

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Fritz

**Toxizität von Avaron-Derivaten aus
Dysidea avara in Säugerzellen:
Aktivierung des „antioxidant response element“
und Induktion der Hämoxxygenase-1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Roland Schmitz

2012

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

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen
Korreferent: PD Dr. med. Dirk Graf

Meinen Eltern Frank und Rita Schmitz gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Journals

Hamed ANE, Waetjen W, Schmitz R, Chovolou Y, Edrada-Ebel R, Youssef DTA, Wray V, Kamel MS Proksch P (2013). A New Bioactive Sesquiterpenoid Quinone from the Mediterranean Sea Marine Sponge *Dysidea avara*. Nat Prod Commun. 8(3): 289-92

Poster

Rohrig R, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kampkötter A, Kahl R, Wätjen W; Influence of dietary flavonoids on Nrf2- mediated gene- expression. 05.03.2009 - 06.03.2009 *3rd Symposium of the Graduate College 1427 - Nanoparticles and the gastrointestinal tract, Düsseldorf*

Rohrig R, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kampkötter A, Kahl R, Wätjen W; Modulation of Nrf2-mediated gene expression by dietary flavonoids. 10.03.2009 - 12.03.2009 *50th Annual Meeting of DGPT, Mainz*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009; 379 Suppl 1:8-100. S72/Nr.351

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 compounds in mammalian cells: Investigation on intracellular signalling pathways, apoptosis and oxidative stress. 10.03.2009 - 12.03.2009 *50th Annual Meeting of DGPT, Mainz*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009; 379 Suppl 1:8-100. S72/Nr.355

Rohrig R, Gassmann K, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kampkötter A, Kahl R, Fritsche E, Wätjen W; Influence of dietary flavonoids on Nrf2- mediated gene- expression. 13.09.2009 - 16.09.2009 *46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden*, Toxicol Lett. 2009; 189 Suppl 1:S1-274. S107/Nr.N31

Wätjen W, Ruhl S, Rohrig R, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou A, Kampkötter A, Proksch P, Kahl R; Marine natural compounds modulate intracellular signalling pathways, apoptosis and oxidative stress in mammalian cells. 13.09.2009 - 16.09.2009 *46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden*, Toxicol Lett. 2009; 189 Suppl 1:S1-274. S107/Nr.N32

Rohrig R, Gassmann K, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kampkötter A, Kahl R, Fritsche E, Wätjen W; Influence of dietary flavonoids on Nrf2- mediated gene- expression. 08.10.2009 - 09.10.2009 *4th Symposium of the Graduate College 1427 - Endocrine Disruptors: Mode of action and exposure assessment, Düsseldorf*

Rohrig R, Ruhl S, Havermann S, Gassmann K, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kahl R, Fritsche R, Wätjen W; Influence of dietary flavonoids on the Nrf2/ARE signaling pathway. 23.03.2010 - 25.03.2010 *51st Annual Meeting of DGPT, Mainz*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2010; 381 Suppl 1:1-92. S68/Nr.318

Rohrig R, Ruhl S, Havermann S, Ackermann D, Schmitz R, Bergermann A, Chovolou Y, Kahl R, Wätjen W; Effects of flavonoids on the Nrf2/ARE signaling pathway in Hct116 cells. 30.03.2011 - 01.04.2011 *77th Annual Meeting of DGPT, Frankfurt a.M.*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2011; 383 Suppl 1:1-112. S100/Nr.P453

Zusammenfassung

Krebserkrankungen des Magen-Darm-Trakts stellen in Deutschland wegen der hohen Zahl an Neuerkrankungen eine große Herausforderung dar. In höheren Stadien ist die systemische Radiochemotherapie ergänzend zur chirurgischen Behandlung ein wichtiger Therapiepfeiler, dessen sukzessive Weiterentwicklung zu einem verlängerten Überleben der Patienten geführt hat.

Zur dieser Entwicklung tragen unter anderem Naturstoffe bei, indem sie entweder direkt als Therapeutika eingesetzt werden oder indem sie als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Pharmaka dienen. Gerade das marine Habitat zeigt sich hierbei als viel versprechende Quelle für pharmakologisch interessante Strukturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen mit den 5 Substanzen Avaron, Avarol, 3'-Methylaminoavaron (AH-27), 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und N-Methylmelemeleone A (AH-25) durchgeführt. Sie wurden vom Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie aus dem Schwamm *Dysidea avara* isoliert und zum Teil erstmalig beschrieben.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden MTT-Assays mit HCT116 Darmkrebszellen und vergleichend auch mit H4IIE Hepatomzellen durchgeführt. Dabei wiesen Avaron und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) EC_{50} -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf. Ein leicht abgeschwächter Effekt ließ sich in den H4IIE-Zellen nachweisen. Die Ergebnisse aus Caspase- und LDH-Assays deuten darauf hin, dass es sich bei der Art des Zelltodes um eine Nekrose handelt.

