Aus dem Institut für Toxikologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

# Toxische Effekte phenolischer Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Limper

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

| | |
|---|---|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf |
| Referent: | Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen |
| Korreferent: | PD Dr. rer. nat. Klaus Unfried |

# Inhaltsverzeichnis


**Abkürzungen** 5

**1. Einleitung** 8

1.1 Krebs – Allgemeines, Epidemiologie 8

1.2 *Psoralea corylifolia* 8

1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe 9

1.3.1 Flavonoide 10

1.3.1.1 Medizinische Effekte von Flavonoiden 11

1.3.2 Cumarine 11

1.3.3 Verwendete phenolische und polyphenolische Verbindungen 12

1.3.3.1 Flavan- und Isoflavanderivate 12

1.3.3.2 Cumarinderivate 16

1.4 Karzinogenese 17

1.5 Apoptose und Nekrose 17

1.5.1 Apoptose 18

1.5.1.1 Caspasen 19

1.5.1.2 Extrinsischer und intrinsischer Signalweg 20

1.5.2 Nekrose 21

1.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade 21

1.7 Oxidativer Stress in Zellen 23

1.7.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen 23

1.7.2 Physiologische und toxische Wirkungen reaktiver Sauerstoff-spezies in Zellen 24

1.7.3 Anti- und prooxidative Wirkungen von Flavonoiden und therapeutische Möglichkeiten 25

1.8 Zielsetzung 26

**2. Material und Methoden** 27

2.1 Material 27

2.1.1 Zelllinien 27

2.1.2 Zellkulturmedien und –seren 27

2.1.3 Lösungen und Puffer 27

2.1.4 Proteingewichtsstandards 29

2.1.5 Chemikalien/Lösungsmittel 29

2.1.6 Untersuchte Substanzen aus *Psoralea corylifolia* 31

2.1.7 Assay-Kits/Plasmide 31

2.1.8 Antikörper 32

2.1.9 Geräte 32

2.1.10 Sonstige Materialien 33

2.1.11 Computerhardware und –software 34

2.2 Methoden 35

2.2.1 Zellkultur 35

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen 35

2.2.1.2 Ausplattieren und Inkubation von Zellen 36

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 36

2.2.1.4 Mikroskopie der Zellen 36

2.2.2 Zytotoxizität (MTT-Assay) 36

2.2.3 Nachweis des Zelltodes: Apoptose und Nekrose 37
2.2.3.1 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay 37
2.2.3.2 LDH-Assay (Cytotoxicity Detection Kit) 37
2.2.3.3 Life-Dead-Assay 38
2.2.4 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade (SDS-PAGE und Western Blot) 39
2.2.4.1 Proteinisolation 40
2.2.4.2 Proteinbestimmung nach *Lowry* 40
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach *Laemmli* 40
2.2.4.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) 41
2.2.4.5 Färbung membrangebundener Proteine 42
2.2.4.6 Antikörper-vermittelter Nachweis spezifischer Proteine 42
2.2.4.7 Strippen von PVDF-Membranen 43
2.2.5 Antioxidative Kapazität 43
2.2.5.1 TEAC-Assay 43
2.2.5.2 DCF-Assay 44
2.2.6 Statistische Auswertung 45

**3. Ergebnisse 46**
3.1 Überblick 46
3.2 Zytotoxizität 46
3.2.1 Zytotoxizität der Substanzen in verschiedenen Zelllinien 46
3.2.1.1 Vergleich der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien 48
3.3 Form des Zelltodes: Apoptose versus Nekrose 49
3.3.1 Caspase 3 und 7-Aktivierung durch die Substanzen 49
3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Caspase 3 und 7-Aktivierung durch Wighteon und Isowighteon 51
3.3.3 LDH-Assay 53
3.3.3.1 Bestimmung der optimalen Zellkonzentration 53
3.3.3.2 Einfluss der Substanzen auf die LDH-Aktivität 54
3.3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der LDH-Aktivität durch Wighteon und Isowighteon 56
3.3.4 Proapoptotische Wirkung der Substanzen im Life-Dead-Assay 58
3.4 Modulation des intrazellulären MAPK-Kaskade 61
3.4.1 Western Blot 62
3.4.1.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung 62
3.4.1.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung 64
3.4.1.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung 66
3.4.1.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung 67
3.5 Antioxidatives Potential 68
3.5.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im TEAC-Assay 68
3.5.2 DCF-Assay 71
3.5.2.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im DCF-Assay 71
3.5.2.2 *Quenching-Effekt* der Substanzen 72

**4. Diskussion** 76
4.1 Zytotoxizität der untersuchten Polyphenole 76
4.1.1 Zytotoxizität der untersuchten Flavane 77
4.1.2 Zytotoxizität der untersuchten Isoflavane 78
4.1.3 Zytotoxizität der untersuchten Cumarinderivate 78
4.1.4 Vergleich der Sensitivität der Zellen 78
4.1.5 Struktur-Zytotoxizitätsbeziehungen der Flavonoide 79
4.2 Induktion von Apoptose versus Nekrose 80
4.2.1 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch die Substanzen 80
4.2.2 Untersuchungen zur Induktion der Nekrose durch die Substanzen 82
4.3 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade 84
4.3.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung 85
4.3.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung 87
4.3.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung 88
4.3.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung 89
4.4 Antioxidatives Potential 90
4.4.1 Antioxidatives Potential im TEAC-Assay 91
4.4.2 Antioxidatives Potential im DCF-Assay 93
4.4.3 Erwägungen zum *quenching-Effekt* 93
4.5 Abschließende Betrachtungen und Ausblick 94

**5. Zusammenfassung** 97

**6. Rohdaten** 98
6.1 MTT-Assay 98
6.1.1 Zytotoxizität in H4IIE-Zellen (Mittelwerte) 98
6.1.2 Zytotoxizität in Hct 116-Zellen (Mittelwerte) 100
6.1.3 Zytotoxizität in C6-Zellen (Mittelwerte) 102
6.2 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay 105
6.2.1 Caspase 3 und 7-Aktivierung durch die Substanzen (Screening) 105
6.2.2 Caspase 3 und 7-Aktivierung durch die Substanzen 105 (Konzentrationsabhängigkeit) 105
6.3 LDH-Assay (Cytotoxicity Detection Kit) 105
6.3.1 Bestimmung der optimalen Zellkonzentration 105
6.3.2 Einfluss der Substanzen auf die LDH-Aktivität (Screening) 105
6.3.3 Einfluss von Wighteon/Isowighteon auf die LDH-Aktivität (Konzentrationsabhängigkeit) 106
6.3.4 Konzentrationsabhängigkeit (zugehörige MTT-Assays) 106
6.4 Life-Dead-Assay 107
6.4.1 Proapoptotische Wirkung der Substanzen im Life-Dead-Assay 107
6.5 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade 108
6.5.1 Western Blot 108
6.5.1.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung 108
6.5.1.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung 108
6.5.1.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung 109
6.5.1.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung 110
6.6 Antioxidatives Potential 110
6.6.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im TEAC-Assay 110

6.6.2 DCF-Assay 111
6.6.2.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im DCF-Assay 111
6.6.2.2 DCF – Fluoreszenzspektren (*quenching-Effekt*) 111

**7. Literaturverzeichnis** 115

**8. Veröffentlichungen** 126

**9. Danksagung** 127

**10. Lebenslauf** 128

**11. Eidesstattliche Erklärung** 129

# Abkürzungen

| | |
|---|---|
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| ABTS | 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure |
| Agarose NEEO | Agarose mit niedriger Elektroendosmose |
| al. | andere |
| AP-1 | *activator protein 1* |
| Apaf-1 | *apoptotic protease activating factor-1* |
| APC | *adenomatous polyposis coli protein* |
| APP | *amyloid precursor protein* |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATF-2 | *activating transcription factor 2* |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BACE-1 | *ß-site of APP cleaving enzyme* |
| Bax | Bcl-2–associated X protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BMK | *big mitogen-activated kinase* |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | zenti- |
| C | Celsius |
| ca. | circa |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CARD | *caspase activation and recruitment domain* |
| Caspase | *cysteinyl-asparate specific protease* |
| Cdc42 | *cell division control protein 42* |
| DCC | *deleted in colon cancer protein* |
| DCF | 2',7'-Dichlorofluorescein |
| DED | *death effector domain* |
| d.h. | das heißt |
| DISC | *death inducing signaling complex* |
| DMEM | *Dulbecco's modified Eagle's medium* |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPHC | 3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on |
| $EC_{50}$ | effektive Konzentration (50 %) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | *epidermal growth factor* |
| EGFR | *epidermal growth factor receptor* |
| Elk-1 | *Ets like gene 1* |
| Em. | Emission |
| ERK | *extracellular signal-regulated kinase* |
| etc. | et cetera |
| Exz. | Exzitation |
| FADD | *fas-associated protein with death domain* |
| Fas | *fas-associated death domain protein* |
| FasL | *fas-associated death domain protein ligand* |
| FCS | fetales Kälberserum |
| g | Gramm |

| | |
|---|---|
| GDP | Guanosindiphosphat |
| ggf. | gegebenenfalls |
| Grb2 | *growth factor receptor-bound protein 2* |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HNPCC | *human not polyposis colon carcinoma* |
| HRP | *horseradish peroxidase* |
| $IC_{50}$ | inhibitorische Konzentration (50 %) |
| i.d.R. | in der Regel |
| INT | Intensität |
| IUPAC | *International Union of Pure and Applied Chemistry* |
| JNK | *c-Jun N-terminal kinase* |
| kDa | kilo-Dalton |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| L | Liter |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LLC | *Lewis lung carcinoma* |
| LSD | *least significant difference* |
| m | milli-, Meter |
| M | Morbus, mol/L |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MAPKK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase |
| MAPKKK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase |
| max | maximal |
| MEK | *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase* |
| min | Minute |
| MKK | *mitogen-activated protein kinase kinase* |
| MLK | *mixed-lineage kinase* |
| MRSA | Methicillin resistenter *staphylococcus aureus* |
| MSSA | Methicillin sensitiver *staphylococcus aureus* |
| MTPT | *mitochondrial permeability transition pore* |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| n | Anzahl der Versuche, nano- |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NFκB | *nuclear factor-kappa B* |
| p | Signifikanzwert |
| p38 | *stress-activated kinase of 38 kDa* |
| p53 | *tumor protein 53* |
| PAK | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PBS | *phosphate buffered saline* |
| pH | pondus hydrogenii, pH-Wert |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Rac | *ras-related C3 botulinum toxin substrate* |
| Raf | *rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma protein* |
| Ras | *rat sarcoma protein* |
| RFU | relative Fluoreszenzeinheiten |
| RIPA | *radioimmunoprecipitation assay* |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | *reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | *rotations per minute* |

| | |
|---|---|
| s | Sekunde |
| SAPK | *stress-activated protein kinase* |
| SDS-PAGE | *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* |
| SEM | *standard error of the mean* |
| Serin | Serin |
| SH2 | *src homology 2* |
| SOS | *son of sevenless* |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| TBST | *tris-buffered saline Tween-20* |
| TEAC | *TROLOX equivalent antioxidative capacity* |
| TEMED | Tetramethylendiamin |
| Thr | Threonin |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TRAIL | *TNF-related apoptosis inducing ligand* |
| TROLOX | 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxyl-Säure |
| Tyr | Tyrosin |
| µ | mikro- |
| U | Unit |
| u.a. | unter anderem |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| v.a. | vor allem |
| WHO | *World Health Organization* |
| z.B. | zum Beispiel |

*nicht aufgeführte Abkürzungen*: technische Geräte, Firmen, Zelllinien, geographische Angaben, chemische Elemente

# 1. Einleitung

## 1.1 Krebs – Allgemeines, Epidemiologie

Nach Zahlen (2006) des Robert-Koch-Institutes handelt es sich bei der Erkrankung „Krebs“ nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen um die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Danach wurde 2006 bei ca. 426.800 Menschen in Deutschland Krebs diagnostiziert, ca. 210.930 Menschen verstarben im gleichen Jahr daran. Das Lebenszeitrisiko, an Krebs zu erkranken, beträgt für Frauen 38 %, für Männer 47 %. Die WHO berichtet von etwa 7,4 Mio. Krebstoten im Jahr 2004 weltweit, bis zum Jahr 2030 wird ein Anstieg dieser Zahl auf ca. 12 Mio. Menschen vermutet.

Es ist also von außerordentlicher Bedeutung, diese Krankheit genau zu erforschen, um den betroffenen Menschen eine wirkungsvolle Therapie zukommen lassen zu können. Chirurgische Resektion, medikamentöse Therapie, Radiotherapie, sowie die palliative Therapie sind dabei die im Wesentlichen klinisch verfolgten Behandlungsstrategien.

Bezüglich der medikamentösen Therapien unterscheidet man die zytostatische (Chemotherapie), die Hormon- und die Antikörpertherapie, die mit z.T. guten Behandlungserfolgen eingesetzt werden. Allerdings können Tumorzellen Resistenzmechanismen entwickeln (*Han et al., 2004*), die den Einsatz vieler krebswirksamer Medikamente erschweren. Aufgrund dessen ist es entscheidend, weiterhin neue Wirkstoffe im Kampf gegen maligne Tumoren zu isolieren und zu erforschen.

In dieser Arbeit wurden potentiell antitumoral wirksame Substanzen (Abschnitt **1.3.3**) aus der asiatischen Heilpflanze *Psoralea corylifolia* (Abschnitt **1.2**) untersucht, um mögliche neue Ansatzpunkte für Medikamente in der Krebstherapie zu finden.

## 1.2 *Psoralea corylifolia*

*Psoralea corylifolia* gehört zur Familie der Leguminosen (Hülsenfrüchtler) (*Warrier et al., 1993*). Sie ist unter zahlreichen Synonymen bekannt, die sprachlich-regional bedingt sind, u.a. ‚Bavachi‘ (*beng.*), ‚Babachi‘/‚Babchi‘ (*hind.*) oder ‚Waghchi‘ (*pers.*). Sie ist in Indien (v.a. Zentral- und Ostindien), China aber auch in Nordamerika beheimatet (*Gupta, 2005*). Es handelt sich um eine krautartige, aufrecht wachsende Einjahrespflanze, die eine Höhe von bis zu 120 cm erreichen kann (*Warrier et al., 1993*). Sie wächst bevorzugt frei in sonniger Umgebung und wird aufgrund ihrer Verwendung als medizinische Heilpflanze auch kultiviert und gezüchtet.

Seit vielen Generationen werden v.a. die Samen und die einsamigen Früchte von *Psoralea corylifolia* in der ayurvedischen und traditionellen chinesischen, sowie der Laienmedizin angewandt. Haupteinsatzgebiete sind Hauterkrankungen wie Psoriasis, Leukodermie und früher sogar Lepra, außerdem wird *Psoralea corylifolia* als Aphrodisiakum, Laxans, oder Diuretikum verwendet (*Dhur, 2006*). Im Internet finden sich zahlreiche Verkaufsangebote, meist werden die Extrakte oder die getrockneten Samen der Pflanze kommerziell vertrieben.

Aufgrund der breiten Anwendung und beschriebenen Wirkungen der Extrakte sind ab etwa der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts einige der biologisch aktiven Bestandteile isoliert und näher untersucht worden. So sind mittlerweile mannigfaltige Wirkungen der unterschiedlichsten Verbindungen *in vitro* nachgewiesen worden. Insbesondere antibakterielle (u.a. *Khatune et al., 2004*), östrogene (u.a. *Zhang et al., 2005*), antidepressive (u.a. *Chen et al., 2007*), zytotoxische (u.a. *Mar et al., 2001*) und Osteoblasten-stimulierende Effekte (u.a. *Xiong et al., 2003*) scheinen eine Rolle zu spielen. Zu anderen Eigenschaften der chemischen Bestandteile von *Psoralea corylifolia* wie der antipsoriatischen (u.a. *Ali et al., 2008*), hepatotoxischen (u.a. *Teschke et al., 2009*) und NFκB-inhibierenden (*Pae et al., 2001*) Wirkung existieren lediglich wenige wissenschaftliche Referenzen.

Als biologisch wirksame Substanzen wurden meist phenolische und polyphenolische Bestandteile (z.B. Flavonoide, Isoflavonoide, Cumarinderivate, prenylierte Verbindungen) identifiziert, es werden jedoch regelmäßig neue Verbindungen aus *Psoralea corylifolia* beschrieben (wie das Cumarinderivat „DPHC“ in der vorliegenden Arbeit, Abschnitt **1.3.3.2**).

## 1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe

Bei den sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von bis heute etwa 200 000 bekannten chemischen Verbindungen, die für den Primärstoffwechsel, der für Wachstum und Entwicklung der Pflanze unverzichtbar ist, keine Bedeutung haben (Übersichtsarbeit: *Hartmann, 2007*). Sie werden vielmehr im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildet. Dieser hat aufgrund seiner hohen Plastizität die wichtige Eigenschaft, den Gesamtstoffwechsel der Pflanze an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen. Aufgrund dessen ist der Sekundärstoffwechsel für das Überleben der Pflanze in ihrer Umgebung unerlässlich (Übersichtsarbeit: *Hartmann,*

*2007*). Wichtige Vertreter der sekundären Pflanzenstoffe sind u.a. Lignane, Polyphenole und Cumarine, die alle wiederum in weitere Subgruppen unterteilt werden können.

In dieser Arbeit wurden elf verschiedene phenolische und polyphenolische Verbindungen aus *Psoralea corylifolia* untersucht (Abschnitt **1.3.3**), die sich durch das Vorkommen eines phenolischen Ringes bzw. mehrerer Hydroxylgruppen an einem aromatischen Grundgerüst auszeichnen.

### 1.3.1 Flavonoide

Flavonoide (lat.: *flavus* = gelb) sind eine ca. 6500 Verbindungen umfassende Stoffgruppe, welche zu den sekundären Pflanzenstoffen gehört (*Harborne et al., 2000*). Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts davon ausgegangen wurde, dass Flavonoide Abfallprodukte der Pflanze sind, sind heute vielfältige physiologische Wirkungen bekannt. Sie dienen der Pflanze z.B. zur Färbung der Blüten, als Lockstoff zur Bestäubung, als UV-Filter, als Fraßgift und wirken zusätzlich antimikrobiell (*Iwashina, 2003*). Im Pflanzenreich sind Flavonoide daher ubiquitär verbreitet.

Chemisch bestehen Flavonoide aus einem Skelett aus 15 Kohlenstoffatomen: Zwei aromatische Ringe (**A** und **B**) sind über einen ein Sauerstoffatom enthaltenden Heterozyklus (**C**) miteinander verbunden. Den Flavonoiden liegen nach der *IUPAC*-Nomenklatur drei verschiedene Grundgerüste zugrunde: Das Flavan-, Isoflavan- und Neoflavangerüst (**Abb. 1.3.1.1**) (Übersichtsarbeit: *Teuscher, 1997*). Der Heterozyklus kann an verschiedenen Stellen modifiziert vorliegen, so dass verschiedene Subklassen wie Flavonole, Flavanone, Chalcone, Flavane etc. entstehen. Häufig sind Flavonoide an Zuckerreste gebunden (Glykoside), was ihre Wasserlöslichkeit erhöht. Daneben können andere funktionelle Gruppen wie z.B. Methyl-, Acetyl- oder Isoprenylgruppen vorkommen.

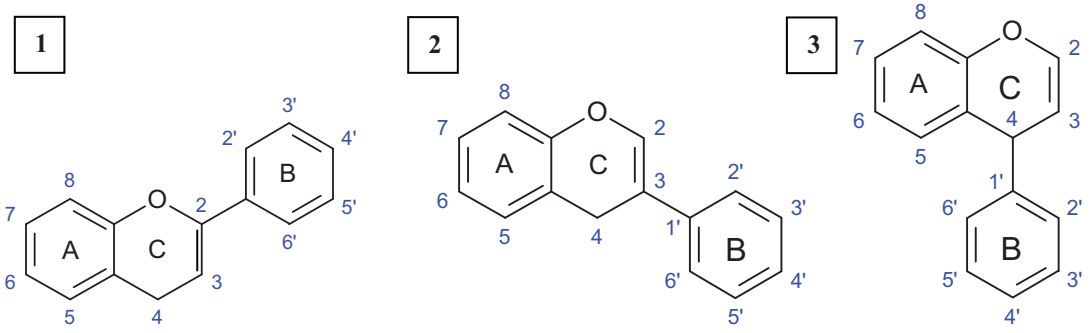



**Abb. 1.3.1.1**: Flavan (**1**), Isoflavan (**2**), Neoflavan (**3**)

In der vorliegenden Arbeit wurden neben zwei Cumarinderivaten (Abschnitt **1.3.3.2**) neun verschiedene Flavonoide untersucht, insgesamt sechs Verbindungen aus der Gruppe der Flavane und drei Verbindungen aus der Gruppe der Isoflavane (Abschnitt **1.3.3.1**).

### 1.3.1.1 Medizinische Effekte von Flavonoiden

In den vergangenen Jahrzehnten sind viele pharmakologische Wirkmechanismen der Flavonoide aufgeklärt worden, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass die Menschen über die Nahrung und verstärkt über flavonoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel zum Teil erhebliche Mengen an Flavonoiden konsumieren (*Scalbert et al., 2000*).

Den Flavonoiden werden viele gesundheitsförderliche Aspekte zugeschrieben. So werden sie aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften als kanzeropräventive Substanzen diskutiert (*Huang et al., 2010*). Desweiteren ist ihr Einsatz in der Therapie maligner Tumoren Bestandteil wissenschaftlicher Forschung (Übersichtsartikel für Luteolin: *Lin et al., 2008*). Epidemiologische Studien haben eine inverse Korrelation zwischen Flavonoidaufnahme und dem Risiko des Auftretens verschiedener Krankheiten festgestellt. So wurden in einigen Studien protektive Wirkungen der Flavonoide z.B. für KHK und Apoplex festgestellt (*Arts et al., 2005; Graf et al., 2005*). *In vitro* zeigten unterschiedliche Flavonoide proliferationshemmende Effekte auf verschiedene Krebszelllinien (für Luteolin: *Seelinger et al., 2008*). Desweiteren konnte ein hoher Flavonoidgehalt in der Nahrung mit einer verringerten Inzidenz bestimmter Tumoren (u.a. Mamma-, Lungenkarzinom) korreliert werden (*Le Marchand et al., 2000*, *Bosetti et al., 2005*). Daneben zeigten zahlreiche Studien antiphlogistische, antibakterielle, neuro- und hepatoprotektive Wirkungen etc. der Flavonoide (u.a. *Orhan et al., 2009*).

## 1.3.2 Cumarine

Cumarine gehören, wie die Flavonoide, zu den sekundären Pflanzenstoffen. Ihr Grundgerüst besteht aus einem aromatischen Ring, der mit einem Lactonring in Verbindung steht (Übersichtsartikel: *Lake, 1999*, **Abb. 1.3.2.1**).

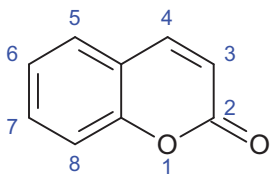



**Abb. 1.3.2.1**: Cumarin-Grundgerüst

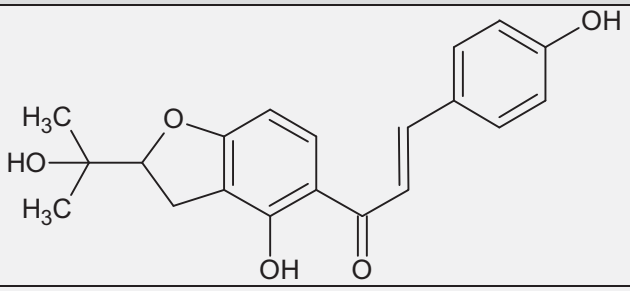
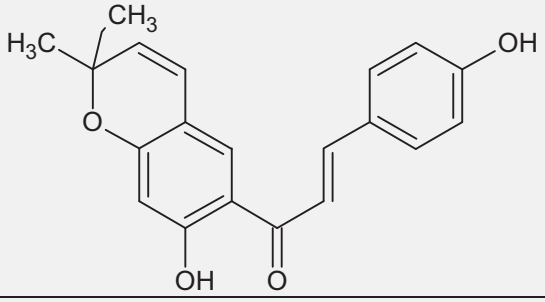
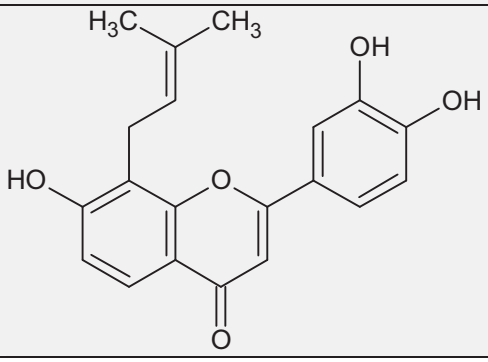
Cumarine haben aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Flavonoiden vergleichbare biologische und medizinische Eigenschaften. So sind Cumarine und ihre Derivate in Neubildung und Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) involviert, sie wirken antiinflammatorisch und antiödematös (*Fylaktakidou et al., 2004*) und weisen zytotoxische, antikanzerogene, analgetische, sowie immunmodulatorische Wirkungen auf (*Wu et al., 2009*).

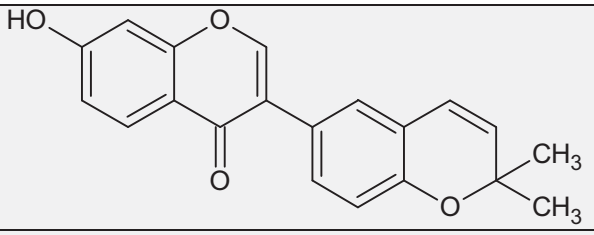
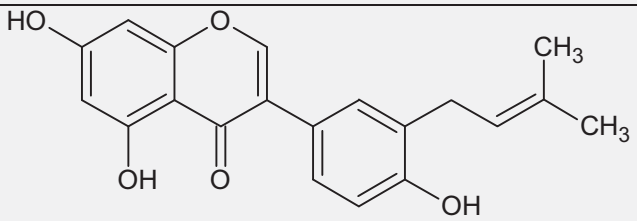
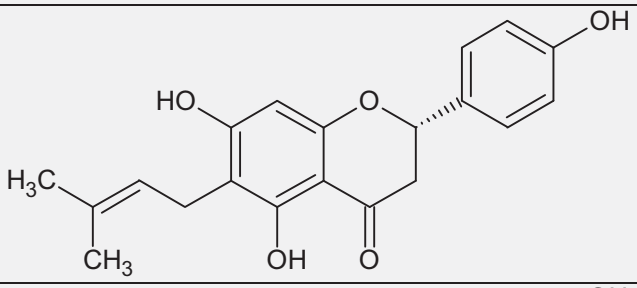
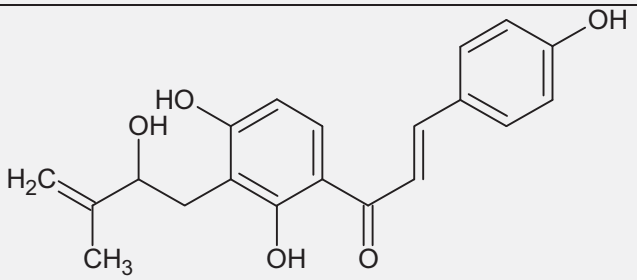
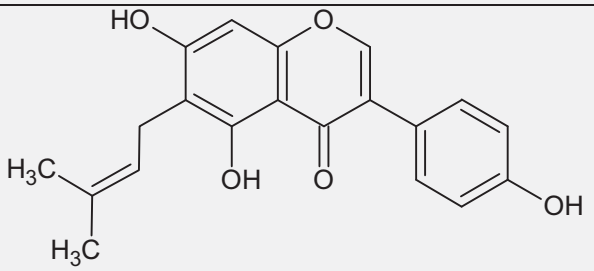
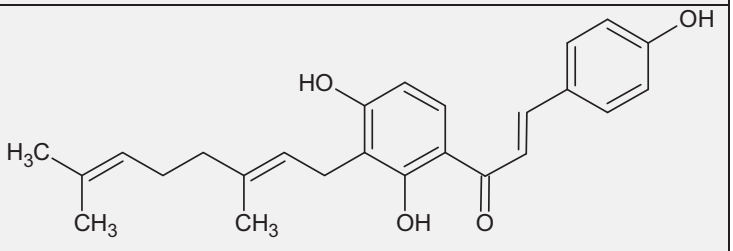
### 1.3.3 Verwendete phenolische und polyphenolische Verbindungen

#### 1.3.3.1 Flavan- und Isoflavanderivate

In der vorliegenden Dissertation wurden die in **Tab. 1.3.3.1.1** aufgeführten Flavan- und Isoflavanderivate untersucht. Sie leiten sich vom Flavan- bzw. Isoflavan-Grundgerüst (**Abb. 1.3.1.1**) ab.

**Tab. 1.3.3.1.1**: Strukturformeln der untersuchten Flavan- und Isoflavanderivate aus *Psoralea corylifolia*. In Klammern findet sich zusätzlich die Subgruppe, der die jeweilige Verbindung angehört.

| **Bezeichnung** | **Strukturformel** |
|---|---|
| **Bakuchalcon (Flavanderivat, Chalkon)** |  |
| **Bavachromen (Flavanderivat, Chalkon)** |  |
| **Corylifol C (Flavanderivat, Flavon)** |  |

| | |
|---|---|
| **Corylin (Isoflavanderivat, Isoflavon)** |  |
| **Isowighteon (Isoflavanderivat, Isoflavon)** |  |
| **6-Prenylnaringenin (Flavanderivat, Flavanon)** |  |
| **Psorachalcon A (Flavanderivat, Chalkon)** |  |
| **Wighteon (Isoflavanderivat, Isoflavon)** |  |
| **Xanthoangelol (Flavanderivat, Chalkon)** |  |

Über die biologischen Eigenschaften der meisten vorliegenden Flavan- und Isoflavanderivate ist bisher nur wenig bekannt, so dass viele dieser Substanzen im Rahmen dieser Dissertation erstmals näher untersucht wurden.

**Bakuchalcon**

Bakuchalcon wurde erstmals 1982 in *Psoralea corylifolia* (*Gupta et al., 1982*) und später auch in *Maclura tinctoria* (*ElSohly et al., 2001*) nachgewiesen.

**Bavachromen**

Bavachromen wurde u.a. 2005 in *Psoralea corylifolia* nachgewiesen (*Zhao et al., 2005*). Bavachromen inhibiert *in vitro* BACE-1, das selektiv das APP (Amyloid-Präkursor-Protein) spaltet, was zur Bildung von Amyloid-β führt, das in der Pathogenese des M. Alzheimer eine wichtige Rolle spielt (*Choi et al., 2008*).

**Corylifol C**

Corylifol C wurde erstmals 2004, gemeinsam mit Corylifol A und B aus *Psoralea corylifolia* isoliert (*Yin et al., 2004*). In der gleichen Arbeit konnte für Corylifol C, anders als für Corylifol B, keine potente antibakterielle Aktivität gegen *staph. aureus* und *staph. epidermidis* gezeigt werden.

**Corylin**

Corylin wurde 1974 in *Psoralea corylifolia* erstbeschrieben (*Jain et al., 1974*). Es ist an der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beteiligt (*Wang et al., 2001; Xiong et al., 2003)*. Zudem wurde Corylin in *Erythrina sigmoidea* nachgewiesen (*Nkengfack et al., 1994*).

**Isowighteon**

Die Erstbeschreibung von Isowighteon erfolgte 1992 (*Gagnon et al., 1992*). Man fand die Substanz in der Wurzel von *Lupinus albus L.*. Isowighteon zeigte gegenüber MRSA und MSSA antibakterielle Effekte (*Hatano et al., 2000*).

**6-Prenylnaringenin**

6-Prenylnaringenin wurde u.a. 1999, gemeinsam mit seinem Strukturisomer 8-Prenylnaringenin, im Hopfen (*Humulus lupulus L.*) nachgewiesen (*Milligan et al., 1999*). Mehrfach wurde eine, wenn auch schwache, östrogene Aktivität (< 1 % der östrogenen Aktivität von 8-Prenylnaringenin) beschrieben (u.a. *Milligan et al., 1999*). *Delmulle et al.* (*2006, 2008*) zeigten, das 6-Prenylnaringenin wachstumsinhibierend und

zytotoxisch auf PC-3- und DU145-Prostatakarzinom-Zelllinien wirkt. Der Zelltod wird dabei Caspase 3-unabhängig, vermutlich durch Autophagie, ausgelöst.

**Psorachalcon A**

Psorachalcon A wurde 2005 erstmals aus dem Samen von *Psoralea corylifolia* isoliert (*Yu et al., 2005*).

**Wighteon**

Die Verbindung ist in einer Vielzahl von Leguminosen, v.a. in zahlreichen *Erythrina*-Spezies (u.a. *El Masry et al., 2002*) nachgewiesen worden.

Bezüglich der Zytotoxizität von Wighteon lassen sich widersprüchliche Angaben finden: *Wang et al., (2005)* konnten kaum zytotoxische Effekte von Wighteon in Hct 116-, SMMC-7721-, SGC-7901-, BGC-823-Zellen ($IC_{50}$: 8,6 µg/mL bis > 30 µg/mL) finden. Gleiches gilt für *Innok et al., 2009* (BC-, NCI-H187 und **KB-Zellen** $IC_{50}$ > 20 µg/mL). Allerdings zeigten *Nkengfack et al., 2001* eine starke Zytotoxozität von Wighteon gegenüber **KB-Zellen** ($EC_{50}$ = 0,78 µg/mL).

Außerdem besitzt Wighteon ein ausgeprägtes antimykotisches (gegen *saccharomyces cerevisiae, candida albicans, cryptococcus neoformans, aspergillus fumigatus, aspergillus nidulans*, *Fukai et al., 2003; Wang et al., 2005*) und antibakterielles (gegen *e.coli, bacillus subtilis, staph. aureus, candida mycoderma*, *Juma et al., 2006*) Potential, sowie schwach antioxidative (*Juma et al., 2006*) und hepatoprotektive Effekte (*Lin et al., 1996*).

**Xanthoangelol**

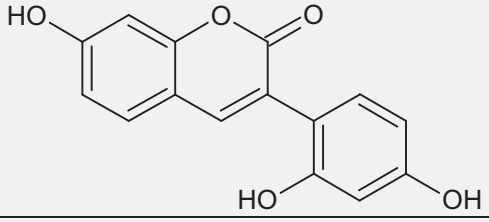
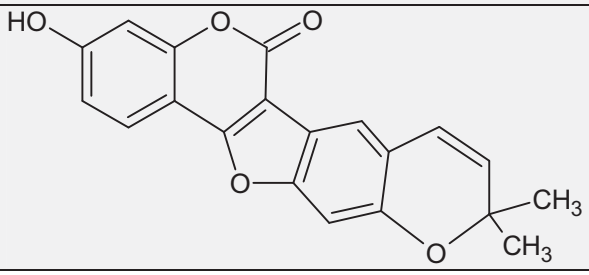
Über das Flavanderivat Xanthoangelol sind deutlich mehr Details bekannt. Es wurde 1977 im Morgenblatt (*Angelica keiskei Koidzumi*) erstmals nachgewiesen (*Kozawa et al., 1977*) und wirkt zytotoxisch auf LA-N-1-, NB-39-, SK-N-SH-, Jurkat- und IMR-32-Tumorzellen (*Tabata et al., 2005; Motani et al., 2008*). Dabei erfolgt der Zelltod in IMR-32- und Jurkat-Zellen durch Induktion Caspase-3-abhängiger Apoptose, ohne Beeinflussung der Bax/Bcl-2-Signaltransduktion (*Tabata et al., 2005*). Xanthoangelol generiert in der Zelle reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und führt über die Freisetzung von Cytochrom c zur Aktivierung der Caspase 9 und anschließend zur Apoptose. Als Targetprotein der erzeugten ROS wird DJ-1 postuliert (*Motani et al., 2008*).

In LLC (*Lewis lung carcinoma*) tragenden Mäusen konnte Xanthoangelol antitumorale und antimetastatische Wirkungen ausüben. So etwa wurden sowohl Tumorwachstum, als auch Lungen- und Lebermetastasierung in der entsprechenden Versuchsanordnung inhibiert und das Gesamtüberleben der Tiere verlängert (*Kimura et al., 2003*).
Zudem sind zahlreiche andere Eigenschaften bekannt: So wirkt Xanthoangelol u.a. antidiabetisch (*Enoki et al., 2007*), vasodilatativ (*Matsuura et al., 2000*), antibakteriell (*Inamori et al., 1991*), es senkt LDL, Triglyzeride und das Gesamtcholesterin im Rattenversuch (*Ogawa et al., 2007*) und inhibiert dosisabhängig die gastrale $H^+/K^+$-ATPase (*Murakami et al., 1991*).

### 1.3.3.2 Cumarinderivate

In der vorliegenden Dissertation wurden die in **Tab. 1.3.3.2.1** aufgeführten Cumarinderivate untersucht. Sie leiten sich vom Cumarin-Grundgerüst (Abschnitt **1.3.2**) ab.

**Tab. 1.3.3.2.1**: Strukturformeln der untersuchten Cumarinderivate aus *Psoralea corylifolia*.

| Bezeichnung | Strukturformel |
|---|---|
| **3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on (= DPHC)** |  |
| **Sophoracoumestan A** |  |

**3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on (= DPHC)**

Diese Substanz wurde von Herrn Dr. rer. nat. Yao Wang (Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düssseldorf, Prof. Dr. Peter Proksch) erstmals isoliert und für die vorliegende Arbeit zur näheren Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

**Sophoracoumestan A**

Die Erstbeschreibung des Cumarins Sophoracoumestan A erfolgte 1981 (Isolation aus der Wurzel von *Sophora franchetiana DUNN, Komatsu et al., 1981*). Auch in einigen anderen Pflanzen, u.a. *Psoralea corylifolia* (*Gupta et al., 1990*) fand man die Substanz. Über die Eigenschaften von Sophoracoumestan A ist hingegen bisher nichts bekannt.

## 1.4 Karzinogenese

Nach Beobachtungen in Tierversuchen ging man lange Zeit von einem *Drei-Stufen-Modell* der Karzinogenese mit den Phasen Initiation, Promotion und Progression aus (*Boutwell, 1964*), wobei vom initialen DNA-Schaden bis zur Entstehung des bösartigen Tumors eine Latenzzeit von einigen Jahren bis Jahrzehnten vergehen kann. Da dieses Modell aber viele Aspekte der Tumorentstehung nur unzureichend zu erklären vermag, ist es heute weitgehend vom *Mehrstufen-Modell* abgelöst worden. Dabei wird die Hypothese propagiert, der Tumor entwickle sich aus einer Vielzahl akkumulierender Gendefekte, die zunächst nur molekularbiologisch und erst später histopathologisch bzw. makroskopisch nachweisbar seien. So kommt es beispielsweise beim kolorektalen Karzinom zu Verlusten bzw. Mutationen u.a. des APC-, DCC-, k-ras und p53-Gens (*Fearon et al., 1990*). Diese Veränderungen haben schwerwiegende Folgen: Während eine gesunde Zelle ständig in der Lage ist, auf exo- oder endogene Stimuli adäquat zu reagieren, sind in der mutierten Zelle intrazelluläre Signalwege (Abschnitt **1.6**) gestört oder konstitutiv aktiv, lebenswichtige Funktionen der Zelle, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, oder Apoptose (Abschnitt **1.5**), liegen dysreguliert vor. Mögliche Folge kann die maligne Transformation der Zelle mit anschließender Entwicklung von Tumorgewebe sein.

Das Verständnis der genauen Mechanismen von Zytotoxizität, Apoptose und intrazellulärer Signaltransduktion in Zellen ist daher entscheidend, um Abweichungen von der Norm erkennnen zu können. Substanzen, die imstande sind, eine gestörte Signalübertragung in der Zelle zu modulieren, oder etwa die Apoptose der Tumorzelle zu induzieren, können daher prinzipiell als neue pharmazeutische Wirkstoffe in der Therapie bösartiger Tumoren zur Anwendung kommen.

## 1.5 Apoptose und Nekrose

Man unterscheidet prinzipiell zwei Formen des Zelluntergangs, die Apoptose und die Nekrose.

### 1.5.1 Apoptose

Bei der Apoptose (griech.: *apo* = weg, *ptosis* = Fall, wie das Abfallen der Blätter eines Baumes) handelt es sich um einen ATP-abhängigen, von der Zelle organisierten Zelltod, der Bestandteil des Stoffwechsels der Zelle ist und, im Gegensatz zur Nekrose, ohne Entzündungsreaktion des Nachbargewebes abläuft (Abschnitt **1.5.2**). Der Begriff der „Apoptose" wurde von *Kerr et al., 1972* in die wissenschaftliche Literatur eingeführt, wohingegen das Synonym des „programmierten Zelltodes" bereits zuvor erstmals verwendet wurde (*Lockshin et al., 1964*). *Kerr et al.* beschrieben *1972* die morphologischen Veränderungen, die die Zelle im Rahmen der Apoptose durchmacht (**Abb. 1.5.1.1**). Zunächst kommt es zur nukleären und zytoplasmatischen Kondensation und zur Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen durch spezifische Endonukleasen (Fragmentierung). Das folgende charakteristische „*membrane budding*" beschreibt die Ausbildung kleiner Ausstülpungen an der sonst intakten Zellmembran mit anschließender Verpackung der Zellbestandteile in membranbegrenzte, *apoptotische Körperchen* (*Wyllie et al., 1980*). Die Zellmembran verliert so ihre ursprüngliche Asymmetrie, wobei das normalerweise auf der Zellmembraninnenseite befindliche Phosphatidylserin nach außen transloziert wird. Dies ermöglicht die Erkennung und anschließende Phagozytose der Vesikel durch Makrophagen (*van Cruchten et al., 2002*).

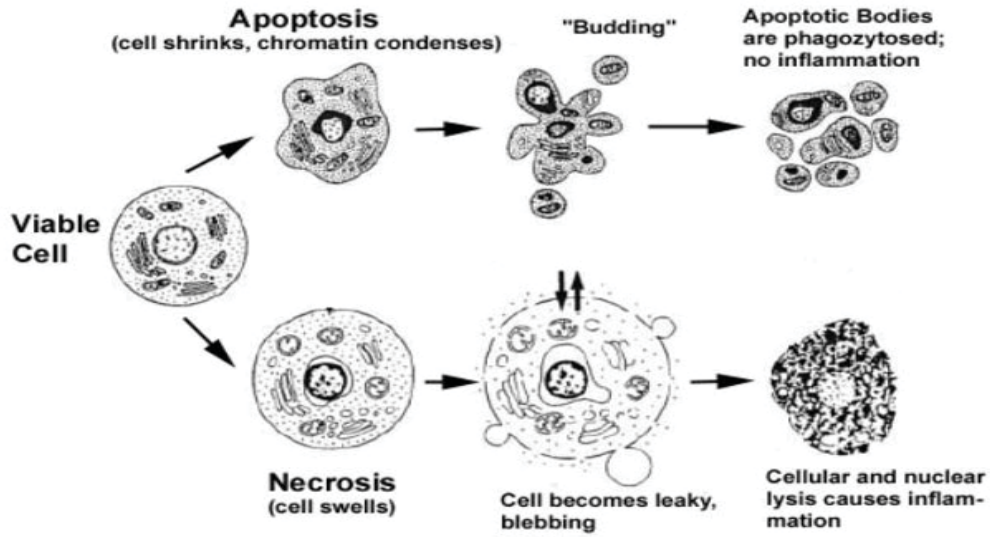



**Abb. 1.5.1.1: Morphologische Veränderungen während Apoptose und Nekrose (modifiziert nach *van Cruchten et al., 2002*).**
Bei der Apoptose kommt es zunächst zur Chromatin-Kondensation und Zellschrumpfung. Das charakteristische „*budding*" beschreibt die Ausbildung von Ausstülpungen an der sonst intakten Zellmembran mit anschließender Formation apoptotischer Körperchen, die ohne begleitende Entzündungsreaktion von benachbarten Makrophagen phagozytiert werden.
Bei der Nekrose kommt es hingegen zur pathologischen Zellschwellung. „*Blebbing*" beschreibt die Bildung von Bläschen an der Zellmembran, die platzen und zur Freisetzung zellulärer Bestandteile führen, was meist eine Entzündungsreaktion nach sich zieht.

