 h	5.65	136.74	5469.71	9465	<b>0.578</b>
2 h	5.10	124.53	4981.12	8146	<b>0.611</b>
4 h	2.59	68.40	2735.93	7251	<b>0.377</b>
6 h	1.99	54.98	2199.02	9559	<b>0.230</b>

**Tabelle 34:** Intrazellulärer Gehalt an Myricetin in HepG2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Myricetin-Metabolite dargestellt.

<b>MYRICETIN HepG2</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			14350	<b>0.000</b>
1 h	10.52	245.74	9829.44	16914	<b>0.581</b>
2 h	3.87	97.06	3882.24	14350	<b>0.271</b>
4 h	2.20	59.52	2380.67	12718	<b>0.187</b>
6 h	1.47	43.25	1730.11	13324	<b>0.130</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			19664	<b>0.000</b>
1 h	13.57	313.99	12559.64	17846	<b>0.704</b>
2 h	6.30	151.40	6055.84	16867	<b>0.359</b>
4 h	0.80	28.20	1127.87	15329	<b>0.074</b>
6 h	n.d.			12392	<b>0.000</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			7011	<b>0.000</b>
1 h	1.76	49.70	1987.83	7860	<b>0.253</b>
2 h	4.89	119.74	4789.62	7311	<b>0.655</b>
4 h	2.10	57.28	2291.19	8310	<b>0.276</b>
6 h	n.d.			5263	<b>0.000</b>



<b>Versuch 4</b>					
0 h	n.d.			8967	<b>0.000</b>
1 h	3.64	91.91	3676.42	8153	<b>0.451</b>
2 h	0.74	26.97	1078.66	8051	<b>0.134</b>
4 h	1.07	34.35	1373.96	9425	<b>0.146</b>
6 h	n.d.			8000	<b>0.000</b>

<b>MYRICETIN Metabolit I</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			14350	<b>0.000</b>
1 h	6.27	150.66	6026.31	16914	<b>0.356</b>
2 h	6.19	148.87	5954.72	14350	<b>0.415</b>
4 h	4.86	119.09	4763.67	12718	<b>0.375</b>
6 h	1.75	49.54	1981.57	13324	<b>0.149</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			19664	<b>0.000</b>
1 h	5.23	127.46	5098.34	17846	<b>0.286</b>
2 h	6.84	163.39	6535.48	16867	<b>0.387</b>
4 h	5.79	139.92	5596.78	15329	<b>0.365</b>
6 h	n.d.			12392	<b>0.000</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			7011	<b>0.000</b>
1 h	6.46	154.98	6199.02	7860	<b>0.789</b>
2 h	5.17	125.96	5038.39	7311	<b>0.689</b>
4 h	3.33	84.80	3391.86	8310	<b>0.408</b>
6 h	0.62	24.21	968.59	5263	<b>0.184</b>
<b>Versuch 4</b>					
0 h	n.d.			8967	<b>0.000</b>
1 h	5.85	141.33	5653.15	8153	<b>0.693</b>
2 h	2.24	60.43	2417.36	8051	<b>0.300</b>
4 h	3.50	88.69	3547.56	9425	<b>0.376</b>
6 h	n.d.			8000	<b>0.000</b>

<b>MYRICETIN Metabolit II</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	0.56	23.03	921.16	14350	<b>0.064</b>
1 h	0.72	26.41	1056.29	16914	<b>0.062</b>
2 h	0.65	24.89	995.44	14350	<b>0.069</b>
4 h	0.66	25.27	1010.65	12718	<b>0.079</b>
6 h	0.56	23.03	921.16	13324	<b>0.069</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	0.85	29.34	1173.51	19664	<b>0.060</b>
1 h	0.88	30.17	1206.62	17846	<b>0.068</b>
2 h	0.89	30.26	1210.20	16867	<b>0.072</b>
4 h	0.82	28.69	1147.56	15329	<b>0.075</b>
6 h	0.68	25.60	1024.07	12392	<b>0.083</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	0.57	23.16	926.53	7011	<b>0.132</b>
1 h	0.53	22.22	888.95	7860	<b>0.113</b>
2 h	0.76	27.48	1099.24	7311	<b>0.150</b>
4 h	0.79	28.04	1121.61	8310	<b>0.135</b>
6 h	0.57	23.07	922.95	5263	<b>0.175</b>
<b>Versuch 4</b>					
0 h	n.d.			8967	
1 h	n.d.			8153	
2 h	n.d.			8051	
4 h	n.d.			9425	
6 h	n.d.			8000	

**Tabelle 35:** Intrazellulärer Gehalt an Laricitrin in Hct116 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Laricitrin-Metabolite dargestellt.

LARICITRIN Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			8299	<b>0.000</b>
1 h	3.79	96.65	3865.92	8027	<b>0.482</b>
2 h	2.80	76.07	3042.73	8680	<b>0.351</b>
4 h	2.30	65.78	2631.14	8789	<b>0.299</b>
6 h	3.04	81.12	3244.80	7810	<b>0.415</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			6873	<b>0.000</b>
1 h	1.016	39.19	1567.78	6245	<b>0.251</b>
2 h	0.602	30.62	1224.93	5796	<b>0.211</b>
4 h	n.d.			5706	<b>n.d.</b>
6 h	0.571	29.98	1199.25	5886	<b>0.204</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	2.984	79.94	3197.60	11652	<b>0.274</b>
1 h	5.718	136.54	5461.78	11200	<b>0.488</b>
2 h	4.750	116.50	4660.12	10115	<b>0.461</b>
4 h	6.922	161.47	6458.88	9708	<b>0.665</b>
6 h	8.493	194.00	7759.92	8488	<b>0.914</b>
<b>Versuch 4</b>					
0 h	1.513	49.48	1979.38	5111	<b>0.387</b>
1 h	2.032	60.23	2409.19	7727	<b>0.312</b>
2 h	1.157	42.11	1684.55	7889	<b>0.214</b>
4 h	2.818	76.50	3060.12	5481	<b>0.558</b>
6 h	3.207	84.56	3382.28	6361	<b>0.532</b>
<b>LARICITRIN Metabolit</b>					
AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein	
<b>Versuch 1</b>					
0 h	2.899	78.18	3127.20	8299	<b>0.377</b>
1 h	7.177	166.75	6670.06	8027	<b>0.831</b>
2 h	5.606	134.23	5369.03	8680	<b>0.619</b>
4 h	3.201	84.43	3377.31	8789	<b>0.384</b>
6 h	2.847	77.10	3084.14	7810	<b>0.395</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	2.359	67.00	2680.00	6873	<b>0.390</b>
1 h	6.435	151.39	6055.57	6245	<b>0.970</b>
2 h	6.102	144.49	5779.79	5796	<b>0.997</b>
4 h	4.601	113.42	4536.73	5706	<b>0.795</b>
6 h	5.549	133.05	5321.82	5886	<b>0.904</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	8.439	192.88	7715.20	11652	<b>0.662</b>
1 h	7.682	177.21	7088.28	11200	<b>0.633</b>
2 h	5.158	124.95	4998.01	10115	<b>0.494</b>
4 h	3.541	91.47	3658.88	9708	<b>0.377</b>
6 h	1.811	55.65	2226.17	8488	<b>0.262</b>
<b>Versuch 4</b>					
0 h	3.805	96.94	3877.52	5111	<b>0.759</b>
1 h	3.193	84.27	3370.68	7727	<b>0.436</b>
2 h	1.876	57.00	2280.00	7889	<b>0.289</b>
4 h	1.970	58.95	2357.85	5481	<b>0.430</b>
6 h	2.201	63.73	2549.15	6361	<b>0.401</b>

**Tabelle 36:** Intrazellulärer Gehalt an Laricitrin in Caco-2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. Nach Inkubation und Aufarbeitung der Zellen konnte nur in 1 von 3 Experimenten Laricitrin detektiert werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Laricitrin-Metabolite dargestellt.

LARICITRIN Caco-2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			11837	
1 h	1.099	40.91	1636.52	10204	<b>0.160</b>
2 h	1.490	49.01	1960.33	13088	<b>0.150</b>
4 h	1.290	44.87	1794.70	9551	<b>0.188</b>
6 h	2.211	63.94	2557.43	11619	<b>0.220</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			10195	n.d.
1 h	n.d.			11228	n.d.
2 h	n.d.			12238	n.d.
4 h	n.d.			10016	n.d.
6 h	n.d.			9544	n.d.
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			8400	n.d.
1 h	n.d.			9522	n.d.
2 h	n.d.			9073	n.d.
4 h	n.d.			8220	n.d.
6 h	n.d.			7591	n.d.

LARICITRIN Metabolit	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	0.993	38.72	1548.74	11837	<b>0.131</b>
1 h	4.092	102.88	4115.20	10204	<b>0.403</b>
2 h	4.000	100.98	4039.01	13088	<b>0.309</b>
4 h	2.174	63.17	2526.79	9551	<b>0.265</b>
6 h	1.047	39.84	1593.46	11619	<b>0.137</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			10195	<b>0.000</b>
1 h	2.388	67.60	2704.02	11228	<b>0.241</b>
2 h	2.810	76.34	3053.50	12238	<b>0.250</b>
4 h	2.014	59.86	2394.29	10016	<b>0.239</b>
6 h	1.462	48.43	1937.14	9544	<b>0.203</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			8400	<b>0.000</b>
1 h	2.480	69.51	2780.21	9522	<b>0.292</b>
2 h	3.741	95.61	3824.51	9073	<b>0.422</b>
4 h	2.864	77.46	3098.22	8220	<b>0.377</b>
6 h	1.893	57.35	2294.08	7591	<b>0.302</b>

LARICITRIN Metabolit II	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			11837	<b>0.000</b>
1 h	0.621	31.02	1240.66	10204	<b>0.122</b>
2 h	1.175	42.49	1699.46	13088	<b>0.130</b>
4 h	1.652	52.36	2094.49	9551	<b>0.219</b>
6 h	2.714	74.35	2974.00	11619	<b>0.256</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			10195	<b>0.000</b>
1 h	0.541	29.36	1174.41	11228	<b>0.105</b>
2 h	1.174	42.47	1698.63	12238	<b>0.139</b>
4 h	1.793	55.28	2211.26	10016	<b>0.221</b>
6 h	2.215	64.02	2560.75	9544	<b>0.268</b>

<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			8400	<b>0.000</b>
1 h	n.d.			9522	<b>0.000</b>
2 h	0.770	34.10	1364.06	9073	<b>0.150</b>
4 h	1.804	55.51	2220.37	8220	<b>0.270</b>
6 h	2.642	72.86	2914.37	7591	<b>0.384</b>

**Tabelle 37:** Intrazellulärer Gehalt an Laricitrin in HepG2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. Nach Inkubation der Zellen konnte kein Laricitrin detektiert werden, sondern nur dessen Metabolite, die in der unteren Tabelle umgerechnet als Laricitrin-Metabolite dargestellt sind.

<b>LARICITRIN Metabolit I HepG2</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			12490	<b>0.000</b>
1 h	5.452	131.04	5241.49	14993	<b>0.350</b>
2 h	3.385	88.24	3529.69	12980	<b>0.272</b>
4 h	1.820	55.84	2233.62	13578	<b>0.165</b>
6 h	1.756	54.52	2180.62	11946	<b>0.183</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	2.199	63.69	2547.49	8624	<b>0.295</b>
1 h	5.245	126.75	5070.06	8310	<b>0.610</b>
2 h	5.577	133.63	5345.01	10644	<b>0.502</b>
4 h	3.401	88.57	3542.94	7861	<b>0.451</b>
6 h	1.990	59.36	2374.41	9926	<b>0.239</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	1.815	55.74	2229.48	13204	<b>0.169</b>
1 h	2.759	75.28	3011.26	11363	<b>0.265</b>
2 h	3.591	92.51	3700.29	10716	<b>0.345</b>
4 h	1.709	53.54	2141.70	12806	<b>0.167</b>
6 h	n.d.			10070	<b>0.000</b>

<b>LARICITRIN Metabolit II</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			12490	<b>0.000</b>
1 h	2.120	62.05	2482.07	14993	<b>0.166</b>
2 h	2.532	70.58	2823.27	12980	<b>0.218</b>
4 h	3.037	81.04	3241.49	13578	<b>0.239</b>
6 h	3.124	82.84	3313.54	11946	<b>0.277</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			8624	<b>0.000</b>
1 h	1.181	42.61	1704.43	8310	<b>0.205</b>
2 h	2.966	79.57	3182.69	10644	<b>0.299</b>
4 h	3.710	94.97	3798.84	7861	<b>0.483</b>
6 h	4.329	107.79	4311.47	9926	<b>0.434</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	0.519	28.90	1156.19	13204	<b>0.088</b>
1 h	2.110	61.84	2473.79	11363	<b>0.218</b>
2 h	3.153	83.44	3337.56	10716	<b>0.311</b>
4 h	4.206	105.24	4209.61	12806	<b>0.329</b>
6 h	5.277	127.41	5096.56	10070	<b>0.506</b>

**Tabelle 38:** Intrazellulärer Gehalt an Syringetin in Hct116 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden.

<b>SYRINGETIN Hct116</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	2.139	50.41	2016.51	7873	<b>0.256</b>
1 h	21.58	411.77	16470.78	6978	<b>2.361</b>
2 h	24.64	468.72	18748.85	7920	<b>2.367</b>
4 h	36.73	693.31	27732.49	6978	<b>3.974</b>
6 h	31.31	592.57	23702.75	7213	<b>3.286</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	3.11	68.46	2738.44	7213	<b>0.380</b>
1 h	10.79	211.12	8444.76	7731	<b>1.092</b>
2 h	18.99	363.63	14545.13	6931	<b>2.099</b>
4 h	40.94	771.55	30861.86	6412	<b>4.813</b>
6 h	19.70	376.77	15070.78	9993	<b>1.508</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	0.937	28.07	1122.83	8391	<b>0.134</b>
1 h	10.16	199.41	7976.36	7260	<b>1.099</b>
2 h	18.54	355.30	14212.04	6836	<b>2.079</b>
4 h	17.70	339.61	13584.54	7543	<b>1.801</b>
6 h	26.66	506.27	20250.71	7213	<b>2.807</b>

**Tabelle 39:** Intrazellulärer Gehalt an Syringetin in Caco-2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden.

<b>SYRINGETIN Caco-2</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	1.42	37.05	1481.93	11064	<b>0.134</b>
1 h	8.71	172.61	6904.24	11019	<b>0.627</b>
2 h	6.79	136.81	5472.27	11833	<b>0.462</b>
4 h	4.90	101.77	4070.78	8533	<b>0.477</b>
6 h	6.50	131.53	5261.12	8805	<b>0.598</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	2.10	49.61	1984.54	10104	<b>0.196</b>
1 h	5.25	108.20	4328.03	9328	<b>0.464</b>
2 h	3.82	81.70	3267.81	8310	<b>0.393</b>
4 h	5.16	106.60	4264.09	10783	<b>0.395</b>
6 h	6.39	129.35	5174.13	10444	<b>0.495</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	1.14	31.92	1276.73	11025	<b>0.116</b>
1 h	3.92	83.55	3342.16	12335	<b>0.271</b>
2 h	5.08	105.04	4201.64	11510	<b>0.365</b>
4 h	5.98	121.86	4874.50	10735	<b>0.454</b>
6 h	4.55	95.23	3809.07	9377	<b>0.406</b>

**Tabelle 40:** Intrazellulärer Gehalt an Syringetin in HepG2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als Syringetin-Metabolite dargestellt. In einem der 3 Experimente konnten keine Metabolite detektiert werden.