Der Schutz der Zelle vor Radikalen wird unter Anderem durch die Nrf2 Signalkaskade geregelt. Zur Detektion von oxidativem Stress wurden DCF-Assays durchgeführt. Sie zeigen für 25 μ M Avaron ein ähnlich starkes Signal wie für 100 μ M Wasserstoffperoxid. Bezüglich der Nrf2 Expression im Western Blot sorgt die neu beschriebene Substanz N-Methylmelemeleone A (AH-25) in 50 mikromolarer Konzentration für die deutlichste Steigerung des Signals, dicht gefolgt 3'-Methylaminoavaron (AH-27), trotz einer toxizitätsbedingt stark reduzierten Konzentration von lediglich 10 μ M. Die deutlichste Aktivierung des „antioxidant response element“, gemessen im Luciferase-Assay, bewirken 50 μ M Avarol und 10 μ M 3'-Methylaminoavaron (AH-27). RT-PCRs zur Darstellung der HO-1-Gen Transkription zeigen ein ähnliches Ergebnis. Bezüglich der Beeinflussung des Nrf2 Signalweges bestehen je nach Ebene der Kaskade substanzspezifische Unterschiede, wobei das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) den durchgehend deutlichsten Effekt zu haben scheint.

Weitere Forschungen im Hinblick auf Apoptose befassen sich mit dem Einfluss der Substanzen auf den NF κ B Signalweg. Im SEAP-Assay zeigten alle Substanzen abgesehen vom Methylmelemeleone A (AH-25) eine signifikante Inhibierung des NF κ B Signalweges, während die basale NF κ B Aktivität unbeeinflusst blieb.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Substanzen in Abhängigkeit von der molekularen Struktur ein hohes Maß an Toxizität besitzen und in intrazelluläre Signalkaskaden einzugreifen vermögen. Im Hinblick auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnte eine stärkere Toxizität und ein größerer Einfluss auf den Nrf2 Signalweg von Position 3 der Methylamino-Gruppe (AH-27) gegenüber der Position 4 (AH-24) gezeigt werden.

Summary

Intestine cancer features a huge challenge in Germany because of the high incidence and the huge amount of cancer-related deaths. Especially in advanced stages chemoradiation is an important therapeutic option in addition to surgical treatment. Gradual progress that has been made in the segment of systemic treatment led to an improved survival of the patients.

Natural materials promote this development too, either being used as remedies themselves, or serving as chemical leads for the development of new pharmaceutical drugs. Especially the marine habitat proved to be a promising source for pharmacologically interesting chemical structures. This paper deals with research towards the 5 substances Avarone, Avarol, 3'-Methylaminoavarone (AH-27), 4'-Methylaminoavarone (AH-24) und N-Methylmelemeleone A (AH-25). They have been isolated from the marine sponge *Dysidea avara* and to some extent initially been characterized by the Institute for Pharmaceutical Biology and Biotechnology in Düsseldorf.

Cytotoxic effects on HCT116 bowel cancer cells and comparatively on H4IIE hepatoma cells have been evaluated with MTT-assays. Avarone and 3'-Methylaminoavarone (AH-27) appeared to have EC₅₀-values within a single-digit mikromolar range. Results in H4IIE cells were similar, even though the impact on the cells was slightly weaker. Caspase- and LDH-assays indicate that the mode of cellular death is assumingly based on necrosis.

The organisms' protection from free radicals is to a certain extent mediated through the Nrf2 signaling cascade. DCF-assays for the detection of oxidative stress revealed an effect of 25 µM Avarone that is equal to 100 µM hydrogen peroxide. The initially characterized compound N-Methylmelemeleone A (AH-25) proved to evoke the strongest effect in Nrf2 western blot analysis at a concentration of 50 µM, closely followed by 3'-Methylaminoavarone (AH-27) at a concentration of 10 µM, reduced due to cytotoxicity. 50 µM Avarol and 10 µM 3'-Methylaminoavarone (AH-27) seem to have the greatest impact on the activation of the "antioxidant response element", evaluated with the help of Luciferase-assays. RT-PCRs displaying the HO-1 gene transcription reveal similar results. On the bottom line, the Nrf2 signaling cascade is variably influenced on different levels in a substance-specific manner, whereas 3'-Methylaminoavarone (AH-27) seems to have the most persistent impact on each level of the cascade.

Further investigations concerning apoptosis deal with the NFκB signaling cascade. Every compound apart from Methylmelemeleone A (AH-25) showed a significant inhibition of the NFκB activity measured with SEAP-assays. Still, the basal NFκB activity remained unaffected.

Altogether these results point out the compounds' high degree of toxicity and the ability to interfere with intracellular signaling cascades. With regard to structure-activity-relations a predominance of the methyl-amino-groups position 3 (AH-27) towards position 4 (AH-24) could be pointed out with respect to cytotoxicity and influence on the Nrf2 signaling cascade.