Die Apoptose hat in der Embryogenese des menschlichen Körpers, bei Differenzierungs- und Anpassungsvorgängen einen essentiellen Stellenwert. Sie ermöglicht beispielsweise die Ausbildung der Finger- und Zehenzwischenräume, die Differenzierung des Nervensystems (*Raff et al., 1993*), der Plazenta (*Straszewski-Chavez et al., 2005*), sowie des Immunsystems (*Krammer, 2000*) und später die physiologische Involution des Thymus (*Owen et al., 1992*).
Die Regeneration adulter Gewebe und Organe wird durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation bzw. Mitose und Apoptose gesteuert. Bei zahlreichen Tumoren verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten der Proliferation, aber auch andere, z.B. neurodegenerative und Autoimmunerkrankungen sind mit Störungen der Apoptoserate verbunden (*Reed, 2002*).

#### 1.5.1.1 Caspasen

Die Apoptose ist, im Gegensatz zur Nekrose, stringent reguliert. In deren Verlauf kommt es, ähnlich wie bei vielen anderen Signalwegen im menschlichen Körper (z.B. Aktivierung von Komplement oder Gerinnungsfaktoren), zu einer kaskadenartigen proteolytischen Spaltung von Zymogenen zum aktivierten Enzym.
Die an der Apoptose beteiligten Enzyme, eine Gruppe von Cysteinproteasen, werden als *Caspasen* (*cysteine aspartate specific proteases*) bezeichnet und spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartatresten. Insgesamt sind in Säugetieren 14 verschiedene Caspasen bekannt (*Jin et al., 2005*), die konstitutiv in allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Die entscheidende Funktion der Caspasen liegt in der Degradation zellulärer Proteine und in der Aktivierung der inaktiv im Zytosol vorliegenden Procaspasen (*Thornberry et al., 1998*). Dabei werden von der jeweiligen Procaspase zwei unterschiedlich große Untereinheiten (ca. 10 kDa und ca. 20 kDa) abgespalten, die nach einem Umlagerungsprozess zur Aktivierung der Caspase führen (*Degterev et al., 2003*).
Man differenziert zwei unterschiedliche Gruppen an Caspasen voneinander, Initiator- und Effektorcaspasen. Als *Initiatorcaspasen* werden z.B. die Caspasen 2, 8, 9 und 10 bezeichnet. Sie besitzen eine lange Prodomäne, die bei der Caspase 8 und 10 eine DED- (*death effector domain*) und bei der Caspase 2 und 9 eine CARD-Domäne (*caspase activation and recruitment domain*) enthält. DED- und CARD-Domäne sind an der Regulation der Aktivierung der Caspasen beteiligt sind (*Martinon et al., 2004*). Die Initiatorcaspasen besitzen die Fähigkeit, Effektorcaspasen direkt zu aktivieren und das

Apoptosesignal zu amplifizieren (*Degterev et al.,* 2003; *Jin et al., 2005*). Zu den *Effektorcaspasen* gehören z.B. die Caspase 3, 6 und 7, sie enthalten eine kurze Prodomäne. Effektorcaspasen werden i. d. R. durch Initiatorcaspasen proteolytisch aktiviert und vermitteln den eigentlichen Zelltod, indem sie an der Degradation der DNA und zellulärer Strukturproteine beteiligt sind, DNA-Reparaturenzyme inaktivieren und zur Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran beitragen (*Henson et al., 2001*; *Fadok et al., 2001*).

Die Apoptose kann auf zwei unterschiedlichen Wegen ausgelöst werden, dem Todesrezeptor vermittelten *extrinsischen* Signalweg, sowie dem mitochondrial vermittelten *intrinsischen* Signalweg.

#### 1.5.1.2 Extrinsischer und intrinsischer Signalweg

Der *extrinsische* Signalweg der Apoptose wird durch Bindung spezifischer sog. Todesliganden (z.B. FasL, TNF-α oder TRAIL) (*Ashkenazi et al., 1998*) an ihre komplementären Todesrezeptoren (z.B. Fas-, TNF-α-, TRAIL-Rezeptor) initiiert. Nach Andocken des Liganden kommt es zur Konformationsänderung und Trimerisierung des Rezeptors, wodurch bestimmte Adapterproteine, z.B. FADD (*Fas-associated protein with death domain*) an zytoplasmatische Anteile des Rezeptors binden können. FADD bildet nun eine Brücke zwischen Todesrezeptor-Komplex (bestehend aus Ligand und Rezeptor) und der Procaspase 8 und 10, alle diese Anteile zusammen werden als DISC (*death inducing signalling complex*) bezeichnet (*Kischkel et al., 1995*). Nachfolgend kommt es zur Demaskierung einer N-terminalen Effektordomäne des Enzyms, was die autoproteolytische Aktivierung der Procaspase 8 und 10 zur Caspase 8 und 10 erlaubt und somit die Caspase-Kaskade bis hin zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 und 7 in Gang setzt (= gemeinsame Endstrecke des *extrinsischen* und *intrinsischem* Weges).

Zwischen *extrinsischem* und *intrinsischem* Signalweg besteht u.a. über das Protein *Bid* eine Querverbindung (*Rust et al., 2000*). Demnach kann die Caspase 8 und 10 neben der direkten Aktivierung der Effektor-Caspase 3 und 7 eine Freisetzung des Cytochrom c aus den Mitochondrien und damit die Induktion des *intrinsischen* Weges der Apoptose verursachen.

Zentrale Schaltstelle des *intrinsischen* Signalwegs der Apoptose sind die Mitochondrien der Zelle. Die Besonderheit der Aktivierung dieses Weges besteht darin, dass sowohl exo-, als auch endogene Stimuli als Auslöser dienen können. Zu diesen Noxen zählen

u.a. Zytostatika, UV-Strahlung, das Fehlen von Wachstumsfaktoren oder reaktive Sauerstoffspezies (z.B. *Foo et al., 2005*).

Diese verursachen eine Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmenbran, indem es zur Bildung von Poren kommt, die als MTPT (*mitochondrial permeability transition pore*) bezeichnet werden (*Hunter & Haworth et al., 1979*). Dies führt zur Ausschwemmung verschiedener Faktoren, u.a. des Cytochrom c, eines wichtigen Enzyms der mitochondrialen Atmungskette, das im Zytosol zusammen mit dem Protein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), dATP und der Procaspase 9 einen Komplex ausbildet (*„Apoptosom"*). Analog zum *extrinsischen* Signalweg der Apoptose erfolgt nun die autoproteolytische Prozessierung der Procaspase 9 zur aktiven Caspase 9 (*Acehan et al., 2002*).

Der letzte Schritt besteht wiederum in der Rekrutierung der Effektorcaspasen 3 und 7, die als ausführende Glieder die eigentliche Apoptose einleiten.

### 1.5.2 Nekrose

Bei der Nekrose (griech.: *necrosis* = Absterben) handelt es sich, anders als bei der Apoptose, um eine pathologische, ATP-unabhängige Form des Zelluntergangs, die meist mit einer Entzündungsreaktion einhergeht (*de Bruin et al., 2008*). Morphologisch kommt es bei der Nekrose zur unnatürlichen Zellschwellung und Vakuolisierung des Zytoplasmas. Das typische „*blebbing*" beschreibt die Ausbildung kleiner Bläschen an der Zellmembran, die platzen und zur unkontrollierten Freisetzung zellulärer Bestandteile in die Umgebung führen, was u.a. eine Entzündungsreaktion verursacht (**Abb. 1.5.1.1**) (*van Cruchten et al., 2002*).

Obwohl meist pathologische Stimuli, wie Trauma, Ischämie oder Infektion zur Nekrose führen, können auch normalerweise Apoptose spezifische Liganden wie der Fas-Ligand oder TNF-α eine Nekrose induzieren (*Vercammen et al., 1998*).

## 1.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade

Die Integration und Weiterleitung extrazellulärer Signale und Stimuli in den Zellkern wird durch eine große Anzahl intrazellulärer Proteine übernommen, die meist hintereinandergeschaltet sind, miteinander interagieren können und schließlich zu einer Reaktion der Zelle führen, z.B. in Form von veränderter Transkription und Translation (*Hunter, 2000*).

Unter diesen Signalmolekülen sind die Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (= MAPK), die sich kaskadenartig durch Phosphorylierung aktivieren, von entscheidender Bedeutung für Überleben und Untergang der Zelle. Sie wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. Grundsätzlich werden wichtige Funktionen wie Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von MAPK moduliert (*Pearson et al., 2001*).

Die MAPK werden den Serin/Threonin-Kinasen zugeordnet, d.h. sie phosphorylieren andere Proteine an ihren Serin- bzw. Threoninresten. Es existieren vier Subfamilien der MAPK, die Proteine ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), BMK1/ERK5 (*big mitogen-activated kinase*), p38 (*stress-activated kinase of 38 kDa*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), die in weitere Subklassen unterteilt werden (*MacCorkle et al., 2005*), z.B. p38-α, -β, -γ, -δ.

Aktiviert werden kann die MAPK-Kaskade (Abb. **1.6.1**) durch viele unterschiedliche Auslöser, wobei jedoch bestimmte Stimuli bevorzugt bestimmte Signalwege stimulieren. Während ERK1/2 v.a. durch Wachstumsstimuli, also mitotische Signale, aktiviert wird, werden der p38- und JNK-Signalweg gleichzeitig durch eine Vielzahl zellulärer und umweltbezogener Einflüsse getriggert. Diese beinhalteten z.B. Veränderungen der Osmolarität oder des Metabolismus, DNA-Schäden, Hitze, UV-Strahlung oder oxidativen Stress (*Wada & Penninger, 2004*).

Nach Bindung eines spezifischen Liganden (z.B. EGF = *epidermal growth factor*) an seinen Rezeptor (z.B. EGFR = *epidermal growth factor receptor*) wird zunächst die Phosphorylierung einiger Tyrosin-Seitenketten dieses Rezeptors eingeleitet, die dann als Bindungsstellen für verschiedene Adapterproteine, z.B. Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und SOS (*son of sevenless*) dienen. Während Grb2 über seine SH2-Domäne (*Src homology 2*) an den transmembranären Rezeptor binden kann, katalysiert SOS den Austausch von GDP und GTP der ensprechenden GTPase (z.B. Ras, Rac, Cdc42). Diese GTPase aktiviert anschließend eine MAPKK-Kinase (z.B. Raf, PAK 1/2, MLK3) durch Phosphorylierung, welche ihrerseits eine MAPK-Kinase (z.B. MEK 1/2, MKK 3/6, MKK 4/7) phosphoryliert. Der letzte Schritt besteht in der Aktivierung der oben angesprochenen MAP-Kinase (z.B. ERK 1/2, SAPK/JNK, p38), die dann in den Zellkern transloziert und dort Transkriptionsfaktoren (z.B. c-myc, NFκB, p53, Elk-1, ATF-2, c-Jun, AP-1) aktivieren kann, die die Transkription ihrer Zielgene (Einfluss u.a. auf: Embryogenese, Proliferation, Differenzierung, Apoptose) regulieren (*Wada & Penninger, 2004*).

Diese Vorgänge soll **Abb. 1.6.1** verdeutlichen:

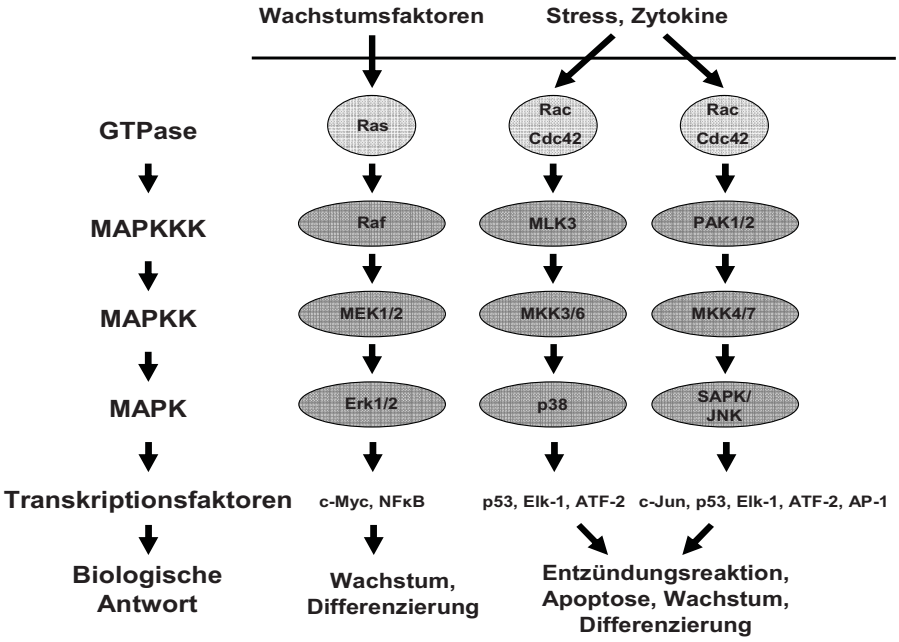



**Abb. 1.6.1: Schematische Darstellung der MAPK-Kaskade (modifiziert nach *Hannke-Lohmann, 2000*)**

Es ist hinlänglich bekannt, dass einzelne Signalwege der MAPK-Kaskade in Tumoren konstitutiv aktiv sind (*Scholl et al., 2005*). Substanzen, die diese Aktivierung zu inhibieren imstande sind, kommen daher als zukünftige antitumorale Medikamente in Betracht.

# 1.7 Oxidativer Stress in Zellen

Unter physiologischen Bedingungen herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Mechanismen. Kippt dieses Gleichgewicht zugunsten prooxidativer Mechanismen, d.h. übersteigt die Neubildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die antioxidativen Kompensationsmechanismen der Zelle, spricht man von *oxidativem Stress* (Übersichtsartikel: *Sies, 1991*). In der gesunden Zelle sorgen antioxidativ wirksame Enzyme, z.B. Superoxiddismutase und Katalase, sowie nichtenzymatische Substanzen, z.B. Ascorbinsäure und α-Tocopherol, für eine Inaktivierung der ROS.

### 1.7.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen

Zur Klasse der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählen u.a. das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet -}$), das Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$) und Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$). Der Hauptanteil endogener ROS wird im physiologischen aeroben Stoffwechsel

der mitochondrialen Atmungskette als Abfallprodukt produziert (Übersichtsartikel: *Le Bras et al., 2005*), andererseits können exogene Stimuli, wie unterschiedliche Arten an Strahlung, Scher-/Schubspannung (Übersichtsartikel: *Sies, 1997*), oder chemische Verbindungen ROS induzieren.

Eine wichtige Stellung in der ROS-Bildung nehmen auch redoxaktive freie Metallionen ein. So kommt es in der *Fenton-Reaktion* zur Umsetzung von $H_2O_2$ mit $Fe^{2+}$-Ionen zum sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal ($OH^{\bullet}$) und $Fe^{3+}$ (**1**). Durch anschließende Reduktion des entstandenen $Fe^{3+}$ durch $O_2^{\bullet -}$ in seinen Ausgangszustand ($Fe^{2+}$) steht es zur erneuten Reduktion von $H_2O_2$ zur Verfügung (**2**), was eine lawinenartige Beschleunigung der Reaktion zur Folge hat, die den intrazellulären Bestandteilen erheblichen Schaden zufügen kann. Die Kopplung dieser beiden Reaktionsschritte wird auch als *Haber-Weiss-Reaktion* bezeichnet (**3**) (Übersichtsartikel: *Valko et al., 2005*):

(**1**) $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$ (*Fenton-Reaktion*)

(**2**) $O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$

(**3**) $H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \longrightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-}$ (*Haber-Weiss-Reaktion*)

### 1.7.2 Physiologische und toxische Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen

ROS erfüllen in der Zelle eine Reihe wichtiger Funktionen und sind für deren Überleben relevant. So dienen sie der Zerstörung in den Körper eindringender Mikroorganismen, indem Makrophagen im Rahmen des „*respiratory burst*“ Superoxidradikale bilden (*Haas et al., 1992*). ROS können, ähnlich wie cAMP oder $Ca^{2+}$ als *second messenger* in Signaltransduktionswegen fungieren (*Sauer et al., 2001*) und sind daher in die Regulation entscheidender zellulärer Aufgaben involviert. Darüber hinaus sind ROS u.a. an der Thrombozytenadhäsion (*Salvemini et al., 1993*) beteiligt.

Neben diesen physiologisch unentbehrlichen Funktionen können ROS, wenn sie in Form *oxidativen Stresses* auftreten (Abschnitt **1.7**), schädliche Effekte auf Makromoleküle in der Zelle haben. Exemplarisch sind hier kurz die wesentlichen Punkte dargestellt:

An der DNA kann es zu Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenmodifikationen und Bildung von Addukten (DNA-DNA-Addukt, DNA-Protein-Addukt) kommen, die in vielen Fällen zu erhöhten Fehlerraten bei Transkription und Translation führen. Mögliche Folge akkumulierender DNA-Veränderungen sind Mutationen, die Ursprung eines malignen, tumorösen Prozesses sein können

(Übersichtsartikel: *Ames et al., 1993; Marnett, 2000; Trachootham et al., 2008*). Substanzen, die oxidativen Stress vermindern, oder ihn sogar verhindern können, sind daher als kanzeropräventives Wirkprinzip von wissenschaftlichem Interesse.

An Proteinen können ROS oxidative Veränderungen verursachen, so dass veränderte Aminosäuren entstehen, die zur Veränderung der Ultrastruktur und zum Funktionsverlust des gesamten Proteins führen können (*Poppek et al., 2006*).

Desweiteren kann an der Zellmembran die radikalische Lipidperoxidation, eine Art Kettenreaktion der Phospholipide der Zellmembran, ausgelöst werden (Übersichtsartikel: *Girotti, 1998*). Da die Zellmembran großen Anteil an Zellintegrität, Signaltransduktion und osmolarer Homöostase hat, können diese Schäden zum Zelluntergang führen.

ROS in Form von *oxidativem Stress* haben also massive Schäden der Zelle und ihrer Bestandteile zur Folge und können zur Karzinogenese beitragen. Darüber hinaus sind ROS an der Entstehung vieler anderer Erkrankungen, z.B. M. Parkinson, M. Alzheimer, Diabetes mellitus etc. (Übersichtsartikel: *Sies, 1997*), sowie Alterungsprozessen im Allgemeinen (*Bertram et al., 2008*) beteiligt.

### 1.7.3 Anti- und prooxiddative Wirkung von Flavonoiden und therapeutische Möglichkeiten

Wie bereits in Abschnitt **1.3.1.1** erwähnt, konnte in zahlreichen epidemiologischen Studien eine inverse Korrelation zwischen Flavonoidaufnahme und dem Risiko des Auftretens verschiedener Krankheiten festgestellt werden. Häufig wird dabei eine mögliche kausale Beteiligung der Flavonoide auf deren antioxidatives Potential zurückgeführt.

In Abhängigkeit der Struktur weisen Flavonoide, wie auch Cumarinderivate (Abschnitt **1.3.2**) antioxidative Fähigkeiten auf, weil sie in der Lage sind, ROS durch Abgabe von Wasserstoffatomen aus ihren phenolischen Hydroxylgruppen neutralisieren zu können. Durch diese Elektronenabgabe entsteht ein Flavonoidradikal, das eine deutlich geringere Reaktivität aufweist. Das Ausmaß der antioxidativen Kapazität ist in Abhängigkeit von der Struktur des Flavonoids sehr unterschiedlich, wobei bestimmte Strukturelemente, die die Stabilität des entstehenden Flavonoidradikals erhöhen, besonders starke Radikalfängereigenschaften aufweisen (*Rice-Evans, 2001*).

Dabei ist jedoch zu beachten, dass Flavonoide in geringen Konzentrationen noch zytoprotektive Eigenschaften ausüben, während höhere Konzentrationen ggf. zu

zytotoxischen, proapoptotischen (*Wätjen et al., 2005, Michels et al., 2005*) und auch prooxidativen Effekten führen können. Daher werden Flavonoide neben ihrem möglichen zukünftigen Einsatzgebiet als Medikament in der Krebsprävention auch als Wirkstoff in der antitumoralen Therapie diskutiert. Beispiele dafür sind eine Vielzahl unterschiedlichster Flavonoide, die in fast allen Pflanzenfamilien vorkommen und aus Blättern, Stamm, Wurzel, Keimlingen oder Blüten extrahiert werden (*Amin et al., 2007*), z.B. das weit verbreitete Luteolin (Übersichtsartikel: *Lin et al., 2008*).
Es ist wichtig, diese oft noch gänzlich unbekannten und unerforschten Flavonoide strukturiert zu untersuchen, um die Möglichkeit eines wirkungsvollen Einsatzes in der Krebstherapie einschätzen zu können.

## 1.8 Zielsetzung

In der modernen Onkologie und Pharmakologie gewinnen Resistenzmechanismen gegen eingesetzte antitumorale Substanzen zunehmend an Bedeutung (*Han et al., 2004*) und erschweren eine effektive Bekämpfung von Tumorzellen zunehmend. Die Isolation, Charakterisierung und Evaluation neuer Wirkstoffe ist daher für Patient und Wissenschaft von außerordentlichem Interesse. Flavonoide und Cumarine haben sich bereits in der Vergangenheit als wirksame zytotoxische Substanzen mit der Aussicht auf einen erfolgreichen Einsatz in der Krebstherapie herausgestellt (*Colic et al., 2000*).
In dieser Dissertation sollten neun Flavonoid- und zwei Cumarinderivate aus der asiatischen Heilpflanze *Psoralea corylifolia* auf ihre mögliche Tauglichkeit als neue antitumorale Verbindungen hin geprüft werden. Dazu wurden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Welchen Einfluss haben die isolierten Substanzen aus *Psoralea corylifolia* auf die Viabilität von H4IIE-Hepatom-, Hct 116-Kolon-Karzinom- und C6-Gliom-Zellen?
2. Welche Mechanismen sind an der durch die Substanzen induzierten Zytotoxizität beteiligt?
3. Welche Rolle spielen Mitogen-aktivierter-Proteinkinasen (MAPK) im Rahmen der durch die Substanzen vermittelten Effekte?
4. Wie ist das antioxidative Potential der Substanzen?
5. Inwieweit unterscheiden sich die beiden isomeren Isoflavanderivate Wighteon und Isowighteon bezüglich ihres Wirkspektrums?

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Anbieter | Erstbeschreiber |
|---|---|---|---|
| **H4IIE** | Hepatomzellen der Ratte | DSMZ GmbH, Braunschweig | *Pitot et al., 1964* |
| **Hct 116** | humane Kolon-Karzinom-Zellen | DSMZ GmbH, Braunschweig | *Fogh et al., 1977* |
| **C6** | Gliomzellen der Ratte | DSMZ GmbH, Braunschweig | *Benda et al., 1968* |

### 2.1.2 Zellkulturmedien und -seren

| Medium | Supplementierung, Lagerung |
|---|---|
| **DMEM (*high glucose*, L-Glutamin, Phenolrot)** | + 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, Lagerung bei 4°C |
| **DMEM ohne Phenolrot** | + 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, Lagerung bei 4°C |
| **FCS Gold** | Lagerung bei -20°C |

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung, Lagerung |
|---|---|
| **Acrylamid-Lösung** | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, 4°C |
| **Anodenpuffer** | 200 mM *tris*-Base, 20 % Methanol, pH 10,4 |
| **APS 10% [w/v]** | 1 g APS ad 10 mL $dH_2O$ |
| **Antikörper-Inkubationslösung** | 5 % Trockenmilchpulver in TBST, -20°C |
| **Antikörper-Inkubationslösung (für Cell Signaling Technology®-Antikörper)** | 5 % BSA in TBST, -20°C |
| **Antikörper-Blockierlösung** | 5 % Trockenmilchpulver in TBST, -20°C |
| ***bis*-Benzimid (Hoechst 33342)** | 50 mM in DMSO, -20°C |
| **BSA-Proteinstandard** | BSA 1 mg/mL $dH_2O$ |
| **Carboxy-$H_2$-DCF-Diacetat-Stocklösung** | 20 mM Carboxy-$H_2$-DCF-Diacetat in DMSO |
| **Coomassie-Entfärbelösung (PVDF-Membranen)** | 50 % [v/v] Methanol, 1 % [v/v] Essigsäure |
| **Coomassie-Entfärbelösung (Polyacrylamid-Gele)** | 5 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure |

| | |
|---|---|
| **Coomassie-Färbelösung (PVDF-Membranen)** | 40 mL Ethanol, 2 mL Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brillantblau ad 100 mL mit $dH_2O$ |
| **Coomassie-Färbelösung (Polyacrylamid-Gele)** | 45 % [v/v] Methanol, 10 % Eisessig [v/v], 0,2 % [w/v] Coomassie Brillantblau |
| **Einfriermedium (Zellen)** | 90 % FCS, 10 % [v/v] DMSO |
| **Entwickler-Lösung** | Fertiglösung, 1:4 verdünnen mit $dH_2O$ |
| **Fixierer** | 600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfit ad 2 L $dH_2O$ |
| **Inhibitorcocktail** | 200 mM Imidazol, 100 mM Natriumfluorid, 115 mM Natriummolybdat, 100 mM Natriumvanadat, 400 mM Natriumtartrat in $dH_2O$ |
| **Kathodenpuffer** | 25 mM *tris*-Base, 20 % Methanol, 40 mM ε-Aminocapronsäure, pH 9,4 |
| **Laufpuffer (10x)** | 250 mM *tris*-Base, 1,92 M Glycin |
| **MTT-Extraktionslösung** | 5 % Ameisensäure, 95 % Isopropanol |
| **MTT-Stammlösung (5x)** | 3,5 mg/mL in PBS filtriert, lichtgeschützt, 4°C |
| **PBS (10x)** | 1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM $Na_2HPO_4$, 15 mM $KH_2PO_4$ |
| **Phosphatase-Inhibitormischung** | 1 mL RIPA-Puffer, 10 µL Inhibitorcocktail, 0,5 µM Okadasäure |
| **Ponceau S-Färbelösung** | 2 g Ponceau-Rot S, 30 g Sulfosalicylsäure, 60 mL 50 % Trichloressigsäure, ad 100 mL $dH_2O$ |
| **Propidiumiodid** | 1,5 mM (1 mg/mL) in $dH_2O$, filtrieren (0,2 µm), -20°C |
| **RIPA-Puffer** | 50 mM *tris*-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] Nonidet-P40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat |
| **Sammelgelpuffer (2x)** | 250 mM *tris*-Base, 0,2 % [w/v] SDS, pH 6,8 |
| **SDS 10 % oder 20 % [w/v]** | 100 g oder 200 g SDS ad 1 L $H_2O$ |
| **SDS-Laufpuffer (1x)** | 25 mM *tris*-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS |
| **SDS-Probenpuffer (4x)** | 40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β-Mercapto-ethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenol-blau |
| **TBS (10x)** | 100 mM *tris*-Base, 1,5 M NaCl, pH 7,4 |
| **TBST** | 1x TBS, 0,1 % [v/v] Tween® 20 |
| **TEAC-Lösung** | 14 mM ABTS, 4,9 mM APS, jeweils in $dH_2O$, Mischungsverhältnis 1:1, lichtgeschützt, 4°C |
| **Trenngelpuffer (4x)** | 1,5 M *tris*-Base, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8 |
| ***Tris*-HCl pH 8,0** | 0,1 M Trizma®-Base |

### 2.1.4 Proteingewichtsstandards

| Proteinmarker | Hersteller |
|---|---|
| **Page Ruler® unstained protein ladder (200/150/120/100/85/70/60/50/40/30/25/20/15/10 kDa)** | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| **Page Ruler® prestained protein ladder (170/130/100/72/55/40/33/24/17/11 kDa)** | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |

### 2.1.5 Chemikalien/Lösungsmittel

| Chemikalie/Lösungsmittel | Hersteller |
|---|---|
| **Acrylamid-Lösung (37,5:1)** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **ABTS** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Agarose NEEO Ultra** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **Ameisensäure** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **ε-Aminocapronsäure** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Ammoniumperoxodisulfat (APS)** | Merck KGaA, Darmstadt |
| ***bis*-Benzimid (Hoechst 33342)** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Bromphenolblau** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **BSA (bovine serum albumin)** | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| **2-Butanol** | Acros Organics, Geel, Belgien |
| **Carboxy-$H_2$-DCF-Diacetat** | Invitrogen, Karlsruhe |
| **Coomassie® Brillantblau R-250** | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| **Deoxycholat** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Diethanolamin** | Fluka, Buchs, Schweiz |
| **DMEM (*high glucose*, L-Glutamin, Phenolrot)** | Invitrogen, Karlsruhe |
| **DMEM ohne Phenolrot** | Invitrogen, Karlsruhe |
| **DMSO (Dimethylsulfoxid)** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **EDTA** | ICN Biochemicals, Aurora, OH, USA |
| **Entwickler (Kodak GBX developer and replenisher)** | Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA |
| **Essigsäure/Eisessig = 100 %** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Ethanol** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **FCS gold** | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |

| | |
|---|---|
| **Glycerin** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **Glycin** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **$H_2O$ (entionisiert)** | Millipore |
| **L-Homoarginin** | Fluka, Buchs, Schweiz |
| **Imidazol** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Isopropanol** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Kaliumchlorid** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Kaliumdisulfit** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Kaliumhydrogenphosphat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **β-Mercaptoethanol** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Methanol** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **MTT** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Natriumchlorid** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumfluorid** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumhydrogenphosphat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumhydroxid** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriummolybdat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumtartrat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumthiosulfat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Natriumvanadat** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **Nonidet-P40** | Fluka, Buchs, Schweiz |
| **Okadasäure** | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| **Ponceau-Rot S** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Penicillin/Streptomycin** | Invitrogen, Karlsruhe |
| **Propidiumiodid** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **Proteinase-Inhibitorcocktail (10x)** | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| **Rotiphorese Gel 30** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| **Salzsäure 37 % [v/v]** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **SDS** | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| **Stripping Buffer** | Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA |

| | |
|---|---|
| **Sulfosalicylsäure** | Merck KGaA, Darmstadt |
| **TEMED** | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| **Trichloressigsäure** | Merck KGaA, Darmstadt |
| ***tris*-Base** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| ***tris*-HCl** | ICN Biochemicals, Aurora, OH, USA |
| **Trockenmilch (nonfat-dried milk-bovine)** | Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| **TROLOX** | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| **Trypsin (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA-HNa)** | Invitrogen, Karlsruhe |
| **Tween® 20** | MP Biomedicals, Solon, OH, USA |
| **Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$)** | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

### 2.1.6 Untersuchte Substanzen aus *Psoralea corylifolia*

| **Bezeichnung** | **MW [g/mol]** |
|---|---|
| **3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on (= DPHC)** | 270 |
| **Bakuchalcon** | 340 |
| **Bavachromen** | 322 |
| **Corylifol C** | 338 |
| **Corylin** | 320 |
| **Isowighteon** | 338 |
| **6-Prenylnaringenin** | 340 |
| **Psorachalcon A** | 340 |
| **Sophoracoumestan A** | 334 |
| **Wighteon** | 338 |
| **Xanthoangelol** | 392 |

Von jeder Substanz wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO angefertigt.

### 2.1.7 Assay-Kits

| **Bezeichnung** | **Hersteller** |
|---|---|
| **Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7-Assay** | Promega GmbH, Mannheim |
| **BM Chemiluminescence Western Blotting Kit** | Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen |

| | |
|---|---|
| **Cytotoxicity Detection Kit (LDH)** | Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen |
| **DC Protein Assay** | BIO-RAD, München |

### 2.1.8 Antikörper

**Primär-Antikörper**

| Zielprotein/Größe | | Hersteller |
|---|---|---|
| **p38α (C-20)** | **38 kDa** | **sc-535**, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| **pp38 (pT180/pY182)** | **42 kDa** | **# 1229-1**, Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA |
| **ERK 1/2 (K-23)** | **42/44 kDa** | **sc-94**, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| **pERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204)** | **42/44 kDa** | **# 9101**, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA |
| **JNK 1/3 (C-17)** | **46/54 kDa** | **sc-474**, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| **pJNK 1/2/3 (Thr 183/Tyr 185)** | **46/54 kDa** | **# 9251**, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA |
| **MEK 1/2 (L38C12)** | **45 kDa** | **# 4694,** Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA |
| **pMEK 1/2 (Ser217/221)** | **45 kDa** | **# 9121**, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA |

**Sekundär-Antikörper**

| Zielprotein/Verdünnung | Hersteller |
|---|---|
| **goat-anti-mouse IgG/HRP-Konjugat** | # **1030-50**, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA |
| **goat-anti-rabbit IgG/HRP-Konjugat** | # **4030-50**, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA |

### 2.1.9 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| **Blotting-Apparaturen** | Pharmacia LKB Multiphor II, Biometra, OWL HEP-1, Thermo Scientific |
| **Eismaschine** | Icematic F90, Compact Electronics |
| **Elektrophoresekammer** | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| **Fluoreszenzmikroskop** | Axiolab, Zeiss (Lampe: HBO 50 Hg) |
| **Geldokumentationsanlage 2000** | Geldoc 2000, BIO-RAD |
| **Heizblock** | Ori-Block® DB-3, Techne<br>DRY Bath System, Starlab |

| | |
|---|---|
| **Inkubator (5 % $CO_2$)** | Jouan IG 150, Binder Serie BC |
| **inverses Lichtmikroskop** | Axiovert 100, Zeiss |
| **Kamera** | CoolSNAP-Pro (INAS)<br>Moticam 2300, Motic Microscopes |
| **pH-Meter** | PHM 93 Reference pH-Meter |
| **Photometer** | Lambda 12 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer |
| **Plattenlesegerät**<br>**(1: Fluoreszenzluminophotometer)**<br>**(2: Fluoreszenzluminospektrophotometer)** | **1**: Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer<br>**2**: BioTek Synergy 5 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek |
| **Power Supply** | E143, Consort<br>EV231, Consort<br>E835, Consort |
| **Rührer** | Heidolph MR 3002 |
| **Schüttler** | Roto-Shake Genie, Scientific Industries<br>Swip, Edmund Bühler |
| **Sterilbänke** | LC2, Jouan<br>BSB4, Bartholomei Labortechnik |
| **Vortexer** | VF2, Janke & Kunkel GmBH & Co. KG IKA®-Labortechnik |
| **Waage** | Sartorius 3716MP<br>Sartorius Analysenwaage MC1 |
| **Wasserbad** | Thermomix-1420, B. Braun<br>Certomat WR, B. Braun |
| **Wasser-Deionisierungsanlage** | Behropur® Wasservollentsalzer, Millipore, Behr Labortechnik |
| **Zentrifugen** | Universal 30F, Hettich<br>Centrifuge 5415R, Eppendorf<br>MR1812, Jouan<br>Minifuge 2, Heraeus Christ |

### 2.1.10 Sonstige Materialien

| Material | Hersteller |
|---|---|
| **6-Well** | Becton Dickinson, Heidelberg |
| **75 $cm^2$-Gewekulturflasche** | Greiner bio-one, Solingen |
| **24-Well/96-Well** | Greiner bio-one, Solingen |
| **Chromatographie Papier, 3MMCHR** | Whatman, Piscataway, NJ, USA |
| **Filme (X-OMAT AR Film XAR-5)** | Kodak, Stuttgart |
| **Glasküvetten** | OS 1000, Hellma, Mülheim |
| **Lab-Tek® Chamber Slide™ (8-Wells)** | Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA |

| | |
|---|---|
| **Membranfilter** | Porengröße 0,22 µm und 0,4 µm, Sartorius, Göttingen |
| **PVDF Western Blotting Membrane** | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| **Safe Lock Tubes 1,5 mL/2,0 mL** | Eppendorf, Hamburg |
| **Zählkammer (Neubauer)** | Welabo, Düsseldorf |
| **Zentrifugenröhrchen 15 mL/50 mL** | Greiner bio-one, Solingen |

### 2.1.11 Computerhardware und –software

| Programm | Hersteller |
|---|---|
| **Analyse-It für Microsoft Excel, Version 1.68** | Analyse-It Software, Ltd., Leeds, UK |
| **ChemSketch 11.02** | Advanced Chemistry Development, Inc. |
| **Graph Pad Prism® 5.00** | Graph Pad Software, Inc. |
| **Image Pro Plus, Version 4.5.1.22 (mit Intas Kamera)** | Media Cybernetics |
| **Quantity One 4.1.1** | BIO-RAD |
| **UV-Winlab 1.0** | Perkin Elmer |
| **Wallac 1420 Workstation, Version 2.00.035** | Perkin Elmer |
| **Word, Excel, Powerpoint, Photo Editor (2007)** | Microsoft Corporation |

# 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

a) H4IIE-Zellen. Bei der H4IIE-Zelllinie handelt es sich um Hepatomzellen der Ratte, die erstmals durch *Pitot et al., (1964)* als Subklon aus dem Reuber-H35-Hepatom isoliert und u.a. durch *Evans et al., (1977)* und *Kovacs et al., (1977)* charakterisiert wurden. Die Zelllinie kann aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades als Modellsystem für Hepatozyten verwendet werden.

b) Hct 116-Zellen. Die Erstbeschreibung dieser humanen Adenokarzinom-Zelllinie erfolgte durch *Fogh et al., (1977)*. Hct 116-Zellen zeichnen sich durch einen Defekt in DNA-mismatch-repair-Genen mit Mikrosatelliteninstabilität aus (*Patsos et al., 2009*). Die Zelllinie kann unter anderem als Modell für das HNPCC (*human not polyposis colon carcinoma*) verwendet werden (*Boland, 1996*).

c) C6-Zellen. Die erstmalige Isolation der C6-Gliom-Zelllinie erfolgte nach Induktion mit N,N‘-Nitrosomethylharnstoff in der Wistar-Furth-Ratte (*Benda et al., 1968*). C6-Zellen sind in der Lage, in Abhängigkeit neuronaler Faktoren (Glutamin-Synthetase und zyklische Nukleotid-Phosphorylase), sowohl astrozytäre, als auch oligodendrozytäre Eigenschaften auszubilden. Frühe Passagen zeigen typischerweise oligodendrozytäre Eigenschaften, wohingegen der astrozytäre Phänotyp bei späten Passagen überwiegt (Transdifferenzierung) (*Parker et al., 1980*). Die Zelllinie kann als Modellsystem für das *glioblastoma mulitforme* dienen (*Auer et al., 1981*).

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 % $CO_2$ und 37°C. Es wurde DME-Medium (*high glucose*, L-Glutamin, Phenolrot) mit 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin verwendet. Die Subkultivierung erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % etwa zweimal wöchentlich. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, 1 mL 10x Trypsin-EDTA-Lösung pro T75-Kulturflasche zugegeben und 2 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in 9 mL frischem Medium, die Zentrifugation für 5 min bei 560 rpm und die manuelle Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Das Zellpellet wurde zuletzt

in einem definierten Volumen DMEM resuspendiert (Zellzahl $1x10^6$/mL) und erneut ausplattiert.

#### 2.2.1.2 Ausplattieren und Inkubation von Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit $1x10^4$ Zellen/Well oder $5x10^4$ Zellen/Well auf 96-Well-Platten, $7{,}5x10^5$ Zellen/Well auf 6-Well-Platten und $5x10^4$ Zellen/Well auf 8-Well-Chamber-Slides ausplattiert. Nach 24 h wurde die Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen für weitere 1-24 h (ggf. Vorinkubation) durchgeführt und die Zellen nach Ablauf dieser Zeitspanne in den jeweiligen Versuchen weiterverwendet.

#### 2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach Erreichen einer etwa 80 % igen Konfluenz wie oben beschrieben abtrypsiniert, zentrifugiert und nach erfolgtem Absaugen des DME-Mediums in FCS aufgenommen. Anschließend wurden 900 µL der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen, in welches zuvor 100 µL DMSO vorgelegt wurden, überführt (10 % [v/v] DMSO, 90 % FCS). Nach kurzer Lagerung auf Eis folgte eine Überführung in eine Umgebung von -20°C und letztlich nach -80°C. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur, die Zellen wurden für 5 min bei 560 rpm zentrifugiert, um das in der Probe befindliche DMSO zu eliminieren. Nach erneuter Resuspension wurden die Zellen in auf 37°C vorgewärmtes DME-Medium überführt und nach Ablauf von 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### 2.2.1.4 Mikroskopie von Zellen

Vor jeder Passagierung und Behandlung wurden die Zellen am Lichtmikroskop Zeiss Axiovert 100 einer Analyse auf Zellmorphologie und eventuelle Kontaminationen unterzogen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung inklusive der Aufnahme der Bilder im Rahmen des Life-Dead-Assays (Abschnitt **2.2.3.3**) erfolgte am Zeiss Axiolab.

### 2.2.2 Zytotoxizität (MTT-Assay)

Das Grundprinzip des MTT-Assays beruht auf der NADH-abhängigen enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum blauen, unlöslichen Formazan. Das Absorptionsmaximum des Formazans beträgt $\lambda = 562$ nm. Die photometrischen

Messwerte repräsentieren die Menge an gebildetem Formazans und erlauben daher Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen als Maß für deren Viabilität (*Mosman, 1983*).

$1x10^4$ Zellen/Well wurden in einem Volumen von 100 µL/Well auf einer 96-Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Nach 24 h wurde für weitere 24 h die Inkubation mit den jeweiligen Testsubstanzen vorgenommen. Die Zellen wurden dann für 2 h mit 100 µL 1x MTT-Gebrauchslösung (5x MTT-Stammlösung verdünnt in DMEM) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand von jedem Well vorsichtig abpipettiert und 100 µL MTT-Extraktionslösung hinzugegeben. Die photometrische Auswertung wurde nach 30 min Extraktion bei $\lambda = 560$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 540$ nm) im Plattenlesegerät (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer) vorgenommen.

### 2.2.3 Nachweis des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

#### 2.2.3.1 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay

Mit Hilfe dieses Assays lässt sich die Caspase 3 und 7-Aktivität als Apoptoseindikator bestimmen. Das Kit enthält eine Pufferlösung, die die Zellen lysiert und ein Substrat, in dem an bestimmte Aminogruppen des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 110 spezifische, aspartathaltige Peptidreste (Z-DEVD-R110) gekoppelt sind. Befindet sich aktivierte Caspase 3 und 7 im Medium, wird das im gekoppelten Zustand nicht-fluoreszente Substrat zum fluoreszenten Rhodamin 110 umgesetzt, welches nach Exzitation bei $\lambda = 499$ nm bei einem Emissionsmaximum von $\lambda = 521$ nm gemessen werden kann. Dabei ist die Menge an gebildetem fluoreszenten Rhodamin 110 proportional zur Aktivität an Caspase 3 und 7 in der Probe (*Leytus et al., 1983*).

Auf einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden $5x10^4$ Zellen/Well in einem Volumen von 100 µL/Well ausplatttiert, für 24 h anwachsen gelassen und für weitere 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Volumenreduktion auf 50 µL und die Zugabe von 50 µL ApoONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay-Reagenz. Die Messung wurde im Plattenlesegerät bei 37°C für 3 h durchgeführt ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 535$ nm).

#### 2.2.3.2 LDH-Assay (Cytotoxicity Detection Kit)

Während der Nekrose kommt es zu einer gestörten Membranintegrität, wodurch das zytosolische Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) in die Umgebung freigesetzt wird. Man verwendet daher die Aktivität dieses Enzyms im zellfreien Überstand, um das

Ausmaß der Nekrose photometrisch bestimmen zu können. In einem ersten Schritt wird dabei Laktat $NAD^+$-abhängig durch die Laktat-Dehydrogenase in Pyruvat und $NADH/H^+$ umgewandelt. In einem zweiten, Diaphorase-katalysierten Schritt werden zwei in der ersten Reaktion entstehende Protonen auf das Tetrazoliumsalz 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (gelbliche Lösung) übertragen, wobei ein tiefrotes Formazansalz gebildet wird (*Decker et al., 1988*). Es kann auf das Ausmaß der Nekrose geschlossen werden, da die Höhe der LDH-Aktivität dabei direkt mit der Menge an gebildetem Formazansalz korreliert.