SYRINGETIN HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	1.50	38.57	1542.90	9477	<b>0.163</b>
1 h	9.91	194.93	7797.17	10330	<b>0.755</b>
2 h	17.30	332.16	13286.39	9657	<b>1.376</b>
4 h	33.37	630.99	25239.55	9522	<b>2.651</b>
6 h	30.42	576.01	23040.30	8355	<b>2.758</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	1.73	42.72	1708.70	8907	<b>0.192</b>
1 h	2.87	64.02	2560.74	7056	<b>0.363</b>
2 h	4.31	90.82	3632.86	4741	<b>0.766</b>
4 h	10.54	206.51	8260.37	7194	<b>1.148</b>
6 h	13.52	261.97	10478.96	6269	<b>1.672</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	0.83	26.14	1045.50	9075	<b>0.115</b>
1 h	11.45	223.46	8938.44	10531	<b>0.849</b>
2 h	26.41	501.62	20064.83	9216	<b>2.177</b>
4 h	30.78	582.81	23312.42	9216	<b>2.530</b>
6 h	35.57	671.88	26875.24	7901	<b>3.401</b>

SYRINGETIN Metabolit	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			9477	<b>0.000</b>
1 h	1.32	35.12	1404.61	10330	<b>0.136</b>
2 h	1.98	47.42	1896.80	9657	<b>0.196</b>
4 h	2.19	51.36	2054.42	9522	<b>0.216</b>
6 h	2.02	48.20	1928.03	8355	<b>0.231</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			8907	<b>n.d.</b>
1 h	n.d.			7056	<b>n.d.</b>
2 h	n.d.			4741	<b>n.d.</b>
4 h	n.d.			7194	<b>n.d.</b>
6 h	n.d.			6269	<b>n.d.</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			9075	<b>0.000</b>
1 h	0.56	20.97	838.81	10531	<b>0.080</b>
2 h	0.64	22.53	901.26	9216	<b>0.098</b>
4 h	0.59	21.68	867.06	9216	<b>0.094</b>
6 h	0.52	20.25	809.81	7901	<b>0.102</b>

**Tabelle 41:** Intrazellulärer Gehalt an MTM in Hct116 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden. In der unteren Tabelle sind die Metabolite umgerechnet als MTM-Metabolite dargestellt. Erst ab einer Inkubationszeit von 4h konnten Metabolite detektiert werden.

MTM Hct116	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	2.86	81.66	3266.22	11015	<b>0.297</b>
1 h	8.37	234.79	9391.78	10119	<b>0.928</b>
2 h	21.79	607.52	24300.67	10816	<b>2.247</b>
4 h	56.10	1560.63	62425.11	9473	<b>6.590</b>
6 h	73.13	2033.49	81339.56	9323	<b>8.724</b>

<b>Versuch 2</b>					
0 h	3.50	99.49	3979.56	9648	<b>0.412</b>
1 h	6.87	192.96	7718.44	9185	<b>0.840</b>
2 h	13.94	389.32	15572.89	8838	<b>1.762</b>
4 h	43.70	1215.99	48639.56	7657	<b>6.352</b>
6 h	78.65	2187.02	87480.67	9185	<b>9.524</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	4.54	128.41	5136.22	11423	<b>0.450</b>
1 h	10.93	305.77	12230.67	9920	<b>1.233</b>
2 h	34.69	965.91	38636.22	10249	<b>3.770</b>
4 h	59.92	1666.71	66668.44	10343	<b>6.446</b>
6 h	76.45	2125.71	85028.44	9404	<b>9.042</b>

<b>MTM Metabolit</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	n.d.			11015	<b>0.000</b>
1 h	n.d.			10119	<b>0.000</b>
2 h	n.d.			10816	<b>0.000</b>
4 h	1.06	31.49	1259.56	9473	<b>0.133</b>
6 h	1.39	40.77	1630.67	9323	<b>0.175</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	n.d.			9648	<b>0.000</b>
1 h	n.d.			9185	<b>0.000</b>
2 h	n.d.			8838	<b>0.000</b>
4 h	0.61	19.21	768.44	7657	<b>0.100</b>
6 h	0.98	29.29	1171.78	9185	<b>0.128</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	n.d.			11423	<b>0.000</b>
1 h	n.d.			9920	<b>0.000</b>
2 h	n.d.			10249	<b>0.000</b>
4 h	1.24	36.52	1460.67	10343	<b>0.141</b>
6 h	1.52	44.46	1778.44	9404	<b>0.189</b>

**Tabelle 42:** Intrazellulärer Gehalt an MTM in Caco-2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden.

<b>MTM Caco-2</b>	<b>AUC [mAU*min]</b>	<b>ng/Injektion</b>	<b>Gesamtmenge [ng]</b>	<b>Proteingehalt [µg]</b>	<b>ng Flavonoid/µg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>					
0 h	5.32	150.04	6001.78	10933	<b>0.549</b>
1 h	5.24	147.82	5912.89	9452	<b>0.626</b>
2 h	9.38	262.66	10506.22	10242	<b>1.026</b>
4 h	10.01	280.35	11214.00	8810	<b>1.273</b>
6 h	18.73	522.38	20895.11	9402	<b>2.222</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	2.30	66.02	2640.67	11685	<b>0.226</b>
1 h	7.72	216.60	8664.00	8676	<b>0.999</b>
2 h	9.25	259.04	10361.78	10528	<b>0.984</b>
4 h	9.71	271.96	10878.44	9370	<b>1.161</b>
6 h	15.17	423.46	16938.44	7056	<b>2.401</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	5.34	150.49	6019.56	11778	<b>0.511</b>
1 h	7.94	222.71	8908.44	10019	<b>0.889</b>
2 h	9.47	265.32	10612.89	10250	<b>1.035</b>
4 h	10.09	282.38	11295.11	8815	<b>1.281</b>
6 h	21.27	593.07	23722.89	10250	<b>2.314</b>

**Tabelle 43:** Intrazellulärer Gehalt an MTM in HepG2 Zellen. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden.

MTM HepG2	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Versuch 1</b>					
0 h	5.94	167.29	6691.78	8722	<b>0.767</b>
1 h	14.85	414.77	16590.67	8444	<b>1.965</b>
2 h	17.08	476.63	19065.11	9880	<b>1.930</b>
4 h	38.92	1083.35	43334.00	6546	<b>6.620</b>
6 h	67.31	1871.96	74878.44	7935	<b>9.436</b>
<b>Versuch 2</b>					
0 h	5.33	150.32	6012.89	9972	<b>0.603</b>
1 h	12.69	354.66	14186.22	10713	<b>1.324</b>
2 h	18.22	508.38	20335.11	10667	<b>1.906</b>
4 h	44.70	1243.91	49756.22	9139	<b>5.444</b>
6 h	48.26	1342.71	53708.44	9602	<b>5.594</b>
<b>Versuch 3</b>					
0 h	6.64	186.49	7459.56	8900	<b>0.838</b>
1 h	12.88	359.82	14392.89	8240	<b>1.747</b>
2 h	34.69	965.88	38635.11	8240	<b>4.689</b>
4 h	66.11	1838.66	73546.22	6968	<b>10.555</b>
6 h	78.05	2170.29	86811.78	8523	<b>10.186</b>

**Tabelle 44:** Permeationsstudien von Quercetin im Caco-2 Transwell-System.

Quercetin	intrazellulär AUC [mAU*min]	apikal AUC [mAU*min]	basolateral AUC [mAU*min]	intrazellulär Metabolit [mAU*min]	apikal Metabolit [mAU*min]	basolateral Metabolit [mAU*min]
<b>Versuch 1</b>	9.112	12.088	4.229	n.d.	n.d.	0.519
<b>Versuch 2</b>	8.727	11.601	5.816	0.512	0.566	0.671
<b>Versuch 3</b>	6.427	14.844	9.142	n.d.	n.d.	0.608
<b>Versuch 4</b>	9.950	13.094	8.293	0.591	n.d.	0.554
	8.974	13.461	8.287	0.571	0.655	0.604
	10.174	12.211	8.035	0.629	n.d.	0.536
<b>Versuch 5</b>	20.043	30.215	1.675	0.836	n.d.	n.d.
<b>Versuch 6</b>	15.002	31.901	2.097	0.627	n.d.	n.d.
	19.037	21.789	8.918	0.681	n.d.	n.d.
<b>Versuch 7</b>	18.029	28.199	1.672	0.540	n.d.	n.d.
<b>MW:</b>	<b>13.455</b>	<b>20.714</b>	<b>6.015</b>	<b>0.622</b>	<b>0.611</b>	<b>0.582</b>

**Tabelle 45:** Permeationsstudien von Myricetin-Derivaten im Caco-2 Transwell-System. Mithilfe der Kalibrierung wurde die AUC in ng pro Injektion in die HPLC umgerechnet. Injiziert wurden jeweils 40 µl Probe. Über den Proteingehalt der jeweiligen Probe konnte schließlich der intrazelluläre Gehalt an Flavonoiden pro mg Protein berechnet werden.

intrazellulär	AUC [mAU*min]	ng/Injektion	Gesamtmenge [ng]	Proteingehalt [µg]	ng Flavonoid/µg Protein
<b>Myricetin</b>	n.d.				<b>n.d.</b>
	n.d.				<b>n.d.</b>
	n.d.				<b>n.d.</b>
	n.d.				<b>n.d.</b>
<b>Laricitrin</b>	2.48	69.51	2780.21	2108	<b>1.319</b>
	2.079	61.20	2448.12	2108	<b>1.161</b>
	90040	43.282	1731.26	3386	<b>0.511</b>
<b>Syringetin</b>	0.972	28.72	1148.85	2524	<b>0.455</b>
	1.690	42.07	1682.68	2385	<b>0.706</b>
	n.d.				<b>n.d.</b>
<b>MTM</b>	156560	121.140	4845.60	2686	<b>1.804</b>



<u>apikal</u>	<b>AUC</b> [mAU*min]	ng/Injektion	gesamt [ng]	<u>basolateral</u>	<b>AUC</b> [mAU*min]	ng/Injektion	gesamt [ng]
<b>Myricetin</b>	n.d.			<b>Myricetin</b>	n.d.		<b>n.d.</b>
	2.455	65.33	<b>2613.33</b>		n.d.		<b>n.d.</b>
	n.d.		<b>n.d.</b>		n.d.		<b>n.d.</b>
	135320	61.04	<b>2441.55</b>		n.d.		<b>n.d.</b>
<b>Laricitrin</b>	8.577	195.74	<b>7829.5</b>	<b>Laricitrin</b>	1.933	58.18	<b>2327.20</b>
	9.127	207.12	<b>8285.0</b>		n.d.		
	305720	205.13	<b>8205.2</b>		195480	122.41	<b>4896.20</b>
<b>Syringetin</b>	47.853	900.12	<b>36004.61</b>	<b>Syringetin</b>	0.951	28.33	<b>1133.23</b>
	49.246	926.01	<b>37040.30</b>		n.d.		<b>n.d.</b>
	1821720	918.28	<b>36731.10</b>		42760	16.44	<b>657.69</b>
<b>MTM</b>	671640	508.83	<b>20353.05</b>	<b>MTM</b>	98600	77.52	<b>3100.60</b>

**Tabelle 46:** Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Quercetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

<b>NSRA</b> (Hct116)	<b>Quercetin [µM]</b> $y=18476x - 13032$ ( $R^2 = 0.9921$ )					<b>Isorhamnetin [µM]</b> $y=1106.6x - 800.73$ ( $R^2 = 0.9858$ )				
	<b>[RFU]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>V 1</b>	0	16038	257936	422426	/	0	7624	45848	59534	142308
<b>V 2</b>	0	23225	576229	768954	1545554	0	4332	19874	27123	77543
<b>V 3</b>	0	69182	791515	1290242	2164852	0	5182	26643	48888	120668
<b>MW</b>	<b>0</b>	<b>36149</b>	<b>541893</b>	<b>827207</b>	<b>1855203</b>	<b>0</b>	<b>5712</b>	<b>30789</b>	<b>45181</b>	<b>113506</b>
	<b>Rhamnetin [µM]</b> $y=12893x + 432152$ ( $R^2 = 0.5493$ )					<b>Tamarixetin [µM]</b> $y=375.6x - 11.083$ ( $R^2 = 0.9977$ )				
	<b>[RFU]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>V 1</b>	0	306318	1376309	1708616	1259936	0	3433	7232	28971	58713
<b>V 2</b>	0	196767	1169674	1444152	1447752	0	1087	9673	8442	24846
<b>V 3</b>	0	286237	1377166	1512021	1359633	0	2157	12374	15070	30660
<b>MW</b>	<b>0</b>	<b>263107</b>	<b>1307716</b>	<b>1554930</b>	<b>1355774</b>	<b>0</b>	<b>2226</b>	<b>9760</b>	<b>17494</b>	<b>38073</b>

**Tabelle 47:** Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Quercetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in HepG2 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

<b>NSRA</b> (HepG2)	<b>Quercetin [µM]</b> $y = 30595x + 46557$ ( $R^2 = 0.9839$ )					<b>Isorhamnetin [µM]</b> $y = 1807.4x + 8184.2$ ( $R^2 = 0.9757$ )				
	<b>[RFU]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>V 1</b>	0	19887	931425	1092708	2442683	0	14376	86529	98979	200718
<b>V 2</b>	0	24832	1215928	2057490	3378532	0	16440	94768	113301	227587
<b>V 3</b>	0	19140	957706	1867898	3211389	0	8469	39915	64360	133336
<b>MW</b>	<b>0</b>	<b>21286</b>	<b>1035020</b>	<b>1672699</b>	<b>3010868</b>	<b>0</b>	<b>13095</b>	<b>73737</b>	<b>92213</b>	<b>187214</b>
	<b>Rhamnetin [µM]</b> $y = 44525x + 194926$ ( $R^2 = 0.8609$ )					<b>Tamarixetin [µM]</b> $y = 2196.2x + 12552$ ( $R^2 = 0.9735$ )				
	<b>[RFU]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>V 1</b>	0	235192	2158394	2243752	2672007	0	12072	81076	105077	239091
<b>V 2</b>	0	468089	2074003	2425745	2602563	0	22304	129259	155987	292535
<b>V 3</b>	0	197205	1495183	1727485	1602326	0	10335	58693		137256
<b>MW</b>	<b>0</b>	<b>300162</b>	<b>1909194</b>	<b>2132327</b>	<b>2292299</b>	<b>0</b>	<b>14904</b>	<b>89676</b>	<b>130532</b>	<b>222961</b>

**Tabelle 48:** Zeitabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Quercetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA (Hct116)	Quercetin [ $\mu\text{M}$ ]				Isorhamnetin [ $\mu\text{M}$ ]			
	[RFU]	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h
V 1	705351	982952	1364180	936353	27212	29605	27650	52082
V 2	1523315	1281477	1255602	1027697	26756	31652	41588	30201
V 3	1201248	1624060	1716351	1490501				
V 4	1200494	1719402	1474929	1437232				
MW	1157602	1401973	1452765	1222946	26984	30629	34619	41142
NSRA	Rhamnetin [ $\mu\text{M}$ ]				Tamarixetin [ $\mu\text{M}$ ]			
	[RFU]	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h
V 1	231424	382999	161349	1140797	8274	12814	12610	40067
V 2	1348190	1382511	1085360	965340	12792	21122	23756	21525
MW	789807	882755	623355	1053069	10533	16968	18183	30796

**Tabelle 49:** Zeitabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Quercetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in HepG2 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA	Quercetin [ $\mu\text{M}$ ]				Isorhamnetin [ $\mu\text{M}$ ]			
	[RFU]	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h
V 1	1103113	1334100	889202	1094278	96611	30687	35198	50788
V 2	1570439	1269150	1232423	978748	48643	43286	33862	40390
V 3	1537092	926356	880375	825840	76665	90212	84486	72115
V 4	1765385	1212978	1064020	857839				
MW	1494007	1185646	1016505	939176	73973	67132	59706	54431
NSRA	Rhamnetin [ $\mu\text{M}$ ]				Tamarixetin [ $\mu\text{M}$ ]			
	[RFU]	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h
V 1	2565379	2386827	1791786	905531	112092	126196	90735	65701
V 2	1882488	1519430	1114209	1036273	130910	98038	24197	30078
V 3	1834049	1554159	1487062	673154	70388	69828	61270	60408
MW	1935340	1723803	1286906	871653	104463	98021	58734	52062

**Tabelle 50:** Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Myricetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA (Hct116)	Myricetin [ $\mu\text{M}$ ] $y = 79.808x + 565.65$ ( $R^2 = 0.9831$ )					Laricitrin [ $\mu\text{M}$ ] $y = 1365.4x + 5034.2$ ( $R^2 = 0.9848$ )				
	[RFU]	0	5	25	50	100	0	5	25	50
V 1	0	1257	2770	5386	9743	0	13084	79160	104118	160414
V 2	0	2603	3399	4731	3567	0	5574	40218	51455	162093
V 3	0	609	2298	2776	12443	0	5716	34351	61512	95133
MW	0	1490	2822	4298	8584	0	8124	51243	72361	139214
NSRA	Syringetin [ $\mu\text{M}$ ] $y = 475.23x + 6458.8$ ( $R^2 = 0.8027$ )					MTM [ $\mu\text{M}$ ] $y = 680.99x + 634.67$ ( $R^2 = 0.9993$ )				
	[RFU]	0	5	25	50	100	0	5	25	50
V 1	0	2285	31618	53847	58190	0	6291	20907	48500	88149
V 2	0	1060	43462	32627	51943	0	3820	22629	30345	74412
V 3	0	773	17881	28562	31259	0	2218	13028	23237	43717
MW	0	1372	30987	38346	47131	0	4110	18855	34027	68760