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius	mg	Milligramm
µl	Mikroliter	min.	Minute
µM	Mikromol	ml	Milliliter
Abb.	Abbildung	mRNA	<i>messenger RNA</i>
Ak	Antikörper	MTT	3-(4, 5 Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	n	Anzahl der Versuche
ARE	<i>antioxidant response element</i>	NaCl	Natriumchlorid
ATP	Adenosin-Triphosphat	NCI	National Cancer Institute der USA
BACH 1	<i>BTB and CNC homology 1</i>	NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	nm	Nanometer
cDNA	<i>complementary DANN</i>	Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid	OD	optische Dichte
CTP	Cytosin-Triphosphat	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DCF	2', 7'-Dichlorofluorescein	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PVDF	<i>polyvinylidene difluorid</i>
dH₂O	destilliertes Wasser	rfu	<i>relative flow units</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>	RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RKI	Robert-Koch-Institut
DNase	Desoxyribonuclease	RLB	<i>reporter lysis buffer</i>
DNS /	Desoxyribonucleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DNA		RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat	ROS	<i>reactive oxygen species</i> = Sauerstoffradikale
DTT	Dithiothreitol	rpm	<i>rotations per minute</i>
EC₅₀	<i>effective concentration 50%</i>	RT	Raumtemperatur; reverse Transkriptase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase	SD	<i>standard deviation</i>
EtBr	Ethidiumbromid	SEAP	sezernierte embryonale alkalische Phosphatase
EtOH	Ethanol	sek.	Sekunde
FCS	<i>fetal calf serum</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
g	Gramm; Erdbeschleunigung	tBHQ	tert-Butylhydrochinon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.	TBST	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
h	Stunde	TNFR1	TNF-α Rezeptor Subtyp 1
H₂-DCF	2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein	TNF-α	Tumornekrose-Faktor α
H₂O	Wasser	TTP	Thymidin-Triphosphat
H₂O₂	Wasserstoffperoxid	UV	ultraviolett
HCl	Salzsäure	V	Volt
HO-1	Hämoxygenase-1	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G	W	Watt
IκB	Inhibitor-κB Protein		
kb	Kilobase		
KCl	Kaliumchlorid		
Keap-1	<i>Kelch-like ECH-associated protein-1</i>		
l	Liter		
Lsg.	Lösung		
mA	Milliampere		
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Protein Kinase		

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	- 1 -
1.1 NATURSTOFFE ALS LEITSTRUKTUREN	- 1 -
1.2 SUBSTANZEN MARINEN URSPRUNGS IM INTERESSE DER FORSCHUNG	- 2 -
1.3 AVARON UND SEINE DERIVATE AUS DEM SCHWAMM <i>DYSIDEA AVARA</i>	- 3 -
1.4 AVARON UND SEINE ANALOGA: MÖGLICHE THERAPEUTISCHE EINSATZGEBIETE	- 5 -
1.5 TOXIZITÄT DER SUBSTANZEN: APOPTOSE VS. NEKROSE	- 6 -
1.6 DER NRF2 SIGNALWEG	- 7 -
1.7 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR NFκB UND DIE ONKOGENESE	- 9 -
1.8 ZIELSETZUNG	- 10 -
<u>2. ERGEBNISSE</u>	- 12 -
2.1 UNTERSUCHUNG VON ZYTOTOXIZITÄT UND ART DES ZELLTODES	- 12 -
2.1.1 NACHWEIS DER ZYTOTOXIZITÄT IN HCT116- UND H4IIE-ZELLEN	- 12 -
2.1.2 UNTERSUCHUNG DER ART DES ZELLTODES: APOPTOSENACHWEIS	- 17 -
2.1.3 UNTERSUCHUNG DER ART DES ZELLTODES: NEKROSENACHWEIS	- 18 -
2.2 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG DES NRF2 SIGNALWEGES	- 22 -
2.2.1 NACHWEIS INTRAZELLULÄRER REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	- 22 -
2.2.2 AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NRF2	- 23 -
2.2.3 AKTIVIERUNG DES „ANTIOXIDANT RESPONSE ELEMENT“	- 26 -
2.2.4 INDUKTION DER HÄMOXYGENASE-1	- 28 -
2.3 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG DES NFκB SIGNALWEGES	- 30 -
2.3.1 MODULATION DES UNSTIMULIERTEN NFκB SIGNALWEGES	- 30 -
2.3.2 INHIBIERUNG DES NFκB SIGNALWEGES	- 31 -
<u>3. DISKUSSION</u>	- 34 -
3.1 ZYTOTOXIZITÄT VON AVARON UND DESSEN DERIVATEN	- 35 -
3.2 BEEINFLUSSUNG DES NRF2 SIGNALWEGES	- 38 -
3.3 BEEINFLUSSUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NFκB	- 42 -
3.4 ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN	- 43 -