$1x10^4$ H4IIE-Zellen/Well wurden in 100 µL ausplattiert und nach 24 h mit den entsprechenden Testsubstanzen für 24 h inkubiert. Da jede Zelllinie unterschiedliche Mengen an Laktat-Dehydrogenase (LDH) besitzt, wurde die optimale Zellzahl in einem Vorversuch ermittelt (Abschnitt **3.3.3.1**). Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung an LDH aus integeren Zellen dienten zwei weitere Wells, die weder mit Lysepuffer, noch mit den Testsubstanzen inkubiert wurden (*low control*). Desweiteren erlaubte ein zellfreies, nur DME-Medium enthaltendes Well Rückschlüsse auf die Hintergrund-Aktivität an LDH im Assay-Medium (*background control*). Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden zwei Wells (nur Zellen, keine Inkubation mit Testsubstanzen) mit 5 µL Lysepuffer für 5 min bei 37°C versetzt, um die maximale LDH-Freisetzung zu simulieren (*high control*). 50 µL Überstand wurden aus allen Wells abgenommen und auf eine neue 96-Well-Platte überführt, die Viabilität der Zellen wurde ggf. in einem MTT-Assay überprüft. Nach Herstellung und Zugabe von 50 µL Reaktionslösung (nach Herstellerangaben) zu allen Wells erfolgte die photometrische Messung im Plattenlesegerät alle 2 min für insgesamt 30 min bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 590$ nm) und 23 °C.

### 2.2.3.3 Life-Dead-Assay

Es handelt sich um einen Zellviabilitäts-Assay, der es erlaubt, aufgrund eines unterschiedlichen Färbeverhaltens zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod differenzieren zu können. Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff *bis*-Benzimid (Hoechst 33342) permeiert frei durch die Zellmembran und führt aufgrund seiner DNA-interkalierenden Wirkung zur Anfärbung der Nuklei viabler Zellen. Fluoreszenzmikroskopisch kann aufgrund von Vorgängen wie Chromatinkondensation und Zellkernfragmentation, die während der Apoptose zu beobachten sind, zwischen

apoptotischen und nichtapoptotischen Zellen unterschieden werden (*Oberhammer et al., 1992*). Die Anzahl apoptotischer Zellen wird in Relation zur Gesamtzellzahl dargestellt:

$$\textbf{(1)}\ \text{apoptotischer Index (\%)} = \frac{Anzahl\ apoptotischer\ Zellen}{Gesamtzellzahl} \text{ x } 100$$

Der geladene Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid ist nicht in der Lage, intakte Zellmembranen zu durchdringen. Bei Störungen der Membranintegrität penetriert Propidiumiodid ins Zellinnere und interkaliert in Nukleinsäuren (*Waring, 1965*). Dies erhöht seine Fluoreszenzintensität sehr stark, so dass der Anteil nekrotischer Zellen ermittelt werden kann:

$$\textbf{(2)}\ \text{nekrotischer Index (\%)} = \frac{Anzahl\ nekrotischer\ Zellen}{Gesamtzellzahl} \text{ x } 100$$

$5x10^4$ Zellen wurden in jeweils 200 µL/Well DMEM auf 8-Well-Chamber-Slides ausplattiert und nach 24 h für weitere 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zweimal mit 250 µL PBS gewaschen und für 10 min mit 100 µM *bis*-Benzimid ($\lambda_{ex}$ = 350 nm, $\lambda_{em}$ = 461 nm nach Interkalation), sowie 5 µM Propidiumiodid ($\lambda_{ex}$ = 535 nm, $\lambda_{em}$ = 617 nm nach Interkalation) bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und das 8-Well-Chamber-Slide luftdicht verschlossen, um einer Austrocknung der Zellen vorzubeugen.
Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop durch Auszählung in zwei bis vier zufällig gewählten Sichtfeldern in jedem Well unter 400facher Vergrößerung. Zur Ermittlung der Gesamtzahl und der Zahl apoptotischer Zellen wurde der Filtersatz II (G 365, FT 395, LP 420), zur Bestimmung der Zahl nekrotischer Zellen der Filtersatz I (BP 546, FT 580, LP 590) verwendet und die Indizes wie unter (**1**) und (**2**) angegeben bestimmt.

### 2.2.4 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade (SDS-PAGE und Western Blot)

Der Western Blot dient dem spezifischen immunologischen Nachweis zellulärer Proteine durch Transfer auf eine Trägermembran (*Towbin et al., 1979, Burnette, 1981*). So lässt sich beispielsweise das Ausmaß der Phosphorylierung zellulärer Proteine quantitativ bestimmen.

### 2.2.4.1 Proteinisolation

$7{,}5x10^5$ Zellen werden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in einem Gesamtvolumen von 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h mit der Inkubation der Testsubstanzen für 3 h begonnen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium in 2 mL-Safe Lock Tubes überführt und die Zellen mit 150 µL 10x Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Nach Suspension im zuvor abgenommenen DMEM wurde die Lösung 2 min mit 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1x PBS resuspendiert und wiederum 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin mit 100 µL RIPA-Puffer in Inhibitorlösung (1x Phosphatase- und 1x Proteinaseinhibitorcocktail) und Okadasäure (0,1 µg/µL) versetzt, und zweimal für mindestens 30 min bei -80°C tiefgefroren. Nach erfolgter Zelllyse wurden die Proben zentrifugiert (15000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand zur Proteinbestimmung und Western Blot verwendet.

### 2.2.4.2 Proteinbestimmung nach *Lowry*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach *Lowry* (*Lowry et al., 1951*) mit Hilfe des DC Protein Assay von BIO-RAD nach Herstellerangaben, wobei zur Standardisierung der Proteinmenge BSA (0,1-1,0 mg/mL) verwendet wurde. Zweiwertiges Kupfer reagiert dabei unter alkalischen Bedingungen mit der Peptidbindung von Proteinen und wird selbst zu monovalentem Kupfer reduziert (*Biuret-Reaktion*). Monovalentes Kupfer reagiert gemeinsam mit Tyrosin, Tryptophan und Cystein zum instabilen, gelben Folin-Reagenz, welches durch Reduktion zu Molybdänblau umgesetzt wird. Das Ausmaß der Blaufärbung dient als Indikator für die Menge an in der Probe befindlichem Protein.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit $dH_2O$ verdünnt. In eine 96-Well-Zellkulturplatte wurde 25 µL Workingreagent A vorgelegt (Reagent S und Reagent A im Verhältnis 1:50), 5 µL der gut vermischten Probe und 200 µL des Reagent B zupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte im Plattenlesegerät bei $\lambda = 590$ nm.

### 2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach *Laemmli*

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dies geschieht durch Retardierung der Proteine in einem Polyacrylamid-Gel nach Anlegen eines elektrischen Feldes (*Laemmli, 1970*). Das Gel entsteht durch radikalische Polymerisation (Starter: APS, Katalysator: TEMED) von Acrylamid zu

linearen Polyacrylamidketten, die durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Es besteht aus einem Sammelgel, welches die Probe konzentriert und einem Trenngel, welches je nach dessen Prozentigkeit (resultierend aus dem Acrylamid-Anteil) für das Ausmaß der Proteinauftrennung sorgt. Das der Probe beigemischte β-Mercaptoethanol verursacht die Spaltung von Disulfidbrücken, während SDS als Detergenz wirkt, die entfaltete Proteinstruktur stabilisiert und zu einer gleichmäßig negativen Ladung der Proteine führt. So wird die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel letztlich hauptsächlich durch ihre Molekülmasse bestimmt.

Die Polymerisation der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, wobei das Trenngel (10 %) mit 2-Butanol überdeckt wurde. Nach 1 h wurde das 2-Butanol entfernt, mit $dH_2O$ nachgespült und mit Sammelgel (4,5 %) übergossen. Anschließend wurde der Probenkamm luftblasenfrei eingesteckt und das Gel dann 1 h bei Raumtemperatur zur Aushärtung stehen gelassen. Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer, wurde diese mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die zuvor berechnete Proteinmenge wurde mit 4x SDS-Probenpuffer (Verdünnung 1:4) und $dH_2O$ zu einem definierten Gesamtvolumen (12-30 µL) vermischt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben 1 min auf Eis gelagert, kurz zentrifugiert und in den Probenkammern aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels mit 15 mA begonnen und dann mit 150 V für 1-2 h fortgeführt.

**Tab. 2.2.4.3.1**: **Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.** Größe des Gels 6x9 cm.

| Acrylamid-Endkonzentration | Acrylamid-Lösung | Trenngel-/ Sammelgelpuffer | $dH_2O$ | APS (10,0 %) | TEMED |
|---|---|---|---|---|---|
| **Trenngel (9,0 %)** | 1,8 ml | 1,5 ml | 2,7 ml | 30,0 µl | 5,0 µl |
| **Sammelgel (4,5 %)** | 0,6 ml | 2,0 ml | 1,4 ml | 24,0 µl | 4,0 µl |

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

Nach erfolgter Größenauftrennung ermöglicht es der Western Blot, die Proteine im *semi-dry*-Verfahren (*Kyhse-Andersen, 1984*) auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Dazu wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angebracht, wodurch die Proteine von der Kathode in Richtung der Anode wandern und auf der PVDF-Membran aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben.

Je vier Whatman-Papiere wurden mit Anoden- und Kathodenpuffer angefeuchtet und das Trenngel und die PVDF-Membran auf die erforderliche Größe zugeschnitten. Die in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papiere wurden mit der Kathode in Kontakt

gebracht, gefolgt von Trenngel, in Methanol aktivierter PVDF-Membran und den in Anodenpuffer getränkten Whatman-Papieren. Die Blotting-Apparatur wurde geschlossen und eine konstante Stromdichte von 5 mA/cm$^2$ für 30 min angelegt.

### 2.2.4.5 Färbung membrangebundener Proteine

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine aus dem Trenngel auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Ponceau-Rot-S-Färbung verwendet (*Korotzer et al., 1961*). Dieser Azofarbstoff färbt Proteine reversibel an, indem er an deren positiv geladene Aminogruppen bindet. Die PVDF-Membran wurde in Ponceau S geschwenkt und anschließend mit $dH_2O$ entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Bei Coomassie-Brillant-Blau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basische Seitenketten von Proteinen anlagert und diese unspezifisch anfärbt. Die PVDF-Membran wurde nach Belichtung der Filme (Abschnitt **2.2.4.6**) 60 s in Coomassie-Brillant-Blau geschwenkt, um dann mit Coomassie-Entfärbelösung den Kontrast von Proteinbanden zum Hintergrund zu erhöhen (*Fazekas de St Groth et al., 1963*). Durch die Färbung der Gele wurde ein Verbleib von Proteinen im Trenngel ausgeschlossen.

### 2.2.4.6 Antikörper-vermittelter Nachweis spezifischer Proteine

Die Proteine auf der PVDF-Membran werden immunologisch im Sinne einer Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion visualisiert. Durch das Schwenken in Milchpulver werden nach dem Transfer alle freien Bindungsstellen mit nicht durch den Antikörper erkennbaren Proteinen blockiert. Die Membran wird dann mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen Epitope des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, behandelt. Die Detektion erfolgt mit einem HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen das $F_c$-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist (*Broome et al., 1978*). In Anwesenheit von $H_2O_2$ katalysiert die HRP die Umsetzung von Luminol in sein oxidiertes Derivat, wobei Lumineszenz emittiert wird, die durch Exposition der PVDF-Membran mit Röntgenfilmen erfasst werden kann.

Die PVDF-Membran wurde nach der Blockierung für 1 h mit verdünnter Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Den anschließenden Waschschritten (**Tab. 2.2.4.6.1**) mit TBST folgte die Inkubation der Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper. Nach erneuten Waschschritten erfolgte die Herstellung der Lumineszenzlösung (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit)

nach Herstellerangaben mit nachfolgender Auflegung der PVDF-Membran auf den Röntgenfilm. Die Filme wurden nach Belichtung kurz in Entwickler-Lösung geschwenkt, in $dH_2O$ getaucht und für 5 min vollständig mit Fixierer bedeckt. Abschließend erfolgte eine Wässerung der Filme für 1 h, bevor die Filme getrocknet wurden.

**Tab. 2.2.4.6.1**: **Western Blot.** Verwendete Proteinmengen, Antikörperkonzentration und Dauer/Anzahl von Waschschritten. Es wurden H4IIE-Zellen verwendet (Versuchsablauf: ab Abschnitt **2.2.4.1**). Genaue Angaben zu den verwendeten Antikörpern finden sich in Abschnitt **2.1.8**.

| Antikörper | Proteinmenge [µg] | Verdünnung Primär-AK | Verdünnung Sekundär-AK | Waschschritte [min] |
|---|---|---|---|---|
| **ERK 1** (K-)23 | 5 | 1:1000 | 1:5000 anti-rabbit | 3x10/3x10 |
| **pERK 1/2** (Thr 202/Tyr 204) | 30 | 1:1000 | 1:2000 anti-mouse | 3x10/3x10 |
| **MEK 1/2** (L38C12) | 5 | 1:1500 | 1:5000 anti-rabbit | 3x10/3x10 |
| **pMEK 1/2** (Ser217/221) | 10 | 1:1000 | 1:2500 anti-rabbit | 3x10/3x10 |
| **JNK 1/3** (C-17) | 5 | 1:1500 | 1:5000 anti-rabbit | 3x10/3x10 |
| **pJNK 1/2/3** Thr 183/Tyr 185 | 10 | 1:1000 | 1:2500 anti-rabbit | 3x12/3x12 |
| **p38α** (C-20) | 5 | 1:1500 | 1:5000 anti-rabbit | 3x15/3x15 |
| **pp38** (pT180/pY182) | 10 | 1:1000 | 1:2500 anti-rabbit | 3x9/3x9 |

### 2.2.4.7 Strippen von PVDF-Membranen

Auf einer einmal verwendeten Membran können weitere Proteine detektiert werden (*stripping*). Dazu wird die in Methanol aktivierte Membran 10 min in TBST gewaschen und dann für 30 min mit zuvor auf 37°C erwärmten Stripping Buffer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt in TBST von 10 min wird die Membran 1 h mit Antikörper-Blockierlösung inkubiert und einer erneuten Immundetektion zugeführt.

## 2.2.5 Antioxidative Kapazität

### 2.2.5.1 TEAC-Assay

Zur Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Substanzen dient der zellfreie TEAC (***T****rolox* ***e****quivalent* ***a****ntioxidative* ***c****apacity*)-Assay (*Miller et al., 1993*, *Re et al., 1999*). Dabei wird die antioxidative Kapazität einer Testsubstanz mit der Bezugssubstanz TROLOX, einem synthetischen Vitamin E-Derivat, verglichen. Das Testprinzip beruht auf der Reduktion eines stabilen tiefgrünen $ABTS^{*}$-Radikals zum farblosen ABTS

durch ein Antioxidans. Das Ausmaß der Entfärbung der Lösung durch die Testsubstanz wird photometrisch bei $\lambda = 734$ nm bestimmt und ist invers mit den antioxidativen Eigenschaften der Testsubstanz korreliert (*decolorization assay*).

24 h vor Versuchsdurchführung wurde die Bildung des ABTS*-Radikals über Nacht bei Raumtemperatur und lichtgeschützt induziert, indem eine 4,9 mM APS-Lösung und eine 14 mM ABTS-Lösung (jeweils in $dH_2O$) im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Kurz vor Versuchsbeginn wurde die ABTS*-Lösung mit 80 % Ethanol so verdünnt, dass bei $\lambda = 734$ nm eine Absorption von 1,4 erhalten wurde. Zur Ermittlung einer TROLOX-Eichgeraden wurden jeweils 250 µL der verdünnten ABTS*-Lösung mit 250 µL TROLOX-Lösung zu Endkonzentrationen von 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM, 15,0 µM, 25,0 µM an TROLOX in einer Halbmikroküvette vermischt. Die Bestimmung der eigentlichen Proben erfolgte analog. Die Änderung der Absorption wurde über 2 min kontinuierlich photometrisch aufgezeichnet. Um mögliche Absorptionsänderungen der ABTS*-Lösung zu detektieren, wurde die Messung eines Blankwertes (DMSO) alle 5 Messungen wiederholt und die Werte gegebenenfalls korrigiert.

#### 2.2.5.2 DCF-Assay

Der zellbasierte DCF-Assay ermöglicht die Detektion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und erlaubt Rückschlüsse auf eine mögliche substanzvermittelte Modulation oxidativen Stresses. Das verwendete nichtfluoreszente Carboxy-$H_2$-DCF-Diacetat passiert dabei aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran. Intrazellulär wird es durch Esterasen in Carboxy-$H_2$-DCF umgewandelt, welches nicht membrangängig ist. Anschließend können intrazelluläre ROS Carboxy-$H_2$-DCF zum fluoreszenten Carboxy-DCF oxidieren. Der Anstieg der Fluoreszenz dient als Maß für die intrazelluläre ROS-Konzentration (*Cathcart et al., 1983*, *Rosenkranz et al., 1992*). Zusätzlich können die antioxidativen Eigenschaften von Substanzen durch eine Inkubation mit $H_2O_2$ (als Induktor oxidativen Stresses) erfasst werden.

Um einen *quenching-Effekt* (Fluoreszenzlöschung), durch DMSO bzw. die Testsubstanzen ausschließen zu können, wurde von jeder Testsubstanz im Plattenlesegerät (BioTek Synergy 5 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) ein Emissionsspektrum und ein Exzitationsspektrum in Anwesenheit von Carboxy-DCF gemessen. Dazu wurde Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit den einzelnen Testsubstanzen (Konzentration = 25 µM) für 1 h bei 37°C inkubiert, die Messung der

Fluoreszenz in Abständen von $\lambda = 1$ nm begonnen und anschließend mit den Werten der Kontrolle verglichen.

In einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden $5x10^4$ Zellen in einem Volumen von jeweils 100 µL/Well DMEM ausplattiert. Nach 24 h wurde das DMEM gewechselt und eine Vorinkubation mit den Testsubstanzen für 1 h vorgenommen. Anschließend erfolgte erneut ein Mediumwechsel und die Zugabe von 100 µL der Carboxy-$H_2$-DCF-DA-Sonde zu jedem Well (Endkonzentration = 10 µM). Nach 30 min wurde das DMEM durch farbloses DMEM ersetzt, mit $H_2O_2$ inkubiert und die Fluoreszenz kontinuierlich über 1 h im Plattenlesegerät gemessen ($\lambda_{ex} = 475$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm).

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Die Messdaten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mit einer einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als *post-hoc*-Test wurde der LSD (*least significant difference*) -Test verwendet (Analyse-It für Microsoft Excel, Version 1.68). Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0,05 festgesetzt.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Überblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene phenolische und polyphenolische, sekundäre Stoffwechselprodukte der seit Jahrhunderten in der ayurvedischen und traditionellen chinesischen Medizin eingesetzten Pflanze *Psoralea corylifolia* (*Liu et al., 2004*) untersucht.

Zunächst wurde die Zytotoxizität der Substanzen auf drei verschiedene Zelllinien (Hepatom-, Kolon-Karzinom- und Gliom-Zellen) ermittelt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die molekularen Mechanismen des Zelltodes (Apoptose und/oder Nekrose) bestimmt und quantifiziert, sowie als Schwerpunkt die Interaktion der Substanzen mit dem intrazellulären MAPK-Signalweg analysiert. Desweiteren wurde das antioxidative Potential der Substanzen ermittelt.

Interesse weckte dieses Thema aufgrund der Tatsache, dass viele strukturell vergleichbare Substanzen aus der Klasse der Flavonoide und Cumarine als mögliche antitumorale Wirkstoffe wissenschaftlich diskutiert werden. Da sich zu den hier untersuchten Verbindungen in der aktuell verfügbaren Literatur kaum strukturierte Abhandlungen finden, sollten nun einige grundlegende toxikologische Wirkprinzipien in verschiedenen Zellultursystemen analysiert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte beurteilt werden, ob sich die Substanzen grundsätzlich als Antikarzinogene eignen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte DPHC wurde im Rahmen der Dissertation erstmalig beschrieben.

## 3.2 Zytotoxizität

### 3.2.1 Zytotoxizität der Substanzen in verschiedenen Zelllinien

Mithilfe des MTT-Assays wurde die Zytotoxizität der Substanzen aus *Psoralea corylifolia* bestimmt. Dazu wurden drei verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Herkunft (H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen) mit Konzentrationen von 10 µM, 25 µM und 50 µM für 24 h inkubiert und anschließend die Zellviabilität gemessen. Bei jedem Experiment erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit eine Abschätzung des Anteils abgetöteter Zellen im Durchlichtmikroskop, die nach Abschluss der Messungen als Plausibilitätskontrolle diente. Folgende $EC_{50}$-Werte (= die effektive Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet wurden) wurden dabei rechnerisch erhalten:

**Tab. 3.2.1.1: Rechnerisch ermittelte $EC_{50}$-Werte in H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen nach Inkubation für 24 h und Durchführung eines MTT-Assays.** Die $EC_{50}$-Werte wurden rechnerisch mit Hilfe von GraphPad Prism® 5.0 ermittelt. n = 3-8, +/- SEM, der SEM wurde ausgehend des der $EC_{50}$ nächstgelegenen Wertes ermittelt.

| untersuchte Substanz | $EC_{50}$ [µM]: H4IIE | $EC_{50}$ [µM]: Hct 116 | $EC_{50}$ [µM]: C6 |
|---|---|---|---|
| **Bakuchalcon** | > 50 | > 50 | > 50 |
| **Bavachromen** | 23 +/- 1 | 14 +/- 1 | 37 +/- 2 |
| **Corylifol C** | > 50 | > 50 | > 50 |
| **Corylin** | 47 +/- 3 | 47 +/- 3 | > 50 |
| **DPHC** | > 50 | 45 +/- 7 | > 50 |
| **Isowighteon** | 22 +/- 2 | 21 +/- 1 | 28 +/- 1 |
| **6-Prenylnaringenin** | 33 +/- 5 | 34 +/- 4 | > 50 |
| **Psorachalcon A** | > 50 | > 50 | > 50 |
| **Sophoracoumestan A** | > 50 | > 50 | > 50 |
| **Wighteon** | 48 +/- 8 | 43 +/- 2 | > 50 |
| **Xanthoangelol** | 39 +/- 3 | 28 +/- 3 | 32 +/- 4 |

Die Flavanderivate Bavachromen, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol, sowie das Isoflavanderivat Isowighteon zeigten sich mit $EC_{50}$-Werten von < 40 µM als am meisten toxisch auf die untersuchten Zelllinien (**Tab. 3.2.1.1**). Der niedrigste $EC_{50}$-Wert war bei Bavachromen in Hct 116-Zellen zu beobachten (**Tab. 3.2.1.1**, **Abb. 3.2.1.2**). Isowighteon zeigte über alle drei getesteten Zelllinien hinweg die stärkste Zytotoxizität (**Abb. 3.2.1.3**), wobei auffällig war, dass sein Isomer Wighteon eine deutlich geringere Toxizität aufwies (**Abb. 3.2.1.4**). Diese Tatsache wurde in den folgenden Experimenten gesondert berücksichtigt und nähergehend untersucht. Wighteon (rot) und Isowighteon (blau) sind in allen weiteren Versuchen farblich kodiert.

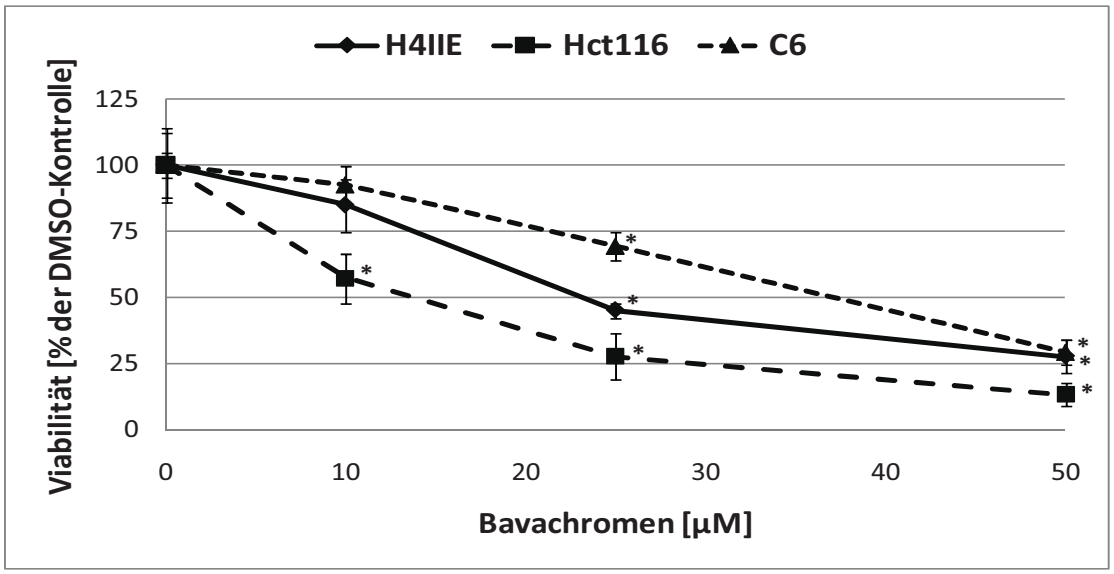



**Abb. 3.2.1.2 Viabilität von H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen nach Inkubation mit Bavachromen für 24 h.** $1x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit Bavachromen behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle (n = 3-6, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

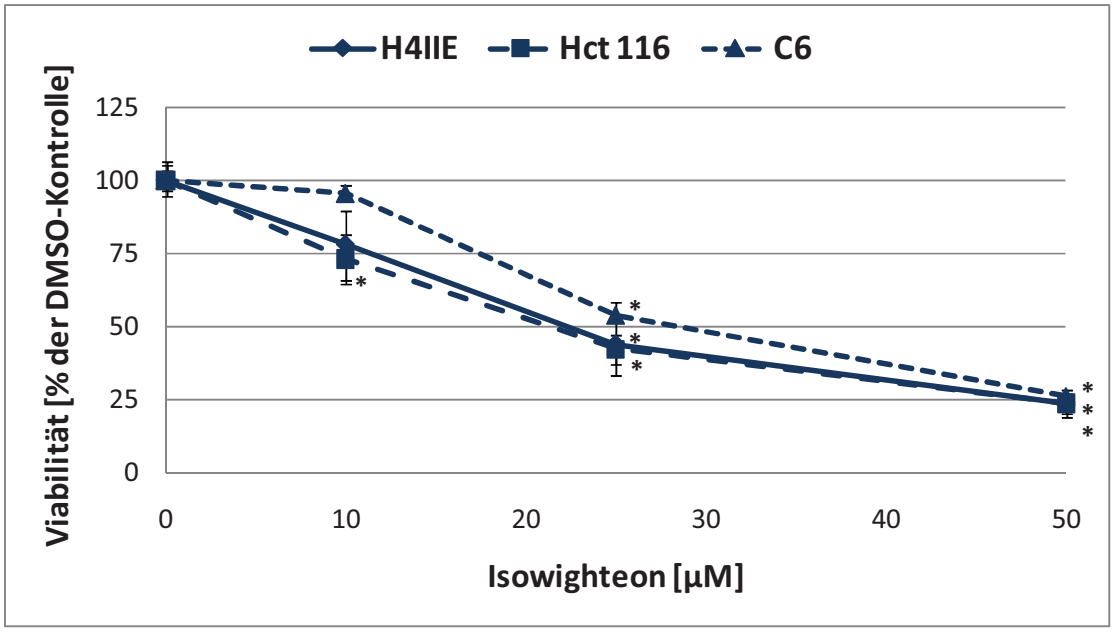



**Abb. 3.2.1.3 Viabilität von H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen nach Inkubation mit Isowighteon für 24 h.** $1x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle (n = 3-8, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/-SEM).

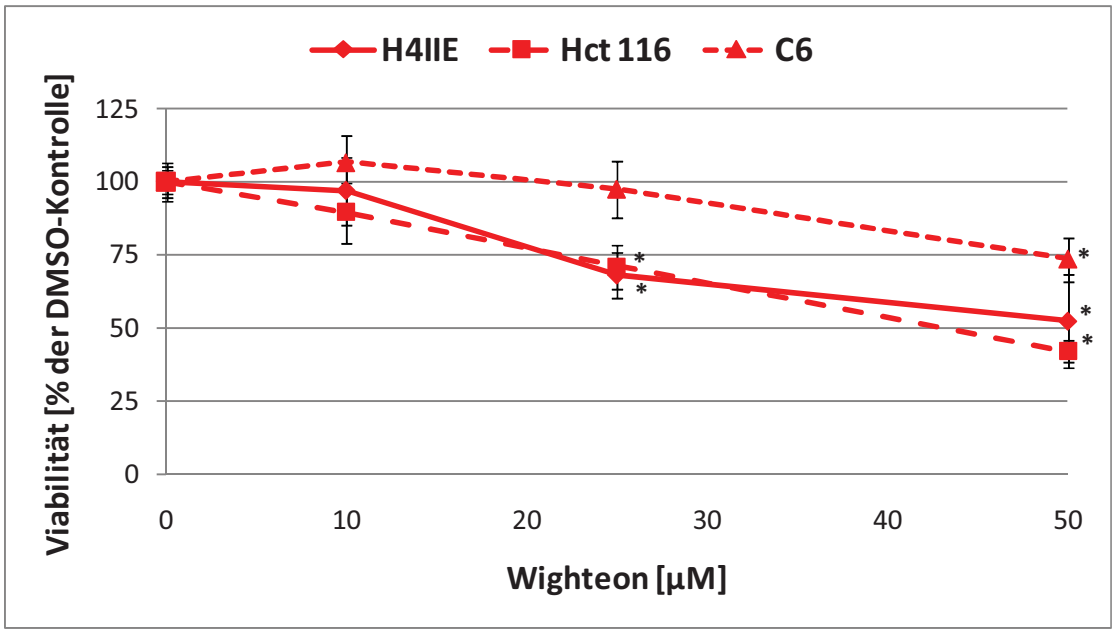



**Abb. 3.2.1.4 Viabilität von H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen nach Inkubation mit Wighteon für 24 h.** $1x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit Wighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle (n = 3-6, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.2.1.2 Vergleich der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien

Hct 116-Zellen reagierten auf einige Substanzen mit einer stärkeren Abnahme der Viabilität als H4IIE-Zellen. Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt bei Bavachromen, der zugehörige $EC_{50}$-Wert war in Hct 116-Zellen um 63 % (C6-Zellen)

bzw. 41 % (H4IIE-Zellen) niedriger ist als in den entsprechenden Vergleichszellen. Eine entsprechende Tendenz konnte zudem bei DPHC, Wighteon und Xanthoangelol beobachtet werden. Dahingegen zeigten C6-Zellen durchweg die vergleichsweise geringste Abnahme der Viabilität bei Zugabe der Substanzen gleicher Konzentration (vgl. Abschnitt **4.1.4**).

Insgesamt ließ sich für alle Substanzen außer Psorachalcon A, Sophoracoumestan A, Corylifol C und Bakuchalcon eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität im Bereich von 0 µM bis 50 µM nachweisen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nur Bavachromen, Isowighteon, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol eine nennenswerte Toxizität auf Hct 116-, H4IIE- und C6-Zellen ausübten. Obwohl Wighteon ein Isomer des Isowighteon ist, wies es eine deutlich geringere Zytotoxizität auf (vgl. Abschnitt **4.1.5**). In den unten beschriebenen Versuchen wurden weitere Unterschiede im Wirkspektrum dieser beiden Substanzen herausgearbeitet.

## 3.3 Form des Zelltodes: Apoptose versus Nekrose

Für einen möglichen Einsatz eines Stoffes als neuen antitumoralen Wirkstoff ist es von Bedeutung, dass die Substanz die Tumorzelle durch Induktion von Apoptose – statt Nekrose – abtötet. Die Apoptose beschreibt die Form des programmierten Zelltodes, in dessen Verlauf alle Zellbestandteile in einem energieabhängigen Prozess in membranbegrenzte, apoptotische Vesikel verpackt und phagozytotisch eliminiert werden (*Arends & Wyllie, 1991*). Bei der Nekrose hingegen kommt es zu einer Entzündungsreaktion (*Judah et al., 1965)*, die im Rahmen einer pharmakologischen Intervention bei bestehender Tumorerkrankung unerwünscht wäre und einer Verwendung einer Substanz als antitumorales Medikament im Wege stünde.

### 3.3.1 Caspase 3 und 7-Aktivierung der Substanzen

Beim bestverstandenen und meistuntersuchten Signalweg im Rahmen der Apoptose handelt es sich um die Caspase-Kaskade (*Earnshaw et al., 1999)*.

Es sollte ermittelt werden, ob die im MTT-Assay zytotoxisch wirkenden Substanzen die Zellen durch Apoptose abtöten und ob dies gegebenenfalls in konzentrationsabhängiger Weise geschieht (Abschnitt **3.3.2**). Mit Hilfe des Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay konnte die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 bzw. deren Veränderung

nach Zugabe der Substanzen (Anstieg dieser Caspasen als Hinweis auf Apoptose) fluorimetrisch nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die H4IIE-Zellen im Rahmen eines Screening-Versuchs mit *einer* Konzentration (25 µM) jeder Substanz für 24 h versetzt, um dann das relative Ausmaß der Caspase 3 und 7-Aktivierung zum Zeitpunkt t = 3 h nach Zugabe des Substrates ermitteln zu können (**Abb. 3.3.1.2**).

Dabei zeigte sich, dass diejenigen Substanzen, die im MTT-Assay in H4IIE-Zellen eine hohe Toxizität mit $EC_{50}$-Werten von < 50 µM aufwiesen, die Caspasen 3 und 7 im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay am stärksten aktivierten. So stieg die Caspase 3 und 7-Aktivität nach Zugabe dieser Substanzen um das 2,9- (Corylin) bis 7,1-fache (Isowighteon) an (**Tab. 3.3.1.1**).

**Tab. 3.3.1.1: Caspase 3 und 7-Induktion nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit den untersuchten Substanzen**. Das Ausmaß der Apoptoseinduktion ist dargestellt als x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung nach Inkubation mit 25 µM der untersuchten Substanzen für 24 h (t = 3 h). Die DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert, n = 3-6, +/- SEM, $RFU_{MW}$ (DMSO) = 11396. Zum Vergleich mit der Zytotoxizität im MTT-Assay (Abschnitt **3.2.1**) sind die zugehörigen $EC_{50}$-Werte aufgeführt, n = 3-8, +/- SEM, der SEM wurde ausgehend des der $EC_{50}$ nächstgelegenen Wertes ermittelt.

| untersuchte Substanz | x-fache Aktivierung der Caspasen 3 und 7 | $EC_{50}$ [µM] in H4IIE-Zellen |
|---|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 1,0 +/- 0,1 | > 50 |
| **Bakuchalcon** | 1,6 +/- 0,1 | > 50 |
| **Bavachromen** | 3,7 +/- 0,6 | 23 +/- 1 |
| **Corylifol C** | 1,2 +/- 0,1 | > 50 |
| **Corylin** | 2,9 +/- 0,4 | 47 +/- 3 |
| **DPHC** | 2,5 +/- 0,2 | > 50 |
| **Isowighteon** | 7,1 +/- 0,6 | 22 +/- 2 |
| **6-Prenylnaringenin** | 5,1 +/- 0,4 | 33 +/- 5 |
| **Psorachalcon A** | 1,1 +/- < 0,1 | > 50 |
| **Sophoracoumestan A** | 1,7 +/- 0,1 | > 50 |
| **Wighteon** | 3,4 +/- 0,2 | 48 +/- 8 |
| **Xanthoangelol** | 3,8 +/- 0,5 | 39 +/- 3 |

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Ausmaß der Zytotoxizität im MTT-Assay (s. $EC_{50}$-Werte) und der Stärke der Caspase 3- und 7-Induktion im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay (s. x-fache Aktivierung der Caspase 3 und 7). Als Ausnahme ist hier DPHC anzuführen, welches die Caspasen 3 und 7 trotz relativ geringer Zytotoxizität ($EC_{50}$ > 50 µM in H4IIE-Zellen) relativ stark (um das 2,5-fache) aktivierte (vgl. Abschnitt **4.2.1**).

Die geringer zytotoxisch wirkenden Substanzen (Bakuchalcon, Corylifol C, Psorachalcon A, Sophoracoumestan A) zeigten nach Inkubation der H4IIE-Zellen

erwartungsgemäß keine signifikante Änderung der Caspasen 3 und 7-Aktivität im Medium.

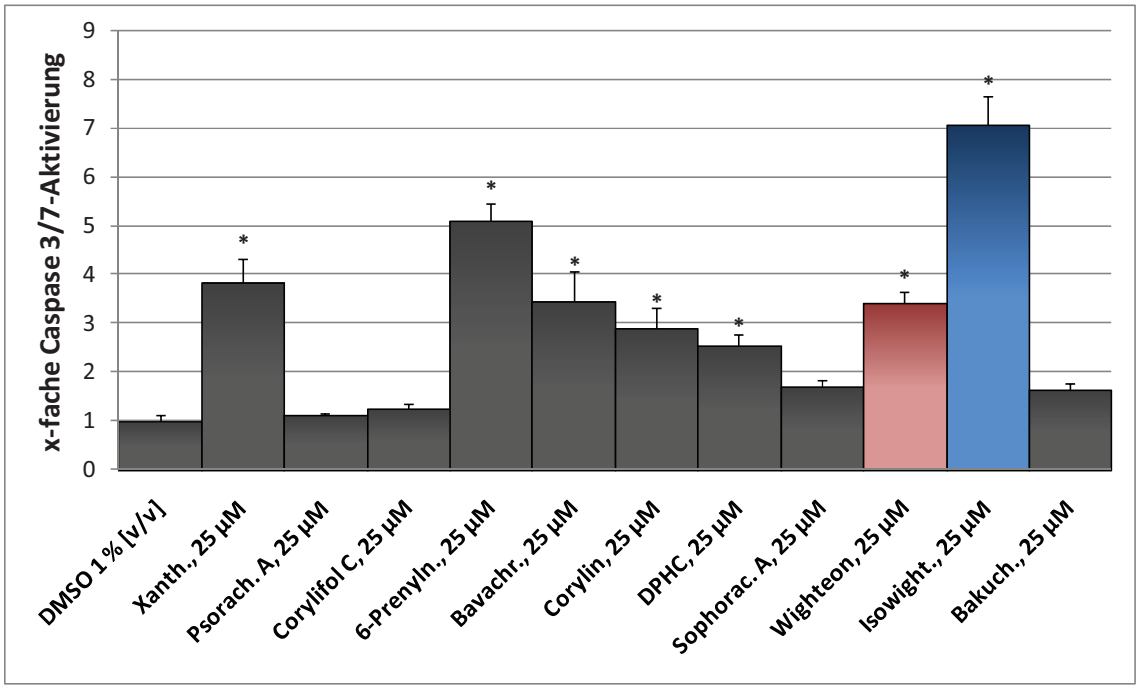



**Abb. 3.3.1.2 Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates in H4IIE-Zellen. Inkubation mit 25 µM der Testsubstanzen für 24 h.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit (> 90 % Konfluenz) mit 25 µM der Testsubstanzen behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates bezogen auf die DMSO-Kontrolle (auf 1 normiert). (n = 3-6, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM, $RFU_{MW}$ (DMSO) = 11396).

### 3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Caspase 3 und 7-Aktivierung durch Wighteon und Isowighteon

Isowighteon zeigte sowohl im MTT-Assay (Abschnitt **3.2.1**), als auch im Screening der Substanzen im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay (Abschnitt **3.3.1**) die stärksten Effekte. Daher sollte diese Substanz, gemeinsam mit seinem Isomer Wighteon, in anderen Konzentrationsbereichen auf die Fähigkeit, die Caspasen 3 und 7 zu aktivieren, untersucht werden. Das Ziel bestand darin, eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Caspase 3 und 7-Induktion durch Isowighteon nachzuweisen und mögliche Unterschiede dieser Eigenschaft zu Wighteon herauszuarbeiten. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen an Wighteon und Isowighteon (10, 25, 50 µM) versetzt und 3 h nach Zugabe des Caspase 3/7-Substrates die Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Fluoreszenzluminometer ermittelt.

**Isowighteon**

Das Isoflavanderivat Isowighteon führte bereits nach Inkubation mit 10 µM für 24 h zu einer signifikanten Änderung der Caspase 3 und 7-Aktivität im Medium (+ 4,8-fach) (**Tab. 3.3.2.1**). Es ließ sich zudem eine verstärkte Caspase 3 und 7-Aktivierung mit zunehmender Konzentration nachweisen. So erzeugte eine Behandlung der Zellen mit 25 µM einen 7,4-fachen, eine Behandlung mit 50 µM einen 12,8-fachen Anstieg der Caspase 3 und 7-Aktivität im Medium im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (**Abb. 3.3.2.3**).

**Tab. 3.3.2.1: x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates in H4IIE-Zellen, Inkubation mit Isowighteon für 24 h.** Angegeben sind die relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) und die x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung, die DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert, n = 3, +/-SEM.

| untersuchte Substanz | RFU | x-fache Aktivierung der Caspase 3 und 7 |
|---|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 12400 | 1,0 +/- 0,1 |
| **Isowighteon, 10 µM** | 59419 | 4,8 +/- 0,5 |
| **Isowighteon, 25 µM** | 91201 | 7,4 +/- 0,5 |
| **Isowighteon, 50 µM** | 158963 | 12,8 +/- 0,4 |

**Wighteon**

Das Isoflavanderivat Wighteon führte, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, in Konzentrationen von 25 µM und 50 µM ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen, signifikanten Anstieg der Caspase 3 und 7-Aktivität im Zellüberstand (+ 3,7-fach bzw. + 5,0-fach) (**Tab. 3.3.2.2**). Allerdings verursachte eine Inkubation von H4IIE-Zellen mit 10 µM für 24 h keine signifikante Aktivierung der Caspasen 3 und 7 (**Abb. 3.3.2.3**).

**Tab. 3.3.2.2 x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates in H4IIE-Zellen, Inkubation mit Wighteon für 24 h.** Angegeben sind die relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) und die x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung, die DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert, n = 3, +/- SEM.

| untersuchte Substanz | RFU | x-fache Aktivierung der Caspase 3 und 7 |
|---|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 11396 | 1,0 +/- 0,1 |
| **Wighteon, 10 µM** | 18430 | 1,5 +/- 0,2 |
| **Wighteon, 25 µM** | 46161 | 3,7 +/- 0,3 |
| **Wighteon, 50 µM** | 62396 | 5,0 +/- 0,4 |

Im Vergleich beider Substanzen lässt sich feststellen, dass sowohl 10 µM, als auch 25 µM und 50 µM Isowighteon die Caspase 3 und 7-Aktivität nach 24 h signifikant stärker erhöhen als entsprechende Konzentrationen von Wighteon (Abb. **3.3.2.3**).

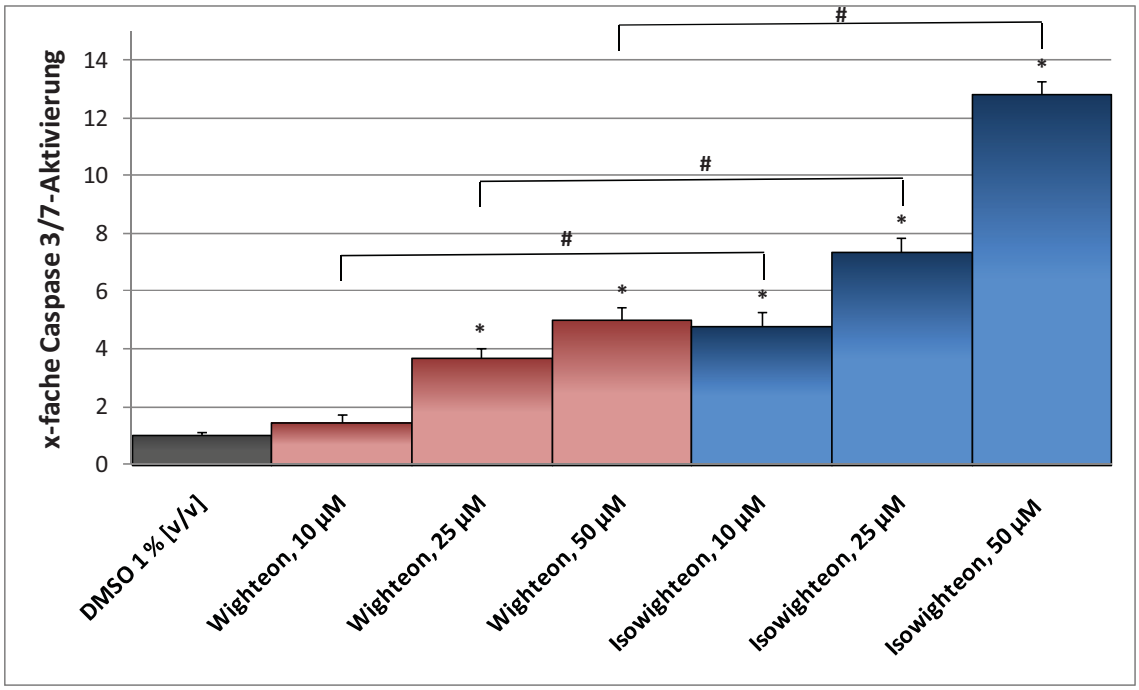



**Abb. 3.3.2.3 Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates in H4IIE-Zellen. Inkubation mit 10 µM, 25 µM und 50 µM Wighteon bzw. Isowighteon für 24 h.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit (> 90 % Konfluenz) mit 10 µM, 25 µM und 50 µM Wighteon bzw. Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die x-fache Caspase 3 und 7-Aktivierung 3 h nach Zugabe des Substrates bezogen auf die DMSO-Kontrolle (auf 1 normiert). (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$; +/- SEM).