**Tabelle 51:** Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Myricetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in HepG2 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA (HepG2)	Myricetin [ $\mu\text{M}$ ]					Laricitrin [ $\mu\text{M}$ ]				
	$y = 3191.3x - 34232$ ( $R^2 = 0.9123$ )					$y = 1528.2x + 2174$ ( $R^2 = 0.9619$ )				
[RFU]	0	5	25	50	100	0	5	25	50	100
V 1	0	1972	7390	15571	468753	0	5541	55853	55013	124033
V 2	0	1326	7459	19684	167249	0	8571	48428	51808	167018
V 3	0	4235	71770	193345	677553	0	6522	69900	65648	186001
MW	0	1649	7425	76200	318001	0	6878	58060	61990	159018
	Syringetin [ $\mu\text{M}$ ]					MTM [ $\mu\text{M}$ ]				
	$y = 536.91x + 11132$ ( $R^2 = 0.8567$ )					$y = 698.89x + 19301$ ( $R^2 = 0.6805$ )				
[RFU]	0	5	25	50	100	0	5	25	50	100
V 1	0	24476	21592	61904	69361	0	37573	121346	26967	26816
V 2	0	9686	46955	52690	59432	0	25692	79680	94849	147664
V 3	0	8774	28828	27734	45475	0	1972	7390	15571	81401
MW	0	14312	32458	47442	58090	0	21746	69472	45796	85293

**Tabelle 52:** Zeitabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Myricetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA	Myricetin [ $\mu\text{M}$ ]				Laricitrin [ $\mu\text{M}$ ]			
	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h	6 h
V 1	10282	1770	4328	8235	285092	30978	27915	15259
V 2	11140	106	7	4070	250719	52425	16878	17124
V 3	4709	2874	467	2565	164280	28353	21370	13330
MW	8710	1583	1601	4957	233364	37252	22055	15238
	Syringetin [ $\mu\text{M}$ ]				MTM [ $\mu\text{M}$ ]			
	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h	6 h
V 1	66422	62524	71734	69490	49204	69991	74458	68568
V 2	50117	53330	41262	50210	30722	69080	56330	47026
V 3	14383	44573	63551	42057	18203	95667	93188	109156
MW	43641	53476	58849	53919	32710	78246	74658	74917

**Tabelle 53:** Zeitabhängigkeit der intrazellulären Verteilung der Myricetin-Derivate nach NSRA Komplexierung in HepG2 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

NSRA	Myricetin [ $\mu\text{M}$ ]				Laricitrin [ $\mu\text{M}$ ]			
	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h	6 h
V 1	101988	2831	1698	1236	618923	37034	13749	18146
V 2	86521	5987	9213	3386	743623	43678	33597	13959
V 3	29506	2558	3076	1388	366191	73881	15929	15966
MW	72672	3792	4662	2003	534035	51531	21092	16024
	Syringetin [ $\mu\text{M}$ ]				MTM [ $\mu\text{M}$ ]			
	15 min	2 h	4 h	6 h	15 min	2 h	4 h	6 h
V 1	87347	81567	65845	100084	134210	150517	115218	185386
V 2	66838	91316	97782	72975	110264	163204	149776	98843
V 3	133121	31731	38425	63786	44502	59073	93272	116740
MW	95769	68205	67351	78948	87141	124265	119422	133656



Syringetin	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
V 1 [RFU]	2773	7276	24872	56242	99704	153757	216321
V 2 [RFU]	3135	5361	11022	19778	30792	47516	75288
V 3 [RFU]	3295	4229	7810	13311	20317	31367	52089
V 4 [RFU]	3113	6236	15493	30831	51934	81027	123439
<b>MW</b>	<b>3079</b>	<b>5775</b>	<b>14799</b>	<b>30040</b>	<b>50687</b>	<b>78417</b>	<b>116784</b>
SD	260	1355	7097	17605	32395	50209	68917
SEM	33	169	887	2201	4049	6276	8615
MTM	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
V 1 [RFU]	2698	6464	20520	48027	88668	139499	198157
V 2 [RFU]	3108	5253	10233	17910	27699	41819	66287
V 3 [RFU]	3261	4212	8062	14797	25467	44742	78967
V 4 [RFU]	3076	8659	24280	51310	88826	133458	192184
<b>MW</b>	<b>3038</b>	<b>6139</b>	<b>15744</b>	<b>32924</b>	<b>57434</b>	<b>89336</b>	<b>132738</b>
SD	227	1822	7214	17564	32648	49460	66669
SEM	28	228	902	2196	4081	6183	8334

Tabelle 57: Antioxidatives Potential strukturverwandter Flavonoide im TEAC Assay.

TEAC	Trolox						Naringenin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.720	0.575	0.442	0.301	0.147	0.000	0.725	0.719	0.705	0.707	0.698	0.682
V 2 [OD]	0.747	0.579	0.431	0.266	0.197	0.038	0.722	0.693	0.683	0.674	0.676	0.656
V 3 [OD]	0.772	0.569	0.457	0.294	0.203	0.000	0.685	0.723	0.68	0.674	0.665	0.685
<b>MW</b>	<b>0.747</b>	<b>0.575</b>	<b>0.444</b>	<b>0.287</b>	<b>0.183</b>	<b>0.013</b>	<b>0.711</b>	<b>0.712</b>	<b>0.689</b>	<b>0.685</b>	<b>0.680</b>	<b>0.674</b>
	Isosakuranetin						Hesperetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.729	0.724	0.709	0.715	0.711	0.704	0.732	0.607	0.467	0.430	0.363	0.356
V 2 [OD]	0.716	0.708	0.715	0.700	0.705	0.699	0.700	0.598	0.543	0.468	0.462	0.410
V 3 [OD]	0.725	0.713	0.729	0.714	0.708	0.744	0.689	0.581	0.535	0.431	0.414	0.379
<b>MW</b>	<b>0.724</b>	<b>0.715</b>	<b>0.718</b>	<b>0.710</b>	<b>0.709</b>	<b>0.716</b>	<b>0.707</b>	<b>0.595</b>	<b>0.515</b>	<b>0.443</b>	<b>0.413</b>	<b>0.382</b>
	Chrysoeriol						Diosmetin					
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.720	0.703	0.710	0.721	0.720	0.715	0.713	0.703	0.718	0.703	0.716	0.707
V 2 [OD]	0.699	0.684	0.645	0.622	0.589	0.564	0.708	0.700	0.688	0.669	0.658	0.654
V 3 [OD]	0.734	0.723	0.724	0.697	0.685	0.713	0.682	0.707	0.699	0.702	0.697	0.736
<b>MW</b>	<b>0.718</b>	<b>0.704</b>	<b>0.693</b>	<b>0.680</b>	<b>0.665</b>	<b>0.664</b>	<b>0.702</b>	<b>0.702</b>	<b>0.702</b>	<b>0.692</b>	<b>0.691</b>	<b>0.700</b>

Tabelle 58: Antioxidatives Potential strukturverwandter Flavonoide (50  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Zellen im DCF Assay.

TEAC	DMSO + DCF					$\text{H}_2\text{O}_2$ + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	6271	6606	7017	7638	8275	15410	18405	19886	21114	22229
V 2 [RFU]	5138	5802	6416	7155	7955	13328	15680	16996	18598	19942
V 3 [RFU]	4903	5692	6564	7370	8197	13959	17104	18575	20085	21336
<b>MW</b>	<b>5437</b>	<b>6033</b>	<b>6666</b>	<b>7387</b>	<b>8142</b>	<b>14232</b>	<b>17063</b>	<b>18486</b>	<b>19933</b>	<b>21169</b>
	Naringenin + $\text{H}_2\text{O}_2$ + DCF					Isosakuranetin + $\text{H}_2\text{O}_2$ + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	14697	17354	18973	20058	21217	13906	16222	17753	19174	20107
V 2 [RFU]	13094	15344	16706	18103	19417	13302	15901	17280	19050	20591
V 3 [RFU]	14673	17975	19921	21878	23216	15842	18850	21021	22970	24596
<b>MW</b>	<b>14155</b>	<b>16891</b>	<b>18533</b>	<b>20013</b>	<b>21283</b>	<b>14350</b>	<b>16991</b>	<b>18685</b>	<b>20398</b>	<b>21765</b>

	Hesperetin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF					Diosmetin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	15872	18532	20225	21480	22914	17196	20367	22527	24078	25496
V 2 [RFU]	13136	15454	17148	18637	20379	13994	16696	18458	20121	21896
V 3 [RFU]	16985	20585	23065	25143	26973	19683	24087	27025	29500	31670
MW	<b>15331</b>	<b>18190</b>	<b>20146</b>	<b>21753</b>	<b>23422</b>	<b>16957</b>	<b>20383</b>	<b>22670</b>	<b>24567</b>	<b>26354</b>
	Chrysoeriol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF									
min	0	30	60	90	120					
V 1 [RFU]	15213	17626	19553	20906	21901					
V 2 [RFU]	14090	16662	18350	19775	21549					
V 3 [RFU]	15554	19109	21063	23096	24652					
MW	<b>14952</b>	<b>17799</b>	<b>19655</b>	<b>21259</b>	<b>22701</b>					

Tabelle 59: Zytotoxizität strukturverwandter Flavonoide in Hct116 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Naringenin				Isosakuranetin				Hesperetin			
µM	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.724	0.551	0.584	0.528	0.849	0.805	0.676	0.574	0.572	0.629	0.582	0.575
V 2 [OD]	0.830	0.780	0.728	0.703	0.857	0.692	0.656	0.606	0.667	0.785	0.743	0.633
V 3 [OD]	0.898	0.837	0.845	0.759	0.885	0.676	0.632	0.536	0.612	0.634	0.591	0.604
MW [OD]	<b>0.817</b>	<b>0.723</b>	<b>0.719</b>	<b>0.663</b>	<b>0.864</b>	<b>0.724</b>	<b>0.655</b>	<b>0.572</b>	<b>0.617</b>	<b>0.683</b>	<b>0.639</b>	<b>0.604</b>
	Chrysoeriol				Diosmetin							
µM	0	25	50	100	0	25	50	100				
V 1 [OD]	0.849	0.655	0.633	0.397	0.724	0.353	0.325	0.249				
V 2 [OD]	0.857	0.593	0.639	0.447	0.830	0.552	0.401	0.291				
V 3 [OD]	0.885	0.751	0.675	0.334	0.898	0.55	0.319	0.31				
MW [OD]	<b>0.864</b>	<b>0.666</b>	<b>0.649</b>	<b>0.393</b>	<b>0.817</b>	<b>0.485</b>	<b>0.348</b>	<b>0.283</b>				

Tabelle 60: Zytotoxizität strukturverwandter Flavonoide in H4IIE Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Naringenin				Isosakuranetin				Hesperetin			
µM	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.664	0.570	0.553	0.494	0.675	0.601	0.523	0.493	0.664		0.560	0.635
V 2 [OD]	0.707	0.605	0.582	0.598	0.491	0.457	0.468	0.427	0.707	0.600	0.650	0.573
V 3 [OD]	0.635	0.645	0.617	0.573	0.670	0.597	0.620	0.602	0.635	0.623	0.597	0.643
V 4 [OD]	0.611	0.517	0.498	0.487	0.755	0.708	0.690	0.53	0.611	0.548	0.533	0.498
MW [OD]	<b>0.654</b>	<b>0.584</b>	<b>0.563</b>	<b>0.538</b>	<b>0.648</b>	<b>0.591</b>	<b>0.575</b>	<b>0.513</b>	<b>0.654</b>	<b>0.590</b>	<b>0.585</b>	<b>0.587</b>
	Chrysoeriol				Diosmetin							
µM	0	25	50	100	0	25	50	100				
V 1 [OD]	0.675	0.576	0.629	0.588	0.664	0.600	0.537	0.492				
V 2 [OD]	0.491	0.474	0.444	0.346	0.707	0.698	0.673	0.565				
V 3 [OD]	0.670	0.596	0.585	0.466	0.635	0.592	0.601	0.569				
V 4 [OD]	0.755	0.662	0.703	0.509	0.611	0.517	0.492	0.427				
MW [OD]	<b>0.648</b>	<b>0.577</b>	<b>0.590</b>	<b>0.477</b>	<b>0.654</b>	<b>0.602</b>	<b>0.576</b>	<b>0.513</b>				

**Tabelle 61:** Intrazellulärer Gehalt an Naringenin, Isoskauranetin, Hesperetin, Chrysoeriol und Diosmetin (jeweils 100 µM) in Hct116 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt (nach der Methode von Lowry ermittelt) der jeweiligen Probe normiert.

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Naring. 0 h	0.286	10.957	<b>0.026</b>	Isosak. 0 h	0.935	9.301	<b>0.101</b>
Naring. 1 h	0.712	9.065	<b>0.079</b>	Isosak. 1 h	1.191	9.676	<b>0.123</b>
Naring. 2 h	0.270	7.437	<b>0.036</b>	Isosak. 2 h	1.034	9.275	<b>0.111</b>
Naring. 4 h	0.533	8.625	<b>0.062</b>	Isosak. 4 h	0.837	8.903	<b>0.094</b>
Naring. 6 h	0.378	9.329	<b>0.041</b>	Isosak. 6 h	1.284	9.097	<b>0.141</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Naring. 0 h	1.035	12.916	<b>0.080</b>	Isosak. 0 h	2.122	13.303	<b>0.160</b>
Naring. 1 h	1.234	13.405	<b>0.092</b>	Isosak. 1 h	2.292	12.278	<b>0.187</b>
Naring. 2 h	0.975	12.160	<b>0.080</b>	Isosak. 2 h	2.054	11.916	<b>0.172</b>
Naring. 4 h	1.254	15.834	<b>0.079</b>	Isosak. 4 h	1.724	13.665	<b>0.126</b>
Naring. 6 h	0.703	13.443	<b>0.052</b>	Isosak. 6 h	1.923	11.433	<b>0.168</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Naring. 0 h	0.841	12.954	<b>0.065</b>	Isosak. 0 h	2.668	15.716	<b>0.170</b>
Naring. 1 h	0.682	13.955	<b>0.049</b>	Isosak. 1 h	2.529	18.612	<b>0.136</b>
Naring. 2 h	1.112	12.374	<b>0.090</b>	Isosak. 2 h	2.581	14.208	<b>0.182</b>
Naring. 4 h	1.351	11.320	<b>0.119</b>	Isosak. 4 h	1.811	16.621	<b>0.109</b>
Naring. 6 h	0.783	10.424	<b>0.075</b>	Isosak. 6 h	1.840	14.449	<b>0.127</b>
Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Hesperet. 0 h	1.484	10.950	<b>0.136</b>	Chryso. 0 h	1.131	10.693	<b>0.106</b>
Hesperet. 1 h	1.054	11.795	<b>0.089</b>	Chryso. 1 h	217.613	13.073	<b>16.645</b>
Hesperet. 2 h	1.701	15.867	<b>0.107</b>	Chryso. 2 h	401.045	10.904	<b>36.779</b>
Hesperet. 4 h	1.603	14.148	<b>0.113</b>	Chryso. 4 h	438.130	11.962	<b>36.626</b>
Hesperet. 6 h	1.453	14.027	<b>0.104</b>	Chryso. 6 h	237.104	11.751	<b>20.178</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Hesperet. 0 h	1.626	13.303	<b>0.122</b>	Chryso. 0 h	1.333	14.666	<b>0.091</b>
Hesperet. 1 h	0.830	12.278	<b>0.068</b>	Chryso. 1 h	104.914	13.612	<b>7.708</b>
Hesperet. 2 h	0.887	11.916	<b>0.074</b>	Chryso. 2 h	429.092	12.957	<b>33.118</b>
Hesperet. 4 h	0.976	13.665	<b>0.071</b>	Chryso. 4 h	444.367	13.355	<b>33.272</b>
Hesperet. 6 h	0.653	11.433	<b>0.057</b>	Chryso. 6 h	452.378	13.982	<b>32.354</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Hesperet. 0 h	2.201	15.716	<b>0.140</b>	Chryso. 0 h	2.902	12.261	<b>0.237</b>
Hesperet. 1 h	1.503	18.612	<b>0.081</b>	Chryso. 1 h	46.565	10.894	<b>4.274</b>
Hesperet. 2 h	2.018	14.208	<b>0.142</b>	Chryso. 2 h	221.876	11.271	<b>19.685</b>
Hesperet. 4 h	2.065	16.621	<b>0.124</b>	Chryso. 4 h	432.281	11.043	<b>39.147</b>
Hesperet. 6 h	1.742	14.449	<b>0.121</b>	Chryso. 6 h	472.049	10.589	<b>44.581</b>

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 3</b>			
Diosmet. 0 h	1.018	11.485	0.089	Diosme. 0 h	1.597	10.697	0.149
Diosmet. 1 h	2.876	8.933	0.322	Diosmet. 1 h	6.542	10.798	0.606
Diosmet. 2 h	3.238	8.757	0.370	Diosmet. 2 h	6.015	12.674	0.475
Diosmet. 4 h	70.533	10.209	6.909	Diosmet. 4 h	52.936	11.965	4.424
Diosmet. 6 h	n.d.	8.889		Diosmet. 6 h	11.710	10.646	1.100
<b>Versuch 2</b>							
Diosmet. 0 h	1.628	13.852	0.118				
Diosmet. 1 h	1.958	9.835	0.199				
Diosmet. 2 h	1.866	10.931	0.171				
Diosmet. 4 h	63.764	9.008	7.078				
Diosmet. 6 h	28.608	9.905	2.888				

**Tabelle 62:** Intrazellulärer Gehalt der strukturverwandten Flavonoide (50 µM) nach NSRA Komplexierung in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind Fluoreszenzwerte, korrigiert um die NSRA-Hintergrundfluoreszenz (Kontrollzellen, die für 5 min mit NSRA inkubiert wurden).