<u>4. MATERIAL UND METHODEN</u>	- 45 -
4.1 MATERIAL	- 45 -
4.1.1 GETESTETE NATURSTOFFE	- 45 -
4.1.2 CHEMIKALIEN	- 46 -
4.1.3 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	- 47 -
4.1.4 ANTIKÖRPER & ENZYME	- 48 -
4.1.5 GERÄTE	- 49 -
4.1.6 SOFTWARE	- 49 -
4.1.7 SONSTIGE MATERIALIEN	- 49 -
4.2 KULTIVIERUNG DER ZELLINIEN	- 50 -
4.2.1 KRYOKONSERVIERUNG	- 51 -
4.3 BESTIMMUNG DER ZELLVIABILITÄT (MTT-ASSAY)	- 51 -
4.4 BESTIMMUNG DER ART DES ZELLTODES (APOPTOSE ODER NEKROSE)	- 52 -
4.4.1 BESTIMMUNG DER CASPASE 3/7 AKTIVITÄT ALS APOPTOSENACHWEIS (APO ONE®)	- 52 -
4.4.2 BESTIMMUNG DER LDH-AKTIVITÄT IM MEDIUM ALS NEKROSENACHWEIS (LDH)	- 53 -
4.5 BESTIMMUNG DES PROOXIDATIVEN POTENTIALS (DCF-ASSAY)	- 55 -
4.6 BESTIMMUNG DER NRF2-AKTIVIERUNG (WESTERN BLOT ANALYSE)	- 56 -
4.6.1 ISOLIERUNG UND FRAKTIONIERUNG VON ZYTOSOLISCHEN UND NUKLEÄREN PROTEINEN	- 57 -
4.6.2 PROTEINBESTIMMUNG	- 57 -
4.6.3 GIEßEN DER GELE	- 57 -
4.6.4 GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG DER PROTEINE	- 58 -
4.6.5 WESTERN-BLOTTING ZUM TRANSFER DER PROTEINE AUF DIE PVDF-MEMBRAN	- 58 -
4.6.6 BEHANDLUNG DER MEMBRAN MIT ANTIKÖRPERN UND DETEKTION DES SIGNALS	- 59 -
4.7 BESTIMMUNG DER ARE-AKTIVIERUNG (LUCIFERASE-ASSAY)	- 59 -
4.7.1 HERSTELLUNG DES TRANSFEKTIONSMEDIUMS	- 60 -
4.7.2 HERSTELLUNG DER ARE-PLASMID-LÖSUNG	- 60 -
4.8 BESTIMMUNG DER HÄMOXIGENASE-1-INDUKTION (RT-PCR)	- 61 -
4.8.1 RNA-ISOLIERUNG	- 62 -
4.8.2 RNA-QUANTIFIZIERUNG	- 62 -
4.8.3 REVERSE TRANSKRIPTION (RT)	- 63 -
4.8.4 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	- 63 -
4.9 AKTIVIERUNG/INHIBIERUNG DES NFκB SIGNALWEGES (SEAP-ASSAY)	- 64 -

<u>5. ROHDATEN</u>	- 66 -
5.1 UNTERSUCHUNG VON ZYTOTOXIZITÄT UND ART DES ZELLTODES	- 66 -
5.2 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG DES NRF2 SIGNALWEGES	- 78 -
5.3 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG DES NFκB SIGNALWEGES	- 81 -
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	- 84 -
<u>8. DANKSAGUNG</u>	- 88 -
<u>9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	- 89 -

1. Einleitung

1.1 Naturstoffe als Leitstrukturen

Viele verschiedene in der Natur vorkommende Substanzen haben das Potential pharmakologische Wirkungen auszuüben. Dieses Potential macht der Mensch sich zu Nutze, indem solche Substanzen isoliert und zu medizinischen Zwecken verwendet werden. Neben dem direkten therapeutischen Effekt können ihre Strukturen Denkanstöße für die Entwicklung neuer Medikamente geben und dienen somit als Leitstrukturen für die Herstellung neuer Pharmaka.

Das Taxol[®] (Paclitaxel), eine Substanz die z.B. zur Therapie des Ovarial-Karzinoms eingesetzt wird (Lipp & Bokemeyer, 2005), ist ein gutes Beispiel für den oben genannten Weg der Medikamentenentwicklung. Im Jahre 1964 wurden Proben des Baumes *Taxus brevifolia* in den Laboratorien von Monroe E. Wall untersucht. Die Pflanze wurde im Rahmen eines von Dr. Jonathan L. Hartwell, einem Mitarbeiter des US-amerikanischen National Cancer Institute (NCI), geleiteten Screening für potentielle Krebsmedikamente entdeckt und kommt primär an den Küstenregionen der US-Bundesstaaten Kalifornien, Washington und Oregon vor. Aus ihr konnte das Paclitaxel isoliert werden, das nach der Untersuchung des Wirkmechanismus und Bestehen der klinischen Versuchsphasen für den therapeutischen Einsatz bereit war (Wall & Wani, 1995).

Inspiziert durch den großen therapeutischen Erfolg des Taxol[®] wurden halbsynthetische Taxane, wie etwa das Taxotere[®] (Docetaxel), entwickelt, um die begrenzte Verfügbarkeit durch die Abhängigkeit von *Taxus brevifolia* zu umgehen und große Mengen des Medikaments produzieren zu können (Strother & Sweeney, 2008). Zur Verringerung von unerwünschten Nebenwirkungen der Medikamente und zur Umgehung der Resistenzentwicklung seitens der Tumore wurden die Taxane weiter entwickelt. Nach Ermittlung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR = structure activity relationship) wurde danach das als Leitstruktur fungierende Taxol[®] an bestimmten Bereichen des Moleküls spezifisch verändert, um neue Substanzen herzustellen, die nach Möglichkeit die o. g. Probleme umgehen und ggf. eine Ausdehnung des Wirkspektrums erzielen können (Ojima & Das, 2009).