### 3.3.3 LDH-Assay

Im Rahmen der Nekrose einer Zelle kommt es zur Freisetzung von LDH (Laktat-Dehydrogenase), einem stabilen Enzym, das Bestandteil des Zytoplasmas jeder Zelle ist und nach Verletzung der Membranintegrität im Zellüberstand nachgewiesen werden kann.

Analog zum durchgeführten Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay sollte mit Hilfe des LDH-Assays herausgefunden werden, ob die im MTT-Assay zytotoxisch wirkenden Testsubstanzen die Zellen durch Nekrose abtöten (Abschnitt **3.3.3.2**) und ob dies gegebenenfalls in konzentrationsabhängiger Weise geschieht (Abschnitt **3.3.3.3**). Dazu wurde in einem ersten Schritt die optimale Zellkonzentration ermittelt, bei der der LDH-Assay durchgeführt werden sollte (Abschnitt **3.3.3.1**).

#### 3.3.3.1 Bestimmung der optimalen Zellkonzentration

Da jede Zelllinie unterschiedliche Mengen an Laktat-Dehydrogenase (LDH) besitzt, musste vor dem eigentlichen Versuch eine einmalige Bestimmung der optimalen

Zellkonzentration an H4IIE-Zellen erfolgen, bei welcher das Experiment optimalen Bedingungen ausgesetzt ist (vgl. Abschnitt **2.2.3.2**). Die optimale Zellkonzentration ist diejenige Zellzahl, bei der sich die größte Differenz in der Absorption zwischen *low control* und *high control* zeigt. Die graphische Auftragung der erhaltenen Messwerte ist in Abb. **3.3.3.1.1** dargestellt.

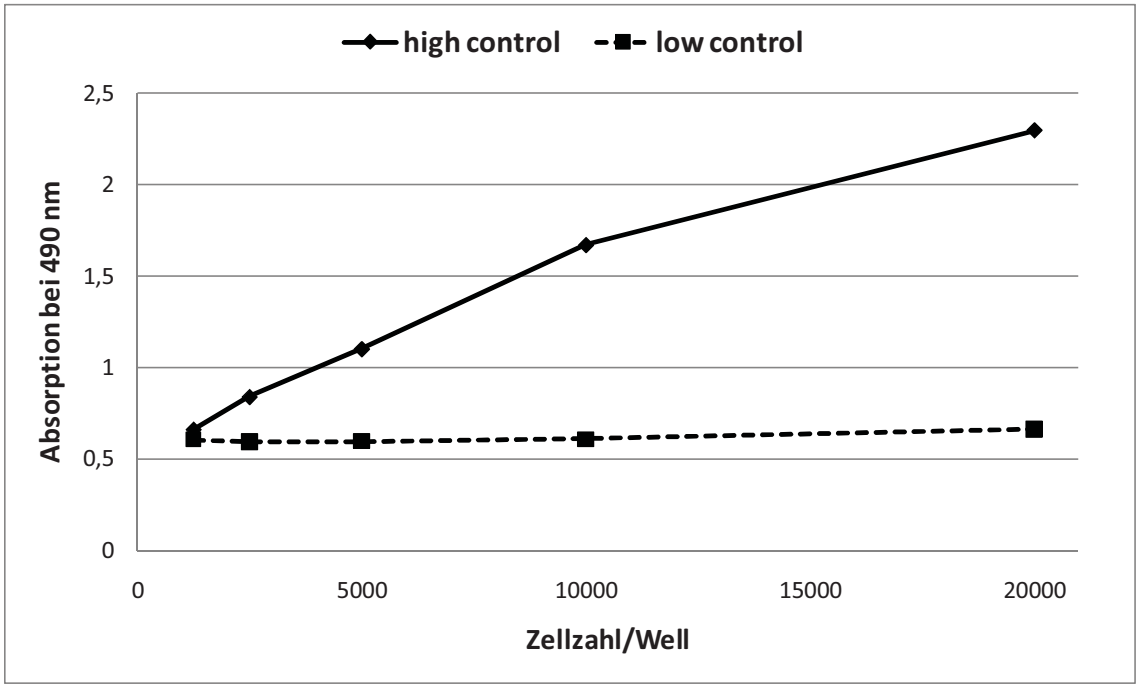



**Abb. 3.3.3.1.1 Bestimmung der optimalen Zellkonzentration für H4IIE-Zellen im LDH-Assay.**
$0{,}25 \times 10^4$ Zellen/Well bis $2{,}0 \times 10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte in 100 µL/Well ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die Absorption bei 490 nm (n = 1).

Während die Spontanfreisetzung (*low control*) an LDH mit steigender Zellzahl annähernd konstant bleibt, kommt es nach Lyse (*high control*) der H4IIE-Zellen zu dem zu erwartenden annähernd linearen Anstieg der Absorption im Zellüberstand, entsprechend einer linear wachsenden LDH-Aktivität (**Abb. 3.3.3.1.1**).
Um möglichst ähnliche Untersuchungsbedingungen im MTT- und LDH-Assay zu schaffen, wurde für die nachfolgenden LDH-Assays eine dem MTT-Assay identische Zellkonzentration von $1{,}0 \times 10^4$ Zellen/Well ausgewählt.

### 3.3.3.2 Einfluss der Substanzen auf die LDH-Aktivität

Die H4IIE-Zellen wurden nun analog zum Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay in einem weiteren Screening-Versuch mit *einer* Konzentration (25 µM) jeder Substanz für 24 h versetzt. Es sollte herausgefunden werden, ob nicht neben der

Apoptose-Induktion (Abschnitt **3.3.1**) auch der nekrotische Zelltod in der Wirkung der untersuchten Substanzen eine wichtige Rolle spielt.

Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte sich nach Inkubation der H4IIE-Zellen mit 25 µM für 24 h bei zehn von elf Substanzen, unabhängig von der im MTT-Assay gemessenen Zytotoxizität (Abschnitt **3.2.1**), keine signifikante Erhöhung der gemessenen LDH-Aktivität als Hinweis für eine Nekrose im abgenommenen Zellüberstand (**Abb. 3.3.3.2.2**). D. h. die im MTT-Assay toxisch wirksamen Substanzen erhöhten die LDH-Aktivität im Medium nach Inkubation für 24 h nicht signifikant. Lediglich die entsprechende Behandlung mit 6-Prenylnaringenin ($EC_{50}$ = 33 µM in H4IIE-Zellen) führte zu einer signifikanten Zunahme der nekrotischen Zellen (13,6 % gegenüber 3,1 % in der DMSO-Kontrolle) (**Tab. 3.3.3.2.1**).

**Tab. 3.3.3.2.1: % der maximalen LDH-Aktivität in H4IIE-Zellen nach Inkubation mit 25 µM der Substanzen für 24 h (LDH-Assay).** Auswertung zum Zeitpunkt t = 30 min nach Zugabe der Reaktionslösung, n = 3, +/- SEM. Zum Vergleich der Zytotoxizität Angabe der $EC_{50}$-Werte in H4IIE-Zellen aus dem MTT-Assay. (Abschnitt **3.2.1**), n = 3-8, +/- SEM, der SEM wurde ausgehend des der $EC_{50}$ nächstgelegenen Wertes ermittelt.

| untersuchte Substanz | % der max. LDH-Aktivität | $EC_{50}$ [µM]: H4IIE |
|---|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 3,1 +/- 1,3 | > 50 |
| **Bakuchalcon** | 4,8 +/- 3,8 | > 50 |
| **Bavachromen** | 6,3 +/- 5,9 | 23 +/- 1 |
| **Corylifol C** | 5,5 +/- 1,8 | > 50 |
| **Corylin** | 1,9 +/- 1,5 | 47 +/- 3 |
| **DPHC** | 2,2 +/- 1,6 | > 50 |
| **Isowighteon** | 7,6 +/- 5,6 | 22 +/- 2 |
| **6-Prenylnaringenin** | 13,6 +/- 5,8 | 33 +/- 5 |
| **Psorachalcon A** | 5,7 +/- 2,5 | > 50 |
| **Sophoracoumestan A** | 5,8 +/- 2,3 | > 50 |
| **Wighteon** | 5,4 +/- 1,0 | 48 +/- 8 |
| **Xanthoangelol** | 8,0 +/- 4,3 | 39 +/- 3 |

Es lässt sich somit sagen, dass die untersuchten Substanzen mit $EC_{50}$-Werten < 50 µM in H4IIE-Zellen (inkl. Wighteon und Isowighteon), die Zelle nach Inkubation mit 25 µM für 24 h eher durch Apoptose als durch Nekrose abtöten. Bei der Substanz 6-Prenylnaringenin scheinen als zytotoxische Prinzipien beide Formen des Zelltodes eine Rolle zu spielen (vgl. Abschnitt **4.2.1**).

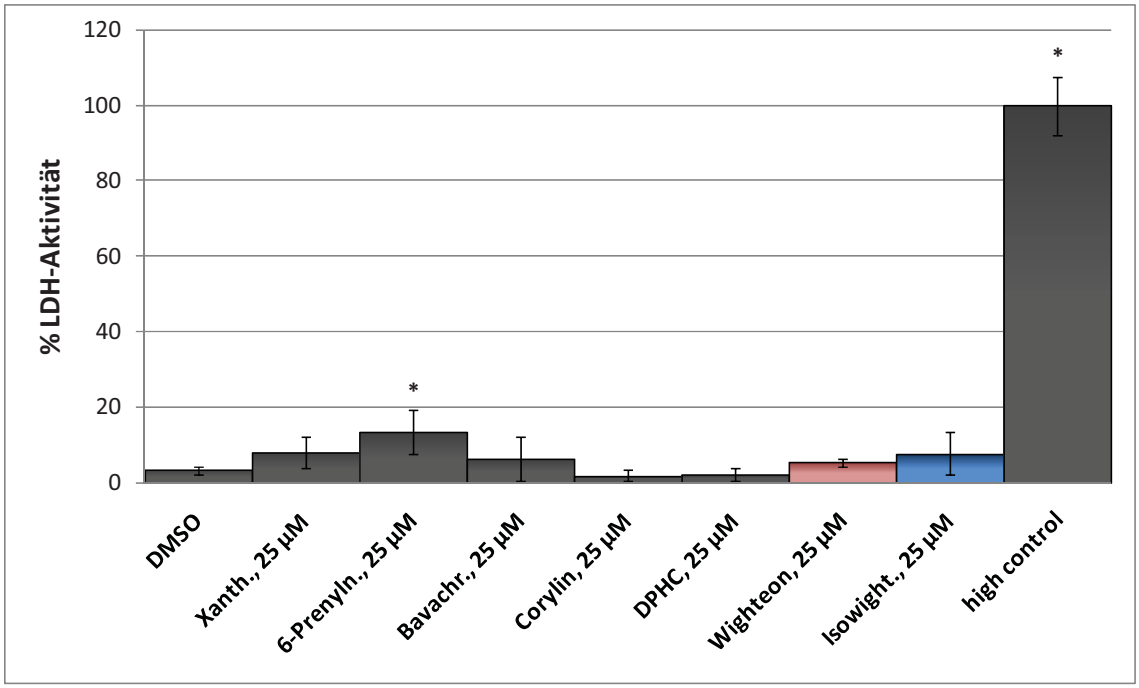



**Abb. 3.3.3.2.2 % der maximalen LDH-Aktivität in H4IIE-Zellen nach Inkubation mit 25 µM der Substanzen für 24 h (LDH-Assay).**
Auswertung zum Zeitpunkt t = 30 min nach Zugabe der Reaktionslösung. $1x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit 25 µM der Testsubstanzen behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die LDH-Aktivität in % der *high control*. Die *high control* wurde auf 100 % normiert. (n = 3; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der LDH-Aktivität durch Wighteon und Isowighteon

Nun sollte, analog zum Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay, untersucht werden, ob bei den besonders interessierenden Substanzen Wighteon und Isowighteon eine Konzentrationsabhängigkeit bzgl. der Auslösung einer Nekrose besteht. Dazu wurden wiederum drei Konzentrationen von 10 µM, 25 µM und 50 µM gewählt und methodisch entsprechend des Versuchsteils **3.3.3.2** vorgegangen.

Es zeigte sich bei beiden Isoflavanderivaten Wighteon und Isowighteon, dass es erst bei einer Inkubationskonzentrationen von 50 µM für 24 h zu einem signifikanten Anstieg der LDH im Zellmedium kommt (**Tab. 3.3.3.3.1**).

**Tab. 3.3.3.3.1: % der maximalen LDH-Aktivität in H4IIE-Zellen nach Inkubation mit Wighteon und Isowighteon für 24 h (LDH-Assay).** Auswertung zum Zeitpunkt t = 30 min nach Zugabe der Reaktionslösung, n = 3, +/- SEM. Zum Vergleich sind die Mittelwerte der Absorption bei 490 nm angegeben.

| untersuchte Substanz | % der max. LDH-Aktivität | Absorption bei 490 nm (MW) |
|---|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 4,7 +/- 1,2 | 0,071 |
| **Wighteon, 10 µM** | 4,7 +/- 1,6 | 0,071 |
| **Wighteon, 25 µM** | 4,6 +/- 1,2 | 0,069 |
| **Wighteon, 50 µM** | 43,2 +/- 1,5 | 0,652 |
| **Isowighteon, 10 µM** | 3,7 +/- 0,6 | 0,056 |
| **Isowighteon, 25 µM** | 8,4 +/- 1,3 | 0,127 |
| **Isowighteon, 50 µM** | 42,1 +/- 2,6 | 0,635 |

Es lässt sich keine lineare Abhängigkeit zwischen verwendeter Konzentration und der LDH-Aktivität im Medium zeigen. Vielmehr zeigt sich ein sprunghafter Anstieg der nekrotischen Zellen (Wighteon: von 4,7 % auf 43,2 %, Isowighteon: von 4,7 % auf 42,1 %) bei Anwendung einer Konzentration von 50 µM (**Abb. 3.3.3.3.2**).

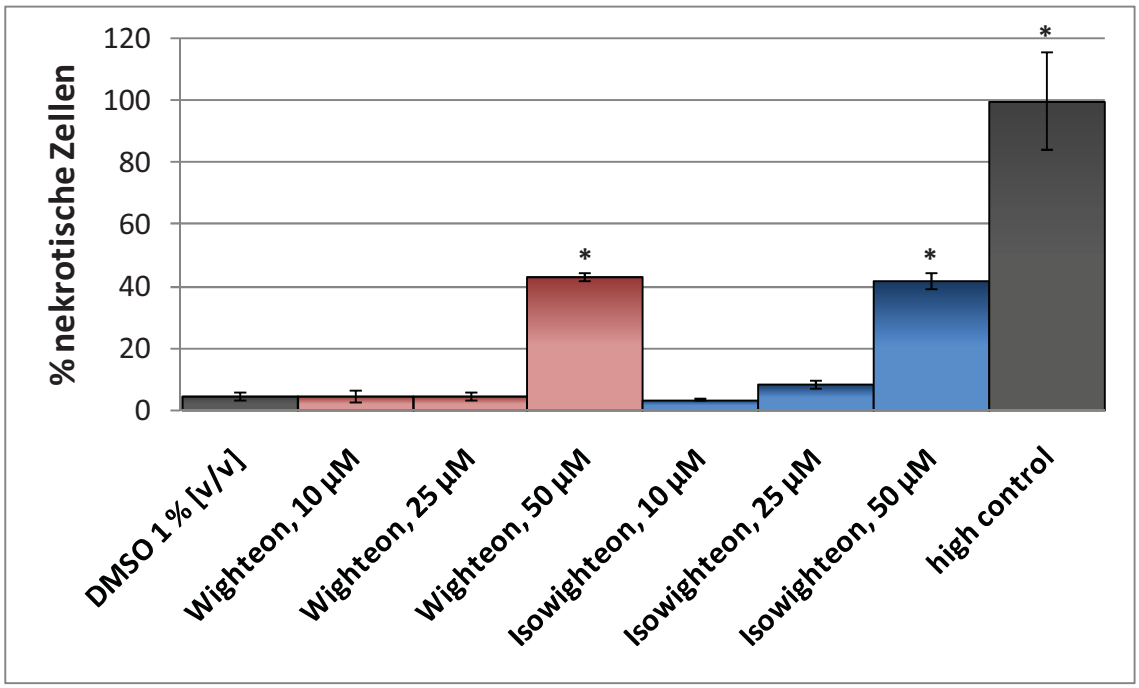



**Abb. 3.3.3.3.2 % der nekrotischen Zellen in H4IIE-Zellen nach Inkubation mit Wighteon und Isowighteon für 24 h (LDH-Assay).**
1x10$^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit 10 µM, 25 µM und 50 µM Wighteon bzw. Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Auswertung zum Zeitpunkt t = 30 min nach Zugabe der Reaktionslösung. Dargestellt ist der Anteil der nekrotischen Zellen in % (ausgehend von der LDH-Aktivität in % der *high control*). Die *high control* wurde auf 100 % normiert. (n = 3; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

Nach Abnahme von 50 µL des Überstandes für den LDH-Assay wurde an diesen Versuchsteil ein MTT-Assay angeschlossen, um zu kontrollieren, ob die Zellen tatsächlich abgetötet wurden, so dass die gemessene LDH als die aus den zerstörten

Zellen freigesetzte LDH angesehen werden konnte (**Abb. 3.3.3.3.3**). Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen denen aus Versuchsteil **3.2.1**.

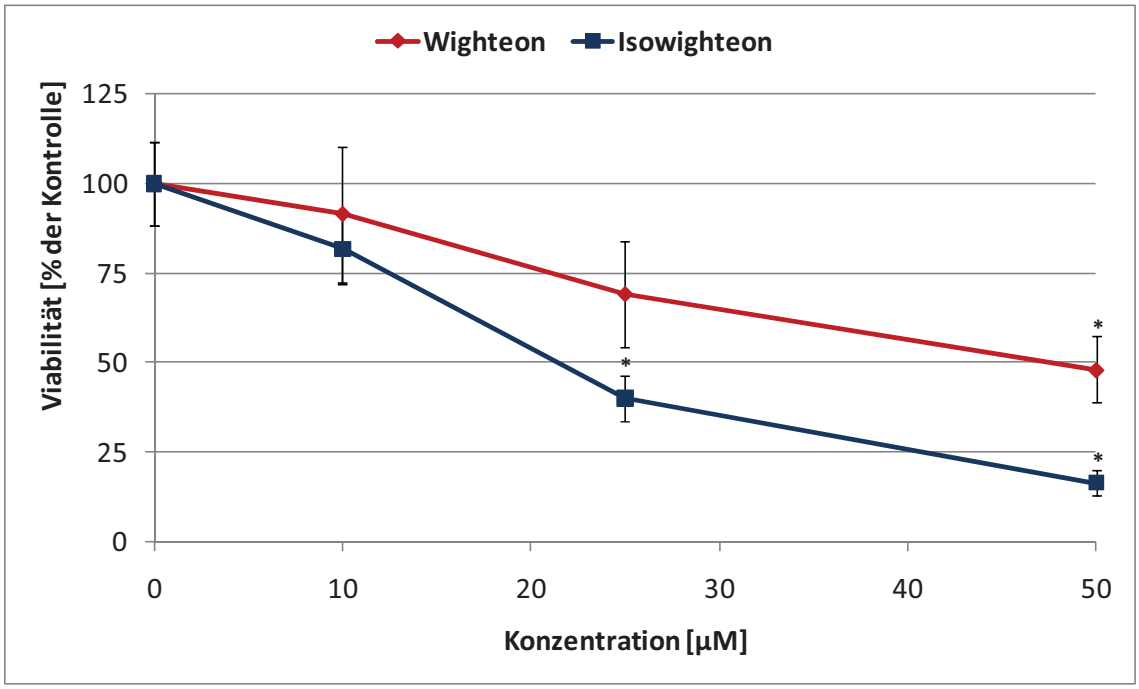



**Abb. 3.3.3.3.3 Viabilität von H4IIE-Zellen nach Inkubation mit Wighteon und Isowighteon für 24 h.**
$1x10^4$ Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit Wighteon oder Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden 50 µL Zellmedium aus jedem Well abgenommen und ein LDH-Assay durchgeführt. Mit den im Well verbliebenen Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die im MTT-Assay berechnete Viabilität in Prozent bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle (n = 3); *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.3.4 Proapoptotische Wirkung der Substanzen im Life-Dead-Assay

Ergänzend zum Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay sollte mit der Methode des Life-Dead-Assays ein *zweiter* Nachweis zu der im Abschnitt **3.3.1** und **3.3.2** gezeigten proapoptotischen Wirksamkeit von Wighteon und Isowighteon geführt werden. Der Vorteil dieses Versuchs liegt darin, gleichzeitig apoptotische und nekrotische Zellen aufgrund ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens differenzieren zu können.

Der Fluoreszenzfarbstoff *bis*-Benzimid führt nach Zugabe zu einer Anfärbung der Zellkerne *aller* Zellen. Da es im Verlauf der Apoptose zu Umbauprozessen des Zellkerns (u.a. Bildung *apoptotischer Körperchen*) kommt, kann neben der Gesamtzellzahl die Menge apoptotischer Zellen bestimmt werden (*Oberhammer et al., 1992)*. Der zweite eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid hingegen lässt Rückschlüsse auf den Anteil nekrotischer Zellen zu, da nur eine zerstörte Zellmembran die Interkalation des Farbstofffes in die DNA zulässt (*Waring, 1965*).

In den Versuchen zeigte sich, dass sowohl Wighteon, als auch Isowighteon bei den verwendeten Konzentrationen bis 25 µM ein gewisses proapoptotisches, jedoch kein pronekrotisches Potential aufweisen (**Abb. 3.3.4.1, 3.3.4.3**). Dieses proapoptotische Potential ist bei Isowighteon (Anteil apoptotischer Zellen bei 25 µM: 37,3 %) signifikant stärker ausgeprägt als bei Wighteon (Anteil apoptotischer Zellen bei 25 µM: 19,2 %).

In **Abb. 3.3.4.1** wird zudem deutlich, dass Wighteon erst ab einer Konzentration von 25 µM, Isowighteon bereits ab 10 µM (Anteil apoptotischer Zellen: 21,3 %) H4IIE-Zellen nach 24 h-Inkubation apoptotisch eliminiert. Bei Konzentrationen von 5 µM sind bei beiden untersuchten Substanzen keine proapoptotischen Effekte zu erkennen.

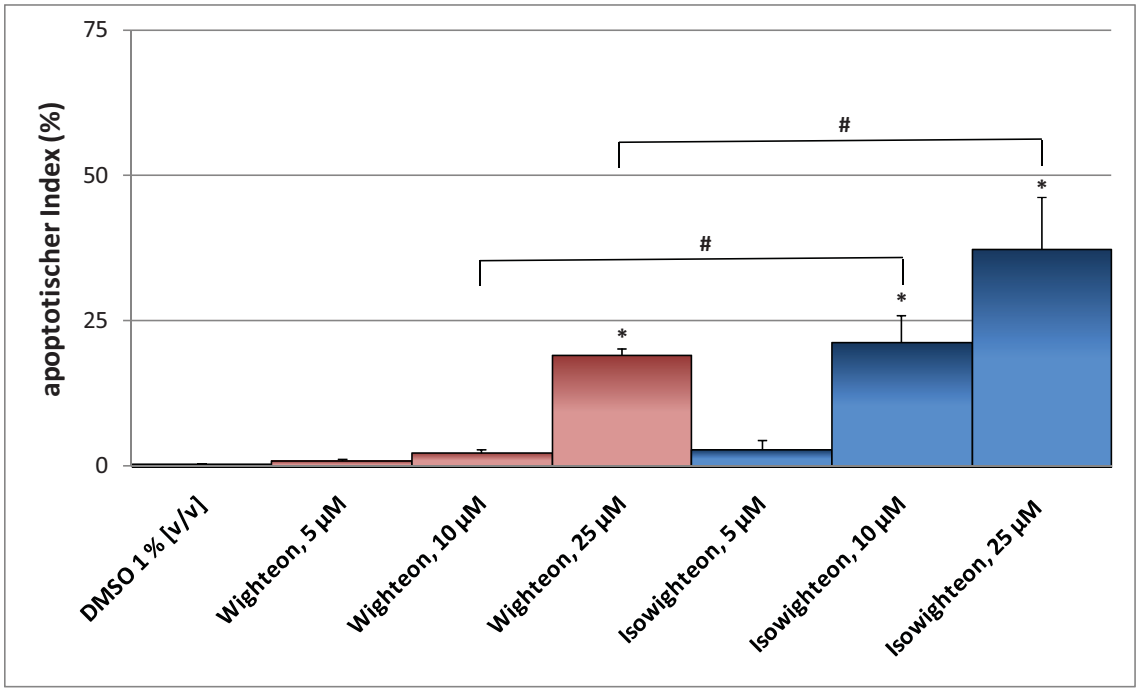



**Abb. 3.3.4.1 Anteil apoptotischer Zellen in H4IIE-Zellen nach Durchführung eines Life-Dead-Assays. Inkubation mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon für 24 h.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einem 8-Well-Chamber-Slide ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Life-Dead-Assay durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen als apoptotischer Index in %. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$; +/- SEM).

Die relativen Werte sind **Tab. 3.3.4.2** aufgeführt:

**Tab. 3.3.4.2: Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit Wighteon bzw. Isowighteon für 24 h (Life-Dead-Assay).** Angegeben ist der Anteil apoptotischer Zellen als apoptotischer Index in %. n = 3, +/- SEM.

| untersuchte Substanz | apoptotischer Index in % |
|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 0,39 +/- 0,1 |
| **Wighteon, 5 µM** | 1,00 +/- 0,3 |
| **Wighteon, 10 µM** | 2,27 +/- 0,5 |
| **Wighteon, 25 µM** | 19,19 +/- 0,9 |
| **Isowighteon, 5 µM** | 2,79 +/- 1,6 |
| **Isowighteon, 10 µM** | 21,27 +/- 4,8 |
| **Isowighteon, 25 µM** | 37,31 +/- 9,1 |

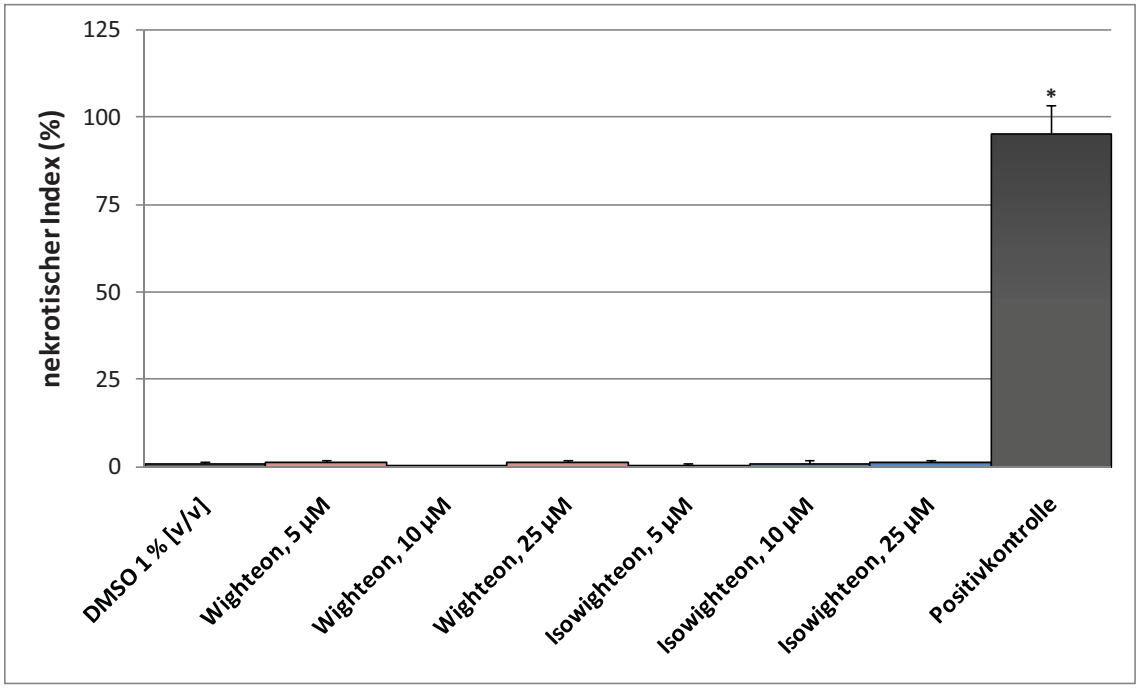



**Abb. 3.3.4.3 Anteil nekrotischer Zellen in H4IIE-Zellen nach Durchführung eines Life-Dead-Assays. Inkubation mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon für 24 h.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einem 8-Well-Chamber-Slide ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon behandelt. Als Positivkontrolle wurde $H_2O_2$ (500 µM) verwendet. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Life-Dead-Assay durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil nekrotischer Zellen als nekrotischer Index in %. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

In einem letzten Schritt wurden von den ausgezählten Zellen am Fluoreszenzmikroskop Fotos erstellt, um die morphologischen Unterschiede besser verdeutlichen zu können. Die Fotos Nr. **1-3** zeigen dabei die untersuchten H4IIE-Zellen der DMSO-Kontrolle (Nr. **1**: Durchlicht, Nr. **2**: *bis*-Benzimid-Färbung, Nr. **3**: Propidiumiodid-Färbung). Eine Positivkontrolle wurde mit $H_2O_2$ (500 µM) durchgeführt.

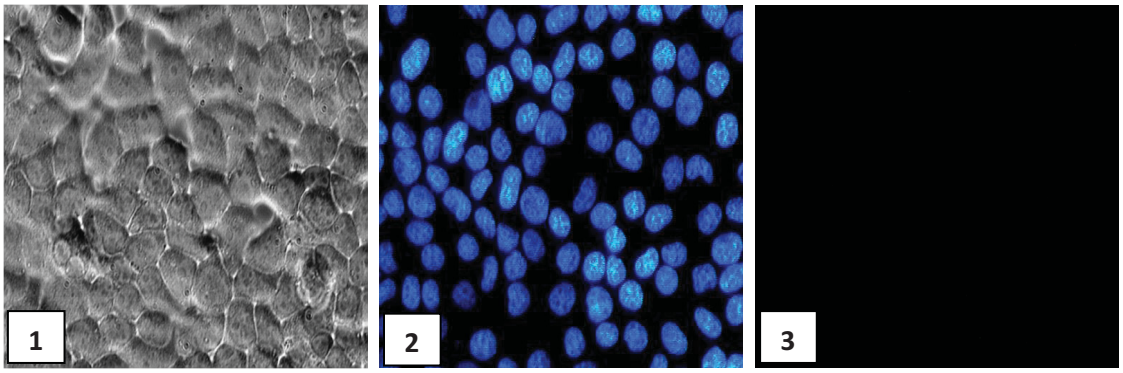



**Abb. 3.3.4.4 DMSO-Kontrolle in H4IIE-Zellen nach 24 h-Inkubation und Durchführung eines Life-Dead-Assays im Fluoreszenzmikroskop.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einem 8-Well-Chamber-Slide ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit DMSO behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Life-Dead-Assay durchgeführt. Dargestellt sind das Durchlichtbild (**1**), die *bis*-Benzimid-Färbung (**2**), sowie die Propidiumiodid-Färbung (**3**) in 400-facher Vergrößerung.

Auf den Fotos Nr. **4-6** zum Vergleich die entsprechenden Bilder nach Behandlung mit 25 µM Isowighteon für 24 h (Nr. **1**: Durchlicht, Nr. **2**: *bis*-Benzimid-Färbung, Nr. **3**: Propidiumiodid-Färbung). Auf Bild Nr. **4** ist bereits eine deutlich reduzierte Adhärenz und Konfluenz der H4IIE-Zellen zu sehen. Bild Nr. **5** lässt zusätzlich die typische Kondensation des Chromatins, sowie die Formation *apoptotischer Vesikel* erkennen. Foto Nr. **6** zeigt eine in Auflösung begriffene nekrotische Zelle. Bei beiden Bildreihen handelt es sich um repräsentative Ausschnitte im entsprechenden Well des Chamber-Slides.

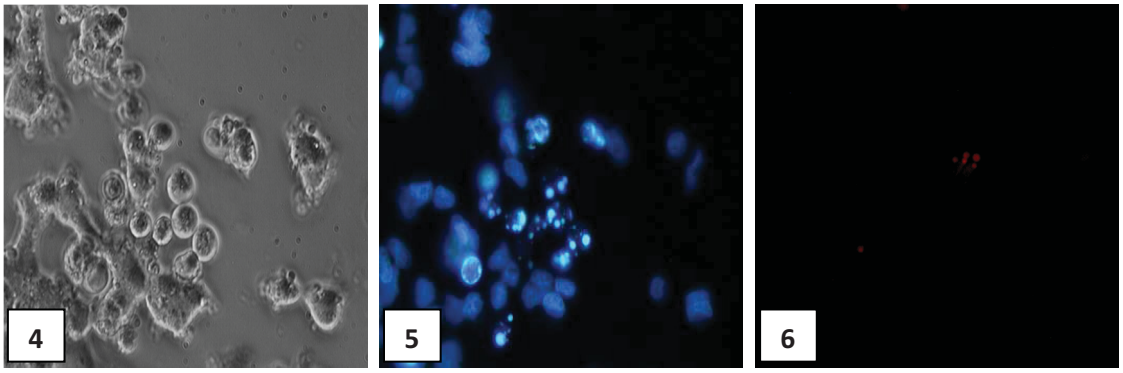



**Abb. 3.3.4.5 H4IIE-Zellen nach 24 h-Inkubation mit 25 µM Isowighteon und Durchführung eines Life-Dead-Assays am Fluoreszenzmikroskop.**
$5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einem 8-Well-Chamber-Slide ausplattiert und nach 24 h Anwachszeit mit 25 µM Isowighteon behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde ein Life-Dead-Assay durchgeführt. Dargestellt sind das Durchlichtbild (**4**), die *bis*-Benzimid-Färbung (**5**), sowie die Propidiumiodid-Färbung (**6**) in 400-facher Vergrößerung.

## 3.4 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade

Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Erforschung der modulierenden Wirkung der untersuchten Substanzen auf den Aktivitätszustand bestimmter Proteine der

intrazellulären MAPK-Kaskade (vgl. Abschnitt **1.6**). Zu diesem Zweck wurden SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen durchgeführt. Der MAPK-Signalweg ist in viele für die Zelle lebenswichtigen Funktionen wie Embryogenese, Differenzierung, Proliferation und *Apoptose* involviert und kann bei zahlreichen Krebserkrankungen dysreguliert vorliegen.

### 3.4.1 Western Blot

#### 3.4.1.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung

Zunächst wurde die Wirkung der Substanzen aus *Psoralea corylifolia* auf den Phosphorylierungs- und damit Aktivitätszustand der Proteinkinase ERK untersucht, also der Frage nachgegangen, inwieweit sich dieser durch vorherige Inkubation mit den Substanzen verändert. Dazu wurden (wie in alle nachfolgenden Western Blot-Untersuchungen) nur diejenigen Verbindungen verwendet, die im MTT-Assay (Abschnitt **3.2**) einen $EC_{50}$-Wert von unter 50 µM in H4IIE-Zellen zeigten. Als Ausnahme ist hier DPHC anzuführen, was trotz seiner geringen Zytotoxizität im MTT-Assay auf eine mögliche modulierende Wirkung auf die Aktivität der ERK untersucht wurde, da diese Substanz im Rahmen der Dissertation erstmalig beschrieben wurde.

Nach einer 3 h-Inkubation mit 25 µM der Substanzen zeigte sich lediglich beim Isoflavonderivat Isowighteon eine signifikante Abnahme der ERK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen, was einem verminderten Aktivierungszustand dieser Proteinkinase entspricht (**Abb. 3.4.1.1.1 b und 3.4.1.1.2**). Bei allen anderen untersuchten Substanzen, einschließlich Wighteon konnte nach statistischer Analyse der durchgeführten Versuche keine signifikante Änderung im Aktivierungszustand der ERK detektiert werden. Die Gesamtmenge an in der Zelle befindlicher ERK (**Abb. 3.4.1.1.1 a**) wurde durch keine der Substanzen beeinflusst.

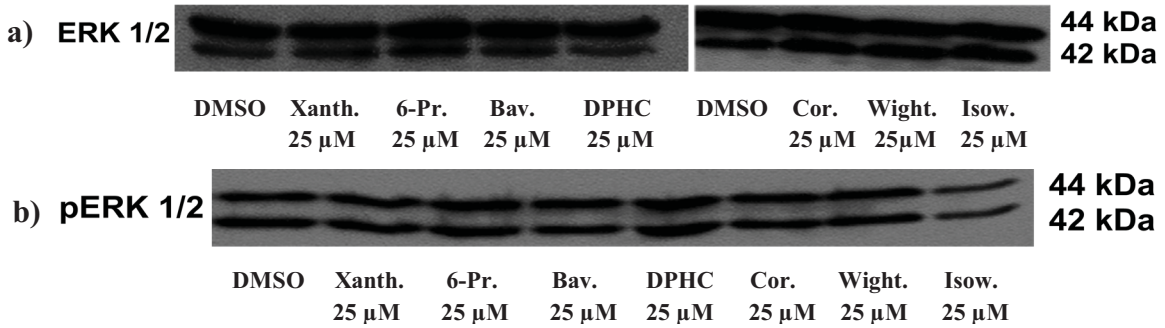



**Abb. 3.4.1.1.1 Einfluss der Substanzen (jeweils 25 µM für 3 h) auf die ERK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen.**

$7{,}5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt.

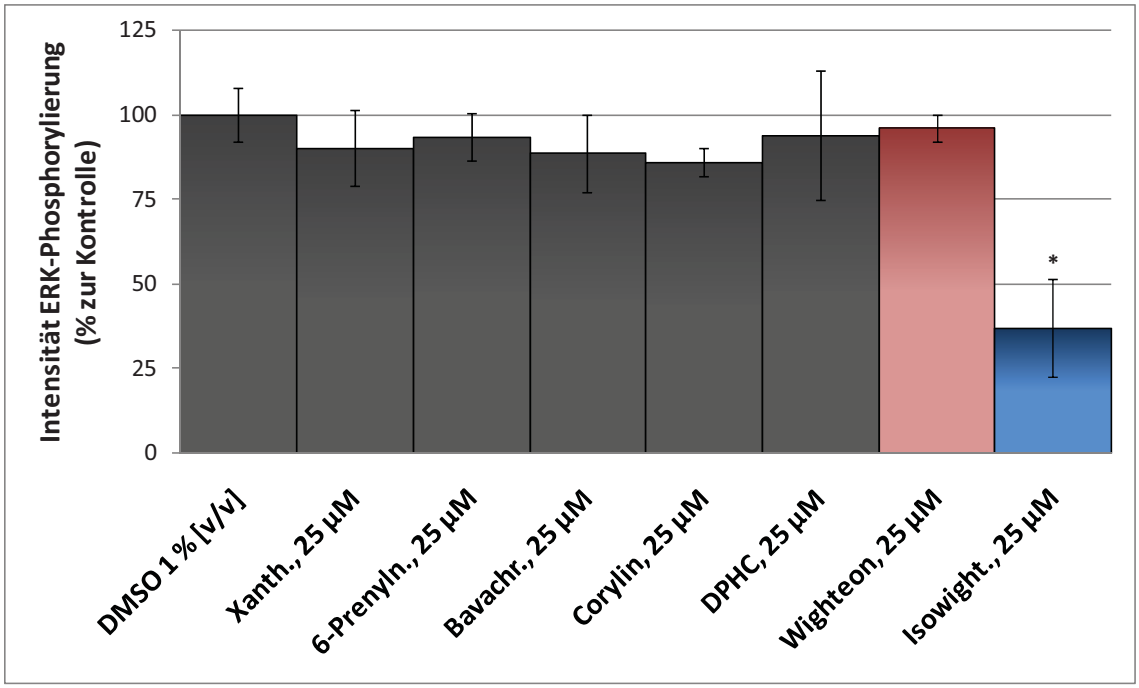



**Abb. 3.4.1.1.2 Densitometrische Auswertung der ERK-Phosphorylierung nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit 25 µM jeder Substanz für 3 h.**
$7{,}5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der ERK-Phosphorylierung in % zur DMSO-Kontrolle (n = 3, *: $p < 0{,}05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

Da sich Isowighteon als die einzige die ERK-Phosphorylierung bei einer Konzentration von 25 µM modulierende Substanz herausstellte, sollte in einem zweiten Schritt mit zwei weiteren Konzentrationen untersucht werden, ob die Proteinkinase ERK *konzentrationsabhängig* inhibiert werden kann. Sein Isomer Wighteon wurde erneut parallel untersucht, um die sich im ersten Versuchsteil gezeigten Unterschiede in der Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung deutlicher herauszuarbeiten.

Es stellte sich nach Inkubation mit Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 25 µM Isowighteon heraus, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der ERK-Phosphorylierung kam, wohingegen Wighteon den entgegengesetzten Effekt verursachte. Es verstärkte die ERK-Phosphorylierung konzentrationsabhängig (**Abb. 3.4.1.1.3 b,** vgl. Abschnitt **4.3.1**). 10 µM Isowighteon führten zu einer Abnahme der ERK-Phosphorylierung um 27,5 %, 25 µM zu einer Abnahme von 63,4 %. 10 µM Wighteon verstärkte die ERK-Phosphorylierung um 22,3 %, 25 µM um 31,8 % (**Abb. 3.4.1.1.4**). Die Gesamtmenge an in den Zellen befindlicher ERK wurde im beschriebenen Versuch erwartungsgemäß nicht verändert (**Abb. 3.4.1.1.3 a**).

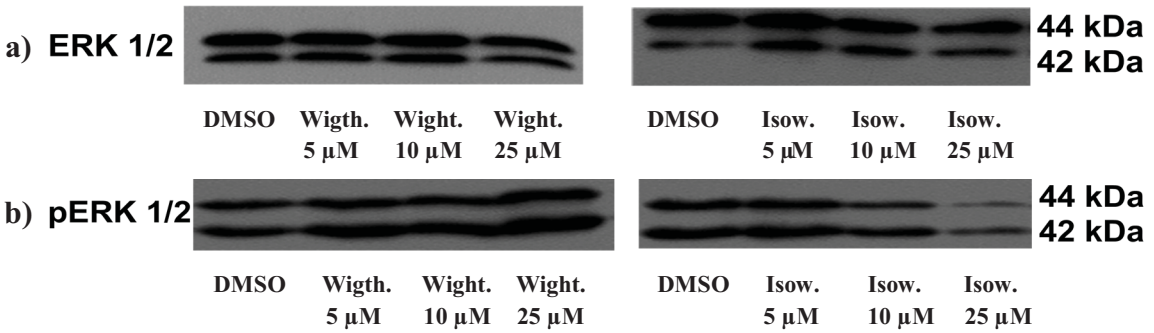



**Abb. 3.4.1.1.3 Einfluss von Wighteon bzw. Isowighteon (5 µM, 10 µM, 25 µM, für 3 h) auf die ERK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt.