RFU	Kontrolle	Naringenin	Isosakuran.	Hesperetin	Chrysoeriol	Diosmetin
V 1	0	5572.8	1414.6	4253.2	246269.7	31736.6
V 2	0	2048.0	320.9	1027.4	170835.1	16010.0
V 3	0	626.0	224.0	209.2	122667.3	8646.7
MW	<b>0</b>	<b>2748.9</b>	<b>653.2</b>	<b>1829.9</b>	<b>179924.0</b>	<b>18797.8</b>

**Tabelle 63:** Antioxidatives Potential diverser Hydroxyzimtsäurederivate im TEAC-Assay.

TEAC	Trolox						Kaffeensäure					
µM	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.720	0.575	0.442	0.301	0.147	0.000	0.694	0.430	0.245	0.071	0.006	0.003
V 2 [OD]	0.747	0.579	0.431	0.266	0.197	0.038	0.714	0.515	0.272	0.165	0.004	0.00
V 3 [OD]	0.772	0.569	0.457	0.294	0.203	0.000	0.759	0.580	0.282	0.101	0.008	0.002
MW	<b>0.747</b>	<b>0.575</b>	<b>0.444</b>	<b>0.287</b>	<b>0.183</b>	<b>0.013</b>	<b>0.722</b>	<b>0.509</b>	<b>0.267</b>	<b>0.113</b>	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>
	Ferulasäure						2,4-Dihydroxyzimtsäure					
	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.710	0.436	0.296	0.225	0.184	0.127	0.698	0.372	0.246	0.170	0.123	0.077
V 2 [OD]	0.696	0.419	0.230	0.165	0.105	0.057	0.703	0.344	0.162	0.075	0.047	0.024
V 3 [OD]	0.714	0.398	0.258	0.170	0.096	0.061	0.685	0.345	0.170	0.086	0.052	0.031
MW	<b>0.707</b>	<b>0.418</b>	<b>0.262</b>	<b>0.187</b>	<b>0.129</b>	<b>0.082</b>	<b>0.696</b>	<b>0.354</b>	<b>0.193</b>	<b>0.111</b>	<b>0.075</b>	<b>0.044</b>
	p-Coumarsäure						m-Coumarsäure					
	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.736	0.684	0.667	0.651	0.639	0.622	0.740	0.729	0.710	0.738	0.716	0.717
V 2 [OD]	0.725	0.707	0.696	0.677	0.672	0.645	0.722	0.75	0.727	0.740	0.738	0.725
V 3 [OD]	0.728	0.712	0.692	0.661	0.65	0.669	0.728	0.736	0.724	0.733	0.759	0.716
MW	<b>0.730</b>	<b>0.701</b>	<b>0.685</b>	<b>0.663</b>	<b>0.654</b>	<b>0.645</b>	<b>0.730</b>	<b>0.738</b>	<b>0.720</b>	<b>0.737</b>	<b>0.738</b>	<b>0.719</b>
	Rosmarinsäure						Chlorogensäure					
	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
V 1 [OD]	0.728	0.446	0.192	0.058	0.057	0.055	0.724	0.546	0.399	0.196	0.093	0.059
V 2 [OD]	0.736	0.445	0.179	0.064	0.058	0.057	0.718	0.552	0.416	0.232	0.087	0.059
V 3 [OD]	0.720	0.494	0.190	0.06	0.058	0.057	0.721	0.594	0.392	0.251	0.091	0.061
MW	<b>0.728</b>	<b>0.462</b>	<b>0.187</b>	<b>0.061</b>	<b>0.058</b>	<b>0.056</b>	<b>0.721</b>	<b>0.564</b>	<b>0.402</b>	<b>0.226</b>	<b>0.090</b>	<b>0.060</b>

**Tabelle 64:** Antioxidatives Potential von Hydroxyzimtsäurederivaten (100 µM) in Hct116 Zellen im DCF Assay.

TEAC	DMSO + DCF					H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	10217	9905	9699	9226	9162	19005	21133	21686	22250	22890
V 2 [RFU]	5359	6326	7202	8157	9314	18596	22730	25052	27209	28741
V 3 [RFU]	4936	5814	6794	7731	8850	15672	19289	21534	23314	25442
MW	6837	7348	7899	8371	9109	17758	21051	22757	24257	25691
	Kaffeessr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF					Ferulasr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	17359	18535	18841	19374	19817	22552	25153	25824	26847	27899
V 2 [RFU]	15165	18206	19928	21517	22945	16710	20206	22095	23791	25434
V 3 [RFU]	15475	19626	21652	23702	25643	14791	18278	20553	22356	23904
MW	16000	18789	20140	21531	22802	18018	21212	22824	24331	25746



	2,4-DHZ + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF					m-Coumarsr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	23217	25640	26841	27671	28611	21036	23113	23980	24696	25560
V 2 [RFU]	15224	18339	19919	21606	23024	16236	19383	21165	22542	24292
V 3 [RFU]	13632	17309	19126	20981	22728	17158	21038	23555	25914	27584
MW	17358	20429	21962	23419	24788	18143	21178	22900	24384	25812
	p-Coumarsr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF					Chlorogensr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	25473	28980	30202	31392	32769	23167	26054	27153	28003	29225
V 2 [RFU]	18332	22084	24158	26023	27805	13813	16568	18137	19537	21145
V 3 [RFU]	19010	23952	26619	29021	31272	15807	19668	21803	23978	25675
MW	20938	25005	26993	28812	30615	17595	20763	22364	23840	25348
	Rosmarinsr. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DCF									
min	0	30	60	90	120					
V 1 [RFU]	26395	29881	31156	32352	33850					
V 2 [RFU]	18701	22979	24821	27127	29229					
V 3 [RFU]	16247	20039	22353	24453	26408					
MW	20448	24299	26110	27978	29829					

Tabelle 65: Zytotoxizität diverser Flavonoide in Hct116 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Kaffeesäure				Ferulasäure				2,4-Dihydroxycimtsäure			
µM	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.951	0.902	0.905	1.086	1.118	1.053	0.993	1.038	0.696	0.553	0.609	0.670
V 2 [OD]	0.849	0.712	0.716	0.735	0.830	0.622	0.731	0.760	0.704	0.742	0.624	0.775
V 3 [OD]	0.857	0.801	0.982	0.895	1.142	1.090	1.139	1.106	0.647	0.562	0.531	0.547
V 4 [OD]	0.885	0.818	0.764	0.787	0.898	0.916	0.928	0.900	0.787	0.795	0.925	0.778
MW [OD]	0.886	0.808	0.842	0.876	0.997	0.920	0.948	0.951	0.709	0.663	0.672	0.693
	p-Coumarsäure				m-Coumarsäure				Chlorogensäure			
µM	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	1.118	1.039	1.126	1.029	0.951	0.956	0.988	0.953	0.672	0.623	0.667	0.629
V 2 [OD]	0.830	0.688	0.737	0.683	0.849	0.689	0.655	0.734	0.931	0.941	0.948	0.957
V 3 [OD]	1.142	1.058	1.012	1.053	0.857	0.781	0.847	0.830	0.967	0.907	0.840	0.799
V 4 [OD]	0.898	0.863	0.917	0.880	0.885	0.750	0.838	0.838	0.679	0.682	0.629	0.629
MW [OD]	0.997	0.912	0.948	0.911	0.886	0.794	0.832	0.839	0.812	0.788	0.771	0.754
	Rosmarinsäure											
µM	0	25	50	100								
V 1 [OD]	0.951	0.887	0.945	0.989								
V 2 [OD]	0.849	0.782	0.786	0.775								
V 3 [OD]	0.857	0.912	0.926	0.793								
V 4 [OD]	0.885	0.754	0.888	0.799								
MW [OD]	0.886	0.834	0.886	0.839								

Tabelle 66: Zytotoxizität von Hydroxycimtsäurederivaten in H4IIE Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Kaffeesäure				Ferulasäure				2,4-Dihydroxycimtsäure			
µM	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
V 1 [OD]	0.675	0.508	0.504	0.623	0.664	0.481	0.516	0.620	0.107	0.103	0.104	0.100
V 2 [OD]	0.491	0.503	0.457	0.541	0.707	0.533	0.566	0.541	0.163	0.145	0.142	0.144
V 3 [OD]	0.670	0.687	0.751	0.683	0.635	0.523	0.594	0.627	0.111	0.110	0.114	0.117
V 4 [OD]	0.755	0.651	0.707	0.722	0.611	0.602	0.549	0.560				
MW [OD]	0.648	0.587	0.605	0.642	0.654	0.535	0.556	0.587	0.127	0.119	0.120	0.121

$\mu\text{M}$	p-Coumarsäure				m-Coumarsäure				Rosmarinsäure			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
<b>V 1 [OD]</b>	0.664	0.589	0.591	0.603	0.675	0.599	0.596	0.599	0.675	0.542	0.592	0.620
<b>V 2 [OD]</b>	0.707	0.481	0.510	0.570	0.491	0.500	0.398	0.445	0.491	0.425	0.464	0.499
<b>V 3 [OD]</b>	0.635	0.637	0.583	0.576	0.670	0.634	0.630	0.617	0.670	0.635	0.658	0.679
<b>V 4 [OD]</b>	0.611	0.436	0.492	0.499	0.755	0.685	0.662	0.645	0.755	0.670	0.707	0.829
<b>MW [OD]</b>	<b>0.654</b>	<b>0.536</b>	<b>0.544</b>	<b>0.562</b>	<b>0.648</b>	<b>0.605</b>	<b>0.572</b>	<b>0.577</b>	<b>0.648</b>	<b>0.568</b>	<b>0.605</b>	<b>0.657</b>

**Tabelle 67:** Intrazellulärer Gehalt an Ferulasäure, 2,4-DHZ, m-Coumarsäure und p-Coumarsäure (je 100  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Zellen nach 0 h bis 6 h Inkubation. Die AUC wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Ferulasr. 0 h	1.081	27.693	<b>0.039</b>	2,4-DHZ 0 h	0.391	22.871	<b>0.017</b>
Ferulasr. 1 h	1.244	28.487	<b>0.044</b>	2,4-DHZ 1 h	1.723	27.278	<b>0.063</b>
Ferulasr. 2 h	1.066	27.518	<b>0.039</b>	2,4-DHZ 2 h	1.464	27.548	<b>0.053</b>
Ferulasr. 4 h	1.392	28.202	<b>0.049</b>	2,4-DHZ 4 h	1.587	24.894	<b>0.064</b>
Ferulasr. 6 h	0.943	25.232	<b>0.037</b>	2,4-DHZ 6 h	1.054	28.937	<b>0.036</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Ferulasr. 0 h	1.203	26.268	<b>0.046</b>	2,4-DHZ 0 h	0.569	30.990	<b>0.018</b>
Ferulasr. 1 h	1.601	25.030	<b>0.064</b>	2,4-DHZ 1 h	2.112	32.287	<b>0.065</b>
Ferulasr. 2 h	0.641	21.500	<b>0.030</b>	2,4-DHZ 2 h	2.127	29.411	<b>0.072</b>
Ferulasr. 4 h	0.710	20.108	<b>0.035</b>	2,4-DHZ 4 h	1.663	30.906	<b>0.054</b>
Ferulasr. 6 h	0.570	19.694	<b>0.029</b>	2,4-DHZ 6 h	1.529	31.656	<b>0.048</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Ferulasr. 0 h	0.999	33.771	<b>0.030</b>	2,4-DHZ 0 h	0.531	48.705	<b>0.011</b>
Ferulasr. 1 h	0.775	38.356	<b>0.020</b>	2,4-DHZ 1 h	1.010	39.603	<b>0.026</b>
Ferulasr. 2 h	0.626	28.764	<b>0.022</b>	2,4-DHZ 2 h	0.917	24.667	<b>0.037</b>
Ferulasr. 4 h	0.924	37.354	<b>0.025</b>	2,4-DHZ 4 h	0.716	29.026	<b>0.025</b>
Ferulasr. 6 h	0.826	35.194	<b>0.023</b>	2,4-DHZ 6 h	0.739	38.449	<b>0.019</b>

Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein	Hct116	AUC [mAU*min]	Protein-gehalt [mg]	AUC/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
m-Coum. 0 h	0.551	33.577	<b>0.016</b>	p-Coum. 0 h	1.279	33.114	<b>0.039</b>
m-Coum. 1 h	0.770	36.718	<b>0.021</b>	p-Coum. 1 h	2.075	27.545	<b>0.075</b>
m-Coum. 2 h	0.939	33.321	<b>0.028</b>	p-Coum. 2 h	2.138	23.634	<b>0.090</b>
m-Coum. 4 h	0.878	36.526	<b>0.024</b>	p-Coum. 4 h	2.194	27.132	<b>0.081</b>
m-Coum. 6 h	0.930	32.679	<b>0.028</b>	p-Coum. 6 h	2.598	31.093	<b>0.084</b>
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
m-Coum. 0 h	0.786	34.026	<b>0.023</b>	p-Coum. 0 h	1.554	39.949	<b>0.039</b>
m-Coum. 1 h	1.215	43.705	<b>0.028</b>	p-Coum. 1 h	3.162	39.747	<b>0.080</b>
m-Coum. 2 h	1.228	36.333	<b>0.034</b>	p-Coum. 2 h	2.454	33.663	<b>0.073</b>
m-Coum. 4 h	1.161	41.654	<b>0.028</b>	p-Coum. 4 h	2.633	38.479	<b>0.068</b>
m-Coum. 6 h	1.291	41.269	<b>0.031</b>	p-Coum. 6 h	2.620	37.313	<b>0.070</b>
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
m-Coum. 0 h	0.997	23.401	<b>0.043</b>	p-Coum. 0 h	1.579	34.910	<b>0.045</b>
m-Coum. 1 h	1.172	21.678	<b>0.054</b>	p-Coum. 1 h	1.942	33.656	<b>0.058</b>
m-Coum. 2 h	1.493	19.955	<b>0.075</b>	p-Coum. 2 h	1.829	31.426	<b>0.058</b>
m-Coum. 4 h	1.504	19.887	<b>0.076</b>	p-Coum. 4 h	1.798	31.907	<b>0.056</b>
m-Coum. 6 h	1.380	23.673	<b>0.058</b>	p-Coum. 6 h	1.440	28.189	<b>0.051</b>

**Tabelle 68:** Antioxidatives Potential von Isothiocyanaten im TEAC-Assay.

TEAC	Trolox						Sulforaphan						
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25	
V 1 [OD]	0.726	0.526	0.450	0.240	0.187	0.056	0.718	0.721	0.721	0.720	0.725	0.718	
V 2 [OD]	0.745	0.558	0.413	0.223	0.116	0.056	0.742	0.747	0.755	0.736	0.742	0.732	
V 3 [OD]	0.748	0.566	0.420	0.226	0.119	0.056	0.736	0.731	0.726	0.729	0.723	0.722	
MW	<b>0.740</b>	<b>0.550</b>	<b>0.428</b>	<b>0.230</b>	<b>0.141</b>	<b>0.056</b>	<b>0.732</b>	<b>0.733</b>	<b>0.734</b>	<b>0.728</b>	<b>0.730</b>	<b>0.724</b>	
	Erysolin						Berteroin						
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25	
V 1 [OD]	0.722	0.745	0.735	0.710	0.708	0.746	0.719	0.723	0.709	0.711	0.715	0.710	
V 2 [OD]	0.743	0.748	0.733	0.738	0.738	0.735	0.736	0.739	0.744	0.750	0.737	0.739	
V 3 [OD]	0.725	0.721	0.721	0.709	0.721	0.716	0.724	0.727	0.731	0.729	0.723	0.715	
MW	<b>0.730</b>	<b>0.738</b>	<b>0.730</b>	<b>0.719</b>	<b>0.722</b>	<b>0.732</b>	<b>0.726</b>	<b>0.730</b>	<b>0.728</b>	<b>0.730</b>	<b>0.725</b>	<b>0.721</b>	
	Erucin												
$\mu\text{M}$	0	5	10	15	20	25							
V 1 [OD]	0.709	0.720	0.704	0.725	0.721	0.715							
V 2 [OD]	0.737	0.751	0.741	0.734	0.728	0.731							
V 3 [OD]	0.731	0.725	0.723	0.726	0.699	0.718							
MW	<b>0.726</b>	<b>0.732</b>	<b>0.723</b>	<b>0.728</b>	<b>0.716</b>	<b>0.721</b>							
SD	<b>0.015</b>	<b>0.017</b>	<b>0.019</b>	<b>0.005</b>	<b>0.015</b>	<b>0.009</b>							

**Tabelle 69:** DCF Assay nach 1 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind die mittleren DCF-Fluoreszenzwerte.