1.2 Substanzen marinen Ursprungs im Interesse der Forschung

Die bereits im Jahre 1951 von Werner Bergmann aus Schwämmen isolierten atypischen Nukleoside führten schlussendlich zur Entwicklung von Vidarabin und Cytarabin, zwei Substanzen die lange Zeit in der Krebstherapie eingesetzt wurden (Molinski et al., 2009). Trotz der aufwendigen Art der Gewinnung mariner Substanzen in ausreichenden Mengen und einem Rückgang der Unterstützung seitens der großen Pharmafirmen in den 90er Jahren, hielten wenige Wissenschaftler an dem Forschungsgebiet der Naturstoffe fest. Durch die Weiterentwicklung analytischer Technologien und Screening-Verfahren, aber auch durch wenig befriedigende Ergebnisse bei der Generierung von Leitsubstanzen im Bereich der kombinatorischen Chemie, hat die Untersuchung von Stoffen aus den Ozeanen einen Aufschwung erlebt (Molinski et al., 2009).

Auch verschiedene aktuelle Studien haben gezeigt, dass Substanzen marinen Ursprungs ein großes Potential zur Behandlung und Bekämpfung von Krankheiten haben können. So konnten nach den Entdeckungen von Müller et al. aus dem Jahre 1985 weitere marine Substanzen mit antileukämischer bzw. antineoplastischer Wirkung identifiziert werden (Pettit et al., 2009). Aber auch auf dem mikrobiologischen Sektor zur Behandlung der Malaria (Prudhomme et al., 2008) und des Herpes-Virus (Genova-Kalou et al., 2008) zeigten sich aussichtsreiche Ergebnisse. Viele Substanzen befinden sich in klinischen Versuchsphasen, andere haben bereits Zugang zum klinischen Alltag gefunden. So wird das Ziconotid (Prialt[®]) als erstes Medikament marinen Ursprungs in den USA gegen chronische Schmerzen und bei Rückenmarksverletzungen eingesetzt (Molinski et al., 2009).

Um die Vielfalt der sich im marinen Lebensraum befindenden Substanzen näher zu durchleuchten, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedenste Substanzen aus diesem Habitat im Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf untersucht. Sie stammen aus den Organismen *Stylissa carteri*, *Dysidea avara*, *Acanthostylotella sp.* und *Thalassia testudinum* und wurden im Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnik der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf isoliert und identifiziert. Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die Strukturformeln der Substanzen, die zusätzlich im Hinblick auf ihre Zytotoxizität in Krebszellen einem Screening unterzogen wurden.