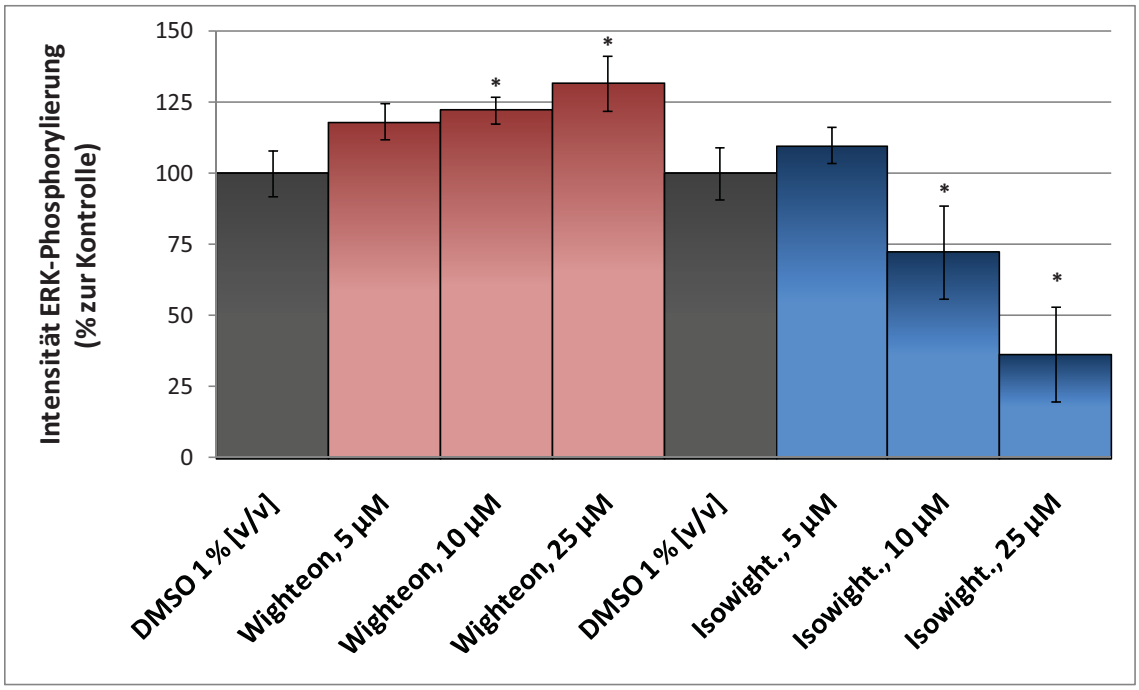



**Abb. 3.4.1.1.4 Densitometrische Auswertung der ERK-Phosphorylierung nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit Wighteon bzw. Isowighteon (5 µM, 10 µM, 25 µM für 3 h).**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der ERK-Phosphorylierung in % zur DMSO-Kontrolle (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.4.1.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung

Nachfolgend wurde die stromaufwärts von ERK lokalisierte Proteinkinase MEK (vgl. Abschnitt **1.6**) auf ihren Phosphorylierungszustand, sowie den Einfluss der Substanzen auf diesen untersucht. In erster Linie sollte jedoch ermittelt werden, ob Isowighteon bereits an dieser der ERK vorgeschalteten Kinase in die MAPK-Kaskade eingreift. Die zytotoxischen Substanzen und DPHC wurden erneut mit einer Konzentration von 25 µM analysiert.

Es stellte sich bei diesem Versuch ebenfalls eine Inhibition der Phosphorylierung von MEK durch Isowighteon (- 81,8 %), allerdings auch durch die Substanzen Xanthoangelol (- 91,6 %), 6-Prenylnaringenin (- 97,8 %) und Bavachromen (- 96,9 %) heraus, die auf die ERK-Phosphorylierung keinen Einfluss hatten (**Abb. 3.4.1.2.1 b, 3.4.1.2.2**) (Abschnitt **4.3.2**).

Die basale MEK-Aktivität in der Zelle blieb durch Inkubation mit 25 µM der Substanzen unberührt (**Abb. 3.4.1.2.1 a**).

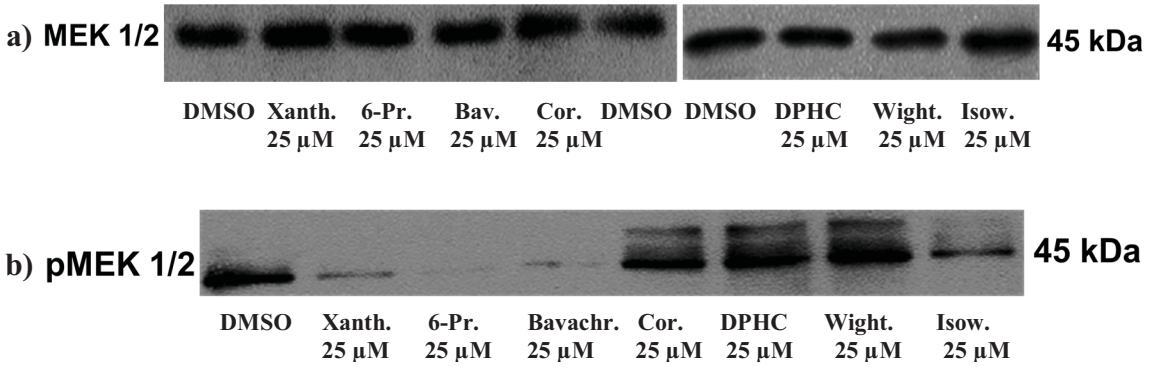



**Abb. 3.4.1.2.1 Einfluss der Substanzen (jeweils 25 µM für 3 h) auf die MEK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt.

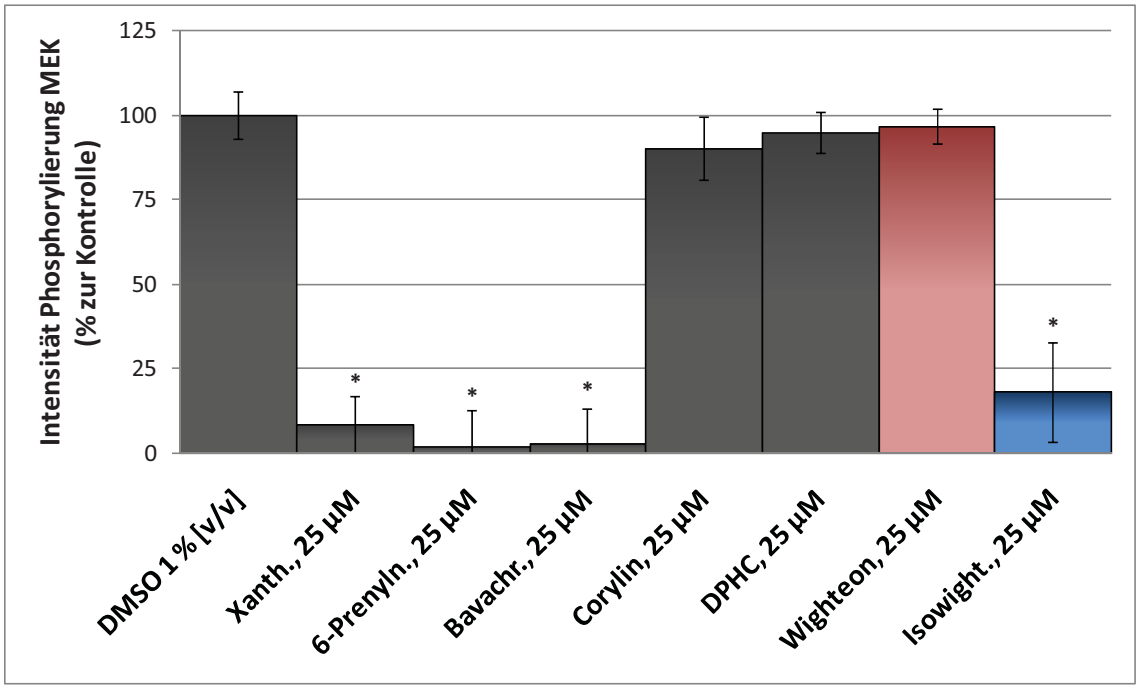



**Abb. 3.4.1.2.2 Densitometrische Auswertung der MEK-Phosphorylierung nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit 25 µM jeder Substanz für 3 h.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der MEK-Phosphorylierung in % zur DMSO-Kontrolle. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.4.1.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung

Neben ERK/pERK existieren auf gleicher Stufe der MAPK-Kaskade zwei weitere Proteinkinasen mit ähnlichen Funktionen, p38 und JNK. p38 kann durch eine Vielzahl an Stimuli, u.a. Zytokine, Hormone, Hitze oder osmotischen Stress aktiviert werden (*Wu et al., 2000*). Nach Inkubation mit 25 µM der Substanzen kam es zu einer Aktivierung der p38-Proteinkinase (+ 56,0 %) durch Isowighteon, alle anderen Substanzen zeigten keine Effekte auf das p38-Aktivitätsniveau (**Abb. 3.4.1.3.1 b, 3.4.1.3.2**). Die Gesamtmenge an p38 blieb konstant (**Abb. 3.4.1.3.1 a**).

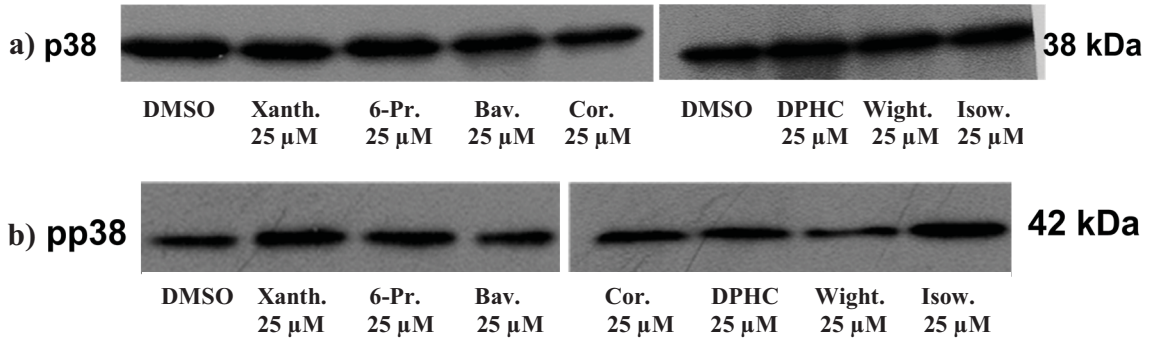



**Abb. 3.4.1.3.1 Einfluss der Testsubstanzen (jeweils 25 µM für 3 h) auf die p38-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt.

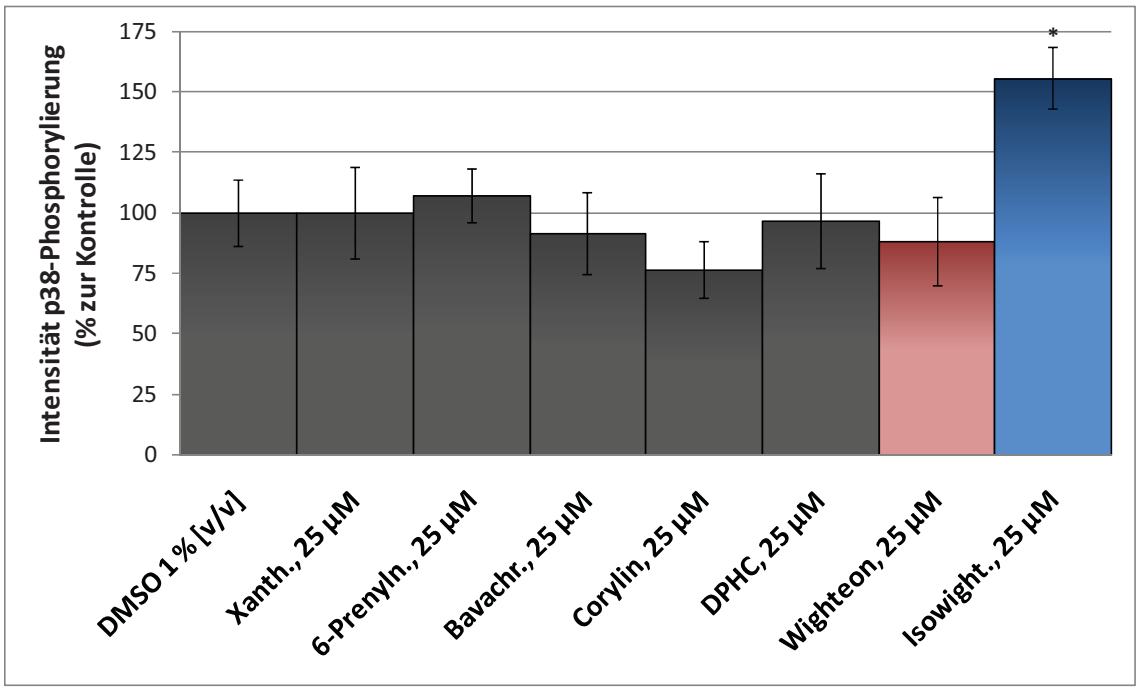



**Abb. 3.4.1.3.2 Densitometrische Auswertung der p38-Phosphorylierung nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit 25 µM jeder Substanz für 3 h.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der p38-Phosphorylierung in % zur DMSO-Kontrolle. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.4.1.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung

JNK wurde als einzige der untersuchten Proteinkinasen nicht durch eine der Substanzen aktiviert. Sowohl die Gesamtmenge an JNK selbst (**Abb. 3.4.1.4.1 a**), als auch die Menge an phosphorylierter und damit aktivierter JNK änderten sich durch Behandlung mit den Substanzen nicht signifikant (**Abb. 3.4.1.4.1 b, 3.4.1.4.2**). Um sicher sein zu können, dass dem Experiment kein Fehler unterlag, wurde eine Positivkontrolle mit 500 µM $H_2O_2$ durchgeführt, welches sicher die JNK aktiviert und dementsprechend im Versuch ein Signal erzeugte.

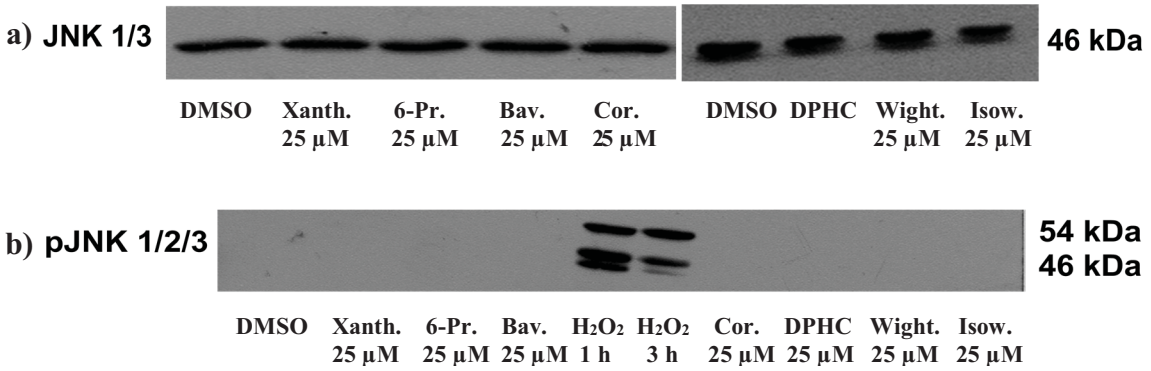



**Abb. 3.4.1.4.1 Einfluss der Testsubstanzen (jeweils 25 µM für 3 h) auf die JNK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen.** 7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Die Positivkontrolle wurde mit $H_2O_2$ (500 µM) durchgeführt. Anschließend wurde eine Proteinisolation, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt.

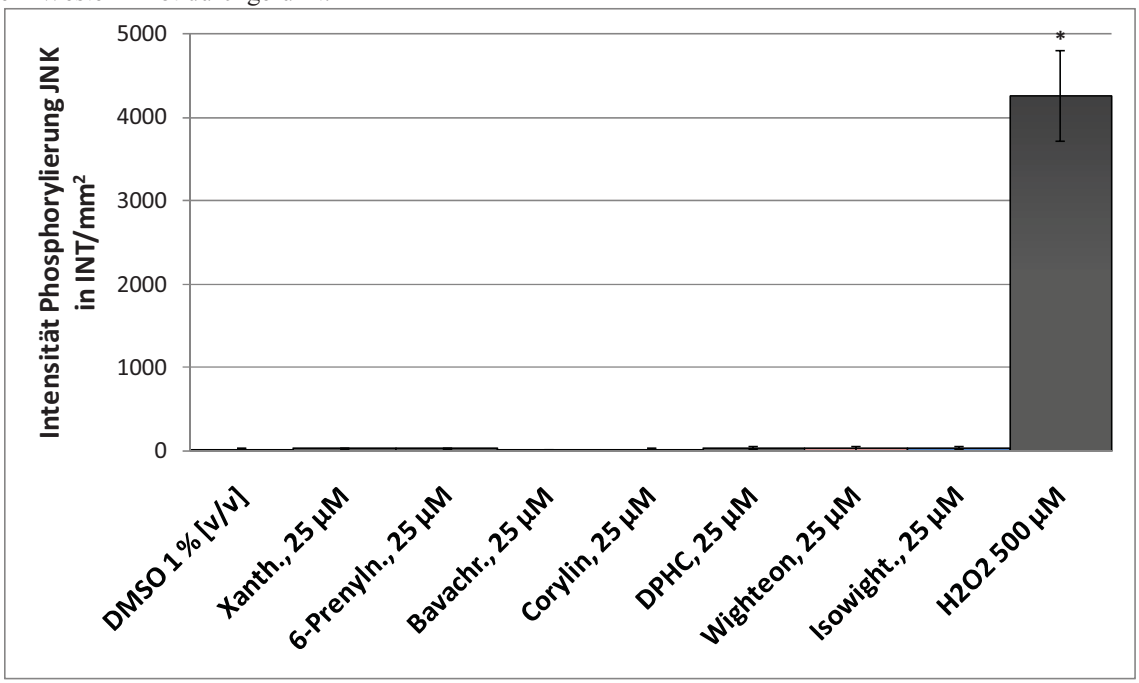



**Abb. 3.4.1.4.2 Densitometrische Auswertung der JNK-Phosphorylierung nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit 25 µM jeder Substanz für 3 h.**
7,5x10$^5$ Zellen/Well wurden auf einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2 mL/Well ausplattiert und nach 48 h Anwachszeit mit 25 µM der jeweiligen Substanz für 3 h behandelt. Die Positivkontrolle wurde mit $H_2O_2$ (500 µM) durchgeführt. Anschließend wurde eine Proteinisolation und ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt ist die JNK-Phosphorylierung in INT/mm$^2$ (OD). (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

## 3.5 Antioxidatives Potential

Im letzten Teil der Arbeit sollte das antioxidative Potential aller Substanzen evaluiert werden. Dies ist bei der Verwendung von Substanzen in der Krebstherapie deshalb von wichtiger Bedeutung, da Verbindungen mit starken antioxidativen Eigenschaften in der Lage sein können, Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen vor toxischen Stimuli zu schützen. Auf der anderen Seite können Substanzen mit fehlenden antioxidativen und starken zytotoxischen Effekten oft wirksam in der antitumoralen Therapie eingesetzt werden (vgl. Abschnitt **1.7.3**).

### 3.5.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im TEAC-Assay

Als Screening-Methode zur Abklärung der antioxidativen Kapazität aller Substanzen eignet sich besonders der TEAC-Assay, da dieser leicht durchführbar ist und zuverlässige Ergebnisse liefert.

Hierbei wird das $ABTS^{*}$-Radikal bei Vorhandensein eines potenten Antioxidans zu ABTS reduziert, was photometrisch nachgewiesen werden kann (vgl. Abschnitt **2.2.5.1**). Das Ausmaß der antioxidativen Wirkung wird anschließend auf die Referenzsubstanz TROLOX bezogen (*Miller et al., 1993, Re et al., 1999*).

Es wurde zunächst *eine* Screening-Konzentration von 10 µM eingesetzt, um diejenigen Substanzen zu identifizieren, die in einem relevanten Konzentrationsbereich antioxidative Eigenschaften aufweisen. Diese Konzentration eignete sich, um Substanzen mit schwachen antioxidativen Effekten von solchen mit stärkeren unterscheiden zu können.

Neben der Referenzsubstanz TROLOX, einem synthetischen Vitamin E-Derivat, ließen sich lediglich bei zwei der elf untersuchten Substanzen signifikante antioxidative Effekte gegenüber der Ethanol-Kontrolle zeigen (**Abb. 3.5.1.1**). Das Flavanderivat Corylifol C wies dabei eine antioxidative Aktivität auf, dessen Stärke 53,6 % derjenigen von TROLOX entspricht, das Cumarinderivat Sophoracoumestan A war bei der Versuchskonzentration von 10 µM sogar 19,1 % stärker antioxidativ wirksam als TROLOX.

Alle anderen Verbindungen, inklusive der zuvor näher betrachteten Wighteon und Isowighteon, waren bei einer Konzentration von 10 µM im Versuchsansatz nicht in der Lage, antioxidative Wirkungen zu entfalten.

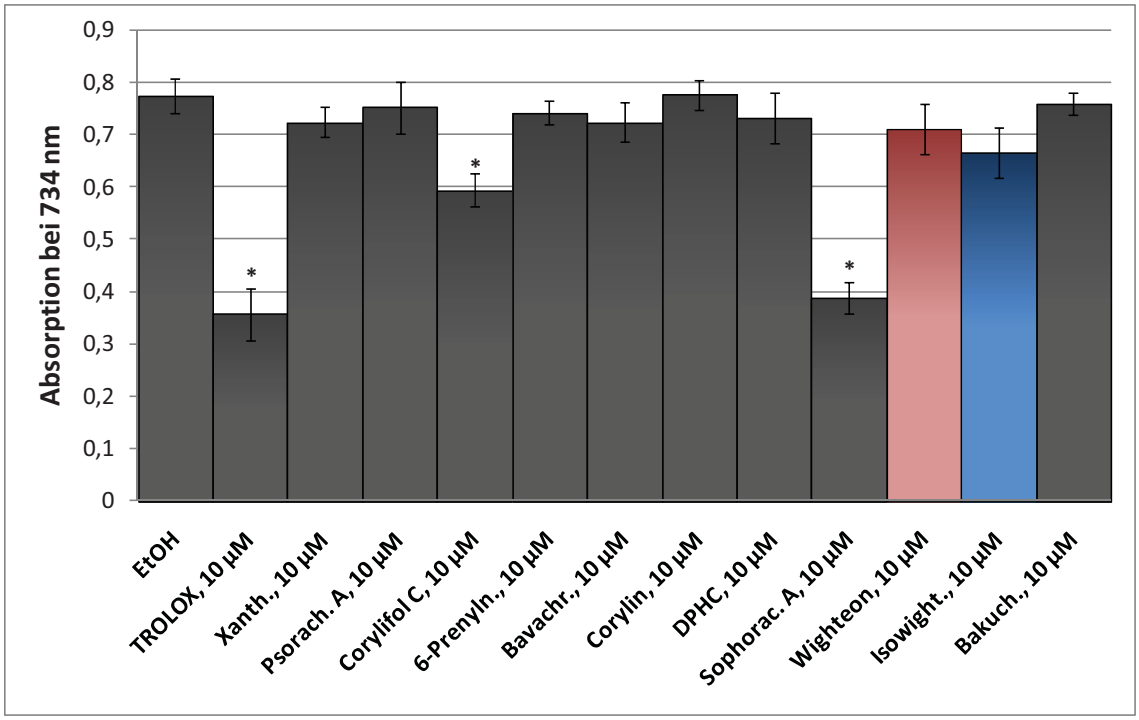



**Abb. 3.5.1.1 Absorption des ABTS*-Radikals 2 min nach Zugabe der jeweiligen Substanzlösung (TEAC-Assay).**
Zu 250 µL der ABTS*-Radikal-Lösung wurden 250 µL der entsprechenden Substanz mit einer Konzentration von 20 µM gegeben (entspricht einer Endkonzentration von 10 µM). Die Absorption wurde 2 min lang kontinuierlich aufgezeichnet. Dargestellt ist die Absorption des ABTS*-Radikals bei 734 nm nach 2 min. Je geringer die Absorption, desto größer der antioxidative Effekt. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

Für Corylifol C und Sophoracoumestan A wurde nun für zwei weitere Konzentrationen (5 µM und 20 µM) gemessen, inwieweit das antioxidative Potential von der eingesetzten Konzentration abhängig ist. Bei 5 µM waren eher geringere, bei 20 µM stärkere antioxidative Effekte zu erwarten.

Es zeigte sich bei beiden Lösungen ein konzentrationsabhängiger antioxidativer Effekt, welcher bei Corylifol C schwächer ausgeprägt war, als bei Sophoracoumestan A (**Abb. 3.5.1.3**). Bei allen drei eingesetzten Konzentrationen konnte eine signifikante Abnahme der Absorption bei 734 nm beobachtet werden, was einer Reduktion des ABTS*-Radikals (im Sinne einer antioxidativen Wirkung) entspricht. 20 µM Sophoracoumestan A neutralisierten das ABTS*-Radikal fast vollständig (noch 6,5 % verbliebene Aktivität), wohingegen 20 µM Corylifol C nur etwa 42,2 % des ABTS*-Radikals reduzieren konnten (**Tab. 3.1.5.2**).

**Tab. 3.5.1.2: Menge des noch vorhandenen ABTS*-Radikals in %; 2 min nach Zugabe von TROLOX, Corylifol C bzw. Sophoracoumestan A (TEAC-Assay).** Die Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) wurde auf 100 % normiert. n = 3, +/- SEM.

| untersuchte Substanzen | ABTS* noch vorhanden in % |
|---|---|
| **Ethanol** | 100 |
| **TROLOX, 2,5 µM** | 90,7 +/- 2,5 |
| **TROLOX, 5 µM** | 73,3 +/- 2,8 |
| **TROLOX, 10 µM** | 46,9 +/- 8,2 |
| **TROLOX, 25 µM** | 3,1 +/- 1,3 |
| **TROLOX, 50 µM** | 0,8 +/- 0,1 |
| **Corylifol C, 5 µM** | 85,1 +/- 1,5 |
| **Corylifol C, 10 µM** | 76,8 +/- 1,7 |
| **Corylifol C, 20 µM** | 57,8 +/- 0,9 |
| **Sophorac. A, 5 µM** | 71,1 +/- 1,4 |
| **Sophorac. A, 10 µM** | 49,9 +/- 2,3 |
| **Sophorac. A, 20 µM** | 6,5 +/- 1,6 |

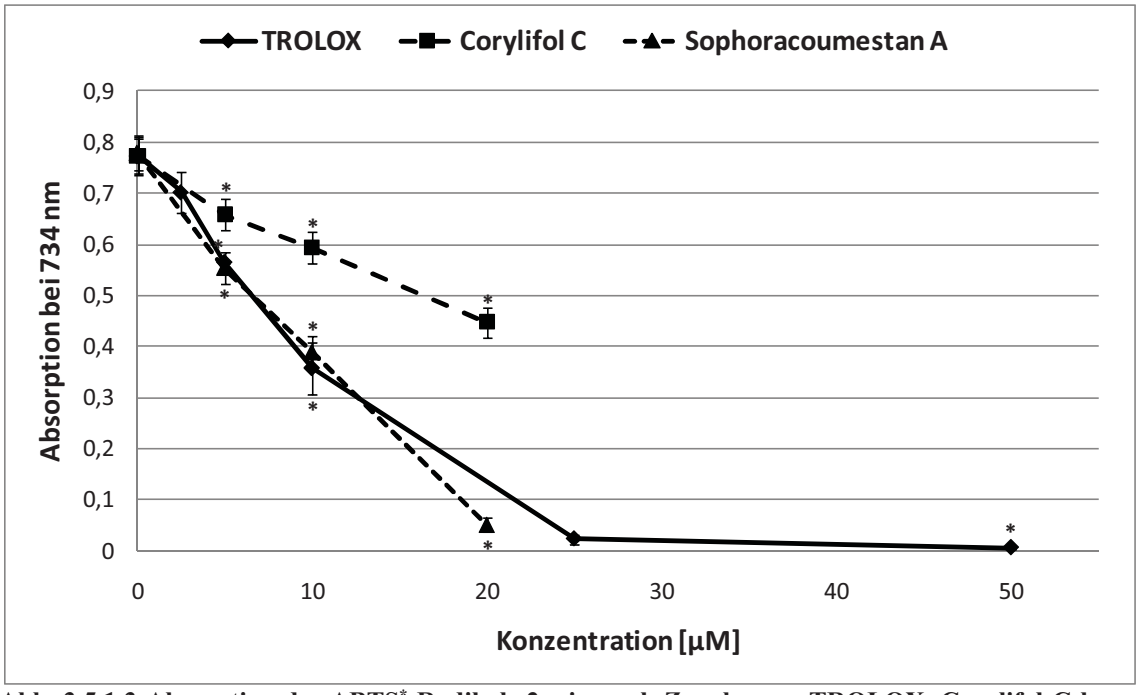



**Abb. 3.5.1.3 Absorption des ABTS*-Radikals 2 min nach Zugabe von TROLOX, Corylifol C bzw. Sophoracoumestan A (TEAC-Assay).**
Zu 250 µL der ABTS*-Radikal-Lösung wurden 250 µL der entsprechenden Substanz mit der jeweils doppelten Konzentration gegeben (z.B. 20 µM bei einer gewünschten Endkonzentration von 10 µM). Die Absorption wurde 2 min lang kontinuierlich aufgezeichnet. Dargestellt ist die Absorption des ABTS*-Radikals bei 734 nm nach 2 min. Je geringer die Absorption, desto größer der antioxidative Effekt. (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass lediglich Corylifol C und Sophoracoumestan A nennenswerte antioxidative Eigenschaften aufweisen, die eine Zelle möglicherweise vor oxidativem Stress schützen können. Dieser Fragestellung wurde im Versuchsteil **3.5.2** nachgegangen.

Die stark zytotoxisch wirkenden Substanzen wie Isowighteon oder Bavachromen erwiesen sich als nicht antioxidativ wirksam, was bei der Verwendung in der Krebstherapie von Vorteil wäre (vgl. Abschnitt **4.4**).

### 3.5.2 DCF-Assay

Neben dem zellfreien TEAC-Assay (vgl. Abschnitt **3.5.1**) sollte mit Hilfe des zellbasierten DCF-Assays herausgefunden werden, inwieweit eine Vorinkubation für 1 h mit den Substanzen Corylifol C und Sophoracoumestan A, die sich im TEAC-Assay als am stärksten antioxidativ wirksam erwiesen hatten, H4IIE-Zellen vor oxidativem Stress schützen kann. Dieser oxidative Stress wurde in Form von exogen zugeführtem $H_2O_2$ erzeugt, was zur Bildung intrazellulärer ROS führt.

Grundsätzlich kommt es bei diesem Versuch in Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zur Oxidation des nicht-fluoreszenten Carboxy-$H_2$-DCF zum fluoreszenten Carboxy-DCF, welches fluorimetrisch nachgewiesen werden kann (*Cathcart et al., 1983, Rosenkranz et al., 1992)*.

Nach der oben angesprochenen einstündigen Vorinkubation, wurden die Wells mit unterschiedlichen Konzentrationen $H_2O_2$ versetzt. Der dadurch ausgelöste oxidative Stress verursachte einen Fluoreszenzanstieg, der wiederum über den Zeitraum von 1 h aufgezeichnet wurde.

#### 3.5.2.1 Antioxidative Wirkung der Substanzen im DCF-Assay

Der gemessene Fluoreszenzanstieg war sowohl in der Kontrolle, als auch nach Zugabe von Corylifol C und Sophoracoumestan A, umso größer, je mehr $H_2O_2$ zugegeben wurde (da mehr ROS vorhanden, die zur Bildung von Carboxy-DCF führen). Der stärkste Fluoreszenzanstieg war in der DMSO-Kontrolle zu sehen (DMSO + 1000 µM $H_2O_2$, Fluoreszenzanstieg: + 79,9 %). Hingegen zeigten sich nach Vorinkubation mit Corylifol C, als auch mit Sophoracoumestan A (25 µM für 1 h) reduzierte maximale Fluoreszenzwerte (**Abb. 3.5.2.1.2**). Corylifol C reduzierte den maximalen Fluoreszenz-anstieg nach Zugabe von 1000 µM $H_2O_2$ um 19,8 %, Sophoracoumestan A um 27,1 %.

25 µM Corylifol C für 1 h wirkten ab einer $H_2O_2$-Konzentration von 1000 µM protektiv gegen oxidativen Stress, Sophoracoumestan A (25 µM) konnte bereits ab $H_2O_2$-Konzentrationen von 500 µM signifikant antioxidativ wirksam werden. Es wies somit eine stärkere antioxidative Potenz auf als Corylifol C (vgl. Abschnitt **4.4**).

**Tab. 3.5.2.1.1: Fluoreszenzanstieg in % nach Vorinkubation mit Corylifol C und Sophoracoumestan A für 1 h und Zugabe ansteigender Konzentrationen an $H_2O_2$ (DCF-Assay).** Nach Vorinkubation mit DMSO, Corylifol C und Sophoracoumestan A (jeweils 25 µM) wurde $H_2O_2$ zugegeben und der durch erzeugte ROS induzierte Fluoreszenzanstieg über 1 h gemessen. Gezeigt ist der maximale Fluoreszenzanstieg in % nach 1 h.

| untersuchte Substanzen | Fluoreszenzanstieg in % |
|---|---|
| **DMSO 1 % [v/v]** | 11,8 +/- 4,4 |
| **DMSO + 250 µM $H_2O_2$** | 33,9 +/- 4,0 |
| **DMSO + 500 µM $H_2O_2$** | 55,0 +/- 1,3 |
| **DMSO + 1000 µM $H_2O_2$** | 79,9 +/- 9,2 |
| **Corylifol C 25 µM + 250 µM $H_2O_2$** | 31,1 +/- 10,8 |
| **Corylifol C 25 µM + 500 µM $H_2O_2$** | 43,0 +/- 10,7 |
| **Corylifol C 25 µM + 1000 µM $H_2O_2$** | 60,1 +/- 10,6 |
| **Sophorac. A 25 µM + 250 µM $H_2O_2$** | 23,8 +/- 3,4 |
| **Sophorac. A 25 µM + 500 µM $H_2O_2$** | 44,7 +/- 4,1 |
| **Sophorac. A 25 µM + 1000 µM $H_2O_2$** | 52,8 +/- 3,3 |

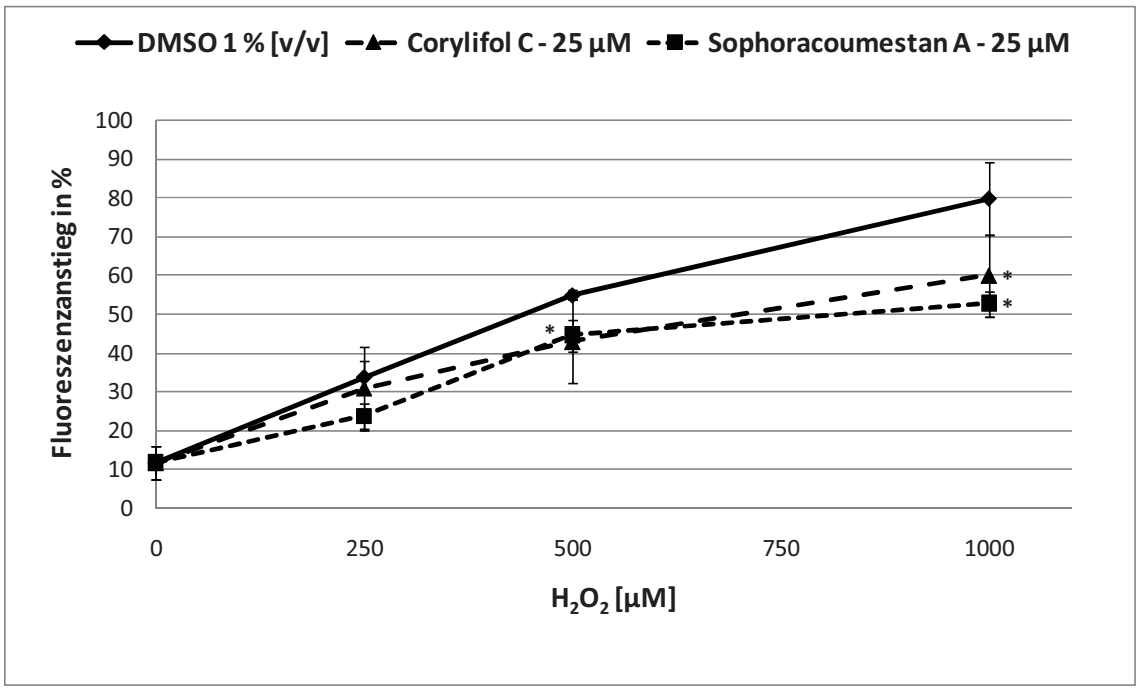



**Abb. 3.5.2.1.2 Fluoreszenzanstieg in % nach Vorinkubation mit Corylifol C und Sophoracoumestan A für 1 h und Zugabe ansteigender Konzentrationen $H_2O_2$ (DCF-Assay).** $5x10^4$ Zellen/Well wurden auf einem 96-Well ausplattiert, nach 24 h Anwachszeit ein Mediumwechsel vorgenommen und für 1 h mit 25 µM Corylifol C bzw. Sophoracoumestan A vorinkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein Mediumwechsel und die Zugabe der Fluoreszenzsonde. Nach 30 min wurde wiederum das Medium gewechselt, mit $H_2O_2$ inkubiert und eine Messung der Fluoreszenz über 1 h gestartet. Dargestellt ist der Fluoreszenzanstieg in % nach 1 h Messzeit (n = 3, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; +/- SEM).

### 3.5.2.2 *Quenching-Effekt* der Substanzen

Da der *quenching-Effekt* (Fluoreszenzlöschung) bei allen Experimenten, in denen bestimmte Eigenschaften einer Substanz über Veränderungen der Fluoreszenz gemessen werden, als Störvariable einwirken kann, wurde in diesem Versuchsteil von Carboxy-DCF (aq.) selbst, DMSO, Corylifol C und Sophoracoumestan A (in Lösung mit

farblosem DMEM und in Anwesenheit von Carboxy-DCF) einmalig ein Emissions- und ein Exzitationsspektrum abgeleitet. Es wurde mit 25 µM die gleiche Konzentration gewählt, mit der auch die obigen DCF-Assays durchgeführt wurden. Sollten Corylifol C und/oder Sophoracoumestan A einem *quenching-Effekt* unterliegen, würde sich dies in verglichen mit der DMSO-Kontrolle systematisch geringeren Fluoreszenzwerten bemerkbar machen.

**Abb. 3.5.2.2.1** zeigt zunächst für die oxidierte DCF-Sonde (Carboxy-DCF) ein Maximum des Exzitationsspektrums bei 501 nm und ein Maximum des Emissionsspektrums bei 528 nm. Dies entspricht den Musterwerten in der Literatur. Die maximalen Werte betragen für das Exzitationsspektrum RFU = 9560 und für das Emissionsspektrum RFU = 29561.

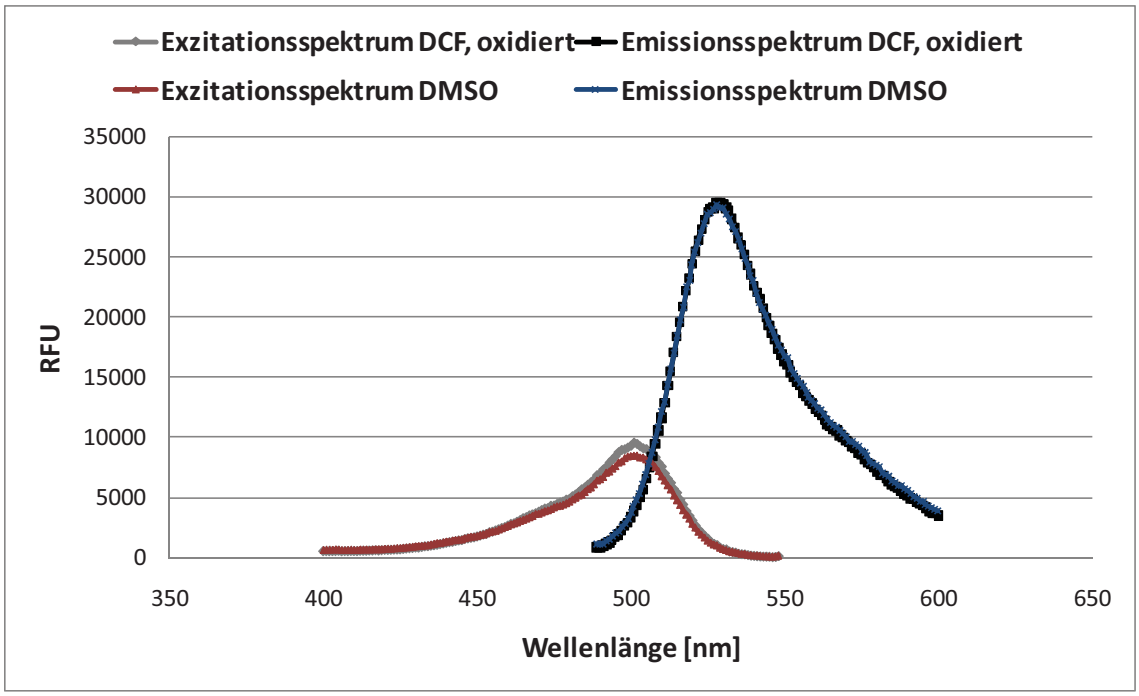



**Abb. 3.5.2.2.1 Emissions- und Exzitationsspektrum von Carboxy-DCF (gelöst in $H_2O$) in farblosem DMEM und Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit DMSO (1 % [v/v]).**
100 µL Carboxy-DCF in $H_2O$ wurden einerseits allein und andererseits mit DMSO (1 % [v/v]) versetzt auf einem 96-Well ausplattiert, für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität in Abständen von λ = 1 nm gemessen. Dargestellt sind die Emissions- und Exzitationsspektren in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), n = 1.

**F**ür die DMSO-Kontrolle wurde das Exzitationsmaximum bei 502 nm mit RFU = 8942, sowie das Emissionsmaximum bei 528 nm mit RFU = 29395 bestimmt. Es lässt sich also keine deutliche Verschiebung der Kurven zu höheren/niedrigeren Wellenlängenbereichen hin feststellen (**Abb. 3.5.2.2.1**).

Anschließend wurden zur im farblosen DME-Medium befindlichen oxidierten DCF-Sonde (Carboxy-DCF) 25 µM Corylifol C bzw. 25 µM Sophoracoumestan A gegeben und erneut für 1 h bei 37°C inkubiert.

Corylifol C weist sein Exzitationsmaximum bei 501 nm auf (RFU = 9739), das Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 528 nm (RFU = 28451) (**Abb. 3.5.2.2.2**).

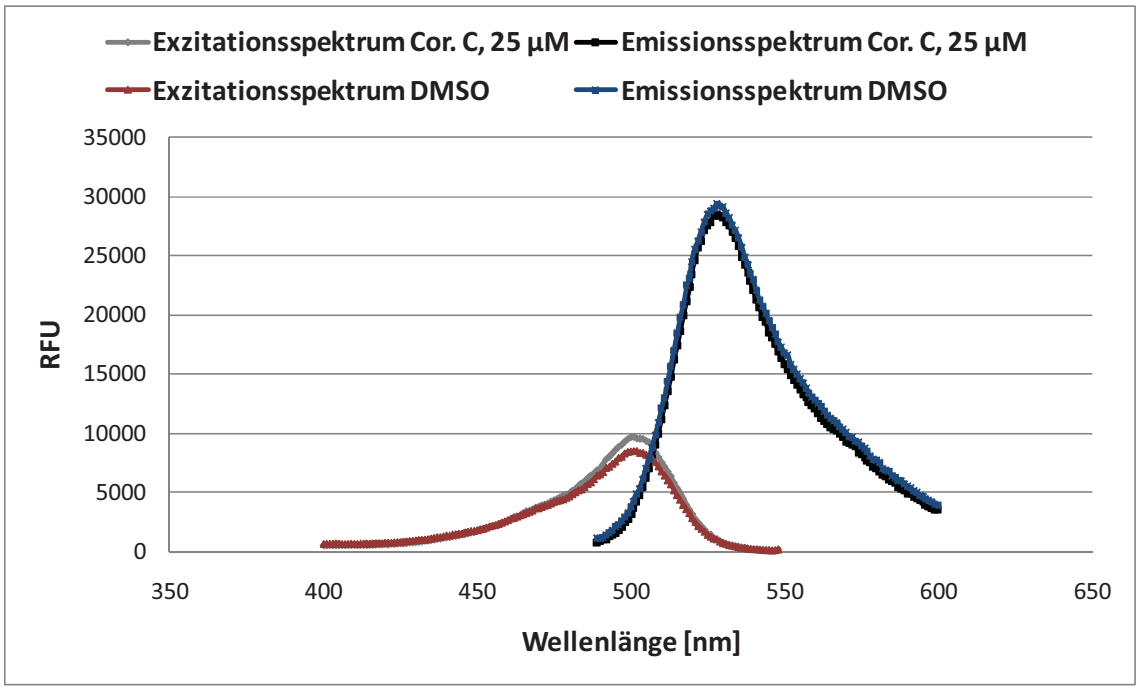



**Abb. 3.5.2.2.2 Emissions- und Exzitationsspektrum von Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit 25 µM Corylifol C und Emissions und Exzitationsspektrum von Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit DMSO (1 % [v/v]).**
100 µL Carboxy-DCF in farblosem DMEM wurden einerseits mit DMSO und andererseits mit 25 µM Corylifol C versetzt auf einem 96-Well ausplattiert. Die Lösung wurde für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität in Abständen von λ = 1 nm gemessen. Dargestellt sind die Emissions- und Exzitationsspektren in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), n = 1.