RFU	Kontrolle	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sulforaphan	Berteroin	Erucin	Erysolin
V 1	19426	120472	94219	267132	171199	127160
V 2	16567	74541	62146	131346	119307	132068
V 3	19216	69573	65952	182329	111002	75527
V 4	27663	64121	93522	233554	132637	108944
MW	<b>20718</b>	<b>82177</b>	<b>78960</b>	<b>203590</b>	<b>133536</b>	<b>110925</b>

**Tabelle 70:** DCF Assay nach 1 h Vorinkubation mit N-Acetylcystein (NAC) und anschliessender Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind die mittleren DCF-Fluoreszenzwerte.

RFU	Kontrolle	K + NAC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC	Sulforaphan	Sulf. + NAC
V 1	16567	26793	79078	72231	62146	106194
V 2	18211	17265	43250	39758	43842	47656
V 3	12833	14037	71067	79001	60690	58322
MW	<b>15870</b>	<b>19365</b>	<b>64465</b>	<b>63664</b>	<b>55559</b>	<b>70724</b>

RFU	Berteroin	Bert. + NAC	Erucin	Eru. + NAC	Erysolin	Ery. + NAC
V 1	226224	208031	172598	130411	126170	115106
V 2	292406	132696	98040	78517	58993	56038
V 3	278156	166413	124479	104110	74091	75052
MW	<b>265595</b>	<b>169046</b>	<b>131706</b>	<b>104346</b>	<b>86418</b>	<b>82065</b>

**Tabelle 71:** DCF Assay nach 1 h Co-Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC) und Isothiocyanaten (25  $\mu\text{M}$ ) in Hct116 Zellen (Messung im Durchflusszytometer). Dargestellt sind die mittleren DCF-Fluoreszenzwerte.

RFU	Kontrolle	K + NAC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC	Sulforaphan	Sulf. + NAC
V 1	15931	14316	54163	32419	49697	21949
V 2	19423	14935	97965	59336	62146	43043
V 3	17194	17588	54742	49493	86899	23552
MW	<b>17516</b>	<b>15613</b>	<b>68957</b>	<b>47083</b>	<b>66247</b>	<b>29515</b>

RFU	Berteroin	Bert. + NAC	Erucin	Eru. + NAC	Erysolin	Ery. + NAC
V 1	142897	64988	110479	49806	72714	26701
V 2	233297	97738	176159	85323	98408	31050
V 3	148876	53729	122236	52308	74587	22728
<b>MW</b>	<b>175023</b>	<b>72151</b>	<b>136291</b>	<b>62479</b>	<b>81903</b>	<b>26826</b>

**Tabelle 72:** DCF Assay nach 2 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) in H4IIE Zellen (96-Wellplatte). Dargestellt sind die mittleren DCF-Fluoreszenzwerte.

TEAC	DMSO + DCF					t-BHQ + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	82974	217117	423548	613473	739488	71210	308949	655893	912015	1069220
V 2 [RFU]	91519	265430	443621	620198		136471	521016	993679	1408958	
V 3 [RFU]	39451	131555	258369	390326	504819	98172	439702	810837	1104472	1321876
<b>MW</b>	<b>71315</b>	<b>204701</b>	<b>375179</b>	<b>541332</b>	<b>622154</b>	<b>101951</b>	<b>423222</b>	<b>820136</b>	<b>1141815</b>	<b>1195548</b>
	Sulforaphan + DCF					Berteroin + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	77576	207880	391555	558457	673065	78980	214412	402098	562270	682509
V 2 [RFU]	84567	244696	386592	543581		85982	250997	400371	553865	
V 3 [RFU]	36168	135309	238019	353536	464663	36704	134284	245348	345939	451846
<b>MW</b>	<b>66103</b>	<b>195962</b>	<b>338722</b>	<b>485191</b>	<b>568864</b>	<b>67222</b>	<b>199898</b>	<b>349272</b>	<b>487358</b>	<b>567178</b>
	Erucin + DCF					Erysolin + DCF				
min	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
V 1 [RFU]	80968	217202	403164	572841	686186	85673	222099	395087	557818	668314
V 2 [RFU]	94667	281245	446027	618846		98220	290548	445105	616045	
V 3 [RFU]	38201	136051	237271	340452	436389	39181	132950	234567	339154	443641
<b>MW</b>	<b>71279</b>	<b>211499</b>	<b>362154</b>	<b>510713</b>	<b>561288</b>	<b>74358</b>	<b>215199</b>	<b>358253</b>	<b>504339</b>	<b>555978</b>

**Tabelle 73:** Hitze-induzierte ROS-Akkumulation in *C. elegans* nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Isothiocyanaten. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte jedes Experimentes sowie SD und SEM.

DMSO	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
V 1 [RFU]	2775	4578	13357	29497	53685	86846	127119
V 2 [RFU]	3290	5923	10012	18072	32677	53331	79329
V 3 [RFU]	3190	6556	13506	24558	39924	59675	81060
<b>MW</b>	<b>3085</b>	<b>5686</b>	<b>12292</b>	<b>24042</b>	<b>42095</b>	<b>66617</b>	<b>95836</b>
<b>SD</b>	284	1787	7631	15299	24667	33644	42428
<b>SEM</b>	41	258	1101	2208	3560	4856	6124
Sulforaphan	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
V 1 [RFU]	2791	7959	25217	52486	89424	132893	178650
V 2 [RFU]	3161	6160	13335	27418	50812	83792	123735
V 3 [RFU]	3182	14897	41911	84350	128553	167705	201345
<b>MW</b>	<b>3045</b>	<b>9672</b>	<b>26821</b>	<b>54751</b>	<b>89596</b>	<b>128130</b>	<b>167910</b>
<b>SD</b>	204	4401	13765	27601	39217	45919	49327
<b>SEM</b>	29	635	1987	3984	5660	6628	7120
Erysolin	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
V 1 [RFU]	2786	6094	21394	46882	80739	122227	168722
V 2 [RFU]	3178	8096	23070	51739	92458	140121	191764
V 3 [RFU]	3072	11386	33790	69463	109990	147773	179705
<b>MW</b>	<b>3012</b>	<b>8525</b>	<b>26084</b>	<b>56028</b>	<b>94396</b>	<b>136707</b>	<b>180063</b>
<b>SD</b>	193	3393	11201	22554	32521	40815	49012
<b>SEM</b>	28	490	1617	3255	4694	5891	7074

Tabelle 74: Zytotoxizität von Isothiocyanaten in Hct116 Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan						
$\mu\text{M}$	0	2,5	5	10	25	50	100
V 1 [OD]	0.552	0.551	0.551	0.235	0.142	0.200	0.115
V 2 [OD]	0.896	0.853	0.832	0.744	0.399	0.192	0.087
V 3 [OD]	0.606	0.596	0.574	0.502	0.261	0.173	0.094
V 4 [OD]	0.989	1.004	0.912	0.835	0.372	0.173	0.081
V 5 [OD]	0.811	0.788	0.765	0.770	0.354	0.319	0.101
MW	<b>0.771</b>	<b>0.758</b>	<b>0.727</b>	<b>0.617</b>	<b>0.305</b>	<b>0.211</b>	<b>0.096</b>
MTT	Berteroin						
$\mu\text{M}$	0	2,5	5	10	25	50	100
V 1 [OD]	0.552	0.522	0.556	0.495	0.229	0.189	0.133
V 2 [OD]	0.896	0.814	0.833	0.740	0.295	0.225	0.086
V 3 [OD]	0.606	0.600	0.528	0.458	0.173	0.116	0.092
V 4 [OD]	0.989	0.973	0.860	0.846	0.287	0.110	0.082
V 5 [OD]	0.811	0.884	0.798	0.747	0.457	0.122	0.096
MW	<b>0.771</b>	<b>0.758</b>	<b>0.715</b>	<b>0.657</b>	<b>0.288</b>	<b>0.152</b>	<b>0.098</b>
MTT	Erucin						
$\mu\text{M}$	0	2,5	5	10	25	50	100
V 1 [OD]	0.552	0.504	0.548	0.452	0.220	0.200	0.115
V 2 [OD]	0.896	0.861	0.796	0.719	0.234	0.175	0.080
V 3 [OD]	0.606	0.644	0.592	0.462	0.234	0.122	0.080
V 4 [OD]	0.989	0.931	0.956	0.755	0.283	0.107	0.074
V 5 [OD]	0.811	0.842	0.873	0.655	0.229	0.153	0.093
MW	<b>0.771</b>	<b>0.756</b>	<b>0.753</b>	<b>0.608</b>	<b>0.240</b>	<b>0.151</b>	<b>0.088</b>
MTT	Erysolin						
$\mu\text{M}$	0	2,5	5	10	25	50	100
V 1 [OD]	0.701	0.640	0.620	0.412	0.169	0.093	0.085
V 2 [OD]	1.035	0.924	0.950	0.690	0.312	0.098	0.085
V 3 [OD]	0.811	0.842	0.917	0.828	0.388	0.113	0.088
V 4 [OD]	0.911	1.000	0.880	0.747	0.296	0.096	0.087
V 5 [OD]	1.107	0.966	1.052	0.897	0.345	0.095	0.092
V 6 [OD]	0.870	0.847	0.804	0.605	0.213	0.109	0.088
MW	<b>0.906</b>	<b>0.870</b>	<b>0.870</b>	<b>0.697</b>	<b>0.287</b>	<b>0.101</b>	<b>0.087</b>

Tabelle 75: Zytotoxizität von Isothiocyanaten in Hct116 Zellen (48 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan					Berteroin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.784	0.648	0.591	0.139	0.109	0.784	0.707	0.464	0.257	0.088
V 2 [OD]	0.986	0.867	0.647	0.145	0.117	0.986	0.838	0.537	0.284	0.088
V 3 [OD]	0.857	0.765	0.772	0.173	0.120	0.857	0.736	0.589	0.334	0.094
V 4 [OD]	0.725	0.718	0.533	0.149	0.096	0.725	0.760	0.450	0.252	0.076
V 5 [OD]	0.890	0.754	0.455	0.118	0.096	0.890	0.602	0.387	0.193	0.073
MW	<b>0.848</b>	<b>0.750</b>	<b>0.600</b>	<b>0.145</b>	<b>0.108</b>	<b>0.848</b>	<b>0.729</b>	<b>0.485</b>	<b>0.264</b>	<b>0.084</b>
MTT	Erucin					Erysolin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.784	0.635	0.444	0.190	0.097	0.784	0.691	0.379	0.107	0.090
V 2 [OD]	0.986	0.814	0.517	0.201	0.112	0.986	0.762	0.371	0.104	0.084
V 3 [OD]	0.857	0.661	0.618	0.222	0.103	0.857	0.777	0.440	0.119	0.091
V 4 [OD]	0.725	0.703	0.368	0.264	0.088	0.725	0.670	0.368	0.112	0.075
V 5 [OD]	0.890	0.549	0.370	0.115	0.088	0.890	0.655	0.279	0.094	0.075
MW	<b>0.848</b>	<b>0.672</b>	<b>0.463</b>	<b>0.198</b>	<b>0.098</b>	<b>0.848</b>	<b>0.711</b>	<b>0.367</b>	<b>0.107</b>	<b>0.083</b>

Tabelle 76: Zytotoxizität von Isothiocyanaten in Hct116 Zellen (72 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan					Berteroin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.750	0.694	0.479	0.098	0.086	0.750	0.656	0.395	0.202	0.077
V 2 [OD]	0.691	0.650	0.411	0.104	0.087	0.691	0.602	0.436	0.255	0.074
V 3 [OD]	0.709	0.655	0.385	0.101	0.093	0.709	0.557	0.369	0.183	0.081
V 4 [OD]	0.816	0.529	0.324	0.110	0.097	0.816	0.652	0.332	0.222	0.079
MW	<b>0.742</b>	<b>0.632</b>	<b>0.400</b>	<b>0.103</b>	<b>0.091</b>	<b>0.742</b>	<b>0.617</b>	<b>0.383</b>	<b>0.215</b>	<b>0.078</b>
MTT	Erucin					Erysolin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.750	0.682	0.338	0.140	0.085	0.750	0.618	0.208	0.086	0.082
V 2 [OD]	0.691	0.379	0.248	0.171	0.088	0.691	0.530	0.186	0.085	0.079
V 3 [OD]	0.709	0.486	0.343	0.132	0.088	0.709	0.478	0.178	0.095	0.084
V 4 [OD]	0.816	0.531	0.253	0.189	0.093	0.816	0.472	0.197	0.094	0.082
MW	<b>0.742</b>	<b>0.520</b>	<b>0.296</b>	<b>0.158</b>	<b>0.089</b>	<b>0.742</b>	<b>0.525</b>	<b>0.192</b>	<b>0.090</b>	<b>0.082</b>

Tabelle 77: Zytotoxizität von Isothiocyanaten in H4IIE Zellen (24 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan					Berteroin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.838	0.805	0.678	0.305	0.083	0.838	0.805	0.721	0.436	0.080
V 2 [OD]	0.602	0.565	0.482	0.428	0.208	0.602	0.546	0.508	0.392	0.181
V 3 [OD]	1.149	1.041	0.993	0.823	0.095	1.149	1.080	1.017	0.886	0.439
V 4 [OD]	1.380	1.298	1.206	0.943	0.096	1.380	1.337	1.220	1.065	0.611
V 5 [OD]	0.966	0.874	0.778	0.351	0.086	0.966	0.841	0.788	0.656	0.116
MW	<b>0.987</b>	<b>0.917</b>	<b>0.827</b>	<b>0.570</b>	<b>0.114</b>	<b>0.987</b>	<b>0.922</b>	<b>0.851</b>	<b>0.687</b>	<b>0.285</b>
MTT	Erucin					Erysolin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.838	0.769	0.509	0.250	0.084	0.838	0.751	0.561	0.080	0.078
V 2 [OD]	0.602	0.553	0.368	0.392	0.100	0.602	0.515	0.430	0.180	0.080
V 3 [OD]	1.149	1.065	0.987	0.880	0.233	1.149	1.034	0.915	0.157	0.080
V 4 [OD]	1.380	1.310	1.150	1.050	0.180	1.380	1.268	1.161	0.105	0.081
V 5 [OD]	0.966	0.844	0.822	0.669	0.131	0.966	0.831	0.670	0.097	0.079
MW	<b>0.987</b>	<b>0.908</b>	<b>0.767</b>	<b>0.648</b>	<b>0.146</b>	<b>0.987</b>	<b>0.880</b>	<b>0.748</b>	<b>0.124</b>	<b>0.080</b>