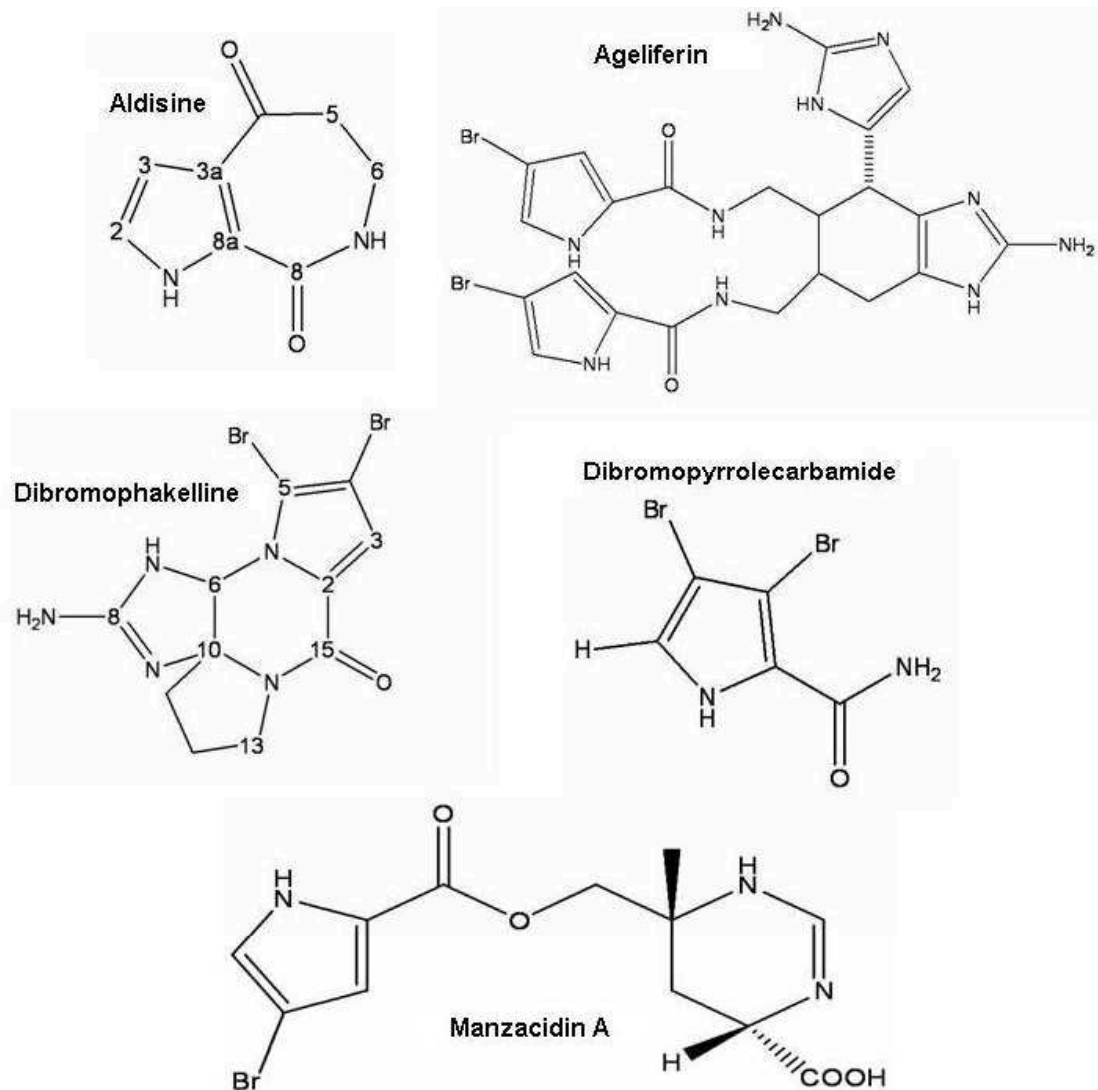


Abb. 1.2 Auszug der Strukturformeln von untersuchten Substanzen
(Quelle: Hamed, 2009)

1.3 Avaron und seine Derivate aus dem Schwamm *Dysidea avara*

Auf Grund des Stands der Forschung und den sich damit deckenden Daten zur Zytotoxizität wurden fünf der insgesamt über dreißig Substanzen zur vertiefenden Untersuchung bzgl. der Art des Zelltods und der Beeinflussung intrazellulärer Signalwege ausgewählt. Sie wurden allesamt aus dem Schwamm *Dysidea avara* isoliert. Dieser rötlich-braune Schwamm gehört zum Stamm der *Porifera*. Die für die Gewinnung der Substanzen verwendeten Schwämme stammen aus dem Mittelmeer in der Nähe der türkischen Stadt Fethiye, wo sie im Februar 2006 aus ca. 22 Metern Tiefe geborgen wurden. Nach der Identifizierung der Organismen wurden diese gefriergetrocknet und die untersuchten Substanzen anschließend extrahiert (Hamed, 2009).

Einleitung

Als Leitsubstanz der 5 strukturell verwandten Substanzen für die weiterführenden Untersuchungen dient hierbei das Avaron (Abb. 1.3).