Bei Sophoracoumestan A fällt eine im Vergleich zum Emissionsspektrum der DMSO-Kontrolle Verminderung der maximalen Fluoreszenz auf. Das Exzitationsmaximum liegt bei 503 nm (RFU = 9201) und das Emissionsmaximum mit RFU = 25047 bei 530 nm (**Abb. 3.5.2.2.3**). Somit ist das Emissionsmaximum hier um 14,8 % kleiner als das der DMSO-Kontrolle.

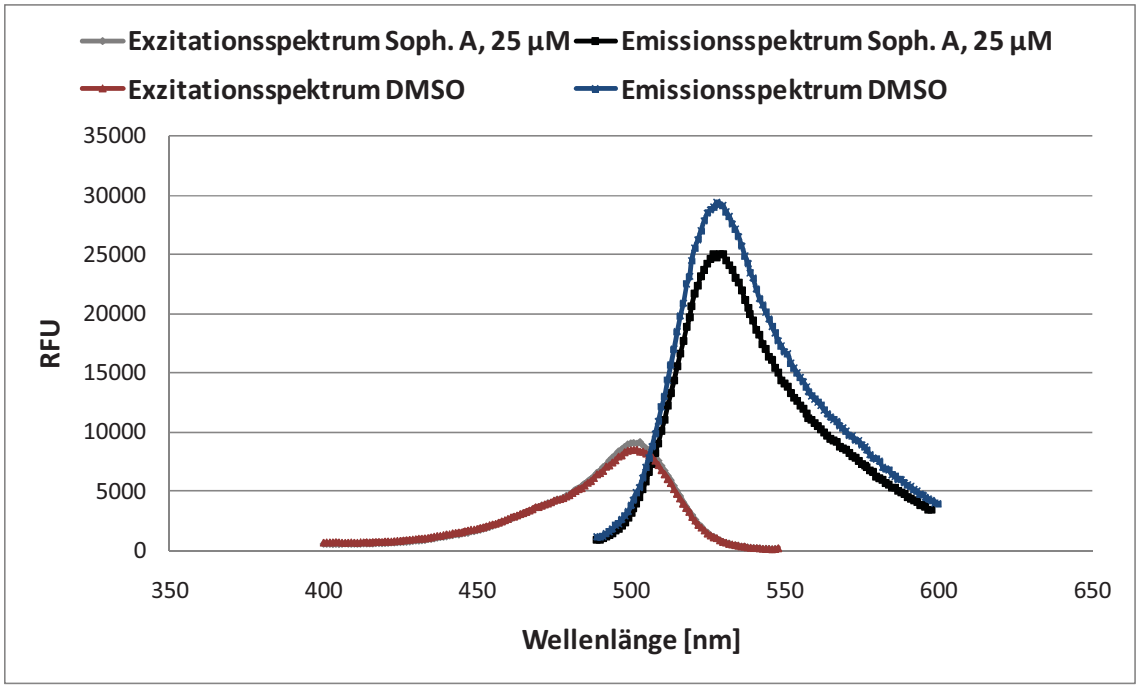



**Abb. 3.5.2.2.3 Emissions- und Exzitationsspektrum von Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit 25 µM Sophoracoumestan A und Emissions- und Exzitationsspektrum von Carboxy-DCF in farblosem DMEM mit DMSO (1 % [v/v]).**
100 µL Carboxy-DCF in DMEM wurden einerseits mit DMSO und andererseits mit 25 µM Sophoracoumestan A versetzt auf einem 96-Well ausplattiert. Die Lösung wurde für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität in Abständen von λ = 1 nm gemessen. Dargestellt sind die Emissions- und Exzitationsspektren in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), n = 1.

Als Plausibilitätskontrolle wurden auch alle anderen Substanzen auf *quenching* hin untersucht. Sämtliche untersuchte Stoffe zeigten z. T. deutlich geringere maximale Fluoreszenzwerte als in der DMSO-Kontrolle.

# 4. Diskussion

In dieser Dissertation wurden toxische Effekte elf verschiedener Flavonoide und Cumarine aus der Leguminose *Psoralea corylifolia* in H4IIE-Hepatom-, C6-Gliom und Hct 116-Kolon-Karzinom-Zellen untersucht. Zunächst wurden zytotoxische Wirkungen der Substanzen auf die Zellen ermittelt und dann in zwei unterschiedlichen Versuchsmethoden bestimmt, welche Form des Zelltodes in den Zellen induziert wird (Apoptose versus Nekrose). Besonderer Wert wurde dabei auf die Untersuchung von Konzentrationsabhängigkeiten der eingesetzten Substanzen gelegt und der Frage nachgegangen, inwieweit sich die Strukturisomeren Wighteon und Isowighteon in ihren Eigenschaften und ihrem Wirkprofil unterscheiden. Desweiteren wurde eine Beeinflussung der Aktivität ausgewählter Enzyme der intrazellulären MAPK-Kaskade (MEK, ERK, p38, JNK) durch die besonders toxisch wirkenden Substanzen analysiert und letztlich das antioxidative Potential der Substanzen ermittelt.
Medizinisch interessant war dabei die Tatsache, dass Flavonoide als vielversprechende neue Wirkstoffe in der Prävention und Therapie bösartiger Tumoren eingeschätzt werden (Abschnitt **1.3.1.1**).

## 4.1 Zytotoxizität der untersuchten Polyphenole

Flavonoide zeigen *in vitro* ein breites Spektrum biologischer Wirkungen (Abschnitt **1.3.1**). Neben antioxidativen Wirkungen (vgl. Abschnitt **4.4**) stehen v.a. zytotoxische Effekte im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, da diese die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten im Kampf gegen Tumorzellen darstellen.
Obwohl Eigenschaften und Risiken der Anwendung von *Psoralea corylifolia* wenig erforscht sind und keinerlei klinische Studien zum Thema existieren, werden in vielen Teilen Asiens Extrakte der Pflanze als Heilmittel gegen unterschiedlichste Beschwerden wie Leukodermie, Psoriasis oder Entzündungen aller Art verwendet. Weltweit haben Menschen über das Internet Zugang zu Kapseln der verarbeiteten Pflanze, die z.T. große Mengen pharmakologisch relevanter Wirkstoffe enthalten (vgl. Abschnitt **1.2**).
Beides waren wichtige Gründe dafür, die isolierten Flavonoide aus *Psoralea corylifolia* auf ihre Zytotoxizität hin zu untersuchen. Alle elf Substanzen wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 25 µM, 50 µM) in drei Säugertumorzelllinien

(H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen) unterschiedlicher Herkunft inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 24 h.

### 4.1.1 Zytotoxizität der untersuchten Flavane

Die Inkubation mit Bavachromen, 6-Prenylnaringenin (außer in C6-Gliom-Zellen) und Xanthoangelol führte nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität in allen drei Zelllinien. Diese Zytotoxizität ist konzentrationsabhängig und liegt im mikromolaren Bereich. Damit stammen drei der vier am toxischsten getesteten Substanzen (neben dem Isoflavan Isowighteon, Abschnitt **4.1.2**) aus der Gruppe der Flavane.

Ein Vergleich mit der eingeschränkt verfügbaren Literatur stützt diese Ergebnisse. 6-Prenylnaringenin zeigte bereits in PC-3- und DU145-Prostatakarzinom-Zelllinien eine wachstumsinhibierende und zeitabhängige zytotoxische Wirkung (*Delmulle et al., 2006, 2008*). Während dort jedoch recht hohe Konzentrationen (100 µM und 200 µM) an 6-Prenylnaringenin eingesetzt wurden, konnten in dieser Arbeit zytotoxische Effekte auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen unter 50 µM in drei Zelllinien nachgewiesen werden.

Für Xanthoangelol konnten *Tabata et al., 2005* und *Motani et al., 2008* in LA-N-1-, NB-39, SK-N-SH-, Jurkat- und IMR-32-Tumorzellen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität demonstrieren. Die Werte lagen meist im niedrigen ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich und waren damit etwas geringer als die in dieser Arbeit gemessenen Daten. Allerdings wurde mit 48 h eine doppelt so lange Inkubationszeit gewählt.

Für Bavachromen finden sich kaum Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit, somit ist dies der erstmalige Nachweis einer relevanten Zytotoxizität in Zellkultursystemen. Es zeigte die stärkste Zytotoxizität aller untersuchten Flavane, der resultierende $EC_{50}$-Wert in Hct 116-Zellen ist mit ca. 14 µM sogar der niedrigste aller getesteten Substanzen.

Die anderen Flavane Bakuchalcon, Corylifol C und Psorachalcon A konnten im MTT-Assay keine signifikanten toxischen Effekte hervorrufen. Es gibt bisher keine Vergleichsdaten, so dass mögliche toxische Effekte in Konzentrationsbereichen > 50 µM weiterer Untersuchungen bedürfen.

### 4.1.2 Zytotoxizität der untersuchten Isoflavane

Unter den Isoflavanen führte einzig Isowighteon zu einer starken konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität in allen drei untersuchten Zelllinien (vgl. Abschnitt **3.2.1**). Mit einem $EC_{50}$-Wert von < 30 µM in allen drei Zelllinien wies es den stärksten zytotoxischen Effekt der elf Substanzen auf. Corylin und Wighteon zeigten geringe zytotoxische Effekte bis zu einer Konzentration von 50 µM. Zu Corylin und Isowighteon finden sich keine wissenschaftlichen Daten zum Thema Zytotoxizität.

Für Wighteon konnten *Wang et al., 2005* und *Innok et al., 2009* ebenfalls nur geringe zytotoxische Effekte in sieben Zelllinien messen (vgl. Abschnitt **1.3.3.1**). Dazu zählten auch Hct 116-Zellen, die in dieser Studie vergleichbar geringe toxische Wirkungen zeigten. *Nkengfack et al., 2001* ermittelten in KB-Zellen eine starke Zytotoxizität ($EC_{50}$: 0,78 µg/mL), *Innok et al., 2009* konnten in den gleichen Zellen fast keine toxischen Wirkungen beobachten. Eine mögliche Ursache für die hohe Zytotoxizität in der Studie von *Nkengfack et al., 2001* könnte in der besonders langen Inkubationsdauer von 72 h begründet sein, die weder von *Innok et al., 2009*, noch in den oben angeführten Versuchen (24 h) erreicht wurde.

### 4.1.3 Zytotoxizität der untersuchten Cumarinderivate

Zu den beiden untersuchten Cumarinderivaten DPHC und Sophoracoumestan A, die im MTT-Assay eine geringe bis keine Zytotoxizität zeigten, existiert bisher keine wissenschaftliche Vergleichsliteratur. Es finden sich aber zahlreiche Publikationen, die eine antikanzerogene und zytotoxische Wirksamkeit von Cumarinen im Allgemeinen erwiesen haben (z.B. für das Cumarinderivat Geiparvarin: *Viola et al., 2004*), wobei i.d.R. sehr viel höhere Konzentrationen eingesetzt wurden.

### 4.1.4 Vergleich der Sensitivität der Zellen (H4IIE-, Hct 116-, C6-Zellen)

Es ließ sich beobachten, dass die eingesetzten Zelllinien unterschiedlich empfindlich auf die Zugabe der einzelnen Substanzen reagierten. Diese Empfindlichkeit war bei C6-Zellen am geringsten ausgeprägt. Nach Behandlung der Zellen resultierten durchschnittlich höhere $EC_{50}$-Werte als in humanen Hct 116-Kolon-Karzinom- oder H4IIE-Rattenhepatom-Zellen. Seit längerer Zeit (*Mangoura et al., 1989*) ist bekannt, dass sich frühe und späte C6-Passagen hinsichtlich ihrer Pluripotenz, also der Eigenschaft, sich in Abhängigkeit einwirkender neuronaler Wachstumsfaktoren,

entweder in Zellen mit astro- oder oligodendrozytischen Eigenschaften zu entwickeln, deutlich unterscheiden. Späte Passagen weisen vorwiegend astrozytische Eigenschaften auf und sind weniger anfällig für die Einwirkung humoraler Faktoren (*Mangoura et al., 1989*; *Grobben et al., 2002*). Da die Versuche in dieser Arbeit v.a. mit C6-Zellen späterer Passagen durchgeführt wurden, könnte dies als Ursache für die geringere Sensitivität der Substanzen geltend gemacht werden.

### 4.1.5 Struktur-Zytotoxizitäts-Beziehungen der Flavonoide

Die Ursache der recht unterschiedlichen zytotoxischen Wirkungen der einzelnen Flavonoide im Allgemeinen und von Wighteon und Isowighteon im Speziellen liegt u.a. in der molekularen Struktur der Substanzen begründet. Flavonoide, bei denen der C-Ring statt an Position 3 (= Isoflavan) an Position 2 (= Flavan) substituiert ist, zeigen eine größere Zytotoxizität (*Chang et al., 2008*). Dies stimmt mit den oben genannten Ergebnissen überein, denn drei der vier toxischsten Flavonoide stammten aus der Gruppe der Flavane.

Desweiteren scheinen diesbezüglich Anzahl und Anordnung der Hydroxyl-Gruppen eine wichtige Rolle zu spielen. Verbindungen mit genau zwei OH-Gruppen am AC-Ring und insgesamt zwei bis vier OH-Gruppen sind besonders zytotoxisch (*Chang et al., 2008*). Dies trifft auf die Substanzen 6-Prenylnaringenin, Isowighteon und Xanthoangelol zu. Jedoch hat Wighteon, genau wie Isowighteon, zwei OH-Gruppen am AC-Ring, ist aber deutlich weniger zytotoxisch wirksam.

OH-Gruppen an Position 3, 6 und 7 am AC-Ring *und* eine ortho-Hydroxylierung an Ring B sollen mit einer hohen Zytotoxizität, eine OH-Gruppe an Position 5 *und* eine meta-Hydroxylierung an Ring B mit einer niedrigen Zytotoxizität vergesellschaftet sein. Vergleicht man die OH-Gruppen der elf Flavonoide mit deren Zytotoxizität *in vitro* haben alle besonders toxischen Substanzen (Bavachromen, Isowighteon, 6-Prenylnaringenin, Xanthoangelol) eine OH-Gruppe an Position 5, die nach *Chang et al., 2008* mit einer geringen Zytotoxizität vergesellschaftet sein müsste. Andererseits weisen diese Substanzen eine Phenolstruktur im Ring B auf, die typischerweise eine besonders hohe prooxidative und damit potentiell zytotoxische Wirkung bedingt (*Galati et al., 2002*). Die tatsächliche Zytotoxizität der Verbindungen kann daher nur teilweise unter strukturellen Gesichtspunkten erklärt werden. Es spielen weitere wichtige Einflussfaktoren wie Aufnahme, Metabolisierung und intrazelluläre Modifikation der Substanzen eine Rolle.

Zudem ist zu erwähnen, dass fast alle untersuchten Verbindungen (außer DPHC) weitere Modifizierungen wie zusätzliche Doppelbindungen, Methylierungen und Prenylierungen aufweisen, die ebenso Einfluss auf die Zytotoxizität auf Krebszellen *in vitro* haben können. So zeigten *Fukai et al., 2000*, dass die Prenylierung eines Isoflavans dessen Zytotoxizität signifikant steigern kann. Von den fünf untersuchten Isoflavanen weisen nur Wighteon und Isowighteon eine Prenylgruppe auf. Da beide Substanzen sich lediglich in der Position ihrer Prenylgruppe unterscheiden, legen die gewonnenen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass eine 3‘-Prenylierung am Ring B im Gegensatz zur 6-Prenylierung am Ring AC die zytotoxischen Fähigkeiten dieser Substanz erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Bavachromen, Isowighteon, 6-Prenylnaringenin (außer in C6-Zellen) und Xanthoangelol in allen drei Zelllinien mit $EC_{50}$-Werten von $< 40\ \mu M$ nennenswerte toxische Effekte entfalten. Diese sind konzentrations- und bedingt strukturabhängig. Die spärlich vorhandene Literatur stützt die gewonnenen Ergebnisse im Wesentlichen, für acht der elf Substanzen (Bakuchalcon, Bavachromen, Corylifol C, Corylin, DPHC, Isowighteon, Psorachalcon A, Sophoracoumestan A) wurde zum ersten Mal die zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen evaluiert.

## 4.2 Induktion von Apoptose versus Nekrose

Nachdem in einem ersten Schritt festgestellt wurde, wie stark die Zytotoxizität der einzelnen Polyphenole ausgeprägt ist, wurde im Anschluss untersucht, welchen Mechanismen diese Zytotoxizität unterliegt. Es wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuchsmethoden durchgeführt, um die Art des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose) voneinander differenzieren zu können.

### 4.2.1 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch die Substanzen

Im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay stellte sich nach Inkubation von H4IIE-Zellen mit $25\ \mu M$ der Polyphenole für 24 h heraus, dass sieben der elf Substanzen einen signifikanten Anstieg der Caspasen 3 und 7 im Medium zeigten. Dabei handelte es sich um diejenigen Verbindungen, die im MTT-Assay in H4IIE-Zellen eine zytotoxische Wirkung ausübten.

Allein für Xantoangelol existiert in IMR-32 und Jurkat-Zellen bereits ein Apoptosenachweis (*Tabata et al., 2005; Motani et al., 2008)*, für die Substanzen Bavachromen, Corylin, DPHC, Isowighteon und Wighteon konnten erstmals Hinweise für die Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. *Delmulle et al., 2008* beschrieben für 6-Prenylnaringenin eine Caspase-3-unabhängige Form des Zelltodes, was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Häufig ist es jedoch problematisch, sicher zwischen Apoptose und Autophagie zu unterscheiden, da beide Prozesse zeitgleich ablaufen und daher gemeinsam zum Zelltod beitragen können (*González-Polo et al., 2005*). Darüber hinaus wurden in der oben genannten Studie Zellen anderer Herkunft verwendet, so dass die zytotoxische Wirkung bei Zugabe der gleichen Substanz über unterschiedliche molekularbiologischen Vorgänge vermittelt werden kann.

Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zytotoxizität im MTT-Assay und des Anstiegs der Caspase 3 und 7-Aktivität im Medium beobachtet werden, d.h. Substanzen, mit relativ niedrigen $EC_{50}$-Werten im MTT-Assay zeigten einen besonders starken Anstieg der Caspasen 3 und 7 im Medium und umgekehrt. Nach *Leytus et al., 1983* ist die Menge des im Assay gebildeten fluoreszenten Rhodamin 110 direkt proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Medium.

Einzig DPHC zeigte eine stärkere Caspase 3 und 7-Induktion, als aufgrund der gemessenen Absorption im MTT-Assay zu erwarten gewesen wäre. Hier wäre eine höhere Anzahl an Versuchen zur Verbesserung der Retest-Reliabilität des Ergebnisses wünschenswert gewesen. Dies war jedoch aufgrund der geringen Menge an zur Verfügung stehendem aufgereinigtem DPHC nicht möglich.

Da das Isoflavan Isowighteon die Caspasen 3 und 7 im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay am stärksten aktivierte (+ 7,1-fach), wurde in einem nächsten Schritt ermittelt, ob eine Konzentrationsabhängigkeit bzgl. der Caspase 3 und 7-Aktivierung besteht. Dies konnte bestätigt werden (Abschnitt **3.3.2**). Beim Isomer Wighteon zeigte sich ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit, die allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen des MTT-Assays, wobei die Hypothese bekräftigt werden kann, dass die 3‘-Prenylierung des Isowighteons gegenüber der 6-Prenylierung des Wighteons die zytotoxische und letztlich proapoptotische Potenz eines Isoflavans signifikant verstärkt (vgl. Abschnitt **4.1.5**).

Untersuchungen mit strukturell vergleichbaren Substanzen haben ebenfalls die Induktion der Apoptose in konzentrationsabhängiger Weise gezeigt: *Jin et al., 2010*

wiesen dies bei gleicher Inkubationszeit von 24 h für das Isoflavon Daidzein bei Konzentrationen von 0 µM bis 100 µM nach, auch Genistein führte nach 48 h konzentrationsabhängig (0 µM bis 25 µM) zur Apoptose (*Li et al., 2008*).

Als zweite Versuchsmethode konnte mit Hilfe des Life-Dead-Assays (Abschnitt **3.3.4**) die proapoptotische, dosisabhängige Wirkung von Isowighteon und Wighteon bestätigt werden. Dabei zeigte sich wiederum die stärkere zytotoxische Potenz des Isowighteon im Vergleich zu Wighteon. Zur Methode an sich ist anzumerken, dass apoptotische Zellen sich aus dem Zellverband herauslösen und im Medium aufschwimmen können, was normalerweise eine Zentrifugation des Zellüberstandes nötig macht. Aufgrund der geringen Menge an zur Verfügung stehender Substanz wurde der Versuch jedoch in 8-Well-Chamber-Slides mit einem relativ geringem Fassungsvolumen von 200 µL durchgeführt. Hier musste auf die Zentrifugation verzichtet werden, um nicht stark an Messgenauigkeit einzubüßen. Darüberhinaus wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, was ebenfalls zu einer Verringerung der auszählbaren Zellen geführt haben könnte. Diese Faktoren könnten eine falsch zu niedrige Apoptoserate zur Folge gehabt haben. Dennoch konnten sehr deutliche proapoptotische Effekte, insbesondere beim Isoflavan Isowighteon ermittelt werden.

Insgesamt liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die durch die Substanzen vermittelte Abnahme der Zellviabilität durch Apoptose ausgelöst wurde. Dies sollte durch den Auschluss des nekrotischen Zelltodes bestätigt werden.

### 4.2.1 Untersuchungen zur Induktion der Nekrose durch die Substanzen

In einem ersten Schritt wurde nach 24 h Inkubation mit einer einheitlichen Konzentration von 25 µM jeder Substanz durch Messung des Nekrosemarkers LDH (Laktat-Dehydrogenase) im Zellüberstand überprüft, inwieweit die elf Flavonoide und Cumarine H4IIE-Zellen auch durch Nekrose abtöten können.

Es zeigte sich lediglich beim Flavanderivat 6-Prenylnaringenin ein signifikanter Anstieg der LDH im Medium auf 13,6 % der ermittelten Maximalaktivität der LDH. Für 6-Prenylnaringenin wurden somit sowohl proapoptotische (Abschnitt **4.1.1**), als auch pronekrotische Eigenschaften nachgewiesen. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich durch den Anstieg der LDH als Ausdruck einer *sekundären Nekrose* erklären. Wie bereits in Abschnitt **1.5.1** beschrieben, wird die apoptotische Zelle *in vivo* nach Bildung *apoptotischer Körperchen* und des Verlusts der Asymmetrie der Zellmembran durch Makrophagen phagozytiert (*van Cruchten et al., 2002*). *In vitro* fehlen jedoch jegliche

Leukozyten in der Versuchsanordnung, die die apoptotisch gewordene Zelle beseitigen könnten. Daher kommt es im weiteren Verlauf zur Freisetzung von LDH aus dem Zytoplasma in die Umgebung der apoptotisch untergegangenen Zelle. Dies führt dazu, dass die Gesamtmenge an LDH im Medium ansteigt und somit die Zelle letztlich als nekrotisch gewertet wird.

Andererseits verursachten die anderen zehn Substanzen nach Inkubation keinen signifikanten LDH-Anstieg. Dies steht im Einklang mit einer Vielzahl wissenschaftlicher Referenzen zur Wirkung von Flavonoiden und Cumarinen, die in diversen Zellkultursystemen eine Beeinflussung apoptotischer Signaltransduktions-prozesse zeigten. Es wurden dabei sowohl pro- (z.B. *Kuntz et al., 1999*) als auch antiapoptotische (*Schroeter et al., 2001*) Effekte nachgewiesen, eine pronekrotische Wirkung stand in der Regel nicht im Vordergrund.

Nachfolgend wurde in einem weiteren LDH-Assay ermittelt, ob sich bei Anwendung höherer Konzentrationen an Wighteon und Isowighteon nekrotische Zellen im Medium nachweisen lassen. Diese Frage konnte für Isowighteon, als auch für Wighteon ab einer Konzentration von 50 µM für 24 h bejaht werden. Der plötzliche Anstieg des nekrotischen Index von nicht signifikanten Werten nach Inkubation mit 25 µM der jeweiligen Substanz auf einen Wert von ca. 40 % nach Inkubation mit 50 µM bei gleichzeitigen deutlich signifikanten proapoptotischen Effekten ist wiederum am ehesten auf sekundäre Nekrose zurückzuführen. Möglicherweise war diese durch die 24 h dauernde Inkubationszeit bedingt. Aufgrund der hohen Zytotoxizität von Isowighteon hätten vermutlich schon kürzere Inkubationszeiten ausgereicht, die Apoptose in H4IIE-Zellen auszulösen, *ohne* bereits zur Sekundärnekrose zu führen. So etwa zeigten *Michels et al., 2005* für das Flavonoid Luteolin, dass schon eine Inkubationszeit von 12 h zur Aktivierung der Caspase 3 und 7 führen kann. In der genannten Publikation kam es zudem nach 6 h zur Caspase 9-Aktivierung, die als Initiatorcaspase mikrokinetisch den Effektorcaspasen 3 und 7 vorgeschaltet ist (vgl. Abschnitt **1.5.1.1**).

Die lichtmikroskopische Analyse im Life-Dead-Assay machte bei einer Konzentration von 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon überdies deutlich, dass die zelluläre Morphologie der H4IIE-Zellen weitgehend aufgehoben wurde (**Abb. 3.3.4.4, 3.3.4.5**). Die Zugabe der doppelten Konzentration hat daher mit großer Wahrscheinlichkeit bereits zur immensen Freisetzung von LDH und damit zur Detektion großer Mengen nekrotischer Zellen geführt.

Mithilfe der Propidiumiodid-Färbung konnte das fehlende pronekrotische Potential von Wighteon und Isowighteon bis zu einer Konzentration von 25 µM bestätigt werden. Diese Konzentration von 25 µM rief im LDH-Assay sicher keine Nekrose hervor und war daher als maximale Konzentration für diesen Versuch festgelegt worden. Bei funktionierender Positivkontrolle konnte weder in der DMSO-Kontrolle, noch nach Inkubation mit 5 µM, 10 µM und 25 µM Wighteon bzw. Isowighteon eine signifikante Erhöhung der nekrotischen Zellen in einer der Proben beobachtet werden.

Insgesamt betrachtet ist davon auszugehen, dass die Substanzen Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin, Bavachromen, Corylin, DPHC, Wighteon und Isowighteon H4IIE-Zellen durch Caspase 3 und 7-Aktivierung apoptotisch abtöten können, wobei für Wighteon und Isowighteon eine konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose nachgewiesen wurde. Die am stärksten zytotoxisch wirksame Substanz Isowighteon unterschied sich dabei in der Höhe der Caspase 3 und 7-Induktion signifikant von Wighteon. Zukünftig sind Versuche zur Induktion von Apoptose und Nekrose in Tumorzellen im Tierversuch erforderlich, um eine mögliche Eignung der Substanzen in der Krebstherapie sicherer evaluieren zu können.

## 4.3 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade

Die kaskadenartige Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) spielt eine essentielle Rolle in der Transduktion extrazellulärer Signale über Transkriptionsfaktoren in den Zellkern, wobei grundlegende Funktionen der Zelle wie Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von MAPK kontrolliert werden (*Pearson et al., 2001*).

Im MTT-Assay (Abschnitt **3.2.1**) zeigten die Substanzen Bavachromen, Isowighteon, 6-Prenylnaringenin (außer in C6-Zellen) und Xanthoangelol eine mittelstarke Abnahme der Viabilität in allen drei untersuchten Zelllinien (H4IIE, Hct 116, C6), Wighteon und Corylin wiesen schwache zytotoxische Effekte in H4IIE- und Hct 116-Zellen auf, wohingegen die übrigen untersuchten Substanzen bis zu einer Konzentration von 50 µM für 24 h keine relevante Reduktion der viablen Zellen im MTT-Assay hervorrufen konnten. In der Western Blot-Analyse (Abschnitt **3.4.1**) wurde daher der Einfluss der sechs am toxischsten wirkenden Substanzen, sowie der neu beschriebenen Substanz DPHC auf die Aktivität der MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), p38 (*stress-activated kinase of 38 kDa*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und MEK

untersucht. In H4IIE-Zellen sollte bestimmt werden, ob und inwieweit die durch die Substanzen verursachte Abnahme der zellulären Viabilität durch Einfluss auf den intrazellulären MAPK-Signalweg vermittelt wird.

### 4.3.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung

Zunächst wurde die Beeinflussung des Phosphorylierungszustandes der Proteinkinase ERK 1/2 durch die Substanzen Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin, Bavachromen, Corylin, DPHC, Isowighteon und Wighteon untersucht.

Nach eingehenden Voruntersuchungen wurde eine Inkubationszeit von 3 h gewählt. Diese Inkubationszeit zeigte sich in H4IIE-Zellen als die kürzeste Zeitdauer, bei der schon signifikante Veränderungen im Aktivitätszustand des Proteins zu detektieren waren. Die Analyse der ERK nach 1 h und 2 h zeigte noch keine Veränderung der Aktivität, bei längeren Inkubationszeiten von 4 h, 6 h, 12 h und 24 h konnte man eine kontinuierliche Abnahme der ERK-Phosphorylierung im Sinne einer Zeitabhängigkeit beobachten. Diese Zeitabhängigkeit ist bereits für viele Flavonoide nachgewiesen worden (z.B. für Apigenin: *Yin et al., 2001*). Darüberhinaus konnte in den Vorversuchen bereits eine konzentrationsabhängige Abnahme der ERK-Phosphorylierung beobachtet werden. Die toxische Einwirkung wurde mit aufsteigenden Konzentrationen an $H_2O_2$ (250 µM, 500 µM, 1000 µM) durchgeführt.

Im eigentlichen Versuch war die ERK unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen konstitutiv aktiv, da das im Zellmedium enthaltene FCS als Stimulans wirkte. Lediglich das Isoflavan Isowighteon vermochte nach 3 h-Inkubation mit 25 µM eine (hoch)signifikante Abnahme der ERK-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen bewirken. Betrachtet man die Tatsache, dass Isowighteon sowohl im MTT-, als auch im Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay die stärksten Effekte zeigte, kann nun die Schlussfolgerung getroffen werden, dass Isowighteon seine apoptotische Wirkung auf H4IIE-Zellen zumindest teilweise über eine Dephosphorylierung der ERK vermittelt. Im Vergleich zu verwandten Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide, über die bereits ausgiebig publiziert wurde, kann dieser Vorgang als ein gängiger in der proapoptotischen Wirkung der Flavonoide angesehen werden. So konnten etwa *Xavier et al., 2009* für die Flavonoide Luteolin und Quercetin in *kras*- und *braf*-mutierten Hct 15- und CO115-Kolon-Karzinom-Zellen eine proapoptotische Wirkung bei gleichzeitiger signifikanter Abnahme der ERK-Phosphorylierung zeigen.

In den nachfolgenden Versuchen konnte für Isowighteon eine konzentrationsabhängige Abnahme der ERK-Phosphorylierung bereits ab einer Konzentration von 10 µM nachgewiesen werden, wohingegen Wighteon zur Erhöhung der Aktivität der ERK in H4IIE-Zellen führte. Aufgrund seiner von Isowighteon abweichenden Konformation könnte Wighteon eine Aktivierung des Enzyms bewirkt haben, während es durch Isowighteon zur Herunterregulation der ERK kam. Nach *Herrmann Emil Fischer, 1890* spricht man in diesem Zusammenhang vom sogenannten *Schlüssel-Schloss-Prinzip*, bei dem es durch nicht-kovalente Bindung zur Bildung eines stabilen Komplexes aus Enzym und Substrat kommt. Trotz der sehr ähnlichen molekularen Struktur der beiden genannten Flavonoide kann so die völlig unterschiedliche Wirkung auf die ERK erklärt werden. Im Lichtmikroskop wurden zeitgleich morphologische Veränderungen (Vakuolisierung) der mit Isowighteon behandelten Zellen beobachtet, während die Inkubation mit Wighteon keine derartigen Folgen hatte.

Allerdings zeigte sich die gesteigerte ERK-Phosphorylierung nicht im zuvor durchgeführten Screening-Versuch. Die Erklärung ist folgende: H4IIE-Zellen können als Modellsystem für Hepatozyten dienen und weisen natürlicherweise einen regen Stoffwechsel auf. Für C6-Zellen wurde bereits gezeigt (*Parker et al., 1980*), dass sich frühe und späte Passagen bezüglich ihrer funktionellen Eigenschaften wesentlich voneinander unterscheiden können. Da im genannten Screening-Versuch höhere Passagen der H4IIE-Zellen eingesetzt wurden, kann im Versuch eine veränderte Metabolisierung der Substanzen in den Zellen nicht ausgeschlossen werden. So etwa könnte es im Rahmen der physiologischen Biotransformation zur Inaktivierung von Wighteon und damit zur Verminderung der toxischen Wirksamkeit dieser Substanz gekommen sein. Andererseits wäre es möglich, dass Isowighteon durch intrazelluläre chemische Modifikation in ein stärker zytotoxisches Molekül transformiert wurde (*Giftung*, z.B. *Konkel et al., 2010*). Hier sind zukünftig Experimente zur Verstoffwechselung der einzelnen Substanzen in der Zelle erforderlich. Aufgrund dieses Sachverhaltes wurden alle weiteren Western Blot-Untersuchungen mit annähernd gleichen H4IIE-Passagen durchgeführt.

Die Gesamtmenge an in den Zellen befindlicher ERK wurde durch keinen der Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia* modifiziert. Daher wurde auf die Berechnung des ERK/pERK-Quotienten verzichtet. Isowighteon übt somit seine Zytotoxizität auf H4IIE-Zellen eher über eine direkte Interaktion mit der Proteinkinase aus, als einen Einfluss auf die Gesamtmenge der ERK in der Zelle zu haben. Dieser Einfluss könnte

sich jedoch noch zu einem späteren Zeitpunkt nach Inkubationsbeginn bemerkbar machen (etwa nach 24 h), da es bei Wirkung über nukleäre Prozesse zu einer gewissen Latenzzeit zwischen toxischer Einwirkung auf die Zelle und in der Folge Verminderung der Synthese eines Proteins kommt.

Insgesamt ist es unwahrscheinlich, dass Isowighteon seine proapoptotische Wirkung nur über ein *einziges* Protein *eines* Signalweges ausübt. Daher wurden weitere Proteinkinasen untersucht. Außerdem sollten so die Zielproteine der Flavanderivate Bavachromen, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol ausfindig gemacht werden. Diese zeigten trotz $EC_{50}$-Werten von $< 40\ \mu M$ im MTT-Assay keine Affektion der ERK-Aktivität. Hier scheint die Zytotoxizität über andere zelluläre Strukturen vermittelt zu werden.

### 4.3.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung

Die Analyse des Phosphorylierungszustandes der *upstream* von ERK lokalisierten Proteinkinase MEK zeigte im Western Blot eine Verminderung der MEK-Aktivität nach Inkubation mit 25 µM von Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin, Bavachromen und Isowighteon für 3 h. Es handelte sich hierbei durchweg um sehr starke Effekte, die sich in jedem der Versuche in gleichem Maße reproduzieren ließen.

Im Falle von Isowighteon zeigte sich somit, dass die Abnahme der MEK-Phosphorylierung die Ursache der verminderten ERK-Phosphorylierung ist. Isowighteon beeinflusst diesen Schenkel der MAPK-Kaskade jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit an einem weiter stromaufwärts lokalisierten Molekül, da MEK *und* ERK inhibiert werden. Als mögliche Ansatzpunkte kommen im Wesentlichen Wachstumsfaktoren (z.B. *EGF*), die GTPase *Ras*, sowie die MAPKKK *Raf* infrage (Übersichtsartikel: *McCubrey et al., 2007*). Auf jeder dieser Ebenen besteht für Isowighteon die Möglichkeit, inhibierend in Wachstum und Differenzierung der H4IIE-Zelle einzugreifen. Aufgrund der Tatsache, dass sich in vielen Tumoren eine Daueraktivität der ERK findet (z.B. *Mizumoto et al., 2007*), ist sowohl eine primäre, als auch eine sekundäre Inhibition der ERK über die Herunterregulation der MEK ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Krebstherapie. Unter dieser Fragestellung kann Isowighteon in Zukunft weiter untersucht werden.

Bavachromen, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol führen in H4IIE-Zellen zur fast vollständigen Downregulation der MEK ($> 90\ \%$), gleichzeitig wird aber *kein* hemmender Effekt auf den Phosphorylierungszustand der ERK vermittelt. In

Betrachtung des in Abschnitt **1.6** vorgestellten Signaltransduktionsweges wäre davon auszugehen, dass die in Abschnitt **3.4.1.2** gemessene verminderte Phosphorylierung der MEK regelhaft eine geringere Phosphorylierung der ERK nach sich ziehen muss. Bei dieser Abbildung handelt es sich jedoch um ein stark vereinfachtes und zur Bewahrung der Übersichtlichkeit gewähltes Schema. Tatsächlich kommt es nach *Pearson et al., 2001* in der Zelle zu ausgeprägten Interaktionen zwischen den verschiedenen Signalkaskaden. Eine verminderte Phosphorylierung der MEK kann neben der Vermittlung über die MAPKKK *Raf* durch Kinasen aus anderen Signalwegen erreicht werden. Diese verminderte Phosphorylierung könnte in der Folge die Bildung von Komplexen zwischen verschiedenen Proteinen der MAPK-Kaskade, die von entscheidender Bedeutung für die Inhibition der ERK ist, verhindert haben. Dieser Mechanismus könnte bei der Vermittlung der Wirkung von Bavachromen, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol eine wichtige Rolle spielen.

Desweiteren zeigen die MAPK grundsätzlich überlappende Substratspezifitäten. Dies bedeutet, dass eine verminderte Aktivierung der MEK durch die genannten Substanzen zu einer Inhibition eines völlig anderen Zielproteins als der ERK, z.B. von p38, JNK, aber auch anderen zellulären Proteinen, führen kann. Es besteht also ausgehend von der MAPK-Kaskade die Möglichkeit einer Kreuzinhibition eines anderen intrazellulären Signalweges, über welchen die Abnahme der Viabilität der H4IIE-Zellen letztlich erreicht wird.

### 4.3.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung

Bei der MAPK p38 handelt es sich, ähnlich der JNK (Abschnit **4.3.4**), um eine proapoptotische Kinase, d.h. alle Stimuli, die in der Zelle eine Apoptose auslösen können, sind in der Lage, p38 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (*Wu et al., 2000*). Dazu gehören u.a. Zytokine wie TNF-α, Hitze oder Kälte, osmotischer Stress und hormonelle Einflüsse.

Die Inkubation mit sechs der elf toxischsten Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia* und DPHC zeigte ausschließlich für Isowighteon eine Induktion von p38 um etwa 56 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Alle anderen untersuchten Substanzen hatten keinen Einfluss auf das Aktivitätsniveau von p38.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Beispielen für eine Induktion des p38-Signalweges durch Flavonoide. So etwa konnten *van Dross et al., 2003* eine zeitabhängige Zunahme Phosphorylierung von p38 durch Apigenin mit einem

Maximum nach 2 h nachweisen, die im weiteren Verlauf (4 h, 6 h, 8 h, 10 h) kontinuierlich abnahm. *Galluzzo et al., 2009* zeigten eine Aktivierung von p38 und der Caspase-3 in HeLa-Zellen nach Inkubation mit Quercetin. Andererseits finden sich in Abhängigkeit von verwendeter Zelllinie, Inkubationskonzentration und –dauer auch einige Berichte über eine Abnahme der basalen p38-Phosphorylierung durch Flavonoide.

Insgesamt zeigen wissenschaftliche Untersuchungen die Tendenz, dass Flavonoide p38 bei kürzeren Inkubationszeiten bis etwa 12 h aktivieren, darüber hinausgehende Inkubation jedoch eher zu einer Abnahme der Aktivität von p38 führt. Das Protein scheint daher v.a. wenige Stunden nach der Inkubation eine wichtige Rolle in der flavonoidvermittelten Abnahme der Viabilität im Sinne einer Apoptose zu spielen. Für Isowighteon kann daher neben der oben diskutierten konzentrationsabhängigen Inhibition der ERK und MEK eine Mitbeteiligung des p38-Signalweges bei der Vermittlung der in H4IIE-Zellen ausgelösten Apoptose postuliert werden.

Die Substanzen Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin, Bavachromen, Corylin, DPHC und Wighteon hingegen zeigten keine Interaktion mit p38 bei einer Konzentration von 25 µM für 3 h. Da es immer dann zur Apoptose kommt, wenn sich das innere Gleichgewicht der Zelle aus pro- und antiapoptotischen Stimuli zugunsten der proapoptotischen verschiebt (Abschnitt **1.5.1**), müssen an der Apoptose nicht zwangsläufig immer die gleichen Proteine, wie in diesem Fall p38, beteiligt sein.

Weitere Experimente können nun zeigen, an welchem Protein genau Isowighteon in die p38-Kaskade eingreift (Rezeptor, GTPase, MAPKKK, MAPKK), welche Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der biologischen Antwort beteiligt sind und inwieweit eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkung besteht.

### 4.3.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung

Zuletzt wurde mithilfe der Western Blot-Untersuchung der modulierende Einfluss der Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia* auf die MAP-Kinase JNK untersucht. JNK gehört gemeinsam mit ERK und p38 zu den wichtigsten MAPK und ist nach deren Aktivierung wesentlich an der Vermittlung von Inflammationsprozessen und Apoptose beteiligt (*Ichijo, 1999*).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen lag keine basale Aktivierung der JNK vor. Keine der untersuchten Substanzen war in H4IIE-Zellen in der Lage, bei einer Konzentration von 25 µM für 3 h eine vermehrte Phosphorylierung der JNK

hervorzurufen. Dies deutet darauf hin, dass die gezeigte proapoptotische Wirkung von Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin, Bavachromen, Corylin, DPHC, Wighteon und Isowighteon über andere intrazelluläre Signalwege vermittelt wird.

In der Literatur gibt es im Einklang mit diesen Ergebnisse kaum Hinweise auf eine direkte Aktivierung des JNK-Signalweges durch Flavonoide oder Cumarine. Andererseits konnte bereits für viele Flavonoide wie u.a. Quercetin (Übersichtsarbeit: *Williams, 2004*) ein inhibierender Einfluss auf die Aktivität von JNK nach vorhergehender Induktion des Signalweges z.B. durch TNF-α (im Sinne einer *antioxidativen* Wirkung) nachgewiesen werden. Da jedoch im Rahmen dieses Versuches die Frage nach einer möglichen Mitbeteiligung der JNK bei der Vermittlung der *proapoptotischen* Wirkung der Substanzen im Mittelpunkt stand, erschien eine vorherige Induktion des Signalweges nicht sinnvoll. Die Evaluation des antioxidativen Potentials der Substanzen wurde im Versuchsteil **3.5** vorgenommen. Eine Phosphorylierung der JNK als Positivkontrolle konnte mit $H_2O_2$ erreicht werden (vgl. *Yoshizumi et al., 2000*).

Eines der wenigen Beispiele für eine Aktivierung der JNK durch Flavonoide ist jedoch die Wirkung der Polyphenole Theaflavin und Thearubigin aus dem schwarzen Tee. Hier konnten *Bhattacharya et al., 2009* sowohl eine Aktivierung des JNK-, als auch des p38-Signalweges, allerdings bei Verwendung deutlich höherer Inkubationskonzentrationen, finden.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die Substanzen ihre proapoptotische Wirkung auch primär über andere Moleküle der Zelle, z.B. NFκB, vermitteln können. Proapoptotisch wirksame Substanzen, die in den Versuchen dieser Arbeit keine Beeinflussung der MAPK gezeigt haben, könnten möglicherweise dort ihren Ansatzpunkt haben.