Tabelle 78: Zytotoxizität von Isothiocyanaten in H4IIE Zellen (48 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan					Berteroin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.919	0.747	0.495	0.086	0.083	0.919	0.743	0.535	0.099	0.067
V 2 [OD]	0.976	0.859	0.525	0.295	0.196	0.976	0.800	0.606	0.461	0.193
V 3 [OD]	1.578	1.386	1.224	0.671	0.093	1.578	1.333	1.255	0.943	0.094
V 4 [OD]	1.219	0.579	0.256	0.112	0.089	1.219	0.924	0.662	0.290	0.075
V 5 [OD]	1.205	1.048	0.806	0.207	0.089	1.205	1.049	0.843	0.557	0.123
MW	<b>1.179</b>	<b>0.924</b>	<b>0.661</b>	<b>0.274</b>	<b>0.110</b>	<b>1.179</b>	<b>0.970</b>	<b>0.780</b>	<b>0.470</b>	<b>0.110</b>
MTT	Erucin					Erysolin				
$\mu\text{M}$	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	0.919	0.446	0.293	0.082	0.079	0.919	0.659	0.133	0.074	0.072
V 2 [OD]	0.976	0.743	0.497	0.382	0.112	0.976	0.752	0.532	0.185	0.078
V 3 [OD]	1.578	1.290	1.111	0.743	0.100	1.578	1.290	1.070	0.089	0.089
V 4 [OD]	1.219	0.529	0.339	0.095	0.085	1.219	0.750	0.132	0.080	0.083
V 5 [OD]	1.205	0.725	0.575	0.418	0.086	1.205	1.025	0.714	0.092	0.086
MW	<b>1.179</b>	<b>0.747</b>	<b>0.563</b>	<b>0.344</b>	<b>0.092</b>	<b>1.179</b>	<b>0.895</b>	<b>0.516</b>	<b>0.104</b>	<b>0.082</b>

**Tabelle 79:** Zytotoxizität von Isothiocyanaten in H4IIE Zellen (72 h Inkubation) im MTT Assay.

MTT	Sulforaphan					Berteroin				
	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	1.140	0.883	0.569	0.249	0.099	1.140	0.803	0.556	0.364	0.110
V 2 [OD]	1.842	1.393	1.173	0.248	0.091	1.842	1.449	1.165	0.718	0.091
V 3 [OD]	1.655	1.258	0.724	0.143	0.102	1.655	1.254	0.816	0.323	0.088
V 4 [OD]	1.321	1.064	0.613	0.096	0.094	1.321	1.137	0.722	0.091	0.075
V 5 [OD]	1.405	0.931	0.638	0.120	0.099	1.405	0.935	0.684	0.147	0.083
MW	<b>1.472</b>	<b>1.106</b>	<b>0.743</b>	<b>0.171</b>	<b>0.097</b>	<b>1.472</b>	<b>1.116</b>	<b>0.789</b>	<b>0.329</b>	<b>0.089</b>
μM	Erucin					Erysolin				
	0	5	10	25	50	0	5	10	25	50
V 1 [OD]	1.140	0.847	0.528	0.354	0.105	1.140	0.774	0.397	0.092	0.082
V 2 [OD]	1.842	1.402	1.068	0.337	0.091	1.842	1.350	0.803	0.087	0.083
V 3 [OD]	1.655	1.192	0.739	0.243	0.093	1.655	0.834	0.156	0.087	0.086
V 4 [OD]	1.321	1.048	0.503	0.096	0.088	1.321	0.723	0.183	0.081	0.079
V 5 [OD]	1.405	0.938	0.661	0.131	0.099	1.405	0.934	0.465	0.092	0.089
MW	<b>1.472</b>	<b>1.085</b>	<b>0.700</b>	<b>0.232</b>	<b>0.095</b>	<b>1.472</b>	<b>0.923</b>	<b>0.401</b>	<b>0.088</b>	<b>0.084</b>

**Tabelle 80:** LDH Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 μM) in Hct116 Zellen. Dargestellt sind die mittleren Absorptionswerte als Δ OD (30 min – 0 min).

Δ OD	low control	high contr.	DMSO	Sulforaph.	Berteroin	Erucin	Erysolin
V 1	0.266	1.582	0.382	0.352	0.320	0.370	0.427
V 2	0.430	1.536	0.395	0.426	0.377	0.455	0.476
V 3	0.537	1.606	0.377	0.449	0.464	0.447	0.510
V 4	0.366	1.723	0.379	0.423	0.377	0.452	0.469
MW	<b>0.399</b>	<b>1.612</b>	<b>0.383</b>	<b>0.412</b>	<b>0.384</b>	<b>0.431</b>	<b>0.470</b>

**Tabelle 81:** LDH Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (10 μM) in H4IIE Zellen. Dargestellt sind die mittleren Absorptionswerte als Δ OD (30 min – 0 min).

Δ OD	low control	high contr.	DMSO	Sulforaph.	Berteroin	Erucin	Erysolin
V 1	0.527	1.264	0.361	0.681	0.613	0.691	0.663
V 2	0.384	1.264	0.477	0.668	0.574	0.688	0.748
V 3	0.387	1.352	0.344	0.383	0.405	0.395	0.668
MW	<b>0.432</b>	<b>1.293</b>	<b>0.394</b>	<b>0.577</b>	<b>0.531</b>	<b>0.591</b>	<b>0.693</b>

**Tabelle 82:** LDH Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 μM) in H4IIE Zellen. Dargestellt sind die mittleren Absorptionswerte als Δ OD (30 min – 0 min).

Δ OD	low control	high contr.	DMSO	Sulforaph.	Berteroin	Erucin	Erysolin
V 1	0.527	1.264	0.361	0.492	0.406	0.469	0.564
V 2	0.384	1.264	0.477	0.460	0.379	0.358	0.496
V 3	0.387	1.352	0.344	0.363	0.407	0.431	0.424
MW	<b>0.432</b>	<b>1.293</b>	<b>0.394</b>	<b>0.438</b>	<b>0.397</b>	<b>0.419</b>	<b>0.494</b>

**Tabelle 83:** Annexin-V/PI Staining nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) bzw. 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Hct116 Zellen. Dargestellt ist die mittlere Verteilung der Zellen in viabel, apoptotisch und nekrotisch (in %).

Hct116 [in %]	viabel	apoptot.	nekrotisch		viabel	apoptot.	nekrotisch
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	81.97	16.34	1.69	Kontrolle	80.99	16.52	2.49
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53.62	32.58	13.80	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60.06	19.48	20.46
Sulforaphan	49.51	45.55	4.94	Sulforaphan	59.89	36.24	3.87
Berteroin	32.81	46.54	20.65	Berteroin	38.15	39.52	22.33
Erucin	34.76	35.74	29.50	Erucin	46.08	19.30	34.62
Erysolin	52.40	38.10	9.50	Erysolin	61.42	33.52	5.06
<b>Versuch 2</b>							
Kontrolle	81.69	16.45	1.86				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53.52	28.55	17.93				
Sulforaphan	69.50	25.66	4.84				
Berteroin	38.81	40.33	20.86				
Erucin	35.11	26.12	38.77				
Erysolin	63.84	26.51	9.65				

**Tabelle 84:** Acridinorange/Ethidiumbromid Färbung nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in Hct116 Zellen. Dargestellt ist die mittlere Verteilung der Zellen in viabel, apoptotisch und nekrotisch (in %).

Hct116 [in %]	viabel	apoptot.	nekrotisch		viabel	apoptot.	nekrotisch
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	72.18	12.03	15.79	Kontrolle	85.32	11.93	2.75
Sulforaphan	56.78	19.49	23.73	Sulforaphan	75.00	25.00	0.00
Berteroin	54.43	35.44	10.13	Berteroin	69.03	26.55	4.42
Erucin	62.77	25.53	11.70	Erucin	71.43	28.57	0.00
Erysolin	68.52	19.44	12.04	Erysolin	72.22	25.93	1.85
<b>Versuch 2</b>							
Kontrolle	86.11	13.89	0.00				
Sulforaphan	81.93	18.07	0.00				
Berteroin	73.68	26.32	0.00				
Erucin	78.57	21.43	0.00				
Erysolin	49.32	50.68	0.00				

**Tabelle 85:** Apo One Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in Hct116 Zellen. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte als Δ RFU (180 min – 0 min).

Δ RFU	Kontrolle	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sulforaphan	Berteroin	Erucin	Erysolin
<b>V 1</b>	45340	77983	54703	70169	67197	58418
<b>V 2</b>	33280	69304	31864	42310	40276	38251
<b>V 3</b>	31411	119197	35680	47605	53665	38961
<b>MW</b>	<b>36677</b>	<b>88828</b>	<b>40749</b>	<b>53361</b>	<b>53713</b>	<b>45210</b>

**Tabelle 86:** Apo One Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in H4IIE Zellen. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte als Δ RFU (180 min – 0 min).

Δ RFU	Kontrolle	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sulforaphan	Berteroin	Erucin	Erysolin
<b>V 1</b>	9254	14765	20943	14579	53114	37659
<b>V 2</b>	6934	32301	21828	23517	26886	49416
<b>V 3</b>	8908	24470	31828	27345	23732	96347
<b>MW</b>	<b>8365</b>	<b>23845</b>	<b>24866</b>	<b>21814</b>	<b>34577</b>	<b>61141</b>



**Tabelle 87:** Apo One Assay nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) in H4IIE Zellen. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzwerte als  $\Delta$  RFU (180 min – 0 min).

$\Delta$ RFU	Kontrolle	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sulforaphan	Berteroin	Erucin	Erysolin
<b>V 1</b>	1984	3663	1182	2354	2235	10601
<b>V 2</b>	1801	4046	4556	2177	9309	15138
<b>V 3</b>	2470	2183	1369	1847	3132	3826
<b>V 4</b>	1541	4986	2086	2726	3218	3153
<b>MW</b>	<b>1949</b>	<b>3720</b>	<b>2298</b>	<b>2276</b>	<b>4474</b>	<b>8180</b>

**Tabelle 88:** Caspase Assay nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25  $\mu$ M) in Hct116. Untersucht wurde dabei die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 nach 0 h, 3 h und 24 h. Nach Ermittlung des Proteingehaltes (nach der Methode von Bradford) wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt normiert.

Hct116 0 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 3 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.064	5.002	0.640	Kontrolle	0.083	5.002	0.825
Sulforaphan	0.063	4.063	0.775	Sulforaphan	0.080	4.063	0.985
Berteroin	0.063	4.137	0.755	Berteroin	0.083	4.137	0.997
Erucin	0.065	3.951	0.816	Erucin	0.085	3.951	1.076
Erysolin	0.068	3.459	0.983	Erysolin	0.085	3.459	1.229
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.065	5.808	0.555	Kontrolle	0.087	5.808	0.749
Sulforaphan	0.065	5.436	0.598	Sulforaphan	0.092	5.436	0.842
Berteroin	0.071	5.383	0.660	Berteroin	0.100	5.383	0.924
Erucin	0.069	5.071	0.680	Erucin	0.100	5.071	0.981
Erysolin	0.067	4.823	0.689	Erysolin	0.093	4.823	0.959
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.077	6.095	0.628	Kontrolle	0.101	6.095	0.824
Sulforaphan	0.076	5.271	0.721	Sulforaphan	0.097	5.271	0.920
Berteroin	0.074	4.843	0.759	Berteroin	0.097	4.843	1.001
Erucin	0.073	4.852	0.752	Erucin	0.098	4.852	1.005
Erysolin	0.081	4.150	0.970	Erysolin	0.101	4.150	1.211
Hct116 24 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 0 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.159	5.002	1.585	Kontrolle	0.064	5.002	0.635
Sulforaphan	0.156	4.063	1.920	Sulforaphan	0.063	4.063	0.775
Berteroin	0.171	4.137	2.060	Berteroin	0.063	4.137	0.755
Erucin	0.178	3.951	2.246	Erucin	0.065	3.951	0.816
Erysolin	0.160	3.459	2.305	Erysolin	0.064	3.459	0.925
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.175	5.808	1.502	Kontrolle	0.066	5.808	0.564
Sulforaphan	0.191	5.436	1.757	Sulforaphan	0.065	5.436	0.598
Berteroin	0.211	5.383	1.960	Berteroin	0.071	5.383	0.660
Erucin	0.218	5.071	2.150	Erucin	0.067	5.071	0.661
Erysolin	0.192	4.823	1.985	Erysolin	0.067	4.823	0.695
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.191	6.095	1.563	Kontrolle	0.078	6.095	0.636
Sulforaphan	0.185	5.271	1.755	Sulforaphan	0.078	5.271	0.735
Berteroin	0.196	4.843	2.023	Berteroin	0.073	4.843	0.748
Erucin	0.201	4.852	2.071	Erucin	0.069	4.852	0.706
Erysolin	0.187	4.150	2.247	Erysolin	0.081	4.150	0.970

Hct116 3 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 24 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.073	5.002	0.730	Kontrolle	0.095	5.002	0.945
Sulforaphan	0.071	4.063	0.874	Sulforaphan	0.090	4.063	1.102
Berteroin	0.070	4.137	0.840	Berteroin	0.089	4.137	1.069
Erucin	0.072	3.951	0.911	Erucin	0.087	3.951	1.101
Erysolin	0.072	3.459	1.033	Erysolin	0.088	3.459	1.272
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.086	5.808	0.736	Kontrolle	0.120	5.808	1.029
Sulforaphan	0.092	5.436	0.842	Sulforaphan	0.125	5.436	1.150
Berteroin	0.100	5.383	0.924	Berteroin	0.139	5.383	1.287
Erucin	0.100	5.071	0.981	Erucin	0.129	5.071	1.272
Erysolin	0.093	4.823	0.959	Erysolin	0.119	4.823	1.228
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.096	6.095	0.787	Kontrolle	0.130	6.095	1.066
Sulforaphan	0.098	5.271	0.925	Sulforaphan	0.130	5.271	1.233
Berteroin	0.091	4.843	0.934	Berteroin	0.119	4.843	1.229
Erucin	0.085	4.852	0.871	Erucin	0.112	4.852	1.154
Erysolin	0.099	4.150	1.193	Erysolin	0.130	4.150	1.566

Hct116 0 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 3 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.065	5.002	0.645	Kontrolle	0.072	5.002	0.715
Sulforaphan	0.066	4.063	0.812	Sulforaphan	0.073	4.063	0.892
Berteroin	0.066	4.137	0.798	Berteroin	0.073	4.137	0.876
Erucin	0.064	3.951	0.804	Erucin	0.069	3.951	0.873
Erysolin	0.064	3.459	0.925	Erysolin	0.070	3.459	1.012
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.075	5.546	0.676	Kontrolle	0.079	5.808	0.676
Sulforaphan	0.076	5.870	0.647	Sulforaphan	0.079	5.436	0.722
Berteroin	0.074	6.050	0.607	Berteroin	0.089	5.383	0.827
Erucin	0.077	5.286	0.728	Erucin	0.083	5.071	0.813
Erysolin	0.074	5.815	0.636	Erysolin	0.079	4.823	0.819
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.078	6.095	0.636	Kontrolle	0.092	6.095	0.755
Sulforaphan	0.075	5.271	0.711	Sulforaphan	0.089	5.271	0.839
Berteroin	0.070	4.843	0.717	Berteroin	0.081	4.843	0.836
Erucin	0.071	4.852	0.732	Erucin	0.080	4.852	0.824
Erysolin	0.079	4.150	0.946	Erysolin	0.081	4.150	1.127

Hct116 24 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein		Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.105	5.002	1.045	Kontrolle	0.136	6.095	1.112
Sulforaphan	0.103	4.063	1.268	Sulforaphan	0.121	5.271	1.143
Berteroin	0.106	4.137	1.281	Berteroin	0.113	4.843	1.167
Erucin	0.090	3.951	1.139	Erucin	0.113	4.852	1.164
Erysolin	0.098	3.459	1.417	Erysolin	0.132	4.150	1.590
<b>Versuch 2</b>							
Kontrolle	0.120	5.808	1.029				
Sulforaphan	0.122	5.436	1.118				
Berteroin	0.136	5.383	1.263				
Erucin	0.122	5.071	1.203				
Erysolin	0.111	4.823	1.151				

**Tabelle 89:** Caspase Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (10  $\mu$ M) in Hct116. Untersucht wurde dabei die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 nach 0 h, 3 h und 24 h. Nach Ermittlung des Proteingehaltes (nach der Methode von Bradford) wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt normiert.