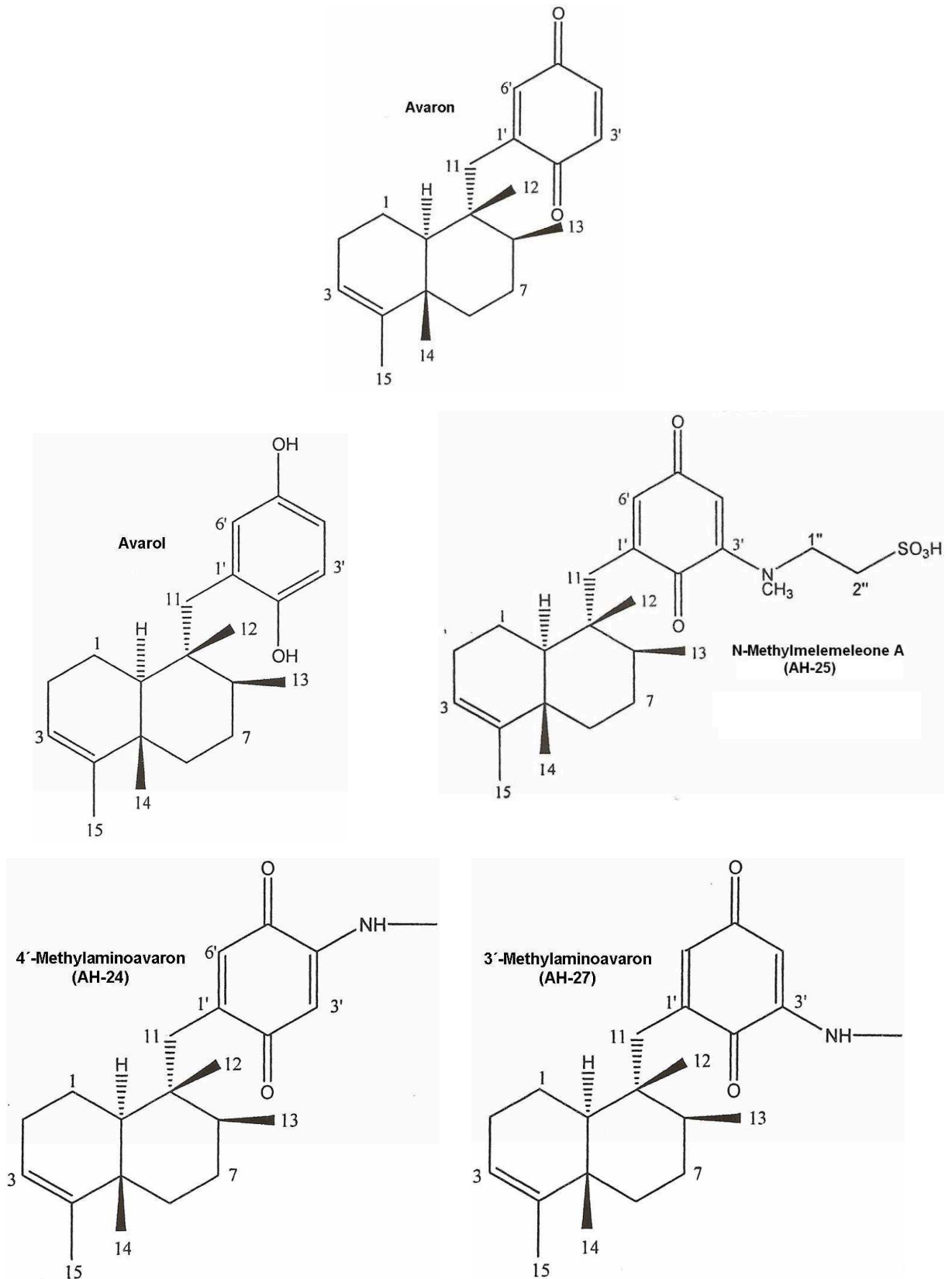


Abb. 1.3 Avaron und seine untersuchten Derivate (Quelle: Hamed, 2009)

1.4 Avaron und seine Analoga: mögliche therapeutische Einsatzgebiete

Im Jahre 1974 wurde das sesquiterpenoide Hydrochinon Avarol zusammen mit seinem korrespondierenden Chinon Avaron erstmals aus dem Schwamm *Dysidea avara* isoliert (Minale et al., 1974). Seit den 80er Jahren sind diese Substanzen im Hinblick auf ihr therapeutisches Einsatzgebiet in verschiedene Richtungen gehend untersucht worden. Einer der ersten Forscher war Werner Müller, dem zusammen mit seiner Arbeitsgruppe im Jahre 1985 auffiel, dass der Schwamm *Dysidea avara* mit vergleichsweise wenig Bakterien besiedelt ist, im Gegenzug jedoch verhältnismäßig große Mengen an Avaron und Avarol beinhaltet (Müller et al., 1985 b). Während die Forschungen dieser Arbeitsgruppe den Effekt der beiden Substanzen auf Lymphomzellen untersuchte (Müller et al., 1985 a und b), wurde in anderen Laboratorien festgestellt, dass sich die reverse Transkriptase, ein essentielles Enzym des HI-Virus, mit Hilfe von Avaron (Sarin et al., 1987) und verschiedenen Avaron Derivaten inhibieren lässt (Loya & Hizi, 1990). Weitere Forschungen im mikrobiologischen Sektor bezogen sich auf antibakterielle und antifungielle Eigenschaften (Seibert et al., 1985), die in aktuellen Studien im Hinblick auf Avaron-Lysozym-Konjugate vertieft werden. Hierbei scheinen die Konjugate einen synergistischen toxischen Effekt gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu haben, der das Ausmaß der jeweiligen Einzelwirkung von Avaron bzw. seinen Derivaten und Lysozym übersteigt (Novakovic et al., 2012). Zurück im marinen Habitat wird die Möglichkeit zum umweltfreundlichen Schutz vor Algenbewuchs an Schiffsrümpfen untersucht (Tsoukatou et al., 2007). Selbst auf dem Gebiet der Thromboseprophylaxe wurden Forschungen angestellt, die zeigten, dass die Substanzen in der Lage sind, die Aggregation von Thrombozyten zu unterbinden (Belisario et al., 1996). Des Weiteren werden chondroprotektive Eigenschaften über die Inhibierung von destruktiven Synovialzellen für die Therapie rheumatischer Erkrankungen untersucht (Mohamed-Ali et al., 1993), sowie die Fähigkeit zur Immunmodulation im Sinne einer Behandlung der Psoriasis (Amigó et al., 2006).

Die oben genannten Beispiele bestätigen, dass Avaron und seine Analoga ein großes Potential besitzen, welches mit Sicherheit noch nicht vollständig erforscht ist. Auffällig ist auch, dass hinsichtlich der Wirkungsstärke zwischen den Derivaten sehr große Unterschiede bestehen, sodass eine Untersuchung

im Hinblick auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen sinnvoll erscheint. In Anlehnung an die Arbeiten der Arbeitsgruppe Müller wurden die Substanzen im Rahmen dieser Doktorarbeit im Hinblick auf eine weitere Einsetzbarkeit im Bereich der Krebstherapie untersucht.