## 4.4 Antioxidatives Potential

Der letzte Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der Bestimmung des antioxidativen Potentials der untersuchten Flavonoide und Cumarine in zellfreier Umgebung und der protektiven Wirkung vor ROS-vermitteltem *oxidativem Stress* in H4IIE-Hepatomzellen. Dabei war zu beachten, dass Flavonoide ihre antioxidative Wirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration ausüben. Geringere Flavonoidkonzentrationen sind mit protektiven Eigenschaften assoziiert, während höhere Konzentrationen

proapoptotische Wirkungen in Zellen entfalten können (*Wätjen et al., 2005, Michels et al., 2005*). Da im MTT-Assay (Abschnitt **3.2.1**) fünf der elf untersuchten Verbindungen bei einer Konzentration von 25 µM für 24 h bereits eine Verminderung der Viabilität in H4IIE-Zellen hervorriefen, wohingegen der Einsatz von 10 µM nicht zu signifikanten Effekten führte, wurde eine Konzentration von 10 µM sowohl im TEAC-, als auch im DCF-Assay ausgewählt.

Flavonoide sind Bestandteil zahlreicher Obst- und Gemüsesorten wie Äpfel oder Zwiebeln, aber auch von Genussmitteln wie Kakao, Schokolade, Rotwein oder Tee (*Hertog et al., 1993*). Epidemiologische Studien zeigten protektive Effekte von Flavonoiden bzgl. des Auftretens von Herzkreislauf-Erkrankungen wie KHK und Apoplex (*Arts et al., 2005, Graf et al., 2005*). Desweiteren konnte ein hoher Flavonoidgehalt in der Nahrung mit einer verringerten Inzidenz bestimmter Tumoren (u.a. Mamma-, Lungenkarzinom) korreliert werden (*Le Marchand et al., 2000*, *Bosetti et al., 2005*). Diese Schutzwirkungen der Flavonoide werden häufig mit ihrem antioxidativen Potential in Verbindung gebracht.

Andererseits werden Flavonoide aufgrund ihrer zytotoxischen und propaoptotischen Wirkung (Übersichtsartikel für Luteolin: *Lin et al., 2008*) als neue Wirkstoffe in der Chemotherapie diskutiert.

### 4.4.1 Antioxidatives Potential im TEAC-Assay

Mithilfe des *Trolox equivalent antioxidative capacity*-Assay (TEAC) sollten zunächst, ähnlich der vorangegangenen Versuche zur Zytotoxizität, diejenigen Substanzen identifiziert werden, die relevante antioxidative Eigenschaften aufweisen. Dazu wurde im *Screening* mit 10 µM die niedrigstmögliche Konzentration gewählt, bei der die Substanzen noch keine Reduktion der Viabilität der H4IIE-Zellen verursachten (vgl. Abschnitt **4.4**). Mit Corylifol C und Sophoracoumestan A wiesen zwei Substanzen starke antioxidative Effekte gegenüber der Kontrolle auf. Für diese beiden Verbindungen konnte im Anschluss zudem eine Konzentrationsabhängigkeit der antioxidativen Wirkung zwischen 5 µM und 20 µM gezeigt werden.

Für viele unterschiedliche Flavonoide und Cumarine konnten in der Vergangenheit bereits antioxidative Wirkungen nachgewiesen werden. Nach *Rice-Evans et al., 1996* ist eine Catechol-Funktion im B-Ring mit radikalfangenden Eigenschaften von Flavonoiden assoziiert. Diese Funktion ist unter den untersuchten Substanzen ausschließlich bei Corylifol C zu finden und ist daher vermutlich für dessen Effekte

verantwortlich. Andere bei antioxidativ wirksamen Flavonoiden gefundene Strukturelemente wie etwa das gleichzeitige Auftreten einer 2,3-Doppelbindung im C-Ring und von Hydroxylgruppen an Position 3 und 4‘ ist bei keiner der Verbindungen aus *Psoralea corylifolia* gegeben.

Das Cumarin Sophoracoumestan A zeigte im TEAC-Assay das stärkste antioxidative Potential aller Substanzen, indem es das $ABTS^{*}$-Radikal um 19,1 % stärker neutralisierte als die Referenzsubstanz TROLOX. Zwar ist ein antioxidatives Potential für zahlreiche Cumarine beschrieben worden, doch existieren in diesem Zusammenhang nur wenige wissenschaftliche Referenzen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Cumarinen. Die Studie von *Morabito et al., 2010* untersuchte 4-Methylcumarine und konnte gute antioxidative Wirkungen v.a. dann nachweisen, wenn sie am Ring A eine Hydroxylgruppe an Position 7 und 8 aufwiesen. Sophoracoumestan A besitzt an Position 7 ebenfalls eine Hydroxylgruppe, was jedoch auch auf das zweite untersuchte Cumarin, DPHC, zutrifft. Allerdings findet sich bei Sophoracoumestan A im Gegensatz zu DPHC an Position 3/4 ein substituierter Furanring, an den außerdem zwei weitere aromatische Ringe angehängt sind. Diese Strukturelemente sind durch das Vorhandensein delokalisierter Elektronen charakterisiert. Da die Radikalfänger-eigenschaften eines Antioxidans vom Ausmaß der Elektronendelokalisierung abhängt, könnte dies die Ursache für die stärkeren radikalabfangenden Eigenschaften von Sophoracoumestan A gegenüber DPHC darstellen (*Bors et al., 1990*).

Alle anderen Substanzen neben Corylifol C und Sophoracoumestan A wiesen keine antioxidative Wirkung auf. In Übereinstimmung dazu wurde von *Motani et al., 2008* demonstriert, dass das Flavonoid Xanthoangelol in IMR-32-Zellen eine zeitabhängige *pro*oxidative Wirkung für Konzentrationen von 10 µM und 100 µM vermittelt. Dies erklärt die fehlende antioxidative Wirkung bei einer identischen Inkubationskonzentration von 10 µM im TEAC-Assay.

In einer anderen Studie wurde für Wighteon im zwar weniger sensitiven, aber methodisch dem TEAC-Assay vergleichbaren DPPH-Assay, ein sehr hoher $IC_{50}$-Wert von 2100 µg/mL (= 536 µM) gemessen, was einer sehr geringen antioxidativen Potenz entspricht (*Erasto et al., 2004*).

Das fehlende antioxidative Potential zytotoxisch und proapoptotisch wirkender Substanzen wie Xanthoangelol oder Isowighteon könnte bei der Anwendung neuer zytotoxischer Therapeutika von Vorteil sein, da auf diese Weise ein Schutz der Zelle vor der vermittelten zytotoxischen Wirkung vermindert werden kann.

### 4.4.2 Antioxidatives Potential im DCF-Assay

Um beurteilen zu können, ob Corylifol C und Sophoracoumestan A in der Lage sind, induzierte ROS zu neutralisieren, wurde der zellbasierte DCF-Assay angeschlossen.

Hier zeigte sich im Einklang mit der Literatur in der Kontrolle ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe von $H_2O_2$ als Ausdruck der erfolgten Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (*Wang et al., 2008*). Dieser war stärker ausgeprägt als nach Zugabe von Corylifol C oder Sophoracoumestan A, da hier keine antioxidativ wirksame Substanz zugesetzt wurde, die die gebildeten ROS hätte abfangen können.

Nach einstündiger Vorinkubation mit 25 µM der Antioxidanzien Corylifol C und Sophoracoumestan A konnte man hingegen eine Verminderung des maximalen Fluoreszenzanstiegs beobachten, der in Anbetracht der im TEAC-Assay (Abschnitt **3.5.1**) gewonnenen Ergebnisse bei Sophoracoumestan A erwartungsgemäß stärker ausgeprägt war als bei Corylifol C. Beide Substanzen können also H4IIE-Zellen schon nach kurzer Zeit vor *oxidativem Stress* schützen. Ähnliche Ergebnisse wurden für vergleichbare polyphenolische Substanzen wie Luteolin, Galangin oder Kämpferol *in vitro* gewonnen (*Rüweler et al., 2008*). Die Ursache der Reduktion *oxidativen Stresses* kann neben der *direkten* Radikalfängereigenschaft der Verbindungen auch in der Hochregulation antioxidativer Abwehrmechanismen oder der Verminderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies liegen (Übersichtsarbeit: *Cotelle, 2001*).

Corylifol C, als auch Sophoracoumestan A können also konzentrationsabhängig sowohl das $ABTS^*$-Radikal, als auch in H4IIE-Zellen gebildete ROS neutralisieren ohne dabei die Viabilität der Zellen zu reduzieren (vgl. Abschnitt **3.2.1**). Daher könnten diese Substanzen bei Krankheiten, bei denen es zu einer Überproduktion von ROS und damit zu *oxidativem* Stress kommt (Übersichtsartikel: *Sies, 1997*), von therapeutischem Nutzen sein. Als Beispiele sind kardiovaskuläre (*Lakshmi et al., 2009*) oder neurodegenerative Erkrankungen (Übersichtsartikel: *Sies, 1997*) zu nennen.

### 4.4.3 Erwägungen zum *quenching-Effekt*

Unter *quenching* werden klassischerweise sämtliche Vorgänge zusammengefasst, die zur Abnahme der Fluoreszenz einer Substanz führen. Bei allen Methoden, die bestimmte Eigenschaften über die Veränderung der Fluoreszenz messen (z.B. im DCF-Assay), ist dieser Effekt daher von wichtiger Bedeutung.

In Abschnitt **3.5.2.2** wurde untersucht, ob die Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia* im DCF-Assay zur Fluoreszenzlöschung geführt haben könnten. Zunächst zeigten sich zwischen der in Wasser gelösten oxidierten DCF-Sonde und der mit DMSO versetzten Probe keine Unterschiede. Dies bedeutet, dass DMSO nicht zur Verminderung der Fluoreszenz führte. *Wang et al., 2008* beschrieben, dass eine Zelllyse mit einem DMSO-PBS-Gemisch ebenfalls kein *quenching* hervorrief, während PBS allein die gemessene Fluoreszenz aufgrund des enthaltenen Albumins stark reduzierte. Es wurden in dieser Untersuchung sehr viel höhere Konzentrationen an DMSO eingesetzt, was die Korrektheit der oben genannten Messung bestätigt.

Gleiches gilt für die Inkubation der in farblosem DME-Medium befindlichen Carboxy-DCF-Sonde mit 25 µM Corylifol C im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es fand sich ebenfalls kein Anhalt für *quenching*. Allerdings konnte für Sophoracoumestan A und auch für sechs weitere Substanzen aus *Psoralea corylifolia* eine deutliche Verminderung des Emissionsspektrums um $\geq 15$ % gegenüber der DMSO-Kontrolle demonstriert werden. Im Einklang damit zeigt die Literatur für viele polyphenolische Substanzen wie z.B. Quercetin oder Morin einen *quenching-Effekt* (*Zhang et al. 2009*), der von der eingesetzten Konzentration abhängen kann. Vermutlich würde sich bei Anwendung höherer Konzentrationen auch bei Corylifol C eine Fluoreszenzlöschung nachweisen lassen. *Terao, 2009* beschreibt in seiner Übersichtsarbeit, dass das *quenching* der Flavonoide ein zugrundeliegender Mechanismus ihrer antioxidativen Wirkung ist.

Es ist also davon auszugehen, dass die in Versuchsteil **3.5** gemessenen Effekte eher unterschätzt wurden, sprich dass das Vorhandensein des *quenching-Effekts* zu geringeren angenommenen antioxidativen Eigenschaften führte, als sie tatsächlich vorhanden waren. Die dennoch signifikanten Veränderungen unterstreichen das hohe antioxidative Potential v.a. von Sophoracoumestan A.

## 4.5 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die vorgestellten und diskutierten Ergebnisse zeigen, dass einige Flavonoide (v.a. Isowighteon) aus *Psoralea corylifolia* zytotoxische Effekte in verschiedenen Tumorzelllinien hervorrufen, die in H4IIE-Zellen durch eine Induktion der Apoptose und die Modulation intrazellulärer Signalwege verursacht werden. Bei Corylifol C und

Sophoracoumestan A, nicht jedoch bei Isowighteon oder anderen hier zytotoxischen Verbindungen, konnten antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden.

Substanzen wie Isowighteon sind als Ansatzpunkte bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung von Krebserkankungen interessant. Häufig besteht die Schwierigkeit der adäquaten Therapie einer Tumorerkrankung im Wirkverlust des eingesetzten Wirkstoffes durch Resistenzbildung (z.B. Mamma-Karzinom: *Germano et al., 2009*). Aufgrunddessen besteht ein großes wissenschaftliches Interesse, diese Resistenzen zu überwinden und neue Perspektiven in der Therapie maligner Neoplasien zu finden. Unter anderem wird der Einsatz von Flavonoiden in der Prävention und Therapie von Tumoren rege diskutiert. Quercetin etwa konnte eine Verbesserung der Wirkung von Chemotherapeutika erzielen (Übersichtsartikel: *Scalbert et al., 2005*), Apigenin zeigte im Tierversuch bei kontinuierlicher oraler Aufnahme eine Reduktion der Tumormasse und eine Induktion der Apoptose in Prostatakarzinomzellen (*Shukla und Gupta, 2006*). Aufrgund dieser und vieler anderer Studien zum Thema scheint eine zukünftige Verwendung von Flavonoiden als neue bzw. als Adjuvantien gängiger Zytostatika durchaus denkbar und sinnvoll.

Um die Frage des Einsatzes in der Krebstherapie konkret für die untersuchten Verbindungen beantworten zu können, sind weitere Experimente notwendig. Dazu könnten die Substanzen zunächst an weiteren Zelllinien mit zusätzlichen Inkubationskonzentrationen und -zeiträumen untersucht werden. Es wäre auch denkbar, die Funktion der Verbindungen aus *Psoralea corylifolia* als *Sensitizer* von Tumorzellen zu untersuchen, etwa indem man die Zellen für einige Stunden mit der entsprechenden Substanz vorinkubiert und anschließend z.B. mit TNF-α einen toxischen Stimulus erzeugt, um dann mögliche Unterschiede zwischen phenolischer Verbindung und Kontrolle detektieren zu können. Desweiteren könnte die Beeinflussung weiterer zentraler an Apoptose und Proliferation der Zelle beteiligter Signalmoleküle wie NFκB, AP-1 oder c-myc untersucht werden.

Während in dieser Arbeit vorwiegend pharmakodynamische Prozesse im Mittelpunkt standen, ist die Pharmakokinetik der Substanzen ein weiterer wichtiger Punkt. Die Kenntnis über Freisetzung, Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung eines Stoffes erlaubt genauere Aussagen über diejenige Dosis, die appliziert werden muss, um im Körper eine bestimmte, z.B. toxische, Wirkung entfalten zu können.

Es ist zu beachten, dass die zytotoxischen und proapoptotischen Wirkungen der meisten Flavonoide und Cumarine auf *in vitro*-Untersuchungen beruhen, die nur bedingt auf die

Verhältnisse *in vivo* übertragbar sind. Da es darüberhinaus unabdingbar ist, die Beeinflussung physiologischer Prozesse im Organismus genau zu kennen, wäre die Anwendung der Substanzen im Tierversuch eine denkbare Option.

Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass Extrakte aus *Psoralea corylifolia* problemlos im Internet als Nahrungsergänzungsmittel erworben werden können, die vermutlich einige der hier untersuchten Substanzen enthalten. Für vergleichbare Flavonoide wie etwa Quercetin existieren Untersuchungen, nach denen die tägliche Aufnahme von 1-2 g zu einem Plasmaspiegel von 10 µM bis maximal 50 µM führen (*Wätjen et al., 2005*) und somit bereits toxische Wirkungen entfalten kann. Anhand der verfügbaren Literatur kann zudem keine Aussage darüber gemacht werden, welche Langzeitwirkungen bei regelmäßigem Konsum derartiger Produkte entstehen können. Solange solche Daten nicht vorliegen, erscheint der Genuss flavonoidhaltiger Nahrungsergänzungsmittel äußerst fragwürdig.

# 5. Zusammenfassung

Bei den sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich um eine große, heterogene Gruppe chemischer Verbindungen, die grundlegender Bestandteil des Stoffwechsels jeder Pflanze und aufgrund ihrer Bioaktivität und molekularstrukturellen Diversität von wachsendem Interesse für die Arzneimittelforschung ist.

In dieser Arbeit wurden neun Flavonoide und zwei Cumarinderivate aus der medizinischen Heilpflanze *Psoralea corylifolia* hinsichtlich ihrer molekularen Wirkung auf die Rattenhepatomzelllinie H4IIE, die Gliomzelllinie C6 und die Kolon-Karzinom-Zelllinie Hct 116 untersucht. Für die Flavonoide Bavachromen, Isowighteon, 6-Prenylnaringenin und Xanthoangelol konnte nach 24 h die stärkste konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation mit $EC_{50}$-Werten von < 40 µM in allen drei Zelllinien (mit Ausnahme von 6-Prenylnaringenin in C6-Zellen) nachgewiesen werden. Geringere toxische Effekte zeigten Corylin, Wighteon und die erstmals beschriebene Substanz DPHC. Im Folgenden wurde demonstriert, dass diese Zytotoxizität über eine Induktion der Apoptose vermittelt wird. Dies konnte durch einen Anstieg der Caspase 3 und 7-Aktivität, Chromatinkondensation und die Bildung apoptotischer Körperchen bei gleichzeitig fehlendem Nachweis jeglicher Nekroseparameter nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der proapoptotischen Wirkung der Substanzen erforscht. Hier konnte für Isowighteon eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proteinkinasen MEK und ERK, sowie eine Aktivierung von p38 für Konzentrationen bis 25 µM gezeigt werden. Gleichzeitig wurde eine Minderphosphorylierung von MEK durch Xanthoangelol, 6-Prenylnaringenin und Bavachromen festgestellt. Ein Einfluss einer der Substanzen auf die MAP-Kinase JNK konnte mithilfe des Immunoblots ausgeschlossen werden.

Zuletzt erfolgte die Evaluation des antioxidativen Potentials der Inhaltsstoffe aus *Psoralea corylifolia*. Dabei konnten mit Corylifol C und Sophoracoumestan A zwei potente Antioxidatien identifiziert werden.

Zusammenfassend bieten diese Ergebnisse neue Ansatzpunkte bei der Entwicklung zytostatischer Wirkstoffe in der Krebstherapie. Insbesondere Isowighteon scheint aufgrund seiner zytotoxischen und proapoptotischen Eigenschaften, sowie seiner Fähigkeit, modulierend in intrazelluläre Signalwege einzuwirken ohne dabei antioxidative Wirkungen zu entfalten, für weitere Untersuchungen geeignet zu sein.

# 6. Rohdaten

## 6.1 MTT-Assay

### 6.1.1 Zytotoxizität in H4IIE-Zellen (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

| 3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,262 | 0,213 | 0,198 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 88,89 | 72,30 | 67,33 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,164 | 0,165 | 0,120 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 65,35 | 65,64 | 47,93 | 11,26 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,162 | 0,215 | 0,141 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 63,20 | 83,50 | 54,86 | 11,54 |

| Bakuchalcon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,296 | 0,277 | 0,232 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 100,7 | 94,02 | 78,70 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,196 | 0,202 | 0,183 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 78,06 | 80,37 | 72,90 | 11,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,217 | 0,226 | 0,264 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 84,34 | 87,81 | 102,7 | 11,54 |

| Bavachromen [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,258 | 0,122 | 0,101 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 87,64 | 41,52 | 34,24 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,284 | 0,267 | 0,213 | 0,119 | 0,058 | 0,029 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 79,77 | 44,51 | 21,54 | 10,87 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,247 | 0,193 | 0,169 | 0,100 | 0,051 | 0,029 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 87,59 | 51,50 | 26,25 | 14,78 |

| Corylifol C [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,304 | 0,273 | 0,252 | 0,258 | 0,221 | 0,041 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 92,30 | 94,57 | 81,00 | 14,85 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,284 | 0,267 | 0,214 | 0,224 | 0,222 | 0,029 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 80,27 | 83,98 | 83,25 | 10,87 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,247 | 0,193 | 0,210 | 0,231 | 0,166 | 0,029 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 108,7 | 119,6 | 86,00 | 14,78 |

| Corylin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,304 | 0,273 | 0,241 | 0,184 | 0,093 | 0,041 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 88,24 | 67,31 | 34,10 | 14,85 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,214 | 0,179 | 0,118 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 85,01 | 71,31 | 46,87 | 11,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,225 | 0,224 | 0,149 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 87,76 | 87,31 | 58,07 | 11,54 |

| Isowighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,267 | 0,172 | 0,075 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 90,70 | 58,50 | 25,47 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,156 | 0,097 | 0,045 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 62,24 | 38,61 | 17,92 | 11,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,202 | 0,082 | 0,071 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 78,81 | 32,03 | 27,57 | 11,54 |

| 6-Prenylnaringenin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,304 | 0,273 | 0,212 | 0,079 | 0,091 | 0,041 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 77,58 | 28,83 | 33,42 | 14,85 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,284 | 0,267 | 0,230 | 0,201 | 0,095 | 0,029 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 86,31 | 75,21 | 35,61 | 10,87 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,247 | 0,193 | 0,224 | 0,148 | 0,041 | 0,029 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 115,9 | 76,62 | 21,25 | 14,78 |

| Psorachalcon A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,304 | 0,273 | 0,232 | 0,266 | 0,271 | 0,041 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 84,94 | 97,51 | 99,32 | 14,85 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,284 | 0,267 | 0,219 | 0,248 | 0,254 | 0,029 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 82,14 | 92,74 | 95,08 | 10,87 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,247 | 0,193 | 0,202 | 0,215 | 0,178 | 0,029 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 104,5 | 110,9 | 92,21 | 14,78 |

| Sophoracoumestan A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,261 | 0,277 | 0,253 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 88,74 | 94,23 | 86,08 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,254 | 0,247 | 0,181 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 101,1 | 98,42 | 72,10 | 11,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,271 | 0,232 | 0,220 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 105,4 | 90,48 | 85,61 | 11,54 |

| Wighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,297 | 0,294 | 0,271 | 0,224 | 0,221 | 0,043 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 92,01 | 75,94 | 74,94 | 14,44 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,262 | 0,251 | 0,200 | 0,160 | 0,079 | 0,028 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 79,54 | 63,62 | 31,45 | 11,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,293 | 0,257 | 0,307 | 0,164 | 0,121 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 119,4 | 63,72 | 47,27 | 11,54 |

| Xanthoangelol [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,304 | 0,273 | 0,285 | 0,164 | 0,113 | 0,041 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 104,2 | 60,08 | 41,47 | 14,85 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,284 | 0,267 | 0,238 | 0,201 | 0,093 | 0,029 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 88,96 | 75,10 | 34,89 | 10,85 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,247 | 0,193 | 0,195 | 0,141 | 0,059 | 0,029 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 101,0 | 72,71 | 30,43 | 14,78 |

### 6.1.2 Zytotoxizität in Hct 116-Zellen (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

| 3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,399 | 0,299 | 0,134 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 77,72 | 58,35 | 26,10 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,483 | 0,489 | 0,351 | 0,055 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 86,31 | 87,34 | 62,66 | 9,80 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,412 | 0,312 | 0,173 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 96,98 | 73,39 | 40,74 | 7,28 |

| Bakuchalcon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,315 | 0,380 | 0,276 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 61,33 | 74,11 | 53,90 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,512 | 0,472 | 0,338 | 0,055 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 91,38 | 84,28 | 60,32 | 9,80 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,323 | 0,288 | 0,160 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 76,07 | 67,71 | 37,62 | 7,28 |

| Bavachromen [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,579 | 0,527 | 0,276 | 0,106 | 0,050 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 52,31 | 20,13 | 9,48 | 6,04 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,646 | 0,690 | 0,371 | 0,198 | 0,093 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 53,83 | 28,65 | 13,55 | 10,62 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,515 | 0,577 | 0,378 | 0,192 | 0,094 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 65,58 | 33,33 | 16,29 | 5,27 |

| Corylifol C [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,579 | 0,527 | 0,513 | 0,455 | 0,412 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 97,28 | 86,35 | 78,19 | 6,04 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,646 | 0,690 | 0,618 | 0,643 | 0,455 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 89,58 | 93,14 | 65,97 | 10,62 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,515 | 0,577 | 0,454 | 0,472 | 0,330 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 78,64 | 81,76 | 57,16 | 5,27 |

| Corylin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,456 | 0,405 | 0,201 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 88,83 | 79,04 | 39,19 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,550 | 0,579 | 0,292 | 0,079 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 98,27 | 103,3 | 52,14 | 14,13 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,389 | 0,392 | 0,186 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 91,62 | 92,27 | 43,71 | 7,28 |

| Isowighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,257 | 0,161 | 0,081 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 50,06 | 31,43 | 15,70 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,523 | 0,261 | 0,099 | 0,055 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 93,39 | 46,57 | 17,66 | 9,80 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,236 | 0,134 | 0,055 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 55,54 | 31,61 | 12,91 | 7,28 |
| n = 4 [OD-Blankwert] | 0,499 | 0,486 | 0,386 | 0,188 | 0,085 | 0,041 |
| n = 4 [%] | | 100,00 | 79,53 | 38,81 | 17,41 | 8,49 |
| n = 5 [OD-Blankwert] | 0,513 | 0,500 | 0,383 | 0,195 | 0,102 | 0,036 |
| n = 5 [%] | | 100,00 | 76,55 | 39,10 | 20,48 | 7,14 |
| n = 6 [OD-Blankwert] | 0,522 | 0,499 | 0,369 | 0,211 | 0,152 | 0,046 |
| n = 6 [%] | | 100,00 | 73,89 | 42,21 | 30,55 | 9,15 |
| n = 7 [OD-Blankwert] | 0,513 | 0,500 | 0,386 | 0,256 | 0,179 | 0,052 |
| n = 7 [%] | | 100,00 | 77,12 | 51,23 | 35,70 | 10,43 |
| n = 8 [OD-Blankwert] | 0,542 | 0,522 | 0,389 | 0,285 | 0,195 | 0,052 |
| n = 8 [%] | | 100,00 | 74,56 | 54,67 | 37,48 | 10,00 |

| 6-Prenylnaringenin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,579 | 0,527 | 0,371 | 0,280 | 0,131 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 70,42 | 53,17 | 24,93 | 6,04 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,646 | 0,690 | 0,554 | 0,387 | 0,173 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 80,31 | 56,12 | 25,15 | 10,62 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,515 | 0,577 | 0,467 | 0,459 | 0,196 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 80,98 | 79,48 | 33,96 | 5,27 |

| Psorachalcon A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,579 | 0,527 | 0,518 | 0,479 | 0,386 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 98,17 | 90,93 | 73,27 | 6,04 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,646 | 0,690 | 0,654 | 0,652 | 0,636 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 94,78 | 94,56 | 92,12 | 10,62 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,515 | 0,577 | 0,534 | 0,529 | 0,498 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 92,57 | 91,73 | 86,36 | 5,27 |

| Sophoracoumestan A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,445 | 0,417 | 0,380 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 86,71 | 81,23 | 74,16 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,449 | 0,517 | 0,462 | 0,055 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 80,26 | 92,25 | 82,45 | 9,80 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,317 | 0,306 | 0,309 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 74,56 | 72,06 | 72,75 | 7,28 |

| Wighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,537 | 0,513 | 0,297 | 0,234 | 0,145 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 57,84 | 45,53 | 28,34 | 6,21 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,543 | 0,560 | 0,619 | 0,481 | 0,268 | 0,055 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 110,5 | 85,98 | 47,88 | 9,80 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,409 | 0,425 | 0,350 | 0,294 | 0,203 | 0,031 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 82,34 | 69,23 | 47,72 | 7,28 |
| n = 4 [OD-Blankwert] | 0,512 | 0,500 | 0,465 | 0,351 | 0,202 | 0,042 |
| n = 4 [%] | | 100,00 | 93,06 | 70,26 | 40,32 | 8,31 |
| n = 5 [OD-Blankwert] | 0,522 | 0,512 | 0,472 | 0,380 | 0,195 | 0,040 |
| n = 5 [%] | | 100,00 | 92,21 | 74,13 | 38,12 | 7,72 |
| n = 6 [OD-Blankwert] | 0,485 | 0,475 | 0,469 | 0,379 | 0,242 | 0,046 |
| n = 6 [%] | | 100,00 | 98,63 | 79,66 | 50,86 | 9,78 |

| Xanthoangelol [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,579 | 0,527 | 0,368 | 0,196 | 0,036 | 0,032 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 69,77 | 37,15 | 6,92 | 6,04 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,646 | 0,690 | 0,505 | 0,374 | 0,072 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 73,26 | 54,23 | 10,46 | 10,62 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,515 | 0,577 | 0,477 | 0,413 | 0,111 | 0,030 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 82,66 | 71,51 | 19,16 | 5,27 |

### 6.1.3 Zytotoxizität in C6-Zellen (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

| 3-(2,4-dihydroxy)-phenyl-7-hydroxy-chromen-2-on [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,706 | 0,719 | 0,643 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 111,8 | 113,9 | 101,7 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,765 | 0,725 | 0,507 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 99,59 | 94,35 | 65,98 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,956 | 0,805 | 0,674 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 124,0 | 104,3 | 87,39 | 2,24 |

| Bakuchalcon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,627 | 0,649 | 0,530 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 99,26 | 102,8 | 83,91 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,764 | 0,743 | 0,722 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 99,48 | 96,66 | 93,98 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,850 | 0,734 | 0,708 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 110,2 | 95,26 | 91,85 | 2,24 |

| Bavachromen [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,793 | 0,837 | 0,768 | 0,591 | 0,201 | 0,020 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 91,68 | 70,58 | 24,01 | 2,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,719 | 0,714 | 0,648 | 0,464 | 0,184 | 0,018 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 90,74 | 65,03 | 25,84 | 2,58 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,894 | 0,890 | 0,899 | 0,651 | | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 101,0 | 73,17 | | 1,86 |
| n = 4 [OD-Blankwert] | 0,785 | 0,765 | 0,645 | 0,513 | 0,322 | 0,025 |
| n = 4 [%] | | 100,00 | 84,32 | 67,06 | 42,03 | 3,33 |

| Corylifol C [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,793 | 0,837 | 0,813 | 0,826 | 0,571 | 0,020 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 97,05 | 98,66 | 68,18 | 2,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,719 | 0,714 | 0,640 | 0,546 | 0,512 | 0,018 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 89,65 | 76,48 | 71,66 | 2,58 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,894 | 0,890 | 0,818 | 0,690 | 0,610 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 91,97 | 77,54 | 68,54 | 1,86 |

| Corylin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,605 | 0,568 | 0,488 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 95,80 | 89,90 | 77,32 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,827 | 0,767 | 0,556 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 107,6 | 99,89 | 72,41 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,796 | 0,720 | 0,559 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 103,2 | 93,44 | 72,49 | 2,24 |

| Isowighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,644 | 0,325 | 0,210 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 101,9 | 51,43 | 33,18 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,715 | 0,405 | 0,155 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 93,10 | 52,75 | 20,14 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,711 | 0,438 | 0,203 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 92,20 | 56,88 | 26,28 | 2,24 |

| 6-Prenylnaringenin [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,793 | 0,837 | 0,743 | 0,581 | 0,473 | 0,020 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 88,76 | 69,35 | 56,51 | 2,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,719 | 0,714 | 0,713 | 0,552 | 0,366 | 0,018 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 99,82 | 77,30 | 51,29 | 2,58 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,894 | 0,890 | 0,931 | 0,769 | 0,464 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 104,6 | 86,45 | 52,10 | 1,86 |

| Psorachalcon A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,793 | 0,837 | 0,953 | 0,928 | 0,882 | 0,020 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 113,8 | 110,8 | 105,3 | 2,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,719 | 0,714 | 0,685 | 0,653 | 0,684 | 0,018 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 95,92 | 91,46 | 95,82 | 2,58 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,894 | 0,890 | 0,912 | 0,956 | 0,972 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 102,5 | 107,4 | 109,2 | 1,86 |

| Sophoracoumestan A [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,646 | 0,648 | 0,609 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 102,3 | 102,6 | 96,41 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,759 | 0,755 | 0,559 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 98,77 | 98,27 | 72,80 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,820 | 0,681 | 0,406 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 106,3 | 88,30 | 52,69 | 2,24 |

| Wighteon [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,620 | 0,632 | 0,650 | 0,563 | 0,432 | 0,074 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 102,8 | 89,10 | 68,40 | 11,72 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,778 | 0,768 | 0,777 | 0,784 | 0,550 | 0,073 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 101,1 | 102,0 | 71,62 | 9,54 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,804 | 0,771 | 0,888 | 0,770 | 0,613 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 115,1 | 99,86 | 79,54 | 2,24 |

| Xanthoangelol [µM] | Zell-kontrolle | DMSO | 10 | 25 | 50 | Positiv-Kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,793 | 0,837 | 0,871 | 0,541 | 0,223 | 0,020 |
| n = 1 [%] | | 100,00 | 104,0 | 64,68 | 26,60 | 2,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,719 | 0,714 | 0,665 | 0,347 | 0,095 | 0,018 |
| n = 2 [%] | | 100,00 | 93,10 | 48,63 | 13,33 | 2,58 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,894 | 0,890 | 0,840 | 0,699 | 0,070 | 0,017 |
| n = 3 [%] | | 100,00 | 94,39 | 78,58 | 7,84 | 1,86 |

# 6.2 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay

### 6.2.1 Caspase 3 und 7-Aktivierung der Substanzen (Screening, Angabe der Mittelwerte)

| Substanz | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | Psorach. [25 µM] | Corylifol C [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 8835 | 35461 | 13212 | 12397 | 63055 | 13654 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 9334 | 49137 | 12453 | 16745 | 42952 | 55432 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 7078 | 35800 | 13022 | 13248 | 61487 | 46725 |
| n = 4 [RFU-Blankwert] | 14812 | 57880 | | | 65353 | 42796 |
| n = 5 [RFU-Blankwert] | 12253 | 39970 | | | 58552 | 38742 |
| n = 6 [RFU-Blankwert] | 16062 | | | | | |

| Substanz | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] | Sophorac. A [25 µM] | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] | Bakuch. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 21768 | 24486 | 63055 | 35150 | 58247 | 15788 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 33399 | 37898 | 42952 | 34246 | 93160 | 20719 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 51030 | 25636 | 61487 | 44689 | 82058 | 19255 |
| n = 4 [RFU-Blankwert] | 24713 | 24713 | 65353 | 46088 | 74600 | |
| n = 5 [RFU-Blankwert] | 31723 | 31723 | 58552 | 35295 | 94555 | |
| n = 6 [RFU-Blankwert] | | | | | | |

### 6.2.2 Caspase 3 und 7-Aktivierung der Substanzen (Konzentrationsabhängigkeit, Angabe der Mittelwerte)

| Substanz | DMSO 1 % [v/v] | Wight. [10 µM] | Wight. [25 µM] | Wight. [50 µM] | Isowight. [10 µM] | Isowight. [25 µM] | Isowight. [50 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 15658 | 15328 | 54085 | 69705 | 50683 | 94867 | 154979 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 9914 | 15618 | 41269 | 65653 | 55490 | 79503 | 169502 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 11627 | 24343 | 43130 | 51831 | 72083 | 99235 | 152409 |

# 6.3 LDH-Assay (Cytotoxicity Detection Kit)

### 6.3.1 Bestimmung der optimalen Zellkonzentration (Mittelwerte)

| Zellzahl/Well | 1250 | 2500 | 5000 | 10000 | 20000 |
|---|---|---|---|---|---|
| low control (Abs. 490 nm) | 0,605 | 0,594 | 0,597 | 0,609 | 0,663 |
| high control (Abs. 490 nm) | 0,664 | 0,841 | 1,103 | 1,671 | 2,298 |

### 6.3.2 Einfluss der Substanzen auf die LDH-Aktivität (Screening, Mittelwerte)

| Substanz | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | Psorach. [25 µM] | Corylifol C [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,084 | 0,124 | 0,107 | 0,071 | 0,217 | 0,005 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,040 | 0,013 | 0,046 | 0,090 | 0,159 | 0,008 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,032 | 0,254 | 0,23287 | 0,198 | 0,285 | 0,292 |

| Substanz | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] | Sophorac. A [25 µM] | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] | Bakuch. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,001 | 0,007 | 0,101 | 0,055 | 0,034 | 0,083 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,012 | 0,069 | -0,021 | 0,095 | 0,031 | -0,025 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,080 | 0,032 | 0,193 | 0,112 | 0,306 | 0,255 |

| Substanz | low control 1 | low control 2 | high control 1 | high control 2 |
|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,198 | 0,072 | 1,836 | 1,931 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,079 | 0,258 | 1,405 | 2,522 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,216 | 0,226 | 1,622 | 2,034 |

### 6.3.3 Einfluss von Wighteon/Isowighteon auf die LDH-Aktivität (Mittelwerte)

| Substanz | DMSO 1 % [v/v] | Wight. [10 µM] | Wight. [25 µM] | Wight. [50 µM] | Isowight. [10 µM] | Isowight. [25 µM] | Isowight. [50 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,105 | 0,118 | 0,089 | 0,639 | 0,054 | 0,091 | 0,711 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,042 | 0,034 | 0,033 | 0,695 | 0,042 | 0,157 | 0,614 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,065 | 0,059 | 0,084 | 0,622 | 0,072 | 0,133 | 0,579 |

### 6.3.4 Einfluss von Wighteon/Isowighteon auf die LDH-Aktivität (Mittelwerte) – zugehörige MTT-Assays

| Wighteon [µM] | DMSO | 10 | 25 | 50 |
|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,114 | 0,083 | 0,063 | 0,045 |
| n = 1 [%] | 100 | 72,86 | 55,49 | 39,82 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,168 | 0,170 | 0,137 | 0,086 |
| n = 2 [%] | 100 | 101,19 | 81,46 | 51,19 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,164 | 0,165 | 0,116 | 0,087 |
| n = 3 [%] | 100 | 100,32 | 70,69 | 53,23 |

| Isowighteon [µM] | DMSO | 10 | 25 | 50 |
|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 0,114 | 0,093 | 0,043 | 0,015 |
| n = 1 [%] | 100 | 81,07 | 37,42 | 13,58 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 0,168 | 0,135 | 0,062 | 0,027 |
| n = 2 [%] | 100 | 80,54 | 36,69 | 16,14 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 0,164 | 0,137 | 0,076 | 0,033 |
| n = 3 [%] | 100 | 83,68 | 46,06 | 19,83 |

# 6.4 Life-Dead-Assay

### 6.4.1 Proapoptotische Wirkung der Substanzen im Life-Dead-Assay (Mittelwerte)

| DMSO 1 % [v/v] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 650 | 2 | 21 |
| n = 2 | 631 | 3 | 3 |
| n = 3 | 565 | 2 | 1 |
| n = 4 | 565 | 3 | 2 |
| n = 5 | 510 | 1 | 3 |
| n = 6 | 650 | 2 | 21 |

| Wighteon [5 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 500 | 5 | 7 |
| n = 2 | 565 | 9 | 5 |
| n = 3 | 585 | 3 | 13 |

| Wighteon [10 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 575 | 10 | 6 |
| n = 2 | 478 | 15 | 3 |
| n = 3 | 475 | 9 | 0 |

| Wighteon [25 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 475 | 100 | 11 |
| n = 2 | 550 | 98 | 5 |
| n = 3 | 440 | 90 | 8 |

| Isowighteon [5 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 575 | 33 | 5 |
| n = 2 | 515 | 14 | 5 |
| n = 3 | 630 | 1 | 1 |

| Isowighteon [10 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 580 | 180 | 14 |
| n = 2 | 465 | 87 | 4 |
| n = 3 | 515 | 70 | 3 |

| Isowighteon [25 µM] | Zellzahl | Zahl apoptotischer Zellen | Zahl nekrotischer Zellen |
|---|---|---|---|
| n = 1 | 251 | 124 | 7 |
| n = 2 | 373 | 154 | 3 |
| n = 3 | 260 | 58 | 2 |

# 6.5 Modulation der intrazellulären MAPK-Kaskade

## 6.5.1 Western Blot

### 6.5.1.1 Einfluss der Substanzen auf die ERK-Phosphorylierung

| ERK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2788,74 | 3655,21 | 2985,32 | 2720,27 | 3770,56 | 3443,13 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3893,84 | 3176,84 | 3287,39 | 3614,43 | 3025,91 | 4317,32 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3104,05 | 2528,91 | 3072,30 | 4425,61 | 2840,27 | 3066,36 |

| ERK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2519,18 | 2716,31 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3532,94 | 3840,43 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3813,23 | 3307,02 |

| pERK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2897,46 | 3073,23 | 3281,78 | 3266,78 | 3031,90 | 4243,00 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3750,11 | 3444,41 | 3260,13 | 3198,55 | 2757,06 | 2632,15 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3157,42 | 2325,68 | 2628,95 | 2234,96 | 2643,74 | 2341,77 |

| pERK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2943,59 | 1318,35 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3364,34 | 1446,59 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3123,62 | 869,80 |

| ERK | DMSO 1 % [v/v] | Wight. [50 µM] | Wight. [10 µM] | Wight. [25 µM] | Isowight. [5 µM] | Isowight. [10 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 3412,60 | 2941,96 | 3115,39 | 3360,93 | 3024,42 | 3476,73 | 3632,33 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3543,73 | 3976,08 | 3509,57 | 2883,53 | 3433,10 | 3949,01 | 3477,20 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3072,14 | 3719,41 | 3091,91 | 2919,18 | 4009,81 | 4168,10 | 2970,15 |

| pERK | DMSO 1 % [v/v] | Wight. [50 µM] | Wight. [10 µM] | Wight. [25 µM] | Isowight. [5 µM] | Isowight. [10 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 3412,60 | 2943,02 | 2990,57 | 3088,95 | 2387,52 | 1335,87 | 762,43 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 3543,73 | 2252,08 | 2602,20 | 2793,38 | 2930,66 | 2350,77 | 1214,27 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 3072,14 | 2293,12 | 3259,13 | 3274,24 | 2881,30 | 1720,84 | 756,97 |

### 6.5.1.2 Einfluss der Substanzen auf die MEK-Phosphorylierung

| MEK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 1812,13 | 2145,11 | 1783,34 | 1849,98 | 1645,15 | 1948,51 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1745,12 | 1879,15 | 1945,11 | 2007,15 | 1845,55 | 1865,95 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2219,15 | 2114,15 | 2456,15 | 2314,45 | 2315,15 | 2204,20 |

| MEK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2098,15 | 2145,16 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1890,08 | 1902,15 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 1945,13 | 1801,17 |

| pMEK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2149,13 | 150,12 | 50,12 | 76,13 | 1612,15 | 1945,46 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1801,62 | 201,16 | 40,12 | 54,12 | 1816,17 | 1784,45 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2304,11 | 175,15 | 35,12 | 61,13 | 2209,15 | 2201,16 |

| pMEK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2205,12 | 301,12 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1845,13 | 489,43 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2001,26 | 351,13 |

### 6.5.1.3 Einfluss der Substanzen auf die p38-Phosphorylierung

| p38 | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 1535,35 | 1857,71 | 1573,05 | 2104,01 | 1858,56 | 2128,41 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1878,00 | 1701,57 | 1732,17 | 1556,95 | 1897,34 | 1514,28 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 1722,86 | 1843,25 | 1997,90 | 1732,74 | 1505,93 | 1923,37 |

| p38 | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2107,95 | 2161,01 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1604,34 | 1471,04 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2016,30 | 2036,04 |

| pp38 | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 348,52 | 304,17 | 441,77 | 341,47 | 301,51 | 287,81 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 512,00 | 516,09 | 625,12 | 385,32 | 347,61 | 502,55 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 563,32 | 605,99 | 461,90 | 580,33 | 446,69 | 591,69 |

| pp38 | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 273,89 | 682,69 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 455,56 | 921,17 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 531,21 | 616,69 |

### 6.5.1.4 Einfluss der Substanzen auf die JNK-Phosphorylierung

| JNK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2144,15 | 2412,12 | 2249,10 | 2209,15 | 2105,16 | 2099,15 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1807,13 | 1952,15 | 1841,10 | 1612,15 | 1712,07 | 1845,16 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2317,13 | 2312,10 | 2108,79 | 2004,10 | 2216,17 | 2518,05 |

| JNK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] |
|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 1802,15 | 2201,16 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 1612,11 | 1794,45 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2498,54 | 2207,49 |

| pJNK | DMSO 1 % [v/v] | Xanth. [25 µM] | 6-Prenyln. [25 µM] | Bavachr. [25 µM] | Corylin [25 µM] | DPHC [25 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 57,77 | 56,34 | 18,94 | 24,02 | 3,17 | 67,43 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 21,86 | 15,24 | 58,52 | 31,10 | 65,39 | 18,04 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 13,43 | 35,45 | 32,37 | 12,47 | 7,72 | 43,65 |

| pJNK | Wighteon [25 µM] | Isowight. [25 µM] | $H_2O_2$ [500 µM] |
|---|---|---|---|
| n = 1 [OD-Blankwert] | 2,86 | 75,25 | 4754,03 |
| n = 2 [OD-Blankwert] | 103,81 | 43,12 | 3185,72 |
| n = 3 [OD-Blankwert] | 2,63 | 1,69 | 4852,17 |