Hct116 0 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 3 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.070	4.081	0.858	Kontrolle	0.097	4.081	1.188
Sulforaphan	0.071	4.290	0.822	Sulforaphan	0.099	4.290	1.148
Berteroin	0.072	4.113	0.875	Berteroin	0.101	4.113	1.228
Erucin	0.074	4.626	0.800	Erucin	0.110	4.626	1.183
Erysolin	0.067	4.562	0.734	Erysolin	0.093	4.562	1.014
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.079	5.546	0.712	Kontrolle	0.122	5.546	1.100
Sulforaphan	0.084	5.870	0.716	Sulforaphan	0.138	5.870	1.171
Berteroin	0.078	6.050	0.645	Berteroin	0.130	6.050	1.070
Erucin	0.079	5.286	0.742	Erucin	0.129	5.286	1.220
Erysolin	0.077	5.815	0.658	Erysolin	0.129	5.815	1.109
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.080	6.295	0.632	Kontrolle	0.121	6.295	0.961
Sulforaphan	0.078	6.044	0.641	Sulforaphan	0.127	6.044	1.046
Berteroin	0.080	6.475	0.618	Berteroin	0.130	6.475	1.000
Erucin	0.082	5.965	0.683	Erucin	0.136	5.965	1.136
Erysolin	0.084	6.120	0.682	Erysolin	0.135	6.120	1.099

Hct116 24 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 0 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.222	4.081	2.720	Kontrolle	0.069	4.081	0.845
Sulforaphan	0.229	4.290	2.663	Sulforaphan	0.069	4.290	0.804
Berteroin	0.248	4.113	3.009	Berteroin	0.069	4.113	0.833
Erucin	0.284	4.626	3.064	Erucin	0.074	4.626	0.794
Erysolin	0.219	4.562	2.395	Erysolin	0.066	4.562	0.718
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.316	5.546	2.849	Kontrolle	0.077	5.546	0.690
Sulforaphan	0.382	5.870	3.250	Sulforaphan	0.080	5.870	0.681
Berteroin	0.356	6.050	2.938	Berteroin	0.079	6.050	0.653
Erucin	0.349	5.286	3.296	Erucin	0.070	5.286	0.662
Erysolin	0.345	5.815	2.962	Erysolin	0.076	5.815	0.653
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.308	6.295	2.447	Kontrolle	0.081	6.295	0.639
Sulforaphan	0.348	6.044	2.875	Sulforaphan	0.075	6.044	0.616
Berteroin	0.339	6.475	2.614	Berteroin	0.079	6.475	0.606
Erucin	0.366	5.965	3.064	Erucin	0.079	5.965	0.662
Erysolin	0.358	6.120	2.925	Erysolin	0.078	6.120	0.633

Hct116 3 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 24 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.076	4.081	0.931	Kontrolle	0.097	4.081	1.188
Sulforaphan	0.078	4.290	0.909	Sulforaphan	0.099	4.290	1.154
Berteroin	0.079	4.113	0.960	Berteroin	0.099	4.113	1.197
Erucin	0.083	4.626	0.892	Erucin	0.105	4.626	1.135
Erysolin	0.074	4.562	0.811	Erysolin	0.096	4.562	1.052
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.094	5.546	0.847	Kontrolle	0.128	5.546	1.149
Sulforaphan	0.102	5.870	0.865	Sulforaphan	0.137	5.870	1.163
Berteroin	0.102	6.050	0.839	Berteroin	0.137	6.050	1.128
Erucin	0.084	5.286	0.795	Erucin	0.101	5.286	0.955
Erysolin	0.099	5.815	0.851	Erysolin	0.134	5.815	1.152

Versuch 3				Versuch 3			
Kontrolle	0.102	6.295	0.806	Kontrolle	0.138	6.295	1.092
Sulforaphan	0.096	6.044	0.790	Sulforaphan	0.133	6.044	1.096
Berteroin	0.098	6.475	0.757	Berteroin	0.134	6.475	1.031
Erucin	0.099	5.965	0.830	Erucin	0.135	5.965	1.127
Erysolin	0.102	6.120	0.829	Erysolin	0.136	6.120	1.111

Hct116 0 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	Hct116 3 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.069	4.081	0.845	Kontrolle	0.078	4.081	0.956
Sulforaphan	0.069	4.290	0.804	Sulforaphan	0.077	4.290	0.897
Berteroin	0.069	4.113	0.839	Berteroin	0.076	4.113	0.924
Erucin	0.072	4.626	0.778	Erucin	0.081	4.626	0.875
Erysolin	0.068	4.562	0.745	Erysolin	0.076	4.562	0.833
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.064	5.808	0.551	Kontrolle	0.089	5.546	0.802
Sulforaphan	0.065	5.436	0.598	Sulforaphan	0.090	5.870	0.767
Berteroin	0.071	5.383	0.660	Berteroin	0.089	6.050	0.736
Erucin	0.067	5.071	0.656	Erucin	0.093	5.286	0.880
Erysolin	0.066	4.823	0.679	Erysolin	0.090	5.815	0.770
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.078	6.295	0.620	Kontrolle	0.091	6.295	0.723
Sulforaphan	0.082	6.044	0.674	Sulforaphan	0.095	6.044	0.786
Berteroin	0.079	6.475	0.606	Berteroin	0.094	6.475	0.726
Erucin	0.082	5.965	0.683	Erucin	0.098	5.965	0.817
Erysolin	0.075	6.120	0.613	Erysolin	0.089	6.120	0.727

Hct116 24 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein		Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.106	4.081	1.299	Kontrolle	0.123	6.295	0.977
Sulforaphan	0.109	4.290	1.264	Sulforaphan	0.140	6.044	1.154
Berteroin	0.106	4.113	1.289	Berteroin	0.135	6.475	1.043
Erucin	0.117	4.626	1.259	Erucin	0.142	5.965	1.186
Erysolin	0.105	4.562	1.145	Erysolin	0.124	6.120	1.013
<b>Versuch 2</b>							
Kontrolle	0.126	5.546	1.131				
Sulforaphan	0.119	5.870	1.009				
Berteroin	0.123	6.050	1.012				
Erucin	0.127	5.286	1.201				
Erysolin	0.121	5.815	1.040				

**Tabelle 90:** Caspase Assay nach 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in H4IIE Zellen. Untersucht wurde dabei die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 nach 3 h und 24 h. Nach Ermittlung des Proteingehaltes (nach der Methode von Bradford) wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt normiert.

H4IIE 3 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	H4IIE 24 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.076	3.228	1.177	Kontrolle	0.089	3.228	1.378
Sulforaphan	0.095	3.787	1.248	Sulforaphan	0.107	3.787	1.406
Berteroin	0.094	3.917	1.200	Berteroin	0.114	3.917	1.455
Erucin	0.101	3.707	1.362	Erucin	0.119	3.707	1.598
Erysolin	0.107	3.213	1.665	Erysolin	0.122	3.213	1.899

<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.094	3.254	1.437	Kontrolle	0.111	3.254	1.706
Sulforaphan	0.104	3.143	1.647	Sulforaphan	0.120	3.143	1.909
Berteroin	0.105	2.742	1.906	Berteroin	0.127	2.742	2.316
Erucin	0.099	3.162	1.558	Erucin	0.116	3.162	1.826
Erysolin	0.099	2.882	1.709	Erysolin	0.120	2.882	2.073
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.090	2.869	1.569	Kontrolle	0.116	2.869	2.013
Sulforaphan	0.104	2.619	1.976	Sulforaphan	0.126	2.619	2.405
Berteroin	0.099	2.275	2.176	Berteroin	0.126	2.275	2.769
Erucin	0.094	2.665	1.754	Erucin	0.116	2.665	2.167
Erysolin	0.108	2.701	1.999	Erysolin	0.132	2.701	2.434

<b>H4IIE 3 h Messung</b>	<b>Caspase 8/10 [OD]</b>	<b>Protein- gehalt [mg/ml]</b>	<b>Enzymakti- vität/mg Protein</b>	<b>H4IIE 24 h Messung</b>	<b>Caspase 8/10 [OD]</b>	<b>Protein- gehalt [mg/ml]</b>	<b>Enzymakti- vität/mg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.078	3.228	1.208	Kontrolle	0.085	3.228	1.309
Sulforaphan	0.094	3.787	1.241	Sulforaphan	0.100	3.787	1.320
Berteroin	0.093	3.917	1.181	Berteroin	0.109	3.917	1.391
Erucin	0.102	3.707	1.369	Erucin	0.111	3.707	1.491
Erysolin	0.098	3.213	1.517	Erysolin	0.104	3.213	1.611
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.078	2.025	1.925	Kontrolle	0.096	3.254	1.468
Sulforaphan	0.088	1.567	2.808	Sulforaphan	0.105	3.143	1.670
Berteroin	0.097	2.172	2.233	Berteroin	0.103	2.742	1.878
Erucin	0.098	1.943	2.522	Erucin	0.102	3.162	1.613
Erysolin	0.103	2.041	2.511	Erysolin	0.091	2.882	1.579
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.086	2.869	1.490	Kontrolle	0.087	2.869	1.516
Sulforaphan	0.100	2.619	1.900	Sulforaphan	0.101	2.619	1.919
Berteroin	0.094	2.275	2.055	Berteroin	0.095	2.275	2.088
Erucin	0.090	2.665	1.679	Erucin	0.093	2.665	1.745
Erysolin	0.099	2.701	1.823	Erysolin	0.102	2.701	1.879

<b>H4IIE 3 h Messung</b>	<b>Caspase 9 [OD]</b>	<b>Protein- gehalt [mg/ml]</b>	<b>Enzymakti- vität/mg Protein</b>	<b>H4IIE 24 h Messung</b>	<b>Caspase 9 [OD]</b>	<b>Protein- gehalt [mg/ml]</b>	<b>Enzymakti- vität/mg Protein</b>
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.090	3.228	1.386	Kontrolle	0.093	3.228	1.440
Sulforaphan	0.103	3.787	1.360	Sulforaphan	0.112	3.787	1.479
Berteroin	0.110	3.917	1.398	Berteroin	0.107	3.917	1.366
Erucin	0.098	3.707	1.315	Erucin	0.095	3.707	1.281
Erysolin	0.094	3.213	1.455	Erysolin	0.098	3.213	1.525
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.083	3.254	1.275	Kontrolle	0.086	3.254	1.322
Sulforaphan	0.094	3.143	1.495	Sulforaphan	0.094	3.143	1.487
Berteroin	0.081	2.742	1.468	Berteroin	0.084	2.742	1.532
Erucin	0.091	3.162	1.431	Erucin	0.093	3.162	1.463
Erysolin	0.074	2.882	1.284	Erysolin	0.077	2.882	1.336
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.091	2.869	1.586	Kontrolle	0.086	2.869	1.499
Sulforaphan	0.099	2.619	1.890	Sulforaphan	0.099	2.619	1.890
Berteroin	0.093	2.275	2.033	Berteroin	0.093	2.275	2.033
Erucin	0.089	2.665	1.670	Erucin	0.087	2.665	1.632
Erysolin	0.097	2.701	1.786	Erysolin	0.093	2.701	1.721

**Tabelle 91:** Caspase Assay nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in H4IIE Zellen. Untersucht wurde dabei die Aktivität der Caspasen 3/7, 8/10 und 9 nach 3 h und 24 h. Nach Ermittlung des Proteingehaltes (nach der Methode von Bradford) wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt normiert.

H4IIE 3 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	H4IIE 24 h Messung	Caspase 3/7 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.071	2.583	1.365	Kontrolle	0.076	2.583	1.461
Sulforaphan	0.096	2.997	1.602	Sulforaphan	0.132	2.997	2.202
Berteroin	0.080	2.892	1.383	Berteroin	0.122	2.892	2.109
Erucin	0.086	2.944	1.452	Erucin	0.118	2.944	1.995
Erysolin	0.126	2.694	2.338	Erysolin	0.180	2.694	3.331
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.080	2.025	1.975	Kontrolle	0.093	2.025	2.296
Sulforaphan	0.095	1.567	3.015	Sulforaphan	0.147	1.567	4.674
Berteroin	0.096	2.172	2.199	Berteroin	0.132	2.172	3.027
Erucin	0.106	1.943	2.715	Erucin	0.154	1.943	3.951
Erysolin	0.113	2.041	2.755	Erysolin	0.179	2.041	4.384
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.088	2.197	1.991	Kontrolle	0.124	2.197	2.810
Sulforaphan	0.119	2.769	2.149	Sulforaphan	0.212	2.769	3.828
Berteroin	0.105	2.376	2.209	Berteroin	0.190	2.376	3.998
Erucin	0.112	2.475	2.252	Erucin	0.205	2.475	4.141
Erysolin	0.120	2.799	2.143	Erysolin	0.231	2.799	4.117

H4IIE 3 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	H4IIE 24 h Messung	Caspase 8/10 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.065	2.583	1.248	Kontrolle	0.073	2.583	1.413
Sulforaphan	0.087	2.997	1.443	Sulforaphan	0.092	2.997	1.527
Berteroin	0.077	2.892	1.331	Berteroin	0.089	2.892	1.539
Erucin	0.084	2.944	1.426	Erucin	0.106	2.944	1.800
Erysolin	0.106	2.694	1.967	Erysolin	0.117	2.694	2.162
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.090	3.254	1.375	Kontrolle	0.079	2.025	1.950
Sulforaphan	0.102	3.143	1.615	Sulforaphan	0.096	1.567	3.047
Berteroin	0.094	2.742	1.714	Berteroin	0.101	2.172	2.325
Erucin	0.096	3.162	1.510	Erucin	0.103	1.943	2.638
Erysolin	0.083	2.882	1.440	Erysolin	0.110	2.041	2.694
<b>Versuch 3</b>				<b>Versuch 3</b>			
Kontrolle	0.084	2.197	1.900	Kontrolle	0.088	2.197	2.002
Sulforaphan	0.106	2.769	1.905	Sulforaphan	0.103	2.769	1.860
Berteroin	0.093	2.376	1.957	Berteroin	0.092	2.376	1.936
Erucin	0.099	2.475	1.990	Erucin	0.101	2.475	2.030
Erysolin	0.102	2.799	1.822	Erysolin	0.100	2.799	1.786

H4IIE 3 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein	H4IIE 24 h Messung	Caspase 9 [OD]	Protein- gehalt [mg/ml]	Enzymakti- vität/mg Protein
<b>Versuch 1</b>				<b>Versuch 1</b>			
Kontrolle	0.069	2.583	1.335	Kontrolle	0.074	2.583	1.423
Sulforaphan	0.085	2.997	1.418	Sulforaphan	0.090	2.997	1.502
Berteroin	0.080	2.892	1.374	Berteroin	0.083	2.892	1.435
Erucin	0.086	2.944	1.452	Erucin	0.094	2.944	1.596
Erysolin	0.114	2.694	2.115	Erysolin	0.124	2.694	2.301
<b>Versuch 2</b>				<b>Versuch 2</b>			
Kontrolle	0.072	2.025	1.777	Kontrolle	0.075	2.025	1.839
Sulforaphan	0.081	1.567	2.585	Sulforaphan	0.084	1.567	2.664
Berteroin	0.091	2.172	2.095	Berteroin	0.088	2.172	2.026
Erucin	0.091	1.943	2.329	Erucin	0.086	1.943	2.201
Erysolin	0.097	2.041	2.376	Erysolin	0.091	2.041	2.217

Versuch 3				Versuch 3			
Kontrolle	0.083	2.197	1.877	Kontrolle	0.085	2.197	1.934
Sulforaphan	0.102	2.769	1.842	Sulforaphan	0.100	2.769	1.797
Berteroin	0.095	2.376	1.989	Berteroin	0.094	2.376	1.968
Erucin	0.097	2.475	1.949	Erucin	0.094	2.475	1.899
Erysolin	0.101	2.799	1.804	Erysolin	0.100	2.799	1.786

**Tabelle 92:** Zellzyklusanalyse nach 24 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in Hct116 Zellen. Als Positivkontrolle wurde 0,5 µM Doxorubicin verwendet. Angegeben ist die mittlere Verteilung der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus.

Hct116 [in %]	subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M		subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Vers. 1</b>					<b>Vers. 3</b>				
Kontrolle	14.80	55.45	10.13	18.56	Kontrolle	11.25	58.60	11.29	19.01
Doxo.	43.37	/	/	/	Doxo.	32.01	15.19	6.88	46.44
Sulfo.	12.51	68.44	5.51	13.01	Sulfo.	20.38	38.15	5.74	35.58
Berteroin	25.41	41.53	6.18	25.81	Berteroin	47.31	20.00	8.82	23.66
Erucin	35.92	23.82	6.41	32.01	Erucin	59.52	14.43	8.26	17.56
Erysolin	19.76	37.98	4.36	37.35	Erysolin	32.70	20.38	11.76	34.12
<b>Vers. 2</b>									
Kontrolle	14.43	60.34	11.30	13.73					
Doxo.	39.49	14.41	11.99	33.82					
Sulfo.	16.20	61.74	7.39	14.26					
Berteroin	35.63	29.29	10.47	23.55					
Erucin	46.46	17.31	9.46	25.40					
Erysolin	27.39	23.92	9.72	38.58					

**Tabelle 93:** Zellzyklusanalyse nach 24 h bzw. 48 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM bzw. 10 µM) in H4IIE Zellen. Als Positivkontrolle wurde 1,0 µM Doxorubicin verwendet. Angegeben ist die mittlere Verteilung der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus.