## 6.6 Antioxidatives Potential

### 6.6.1 Antioxidative Wirkungen der Substanzen im TEAC-Assay (Mittelwerte)

| Substanz | Ethanol | Xanth. [10 µM] | Psorach. A [10 µM] | 6-Prenyln. [10 µM] | Bavachr. [10 µM] |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD] | 0,749 | 0,685 | 0,716 | 0,719 | 0,678 |
| n = 2 [OD] | 0,839 | 0,780 | 0,850 | 0,787 | 0,801 |
| n = 3 [OD] | 0,733 | 0,708 | 0,690 | 0,722 | 0,694 |

| Substanz | Corylin [10 µM] | DPHC [10 µM] | Wight. [10 µM] | Isowight. [10 µM] | Bakuch. [10 µM] |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD] | 0,753 | 0,69 | 0,624 | 0,524 | 0,758 |
| n = 2 [OD] | 0,835 | 0,831 | 0,794 | 0,783 | 0,795 |
| n = 3 [OD] | 0,741 | 0,677 | 0,716 | 0,691 | 0,722 |

| Substanz | TROLOX [2,5 µM] | TROLOX [5 µM] | TROLOX [10 µM] | TROLOX [25 µM] | TROLOX [50 µM] |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD] | 0,707 | 0,568 | 0,364 | 0,039 | 0,004 |
| n = 2 [OD] | 0,7705 | 0,568 | 0,269 | 0,005 | 0,008 |
| n = 3 [OD] | 0,630 | 0,561 | 0,441 | 0,026 | 0,007 |

| Substanz | Corylifol C [5 µM] | Corylifol C [10 µM] | Corylifol C [20 µM] | Soph. A [5 µM] | Soph. A [10 µM] | Soph. A [20 µM] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n = 1 [OD] | 0,650 | 0,589 | 0,417 | 0,510 | 0,338 | 0,039 |
| n = 2 [OD] | 0,714 | 0,651 | 0,506 | 0,614 | 0,444 | 0,082 |
| n = 3 [OD] | 0,611 | 0,542 | 0,421 | 0,537 | 0,385 | 0,034 |

### 6.6.2 DCF-Assay

#### 6.6.2.1 Antioxidative Wirkungen der Substanzen im DCF-Assay (Mittelwerte)

| Substanz | DMSO 1 % [v/v] | $H_2O_2$ [250 µM] | $H_2O_2$ [500 µM] | $H_2O_2$ [1000 µM] |
|---|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 9825 | 11367 | 13684 | 17004 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 7160 | 8873 | 10659 | 12260 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 6692 | 8495 | 10608 | 14425 |

| Substanz | Corylifol C [25 µM] + 250 µM $H_2O_2$ | Corylifol C [25 µM] + 500 µM $H_2O_2$ | Corylifol C [25 µM] + 1000 µM $H_2O_2$ |
|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 14396 | 15227 | 17272 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 8951 | 9953 | 12698 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 8289 | 10253 | 10878 |

| Substanz | Sophoracoumestan A [25 µM] + 250 µM $H_2O_2$ | Sophoracoumestan A [25 µM] + 500 µM $H_2O_2$ | Sophoracoumestan A [25 µM] + 1000 µM $H_2O_2$ |
|---|---|---|---|
| n = 1 [RFU-Blankwert] | 11610 | 15322 | 14724 |
| n = 2 [RFU-Blankwert] | 8274 | 9260 | 11047 |
| n = 3 [RFU-Blankwert] | 7555 | 9519 | 11526 |

#### 6.6.2.2 DCF – Fluoreszenzspektren (*quenching*-Effekt der Substanzen)

| Wellenlänge [nm] | $DCF_{ox}$ Exz. | $DCF_{ox}$ Em. | DMSO Exz. | DMSO Em. | Cor. C 25 µM Exz. | Cor. C 25 µM Em. | Soph. A 25 µM Exz. | Soph. A 25 µM Em. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 400 | 584 | | 646 | | 536 | | 546 | |
| 401 | 588 | | 676 | | 534 | | 567 | |
| 402 | 592 | | 669 | | 547 | | 562 | |
| 403 | 598 | | 666 | | 536 | | 539 | |
| 404 | 595 | | 695 | | 542 | | 550 | |
| 405 | 622 | | 673 | | 533 | | 527 | |
| 406 | 579 | | 642 | | 556 | | 552 | |
| 407 | 594 | | 637 | | 551 | | 585 | |
| 408 | 592 | | 642 | | 550 | | 562 | |
| 409 | 606 | | 674 | | 568 | | 555 | |
| 410 | 600 | | 649 | | 543 | | 553 | |
| 411 | 596 | | 638 | | 563 | | 565 | |
| 412 | 610 | | 685 | | 557 | | 567 | |
| 413 | 625 | | 676 | | 553 | | 585 | |
| 414 | 617 | | 690 | | 565 | | 588 | |
| 415 | 635 | | 666 | | 567 | | 577 | |
| 416 | 642 | | 693 | | 590 | | 580 | |
| 417 | 661 | | 708 | | 586 | | 603 | |
| 418 | 644 | | 705 | | 610 | | 615 | |
| 419 | 670 | | 702 | | 604 | | 608 | |
| 420 | 692 | | 743 | | 633 | | 627 | |
| 421 | 690 | | 748 | | 604 | | 643 | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 422 | 702 | | 740 | | 663 | | 670 | |
| 423 | 713 | | 772 | | 651 | | 679 | |
| 424 | 730 | | 805 | | 703 | | 686 | |
| 425 | 735 | | 801 | | 704 | | 700 | |
| 426 | 768 | | 833 | | 704 | | 713 | |
| 427 | 795 | | 860 | | 716 | | 728 | |
| 428 | 823 | | 892 | | 764 | | 759 | |
| 429 | 845 | | 914 | | 779 | | 798 | |
| 430 | 884 | | 944 | | 802 | | 826 | |
| 431 | 888 | | 983 | | 821 | | 835 | |
| 432 | 941 | | 982 | | 862 | | 851 | |
| 433 | 986 | | 1013 | | 903 | | 896 | |
| 434 | 1002 | | 1044 | | 935 | | 967 | |
| 435 | 1032 | | 1096 | | 979 | | 978 | |
| 436 | 1082 | | 1158 | | 1015 | | 1033 | |
| 437 | 1119 | | 1215 | | 1061 | | 1075 | |
| 438 | 1167 | | 1220 | | 1094 | | 1127 | |
| 439 | 1231 | | 1292 | | 1175 | | 1167 | |
| 440 | 1269 | | 1344 | | 1208 | | 1195 | |
| 441 | 1331 | | 1355 | | 1232 | | 1271 | |
| 442 | 1362 | | 1438 | | 1298 | | 1279 | |
| 443 | 1423 | | 1473 | | 1317 | | 1361 | |
| 444 | 1477 | | 1505 | | 1373 | | 1357 | |
| 445 | 1503 | | 1514 | | 1440 | | 1440 | |
| 446 | 1588 | | 1622 | | 1506 | | 1483 | |
| 447 | 1649 | | 1676 | | 1545 | | 1481 | |
| 448 | 1687 | | 1745 | | 1618 | | 1612 | |
| 449 | 1727 | | 1755 | | 1639 | | 1631 | |
| 450 | 1800 | | 1811 | | 1745 | | 1697 | |
| 451 | 1873 | | 1893 | | 1782 | | 1757 | |
| 452 | 1955 | | 1935 | | 1858 | | 1841 | |
| 453 | 2012 | | 2025 | | 1956 | | 1913 | |
| 454 | 2155 | | 2135 | | 2091 | | 1984 | |
| 455 | 2200 | | 2184 | | 2126 | | 2086 | |
| 456 | 2302 | | 2237 | | 2235 | | 2181 | |
| 457 | 2386 | | 2339 | | 2328 | | 2313 | |
| 458 | 2498 | | 2446 | | 2423 | | 2397 | |
| 459 | 2573 | | 2551 | | 2532 | | 2465 | |
| 460 | 2699 | | 2651 | | 2645 | | 2612 | |
| 461 | 2839 | | 2780 | | 2766 | | 2668 | |
| 462 | 2893 | | 2847 | | 2931 | | 2828 | |
| 463 | 3017 | | 2944 | | 2999 | | 2885 | |
| 464 | 3169 | | 3068 | | 3044 | | 2998 | |
| 465 | 3308 | | 3154 | | 3258 | | 3120 | |
| 466 | 3392 | | 3250 | | 3419 | | 3230 | |
| 467 | 3542 | | 3362 | | 3460 | | 3332 | |
| 468 | 3627 | | 3479 | | 3578 | | 3466 | |
| 469 | 3715 | | 3644 | | 3722 | | 3612 | |
| 470 | 3842 | | 3661 | | 3820 | | 3674 | |
| 471 | 3972 | | 3770 | | 3931 | | 3809 | |
| 472 | 4106 | | 3878 | | 4012 | | 3840 | |
| 473 | 4131 | | 3947 | | 4097 | | 3999 | |
| 474 | 4341 | | 4056 | | 4254 | | 4042 | |
| 475 | 4351 | | 4196 | | 4357 | | 4145 | |
| 476 | 4484 | | 4280 | | 4463 | | 4313 | |
| 477 | 4610 | | 4321 | | 4614 | | 4304 | |
| 478 | 4679 | | 4413 | | 4768 | | 4466 | |
| 479 | 4840 | | 4543 | | 4847 | | 4637 | |
| 480 | 4902 | | 4664 | | 4948 | | 4717 | |
| 481 | 5119 | | 4839 | | 5151 | | 4884 | |
| | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 482 | 5266 | | 4995 | | 5319 | | 5093 | |
| 483 | 5462 | | 5175 | | 5536 | | 5239 | |
| 484 | 5693 | | 5241 | | 5755 | | 5432 | |
| 485 | 5844 | | 5464 | | 5945 | | 5631 | |
| 486 | 6074 | 22376 | 5704 | | 6206 | 18264 | 5860 | 16387 |
| 487 | 6279 | 6733 | 5845 | 9502 | 6432 | 5358 | 6035 | 4496 |
| 488 | 6500 | 1773 | 6110 | 2121 | 6627 | 1462 | 6275 | 1331 |
| 489 | 6863 | 867 | 6412 | 1109 | 6896 | 822 | 6558 | 918 |
| 490 | 6998 | 886 | 6525 | 1117 | 7084 | 893 | 6741 | 906 |
| 491 | 7335 | 1026 | 6705 | 1200 | 7391 | 983 | 7074 | 1052 |
| 492 | 7551 | 1149 | 7071 | 1401 | 7834 | 1060 | 7253 | 1111 |
| 493 | 7905 | 1286 | 7172 | 1581 | 8053 | 1291 | 7600 | 1289 |
| 494 | 8156 | 1479 | 7415 | 1777 | 8332 | 1447 | 7885 | 1433 |
| 495 | 8436 | 1692 | 7611 | 2093 | 8639 | 1619 | 8108 | 1647 |
| 496 | 8768 | 1928 | 7920 | 2250 | 8882 | 1866 | 8407 | 1860 |
| 497 | 8944 | 2268 | 8012 | 2580 | 9070 | 2132 | 8552 | 2135 |
| 498 | 9007 | 2620 | 8290 | 2900 | 9334 | 2437 | 8768 | 2412 |
| 499 | 9145 | 2944 | 8413 | 3279 | 9547 | 2787 | 8986 | 2714 |
| 500 | 9300 | 3362 | 8461 | 3771 | 9718 | 3204 | 9080 | 3113 |
| 501 | 9560 | 3906 | 8482 | 4275 | 9739 | 3647 | 9113 | 3535 |
| 502 | 9442 | 4386 | 8492 | 4842 | 9605 | 4223 | 9049 | 4004 |
| 503 | 9246 | 5004 | 8341 | 5348 | 9586 | 4803 | 9201 | 4506 |
| 504 | 9083 | 5698 | 8330 | 6116 | 9576 | 5462 | 8892 | 5094 |
| 505 | 9018 | 6618 | 8181 | 6954 | 9391 | 6260 | 8644 | 5770 |
| 506 | 8788 | 7556 | 8008 | 7812 | 9262 | 7009 | 8528 | 6555 |
| 507 | 8555 | 8407 | 7858 | 8782 | 8760 | 7857 | 8388 | 7323 |
| 508 | 8345 | 9496 | 7564 | 9867 | 8392 | 9001 | 7870 | 8273 |
| 509 | 7888 | 10596 | 7209 | 10894 | 8016 | 9927 | 7617 | 9014 |
| 510 | 7569 | 11656 | 6777 | 12122 | 7587 | 11147 | 7165 | 10094 |
| 511 | 7005 | 12919 | 6426 | 13010 | 7201 | 12285 | 6772 | 11057 |
| 512 | 6573 | 14305 | 6020 | 14408 | 6800 | 13487 | 6325 | 12161 |
| 513 | 6237 | 15521 | 5676 | 15681 | 6402 | 14755 | 5951 | 13278 |
| 514 | 5726 | 17045 | 5164 | 17010 | 5846 | 16150 | 5478 | 14376 |
| 515 | 5413 | 18375 | 4776 | 18424 | 5388 | 17439 | 5042 | 15559 |
| 516 | 4843 | 19584 | 4386 | 19770 | 5017 | 18677 | 4614 | 16616 |
| 517 | 4441 | 20876 | 3937 | 20836 | 4450 | 19939 | 4083 | 17618 |
| 518 | 3897 | 22243 | 3575 | 22482 | 3962 | 21115 | 3713 | 18829 |
| 519 | 3499 | 23265 | 3251 | 23123 | 3551 | 22327 | 3284 | 19660 |
| 520 | 3123 | 24467 | 2820 | 24435 | 3190 | 23422 | 2983 | 20588 |
| 521 | 2700 | 25522 | 2513 | 25487 | 2761 | 24559 | 2626 | 21617 |
| 522 | 2367 | 26432 | 2153 | 26252 | 2458 | 25616 | 2245 | 22300 |
| 523 | 2103 | 27310 | 1914 | 26989 | 2140 | 26250 | 2010 | 23152 |
| 524 | 1831 | 28083 | 1673 | 27836 | 1869 | 27124 | 1697 | 23672 |
| 525 | 1618 | 28787 | 1424 | 28540 | 1544 | 27477 | 1503 | 24221 |
| 526 | 1330 | 29031 | 1253 | 28745 | 1440 | 27860 | 1262 | 24638 |
| 527 | 1191 | 29114 | 1094 | 28968 | 1161 | 28399 | 1148 | 24979 |
| 528 | 1086 | 29561 | 1031 | 29395 | 1042 | 28451 | 984 | 24683 |
| 529 | 870 | 29532 | 835 | 29144 | 893 | 28400 | 867 | 25047 |
| 530 | 762 | 29413 | 714 | 29125 | 769 | 28245 | 727 | 24989 |
| 531 | 728 | 29090 | 646 | 28609 | 672 | 27767 | 637 | 24535 |
| 532 | 559 | 28882 | 546 | 28193 | 591 | 27521 | 582 | 24091 |
| 533 | 511 | 28176 | 496 | 27569 | 535 | 27039 | 474 | 23613 |
| 534 | 459 | 27480 | 430 | 27081 | 459 | 26480 | 442 | 23055 |
| 535 | 375 | 26619 | 396 | 26480 | 411 | 25788 | 384 | 22563 |
| 536 | 338 | 26050 | 316 | 25744 | 364 | 24847 | 321 | 21935 |
| 537 | 324 | 25198 | 314 | 24872 | 325 | 24208 | 300 | 21205 |
| 538 | 267 | 24321 | 237 | 24226 | 274 | 23571 | 267 | 20490 |
| 539 | 212 | 23606 | 220 | 23433 | 229 | 22882 | 197 | 19978 |
| 540 | 192 | 22644 | 188 | 23001 | 200 | 22043 | 196 | 19431 |
| 541 | 170 | 22039 | 193 | 22027 | 173 | 21214 | 166 | 18616 |
| | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 542 | 155 | 21561 | 157 | 21219 | 155 | 20548 | 172 | 18180 |
| 543 | 133 | 20728 | 128 | 20733 | 141 | 19851 | 120 | 17475 |
| 544 | 137 | 19934 | 120 | 20140 | 124 | 19378 | 142 | 16974 |
| 545 | 124 | 19283 | 122 | 19547 | 111 | 18501 | 123 | 16412 |
| 546 | 93 | 18643 | 94 | 18941 | 95 | 18033 | 98 | 16064 |
| 547 | 106 | 18148 | 108 | 18395 | 111 | 17498 | 119 | 15481 |
| 548 | 177 | 17427 | 179 | 17742 | 169 | 16830 | 291 | 15004 |
| 549 | 927 | 16899 | 1436 | 17232 | 754 | 16332 | 1107 | 14359 |
| 550 | 5404 | 16305 | 7422 | 16795 | 4258 | 15795 | 4552 | 14060 |
| 551 | | 16012 | | 16579 | | 15472 | | 13809 |
| 552 | | 15460 | | 15764 | | 14822 | | 13241 |
| 553 | | 14962 | | 15365 | | 14543 | | 12909 |
| 554 | | 14602 | | 14955 | | 14052 | | 12577 |
| 555 | | 14302 | | 14565 | | 13706 | | 12185 |
| 556 | | 13757 | | 14243 | | 13325 | | 11935 |
| 557 | | 13401 | | 13787 | | 12982 | | 11507 |
| 558 | | 13094 | | 13382 | | 12552 | | 11197 |
| 559 | | 12841 | | 13049 | | 12325 | | 11045 |
| 560 | | 12402 | | 12781 | | 12097 | | 10730 |
| 561 | | 12139 | | 12490 | | 11734 | | 10443 |
| 562 | | 11817 | | 12247 | | 11336 | | 10204 |
| 563 | | 11432 | | 11868 | | 11066 | | 9902 |
| 564 | | 11037 | | 11529 | | 10687 | | 9684 |
| 565 | | 10950 | | 11235 | | 10515 | | 9379 |
| 566 | | 10662 | | 11029 | | 10306 | | 9266 |
| 567 | | 10590 | | 10826 | | 10179 | | 9098 |
| 568 | | 10201 | | 10549 | | 9890 | | 8796 |
| 569 | | 9957 | | 10342 | | 9669 | | 8653 |
| 570 | | 9765 | | 10052 | | 9314 | | 8475 |
| 571 | | 9635 | | 9730 | | 9104 | | 8213 |
| 572 | | 9280 | | 9633 | | 9005 | | 7986 |
| 573 | | 9067 | | 9350 | | 8885 | | 7801 |
| 574 | | 8753 | | 9244 | | 8404 | | 7528 |
| 575 | | 8624 | | 8923 | | 8257 | | 7311 |
| 576 | | 8187 | | 8707 | | 7973 | | 7142 |
| 577 | | 7914 | | 8426 | | 7718 | | 6986 |
| 578 | | 7727 | | 8023 | | 7609 | | 6798 |
| 579 | | 7468 | | 7793 | | 7175 | | 6588 |
| 580 | | 7194 | | 7697 | | 6967 | | 6278 |
| 581 | | 6878 | | 7509 | | 6738 | | 6126 |
| 582 | | 6815 | | 7007 | | 6530 | | 5910 |
| 583 | | 6577 | | 6862 | | 6311 | | 5621 |
| 584 | | 6343 | | 6757 | | 6118 | | 5542 |
| 585 | | 6065 | | 6363 | | 5930 | | 5329 |
| 586 | | 5892 | | 6229 | | 5796 | | 5246 |
| 587 | | 5782 | | 6010 | | 5455 | | 5046 |
| 588 | | 5549 | | 5973 | | 5285 | | 4831 |
| 589 | | 5260 | | 5727 | | 5090 | | 4792 |
| 590 | | 5155 | | 5543 | | 4950 | | 4491 |
| 591 | | 4939 | | 5362 | | 4845 | | 4319 |
| 592 | | 4837 | | 5097 | | 4632 | | 4236 |
| 593 | | 4644 | | 4993 | | 4471 | | 4029 |
| 594 | | 4477 | | 4747 | | 4303 | | 3850 |
| 595 | | 4393 | | 4639 | | 4155 | | 3786 |
| 596 | | 4151 | | 4473 | | 3967 | | 3716 |
| 597 | | 3891 | | 4351 | | 3872 | | 3442 |
| 598 | | 3751 | | 4158 | | 3654 | | 3357 |
| 599 | | 3696 | | 3997 | | 3581 | | 3304 |
| 600 | | 3511 | | 3944 | | 3547 | | 3137 |

# 7. Literaturverzeichnis

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CM (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, **9 (2)**, 423-432

Ali J, Akhtar N, Sultana Y, Baboota S, Ahuja A (2008). Antipsoriatic microemulsion gel formations for topical drug delivery of babchi oil (*Psoralea corylifolia*). *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **30 (4)**, 277-285

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90 (17)**, 7915-7922

Amin A, Buratovich M (2007). The anti-cancer charm of flavonoids: a cup-of-tea wil do! *Recent Patents on Anticancer Drug Discovery*, **2 (2)**, 109-117

Arends MJ, Wyllie AH (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology*, **32**, 223-354

Arts IC, Hollman PC (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81 (1 Suppl)**, 317S-325S

Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281 (5381)**, 1305-1308

Auer R, Del Maestro RF, Anderson R (1981). A simple and reproducible experimental *in vivo* glioma model. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, **8 (4)**, 325-331

Bhattacharya U, Halder B, Mukhopadhyay S, Giri AK (2009). Role of oxidation-triggered activation of JNK and p38 MAPK in black tea polyphenols induced apoptotic death of A375 cells. *Cancer Science*, **100 (10)**, 1971-1978

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161 (839)**, 370-371

Berger J, Hauber J, Hauber R, Geiger R, Cullen BR (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, **66 (1),** 1-10

Bertram C, Hass R (2008). Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biological Chemistry*, **389 (3)**, 211-220

Boland CR (1996). Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *International Journal of Cancer*, **69 (1)**, 47-49

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, **186**, 43-55

Bosetti C, Spertini L, Parpinel M, Gnagnarella P, Lagiou P, Negri E, Franceschi S, Montella M, Peterson J, Dwyer J, Giacosa A, La Vecchia C (2005). Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **14 (4)**, 805-808

Boutwell RK (1964). Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progression in Experimental Tumor Research*, **4**, 207-250

Broome S, Gilbert W (1981). Immunological screening method to detect specific translation products. *Proceedings of the National Acedemy of Sciences of the United States of America*, **75 (6)**, 2746-2749

Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, **112 (2),** 195-203

Cathcart R, Schwiers E, Ames BN (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*, **134 (1)**, 111-116

Chang H, Mi M, Ling W, Zhu J, Zhang Q, Wei N, Zhou Y, Tang Y, Yuan J (2008). Structurally related cyotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro. *Archives of Pharmacal Research*, **31 (9)**, 1137-1144

Chen Y, Wang HD, Xia X, Kung HF, Pan Y, Kong LD (2007). Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the chronic mild stress model of depression in mice. *Phytomedicine*, **14 (7-8)**, 523-529

Choi YH, Yon GH, Hong KS, Yoo DS, Choi CW, Park WK, Kong JY, Kim YS, Ryu SY (2008). In vitro BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Planta Medica*, **74 (11)**, 1405-1408

Colic M, Pavelic K (2000). Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *Journal of Molecular Medicine*, **78 (6)**, 333-336

Cotelle N (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **1 (6)**, 569-590

Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, **115 (1),** 61-69

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, **22 (53)**, 8543-8567

Delmulle L, Bellahcène A, Dhooge W, Comhaire F, Roelens F, Huvaere K, Heyerick A, Castronovo V, De Keukeleire D (2006). Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus L.*) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*, **13 (9-10)**, 732-734

Delmulle L, Vanden Berghe T, De Keukeleire D, Vandenabeele P (2008). Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus L.*) induces a caspase-independent form of cell death. *Phytotherapy Research*, **22 (2)**, 197-203

Dhur, BK (publisher) (2006). Chopra's indigenous drugs of India. *Academic publishers*, **3rd reprint**, 391-395

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 383-424

El-Masry S, Amer ME, Abdel-Kader MS, Zaatout HH (2002). Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt. *Phytochemistry*, **60 (8)**, 783-787

ElSohly HN, Joshi AS, Nimrod AC, Walker LA, Clark AM (2001). Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Medica*, **67 (1)**, 87-89

Enoki T, Ohnogi H, Nagamine K, Kudo Y, Sugiyama K, Tanabe M, Kobayashi E, Sagawa H, Kato I (2007). Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese herb, *Angelica keiskei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55 (15)**, 6013-6017

Erasto P, Bojase-Moleta G, Majinda RR (2004). Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*, **65 (7)**, 875-880

Evans MJ, Kovacs CJ (1977). Properties of the H-4-II-E tumor cell system. I. Growth and cell proliferation kinetics of an experimental hepatoma. *Cell and Tissue Kinetic,* **10 (3)**, 233-243

Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *The Journal of Clinical Investigation*, **108 (7)**, 957-962

Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta*, **71**, 377-391

Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61 (5)**, 759-767

Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **58 (2)**, 209-214

Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005). Death begets failure in the heart. *The Journal of Clinical Investigation*, **115 (3)**, 565-571

Fukai T, Yonekawa M, Hou AJ, Nomura T, Sun HD, Uno J (2003). Antifungal agents from the roots of *Cudrania cochinchinensis* against *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Journal of Natural Products*, **66 (8)**, 1118-1120

Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities, *Current Pharmaceutical Design*, **10 (30)**, 3813-3833

Gagnon H, Seguin J, Bleichert E, Tahara S, Ibrahim RK (1992). Biosynthesis of white lupin isoflavonoids from [U-‘4C] L-phenylalanine and their release into the culture medium. *Plant Physiology*, **100**, 76-79

Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O’Brien PJ (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, **177 (1)**, 91-104

Galluzzo P, Martini C, Bulzomi P, Leone S, Bolli A, Pallottini V, Marino M (2009). Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor alpha-dependent mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53 (6)**, 699-708

Germano S, O’Driscoll L (2009). Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalized medicine. *Current Cancer Drug Targets*, **9 (3)**, 398-418

Girotti AW (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, **39 (8)**, 1529-1542

González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic cell death. *Journal of Cell Science*, **118 (14)**, 3091-3102

Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, **8 (3)**, 281-290

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and, invasion. *Cell and Tissue Research*, **310 (3)**, 257-270

Gupta, AK (publisher) (2005). Herbal soaps & detergents hand book. *National Institute of Industrial Research*, 103-104

Gupta GK, Suri JL, Gupta BK, Dhar KL (1982). Bakuchalcone, a dihydrofuranochalcone from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Phytochemistry*, **21 (8)**, 2149-2151

Gupta S, Jha BN, Gupta GK, Gupta BK, Dhar KL (1990). Coumestans from the seeds of *Psoralea corylifolia*, *Phytochemistry*, **29 (7)**, 2371-2373

Haas A, Goebel W (1992). Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Research Community*, **16 (3)**, 137-157

Han B, Zhang JT (2004). Multidrug resistance in cancer chemotherapy and xenobiotic protection mediated by the half ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Current Medicinal Chemistry. Anti-cancer Agents*, **4 (1)**, 31-42

Hannke-Lohmann A, Pildner von Steinburg S, Dehne K, Benard V, Kolben M, Schmitt M, Lengyel E (2000). Downregulation of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the placentas of women with preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, **96 (4)**, 582-587

Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55 (5)**, 481-504

Hartmann T (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **68 (22-24)**, 2831-2846

Hatano T, Shintani Y, Aga Y, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T (2000). Phenolic constituents of Licorice. VIII.[1)] Structure of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of Licorice phenolics on methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **48 (9)**, 1286-1292

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001). Apoptotic cell removal. *Current Biology: CB.*, **11 (19)**, R795-805

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer*, **20 (1)**, 21-29

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, **62 (1)**, 1-20

Hunter DR, Haworth RA (1979). The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **195 (2)**, 453-459

Hunter T (2000). Signaling—2000 and beyond. *Cell*, **100 (1)**, 113-127

Ichijo H (1999). From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, **18 (45)**, 113-127

Inamori Y, Baba K, Tsujibo H, Taniguchi M, Nakata K, Kozawa M (1991). Antibacterial activity of two chalcones, Xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei KOIDZUMI*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **39 (6)**, 1604-1605

Innok P, Rukachaisirikul T, Suksamrarn A (2009). Flavnoids and pterocarpans from the bark of *Erythrina fusca*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, **57 (9)**, 993-996

Iwashina T (2003). Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*, **17 (1)**, 24-44

Jain AC, Gupta GK, Ran PR (1974). Isolation and constitution of Corylin, a new isoflavone from the fruits of *Psoralea corylifolia*. *Indian Journal of Chemistry*, **12**, 659-660

Jin Z, El-Deiry WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, **4 (2)**, 139-163

Jin S, Zhang QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH (2010). Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via zhe mitochondrial pathway. *Annals of Oncology*, **21 (2)**, 263-268

Judah JD, Ahmed K, McLean AE (1965). Pathogenesis of cell necrosis. *Federation Proceedings*, **24 (5)**, 1217-1221

Juma BF, Majinda RT (2006). Three new compounds from *Erythrina lysistemon* and their antimicrobial, radical scavenging activities and their brine shrimp lethality. *11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananariva, Maddagascar*, 97-109

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26 (4)**, 239-257

Khatune NA, Islam ME, Haque ME, Khondkar P, Rahman MM (2004). Antibacterial compounds from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Fitoterapia*, **75 (2)**, 228-230

Kimura Y, Baba K (2003). Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: Isolation of an active substance, Xanthoangelol. *International Journal of Cancer*, **106 (3)**, 429-437

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependant APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, **14 (22)**, 5579-5588

Komatsu M, Yokoe I, Shirataki Y (1981). Studies on the constituents of *Sophora* species XIV.[1)] Constituents of the root of *Sophora franchetiana DUNN*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **29 (2)**, 532-538

Konkel A, Schunck WH (2010). Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, (epub ahead of print)

Korotzer JL, Bergquist LM, Searcy RL (1961). Use of cellulose acetate and Ponceau S for electrophoretic serum protein analysis. *The American Journal of Medical Technology*, **27**, 197-203

Kovacs CJ, Evans MJ, Hopkins HA (1977). Properties of the H-4-II-E tumor cell system. II. *In vitro* characteristics of an experimental tumor cell line. *Cell and Tissue Kinetics*, **10 (3)**, 245-254

Kozawa M, Morita N, Baba K, Hata K (1977). The structure of Xanthoangelol, a new chalcone from the roots of *Angelica keiskei KOIDZUMI (Umbelliferae)*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **25 (3)**, 515-516

Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407 (6805)**, 789-795

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of nutrition*, **38 (3)**, 133-142

Kyhse-Andersen J (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **10 (3-4)**,203-9

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227 (5259)**, 680-5

Lake BG (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, **37 (4)**, 423-453

Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK (2009). Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **46 (6)**, 421-440

Le Bras M, Clément MV, Pervaiz S, Brenner C (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*, **20 (1)**, 205-219

Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **92 (2)**, 154-160

Leytus SP, Melhado LL, Mangel WF (1983). Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases, *The Biochemical Journal*, **209 (2)**, 299-307

Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, Wang X, Xu J (2008). Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway, *Toxicology in vitro*, **22 (7)**, 1749-1753

Lin CC, Lee HY, Chang CH, Namba T, Hattori M (1996). Evaluation of the liver protective principles from the root of *Cudrania cochinchinensis var. gerontoges*. *Phytotherapy Research*, **10**, 13-17

Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, **8 (7)**, 634-646

Liu R, Li A, Sun A and Kong L (2004). Preparative isolation and purification of psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1157 (1-2)**, 225-228

Lockshin RA, Williams CM (1964). Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology*, **10**, 643-649

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry,* **193 (1)**, 265-275

MacCorkle RA, Tan TH (2005). Mitogen-activated protein kinases in cell-cyccle control. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **43 (3)**, 451-461

Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A (1989). Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochemical Research*, **14 (10)**, 941-947

Mar W, Je KH, Seo EK (2001). Cytotoxic constituents of *Psoralea corylifolia*, *Archives of Pharmacal Research*, **24 (3)**, 211-213

Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21 (3)**, 361-370

Martinon F, Tschopp J (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, **117 (5)**, 561-574

Matsuura M, Kimura Y, Nakata K, Baba K, Okuda H (2000). Artery relaxation by chalcones isolated from the roots of *Angelica keiskei*. *Planta Medica*, **67 (3)**, 230-235

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773 (8)**, 1263-1284

Michels G, Wätjen W, Niering P, Steffan B, Thi QH, Chovolou Y, Kampkötter A, Bast A, Proksch, P, Kahl R (2005). Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, **206 (3)**, 337-348

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status of premature neonates. *Clinical Science*, **84 (4)**, 407-411

Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus L.*) and beer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84 (6)**, 2249-2252

Mizumoto Y, Kyo S, Mori N, Sakaguchi J, Ohno S, Maida Y, Hashimoto M, Takakura M, Inoue M (2007). Activation of ERK 1/2 occurs independently of KRAS or BRAF status in endometrial cancer and is associated with favorable prognosis. *Cancer science*, **98 (5)**, 652-658

Morabito G, Trombetta D, Singh Brajendra K, Prasad Ashok K, Parmar Virinder S, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L (2010). Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in *in vitro* cell-free systems. *Biochimie*, **92 (9)**, 1101-1107

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65 (1-2)**, 55-63

Motani K, Tabata K, Kimura Y, Okano S, Shibata Y, Abiko Y, Nagai H, Akihisa T, Suzuki T (2008). Proteomic analysis of apoptosis induced by Xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **31 (4)**, 618-626

Murakami S, Kijima H, Isobe Y, Muramatsu M, Aihara H, Otomo S, Baba K, Kozawa M (1990). Inhibition of gastric H+, K (+)-ATPase by chalcone derivatives, Xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, from *Angelica keiskei KOIDZUMI*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **42 (10)**, 723-726

Nkengfack AE, Vouffo TW, Fomum ZT, Meyer M, Bergendorff O, Sterner O (1994). Prenylated isoflavone from the roots of *Erythrina sigmoidea*. *Phytochemistry*, **36 (4)**, 1047-1051

Nkengfack AE, Azebaze AG, Waffo AK, Fomum ZT, Meyer M, van Heerden FR (2001). Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. *Phytochemistry*, **58 (7)**, 1113.1120

Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R (1992). Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Acedemy of Sciences of the United States of America*, **89 (12)**, 5408-5412

Ogawa H, Okada Y, Kamisako T, Baba K (2007). Beneficial effect of Xanthoangelol, a chalcone compound from *Angelica keiskei*, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **34 (3)**, 238-243

Orhan DD, Ozçelik B, Ozgen S, Ergun F (2009). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*,

Owen JJ, Jenkinson EJ (1992). Apoptosis and T-cell repertoire selection in the thymus. *Annals of the New York Academy of Science*, **663**, 305-310

Pae HO, Cho H, Oh GS, Kim NY, Song EK, Kim YC, Yun YG, Kang CL, Kim JD, Kim JM, Chung HT (2001). Bakuchiol from *Psoralea corylifolia* inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase gene via inactivation of nuclear transcription factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*, **1 (9-10)**, 1849-1855

Parker KK, Norenberg MD, Vernedakis A (1980). „Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science*, **208** (4440), 179-181

Patsos G, André S, Roeckel N, Gromes R, Gebert J, Kopitz J, Gabius HJ (2009). Compensation of loss of protein function in microsatellite-unstable colon cancer cells (HCT 116): a gene-dependent effect on the cell surface glycan profile. *Glycobiology*, **19 (7)**, 726-734

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, **22 (2)**, 153-183

Pitot HC, Peraino C, Morse PA Jr., Potter VA (1964). Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*. *National Cancer Institute Monograph*, **13**, 229-245

Poppek D, Grune T (2006). Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxidants & Redox signaling*, **8 (1-2)**, 173-184

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, **262 (5134)**, 695-700

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, **26 (9-10)**, 1231-1237

Reed JC (2002). Apoptosis-based therapies. *Nature Reviews. Drug Discovery,* **1 (2)**, 111-121

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20 (7)**, 933-956

Rice-Evans (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, **8 (7)**, 797-807

Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods*, **156**, 39-45

Rust C, Gores GJ (2000). Apoptosis and liver disease. *The American Journal of Medicine*, **108 (7)**, 567-574

Rüweler M, Anker A, Gülden M, Maser E, Seibert H (2008). Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in C6 astroglioma cells. *Toxicology in vitro*, **22 (5)**, 1377-1381

Salvemini D, Botting R (1993). Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **14 (2)**, 36-42

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiology and Biochemistry*, **11 (4)**, 173-186

Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, **130 (8S Suppl)**, 2073S-2085S

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005). Dietary polyphenols and the prevetion of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45 (4)**, 287-306

Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA (2005). Effects of active MEK1 expression in vivo. *Cancer Letters*, **230 (1)**, 1-5

Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The biochemical Journal*, **358 (3)**, 547-557

Shukla S, Gupta S (2006). Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5 (4)**, 843-852

Seelinger G, Merfort I, Wölfle U, Schempp CM (2008). Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, **13 (10)**, 2628-2651

Sies H (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, **91 (3C)**, 31S-38S

Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82 (2)**, 291-295

Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G (2005). The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews*, **26 (7)**, 877-897

Tabata K, Motani K, Takayanagi N, Nishimura R, Asami S, Kimura Y, Ukiya M, Hasegawa D, Akihisa T, Suzuki T (2005). Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **28 (8)**, 1404-1407

Terao J (2009). Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum of Nutrition*, **61**, 87-94

Teschke R, Bahre R (2009). Severe hepatotoxicity by Indian Ayurvedic herbal products: a structured causality assessment. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology*, **8 (3)**, 258-266

Teuscher E (1997). Biogene Arzneimittel. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*, **5. Auflage**

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281 (5381)**, 1312-1316

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76 (9)**, 4350-4

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, **10 (8)**, 1343-1374

Valko M, Morris H, Cronin MT (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, **12 (10)**, 1161-1208

van Cruchten S, van den Broeck W (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, **31(4)**, 214-223

van Dross R, Xue Y, Knudson A, Pelling JC (2003). The chemopreventive bioflavonoid apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *The Journal of Nutrition*, **133 (11 Suppl 1)**, 3800S-3804S

Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, van Loo G, Declerq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicin*, **187 (9)**, 1477-1485

Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, van de Craen M, Declerq W, Fiers W, Vandenabeele P (1998). Dual signaling of the Fas receptor: inhibition of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, **188 (5)**, 919-930

Viola G, Vedaldi D, dall'Acqua F, Basso G, Disarò S, Spinelli M, Cosimelli B, Boccalini M, Chimichi S (2004). Synthesis, cytotoxicity, and apoptosis induction in human tumor cells by geiparvarin analogues. *Chemistry & Biodiversity*, **1 (9)**, 1265-1280

Wada T, Penninger JM (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, **23 (16)**, 2838-2849

Wang D, Li F, Zhiming J (2001). Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia* extracts and two of its flavonoids. *Planta Medica*, **67 (8)**, 748-749

Wang YH, Hou AJ, Zhu GF, Chen DF, Sun HD (2005). Cytotoxic and antifungal isoprenylated xanthones and flavonoids from *Cudrania fruticosa*. *Planta Medica*, **71 (3)**, 273-274

Wang G, Gong Y, Burczynski FJ, Hasinoff BB (2008). Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. *Free Radical Research*, **42 (5)**, 435-441

Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, **13 (1)**, 269-282

Warrier PK, Nambiar PK (1993). Indian medicinal plants: A compendium of 500 species. *Orient Longman*, **Ausg. 4**, 374-375

Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi QH, Proksch P, Kahl R (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of Nutrition*, **135 (3)**, 525-531

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology & Medicine*, **36 (7)**, 838-849

Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JF, Karin M, Wang JY, Puri PL (2000). p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Molecular and Cellular Biology*, **20 (11)**, 3951-3964

Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R (2009). The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, **16 (32)**, 4236-4260

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, **68**, 251-306

Xavier CP, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2009). Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Letters*, **281 (2)**, 162-170

Xiong Z, Wang D, Xu Y, Li F (2003). Osteoblastic differentiation bioassay and its application to investigating the activity of fractions and compounds from *Psoralea corylifolia L. Die Pharmazie*, **58 (12)**, 925-928

Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ (2001). Apigenin inhibits growth and induces G2/m arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Research*, **21 (1A)**, 413-420

Yin S, Fan CQ, Wang Y, Dong L, Yue JM (2004). Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12 (16)**, 4387-4392

Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC (2000). Src and Cas mediate JNK activation but not ERK 1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, **275 (16)**, 11706-11712

Yu LL, Chen YG, Liu JC, Lu YP, Gui SH (2005). Chalcones from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Polish Journal of Chemistry*, **79**, 1173-1177

Zhang CZ, Wang SX, Zhang Y, Chen JP, Liang XM (2005). In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used fort he management of menopausal symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, **98 (3)**, 295-300

Zhang HM, Wang YQ, Zhou QH (2009). Investigation oft he interactions of quercetin and morin with trypsin. *Luminescence*, **24 (5)**, 355-362

Zhao LH, Wu MH, Xiang BR (2005). Analysis of *Psoralea corylifolia L.* fruits in different regions. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **53 (8)**, 1054-1057

# 8. Veröffentlichungen

Posterpräsentationen:

Limper C., Wang Y., Chovolou Y., Kampkötter A., Ruhl S., Rohrig R., Proksch P., Kahl R., Wätjen W. Toxic effects of phenolic compounds isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia*. 50. Frühjahrstagung der DGPT (10.03.-12.03.2009), Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Limper C., Wang Y., Chovolou Y., Kampkötter A., Ruhl S., Rohrig R., Proksch P., Kahl R., Wätjen W. Toxic effects of phenolic compounds isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia*. 3rd international Symposium Graduate College (05.03.-06.03.2009), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Wätjen W., Rohrig R., Ruhl S., Böddeker S., Limper C., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Proksch P., Kahl R.: Effects of marine natural compunds in mammalian cells: Investigation on intracellular signalling pathways, apoptosis and oxidative stress, 50. Frühjahrstagung der DGPT (10.03.-12.03.2009), Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Limper C., Wang Y., Ruhl S., Wang Z., Lou Y., Totzke F., Kubbutat M., Chovolou Y., Proksch P., Wätjen W. (2013). Compounds isolated from *Psoralea corylifolia* seeds inhibit protein kinase activity and induce apoptotic cell death in mammalian cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **65 (9)**, 1393-1408

# 9. Danksagung

Ich möchte gerne einigen Menschen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Regine Kahl und Herrn Prof Dr. rer. nat. Gerhard Fritz, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation im Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen.

Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Wim Wätjen für die Vergabe des Promotionsthemas bedanken. Die vielen Diskussionen, Ratschläge und Anregungen, sowie der tolerante und freundschaftliche Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe haben mir bei der Durchführung der Arbeit sehr geholfen.

Desweiteren danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Klaus Unfried für seine Bereitschaft, sich als Korreferent zur Verfügung zu stellen.

Herrn Dr. rer. nat. Sven Ruhl danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit zu Beginn des Freisemesters, sowie für die zahlreichen Hilfestellungen während meiner gesamten Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Yao Wang (Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie) danke ich für die Bereitstellung der untersuchten Substanzen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer großartig unterstützt und mir das Medizinstudium ermöglicht haben. Meinem Bruder Dominik danke ich für seine Hilfe in allen Lebenslagen. Meiner Freundin Christina danke ich für die große Liebe und Unterstützung, du bist und bleibst die Beste!

# 10. Lebenslauf

**persönliche Daten:**

| | |
|---|---|
| Familienname | Limper |
| Vorname | Christian |
| Geburtsdatum | 12.11.1984 |
| Geburtsort | Siegen |

**Hochschulstudium:**

| | |
|---|---|
| 2005-2012 | Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf |
| 2007 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2012 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2008-2013 | Promotion, Institut für Toxikologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf |

**Zivildienst:**

| | |
|---|---|
| 2004-2005 | Ambulanter sozialer Dienst der Caritas, Lennestadt |

**Schulausbildung:**

| | |
|---|---|
| 1991-1995 | St. Johannes Grundschule, Kirchhundem |
| 1995-2004 | Gymnasium Maria Königin, Lennestadt |
| 2004 | Allgemeine Hochschulreife |

# 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum _____

Christian Limper