H4IIE [in %]	subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	<u>24 h</u>	subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Vers. 1</b>					<b>Vers. 3</b>				
Kontrolle	16.12	65.92	6.61	11.34	Kontrolle	23.85	60.06	4.82	10.91
Doxo.	21.53	66.02	2.80	9.56	Doxo.	28.56	49.82	2.73	17.09
Sulfo.	54.46	20.16	4.80	20.54	Sulfo.	62.69	14.15	4.38	18.62
Berteroin	51.80	24.64	4.67	18.86	Berteroin	48.38	22.78	5.44	23.11
Erucin	50.55	18.49	7.19	23.73	Erucin	58.28	14.57	9.41	17.59
Erysolin	65.47	14.91	4.97	14.59	Erysolin	62.81	18.02	6.68	11.99
<b>Vers. 2</b>									
Kontrolle	19.90	60.55	7.48	11.18					
Doxo.	28.22	53.06	3.40	14.59					
Sulfo.	51.69	19.72	5.58	22.20					
Berteroin	53.98	18.39	5.14	21.57					
Erucin	55.28	14.50	7.05	22.36					
Erysolin	73.96	11.57	4.53	9.65					

H4IIE [in %]	subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	<u>48 h</u>	subG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Vers. 1</b>					<b>Vers. 3</b>				
Kontrolle	28.16	52.72	4.97	11.33	Kontrolle	28.87	55.31	4.76	10.36
Doxo.	40.02	43.00	3.75	9.11	Doxo.	49.05	33.03	2.31	14.87
Sulfo.	33.47	45.55	5.28	11.83	Sulfo.	35.13	46.05	5.95	12.21
Berteroin	40.54	41.93	4.19	10.60	Berteroin	41.31	39.39	5.39	13.37
Erucin	43.27	36.52	4.61	12.99	Erucin	43.91	35.81	5.65	14.34
Erysolin	46.39	34.91	5.23	11.35	Erysolin	45.42	35.58	5.85	12.20

<b>Vers. 2</b>				
Kontrolle	25.72	57.41	6.55	10.32
Doxo.	46.73	39.91	2.99	9.93
Sulfo.	42.42	39.31	6.59	11.15
Berteroin	40.30	38.87	7.50	12.81
Erucin	44.83	35.32	6.32	13.16
Erysolin	44.97	35.07	7.28	12.17

**Tabelle 94:** Comet Assay nach 24 h bzw. 6 h Inkubation mit Isothiocyanaten (25 µM) in H4IIE Zellen. Als Positivkontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet (1 mM). Dargestellt ist der mittlere Anteil an DNA (in %) im Schweif.

<b>% DNA im Schweif (24 h)</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Sulforaphan</b>	<b>Berteroin</b>	<b>Erucin</b>	<b>Erysolin</b>
<b>V 1</b>	2.01	4.51	3.99	5.31	4.45	5.65
<b>V 2</b>	3.12	4.18	3.80	4.37	4.86	4.77
<b>V 3</b>	4.81	22.40	11.70	14.74	16.25	11.58
<b>V 4</b>	8.82	26.96	14.42	17.00	13.27	15.74
<b>MW</b>	<b>4.69</b>	<b>14.51</b>	<b>8.48</b>	<b>10.36</b>	<b>9.71</b>	<b>9.43</b>

<b>% DNA im Schweif (6 h)</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Sulforaphan</b>	<b>Berteroin</b>	<b>Erucin</b>	<b>Erysolin</b>
<b>V 1</b>	8.82	19.66	9.68	14.60	12.37	15.14
<b>V 2</b>	6.74	19.59	12.33	12.38	14.84	16.11
<b>V 3</b>	8.62	19.87	13.85	14.62	11.72	16.11
<b>MW</b>	<b>8.06</b>	<b>19.71</b>	<b>11.95</b>	<b>13.87</b>	<b>12.98</b>	<b>15.79</b>

**Tabelle 95:** SEAP Assay Inkubation mit Isothiocyanaten (0,5, 1, 2,5 und 5 µM) in H4IIE Zellen. Zur Induktion der NFκB-Aktivität wurden 4 ng/ml TNFα verwendet. Dargestellt ist der mittlere Anstieg der NFκB-abhängigen SEAP-Aktivität sowie die Zellviabilität (MTT Assay).

<b>SEAP</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>DMSO</b>	<b>TNFα</b>	<b>Sulfo.</b>	<b>0.5 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>2.5 µM</b>	<b>5 µM</b>
<b>V 1</b>	3486	3290	19127	3025	15809	15689	13196	10092
<b>V 2</b>	3533	2759	13820	2174	13256	12532	9568	6659
<b>V 3</b>	5094	6814	26300	6735	25459	19082	18264	21594
<b>V 4</b>	6453	7284	20963	6565	21536	21072	19743	19924
<b>V 5</b>	5888	5359	26402	4670	24685	25220	20490	17963
<b>V 6</b>	5643	6257	23244	5481	25422	19558	19218	16640
<b>V 7</b>	6876	7606	42297	6795	34333	34445	32449	28717
<b>MW</b>	<b>5282</b>	<b>5624</b>	<b>24593</b>	<b>5064</b>	<b>22929</b>	<b>21085</b>	<b>18990</b>	<b>17370</b>

<b>MTT</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>DMSO</b>	<b>TNFα</b>	<b>Sulfo.</b>	<b>0.5 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>2.5 µM</b>	<b>5 µM</b>
<b>V 1</b>	1.305	0.935	0.939	1.250	0.876	0.792	0.740	0.553
<b>V 2</b>	1.367	1.163	1.084	1.268	0.981	0.850	0.647	0.481
<b>V 3</b>	0.540	0.527	0.584	0.494	0.563	0.572	0.580	0.567
<b>V 4</b>	0.721	0.645	0.608	0.676	0.751	0.744	0.746	0.622
<b>V 5</b>	1.356	1.224	0.980	1.285	0.975	0.973	0.845	0.809
<b>V 6</b>	1.047	0.950	0.946	1.002	0.813	0.994	0.712	0.675
<b>V 7</b>	0.876	0.693	0.646	0.840	0.544	0.685	0.595	0.599
<b>MW</b>	<b>1.030</b>	<b>0.877</b>	<b>0.827</b>	<b>0.974</b>	<b>0.786</b>	<b>0.801</b>	<b>0.695</b>	<b>0.615</b>



SEAP	Kontrolle	DMSO	TNF $\alpha$	Berberoin	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
V 1	3486	3290	19127	2918	15093	16284	15233	12404
V 2	3533	2759	13820	2227	14917	11596	10420	7812
V 3	5094	6814	26300	5845	15566	15723	15591	17413
V 4	10453	7284	20963	6926	19972	17566	20128	20882
V 5	5888	5359	26402	4818	24632	24848	21784	16917
V 6	5643	6257	23244	5243	22682	22298	20780	20621
V 7	6876	7606	42297	5783	32736	32523	29313	28050
<b>MW</b>	<b>5853</b>	<b>5624</b>	<b>24593</b>	<b>4823</b>	<b>20800</b>	<b>20120</b>	<b>19036</b>	<b>17728</b>

MTT	Kontrolle	DMSO	TNF $\alpha$	Berberoin	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
V 1	1.305	0.935	0.939	0.975	0.767	0.771	0.731	0.604
V 2	1.367	1.163	1.084	1.178	0.917	0.803	0.721	0.438
V 3	0.540	0.527	0.584	0.410	0.555	0.553	0.530	0.401
V 4	0.721	0.645	0.608	0.553	0.649	0.656	0.680	0.585
V 5	1.356	1.224	0.980	1.123	0.920	0.826	0.722	0.689
V 6	1.047	0.950	0.946	0.925	0.802	0.749	0.694	0.626
V 7	0.876	0.693	0.646	0.740	0.619	0.646	0.617	0.568
<b>MW</b>	<b>1.030</b>	<b>0.877</b>	<b>0.827</b>	<b>0.843</b>	<b>0.747</b>	<b>0.715</b>	<b>0.671</b>	<b>0.559</b>

SEAP	Kontrolle	DMSO	TNF $\alpha$	Erucin	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
V 1	3486	3290	19127	2964	15551	15068	13457	10222
V 2	3533	2759	13820	2809	12481	10454	7869	7561
V 3	5094	6814	26300	6101	15434	16087	17098	17898
V 4	10453	7284	20963	5724	20226	19296	20568	20398
V 5	5888	5359	26402	4670	27558	21973	20124	14689
V 6	5643	6257	23244	4702	22076	22460	19082	13362
V 7	6876	7606	42297	5777	31329	29672	27977	25993
<b>MW</b>	<b>5853</b>	<b>5624</b>	<b>24593</b>	<b>4678</b>	<b>20665</b>	<b>19287</b>	<b>18025</b>	<b>15732</b>

MTT	Kontrolle	DMSO	TNF $\alpha$	Erucin	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
V 1	1.305	0.935	0.939	1.013	0.793	0.735	0.669	0.487
V 2	1.367	1.163	1.084	1.219	0.864	0.663	0.521	0.429
V 3	0.540	0.527	0.584	0.425	0.545	0.564	0.553	0.418
V 4	0.721	0.645	0.608	0.583	0.681	0.660	0.658	0.547
V 5	1.356	1.224	0.980	1.142	0.927	0.849	0.771	0.613
V 6	1.047	0.950	0.946	0.867	0.733	0.781	0.691	0.510
V 7	0.876	0.693	0.646	0.713	0.583	0.589	0.528	0.561
<b>MW</b>	<b>1.030</b>	<b>0.877</b>	<b>0.827</b>	<b>0.852</b>	<b>0.732</b>	<b>0.692</b>	<b>0.627</b>	<b>0.501</b>

SEAP	Kontrolle	DMSO	TNF $\alpha$	Erysolin	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
V 1	3486	3290	19127	2909	16046	15234	12384	6874
V 2	3533	2759	13820	2213	11538	10559	8210	5159
V 3	5094	6814	26300	5800	20077	20253	18687	16092
V 4	10453	7284	20963	5942	21570	21818	19729	20935
V 5	5888	5359	26402	4516	23805	25664	20472	12072
V 6	5643	6257	23244	5346	21874	22707	20209	13982
V 7	6876	7606	42297	5864	32132	29509	24401	22070
<b>MW</b>	<b>5853</b>	<b>5624</b>	<b>24593</b>	<b>4656</b>	<b>21006</b>	<b>20821</b>	<b>17727</b>	<b>13883</b>

<b>MTT</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>DMSO</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>ErysoLin</b>	<b>0.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>5 <math>\mu</math>M</b>
<b>V 1</b>	1.305	0.935	0.939	1.040	0.880	0.862	0.683	0.436
<b>V 2</b>	1.367	1.163	1.084	1.228	0.836	0.685	0.473	0.380
<b>V 3</b>	0.540	0.527	0.584	0.448	0.576	0.574	0.422	0.432
<b>V 4</b>	0.721	0.645	0.608	0.572	0.699	0.711	0.728	0.629
<b>V 5</b>	1.356	1.224	0.980	1.235	1.000	0.920	0.729	0.576
<b>V 6</b>	1.047	0.950	0.946	0.985	0.890	0.831	0.755	0.559
<b>V 7</b>	0.876	0.693	0.646	0.782	0.681	0.760	0.729	0.526
<b>MW</b>	<b>1.030</b>	<b>0.877</b>	<b>0.827</b>	<b>0.899</b>	<b>0.795</b>	<b>0.763</b>	<b>0.646</b>	<b>0.505</b>

## Veröffentlichungen

### *Posterpräsentationen*

**Ackermann, D.**, Büchter, C., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W.  
„Uptake of methylated myricetin derivatives in cell culture and *C. elegans*“  
EUROTOX 2012, Stockholm, Schweden

**Ackermann, D.**, Büchter, C., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W.  
„Uptake and metabolism of methylated myricetin derivatives: Studies in cell culture and *C. elegans*“  
53. Jahrestagung der DGPT, Dresden

**Ackermann, D.**, Kohns, M., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W.  
„Uptake and metabolism of methylated flavonoids in colon carcinoma and hepatoma cell lines“  
52. Jahrestagung der DGPT, Frankfurt

**Ackermann, D.**, Ruhl, S., Havermann, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W.  
„Uptake and metabolism of polyphenols in hepatoma cells“  
51. Jahrestagung der DGPT, Mainz

---

**Lebenslauf**

---

**Daniela Ackermann, M. S.**

AugustastraÙe 34  
40477 Düsseldorf

*Staatsangehörigkeit:* Deutsch

*Geburtstag/-ort:* 14.09.1985 / Homberg (Efze)

---

- ab 2009/10                      Doktorandin am Institut für Toxikologie sowie am Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- bis 2012/03: Stipendiatin im Graduiertenkolleg 1427 („Nahrungsinhaltsstoffe als Signalgeber nukleärer Rezeptoren im Darm“) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
- 2008/08 – 2009/08              Graduiertenprogramm zum Master of Science in Nutritional Sciences, University of Connecticut (UConn), Storrs, USA  
Research Assistant im Department of Nutritional Sciences (UConn)  
Teilnahme am Studenten-Austausch-Programm „Landesprogramm Baden-Württemberg/Connecticut“
- 2005/10 – 2008/07              Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Hohenheim (Stuttgart), Vordiplom August 2007
- 2002 – 2005                      Oberstufengymnasium Geschwister Scholl Schule Melsungen (Abitur)

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem beiden Doktorvätern Prof. Wim Wätjen und Prof. Peter Proksch für die Überlassung des interessanten Themas, für hilfreiche Diskussionen und Ratschläge und für die Möglichkeit der Teilnahme an der Weiterbildung zum Fachtoxikologen sowie an nationalen und internationalen Kongressen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie sowie des Instituts für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie. Besonderer Dank gilt den TAs Ingrid Köhler und Hermine Kannengießler für die Durchführung von Experimenten und Kerstin de Mezzo für viele hilfreiche Ratschläge. Susannah Havermann und Sebastian Honnen möchte ich für die gemeinsamen drei Jahre danken. Ein besonderes Dankeschön gilt Christian Bächter für die konstruktiven Diskussionen, die gemeinsame Durchführung von *C. elegans* Experimenten (sowie die Überlassung der *C. elegans* DCF Daten und NSRA Bilder) und vor allem fürs (unermüdliche) Korrekturlesen der Arbeit. Allen aktuellen und ehemaligen TAs, Postdocs, Doktoranden, Diplomanden und Bachelor- und Masterstudenten möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, die den Laboralltag deutlich erleichtert hat. Bei Yvonne Chovolou bedanke ich mich für ihre fachliche Hilfe und Unterstützung bei den Apoptose (und vielen weiteren) Experimenten, bei allen Fragen zum Durchflusszytometer, für die Messung der SEAP Assays und allgemein für die Diskussionsbereitschaft. Marbod Kohns und Anna Wellenberg danke ich für die Durchführung von Experimenten und Marbod besonders für die Auswahl der Myricetin Substanzen, die einen Hauptteil der Arbeit bildeten. Mira Pavkovic, Lena Schumacher und Sandra Hildebrandt danke ich dafür, dass es immer was zu Lachen gab und es nie langweilig wurde. Andreas Marmann und Robert Bara möchte ich für die Hilfe bei allen analytischen Fragestellungen und beim Umgang mit der HPLC und LC-MS danken. Auch bei Sarah Wagener aus dem Institut für Biochemie möchte ich mich für die Nutzung der HPLC und des Plattenlesegerätes und der großartigen Hilfe dabei bedanken. Desweiteren gilt mein Dank den beiden Sekretärinnen Martina Bennat und Claudia Eckelskämper für die große Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten.

Meinem Vater danke ich für die finanzielle Förderung, ohne die mein Studium (v.a. in den USA) so nicht möglich gewesen wäre. Meiner Schwester Anja gilt mein ganz besonderer Dank für ihre Hilfe in allen Lebenslagen und dafür, dass sie immer für einen da ist und vor keinem Umzug zurück schreckt (mindestens einer wird noch kommen!). Last but not least gilt mein Dank Jens und seiner Familie, die mich immer wieder aufgebaut haben und mir zur Seite standen. Danke Jens, dass es Dich gibt, und für so vieles, was ohne Dich nicht möglich (gewesen) wäre!

**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