Die Grundanforderung an jede Therapie besteht zum einen aus einem Maximum an Wirksamkeit und zum anderen aus einem Minimum an Nebenwirkungen. Dazu muss eine Substanz so spezifisch wie möglich auf die gewünschten Zielstrukturen im Organismus anspringen. Im Falle der Krebstherapie bedeutet dies, dass die Substanzen ihren hauptsächlichen Effekt selektiv auf die entarteten Zellen ausüben sollten.

Für die Abschätzung dieser Parameter ist es wichtig, dass zunächst grundlegende Untersuchungen bzgl. des Wirkmechanismus und der Signalwege sowie der benötigten Konzentrationen durchgeführt werden.

1.5 Toxizität der Substanzen: Apoptose vs. Nekrose

Zur Behandlung von sich unkontrolliert teilenden Zellen sollte eine Substanz nach Möglichkeit das Wachstum inhibieren, wenn nicht sogar ein Absterben der Zellen verursachen. Hierbei ist jedoch auch die Art des Zelltodes von Interesse. Bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, handelt es sich um einen gesteuerten und physiologischen Vorgang, ohne den die Entwicklung des menschlichen Organismus und dessen weiteres Leben nicht möglich wären. So spielt sie z.B. eine entscheidende Rolle bei der positiven und negativen Selektion im Rahmen der Lymphozytenreifung (Opferman, 2008), aber auch schlichtweg gealterte oder beschädigte Zellen werden auf dem Weg aussortiert. Hierbei wird der Inhalt der Zelle mit Hilfe von speziellen Enzymen, den Caspasen, fragmentiert. Dieser Vorgang geschieht ohne eine Lyse der Zelle, sodass eine inflammatorische Reaktion ausbleibt. Die „Entsorgung“ findet mit Hilfe von Makrophagen statt (Elmore, 2007).

Im Gegensatz dazu steht die Nekrose, ein unphysiologischer Vorgang, der z.B. bei Verletzungen oder Infektionen stattfindet. Hierbei reißt die Zellmembran ein und der Inhalt der Zelle wird im umliegenden Gewebe freigesetzt. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion mit zusätzlicher Belastung des Organismus.

Das Ziel einer Chemotherapie ist somit die Induktion einer Apoptose, die die für den Organismus schonendere Art des Zelltodes darstellt (Elmore, 2007).

Auch durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) können Zellen so nachhaltig geschädigt werden, dass ein weiteres Überleben nicht möglich ist. Da ROS aber auch unter physiologischen Bedingungen, z.B. im Rahmen des aeroben Stoffwechsels entstehen, besitzt der Organismus ein System zur Abwehr dieser Noxen. Dabei ist die Balance zwischen ROS-Konzentration und enzymatischen Verteidigungsmöglichkeiten für die Integrität der Zelle essentiell. In Abhängigkeit von der Konzentration der ROS und anderen Faktoren entscheidet sich dann ob eine Apoptose oder eine Nekrose induziert wird (Papa, 1997).

1.6 Der Nrf2 Signalweg

Bei dem Nrf2 Signalweg handelt es sich um eine intrazelluläre Reaktionskette, die der Zelle die Möglichkeit gibt auf Noxen, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu reagieren und sich somit zu schützen. Sog. reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), wie z.B. das Superoxidradikal (O_2^-), entstehen regelmäßig im menschlichen Körper. Generell sind ROS in der Lage verschiedene Makromoleküle zu oxidieren und darüber z.B. Enzyme in ihrer Funktion zu beeinträchtigen oder DNA-Strangbrüche herbeizuführen. Auf der einen Seite macht der Organismus sich dieses schädigende Potential zunutze, wenn ROS von neutrophilen Granulozyten im Zuge eines „*respiratory burst*“ zur Abwehr von eingedrungenen Keimen generiert werden (Chanock et al., 1994). Auf der anderen Seite ist es aber auch wichtig, dass z.B. im Rahmen des Stoffwechsels entstandene Radikale „entschärft“ werden, bevor sie den eigenen Zellen Schaden zufügen können. Dazu besitzt er enzymatische Systeme, wie z.B. die Superoxiddismutase und die Glutathion-Peroxidase, aber auch nicht-enzymatische Systeme, wie z.B. Ascorbat und α -Tocopherol (Sies, 1997).

Unter normalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytoplasma gebunden an seinen Inhibitor Keap1 vor. Steigt die Menge an ROS innerhalb der Zelle an, so werden Thiol-Gruppen innerhalb des Keap1-Moleküls oxidiert, sodass Nrf2 nicht mehr gebunden werden kann und für die Translokation in den Zellkern entlassen wird (Abb. 1.6). Keap1 fungiert somit als Sensor verschiedener Stressoren, die dann zu einer Nrf2-Aktivierung führen (Dinkova-Kostova et al., 2002). Ist Nrf2 in den Kern transloziert, so bindet es an das *antioxidant response element* (ARE), eine

Promotorregion, die z.B. für die Transkription von verschiedenen Enzymen des Phase 2-Metabolismus verantwortlich ist (Abb. 1.6). Eines dieser Enzyme ist die Hämoxxygenase 1 (HO-1).

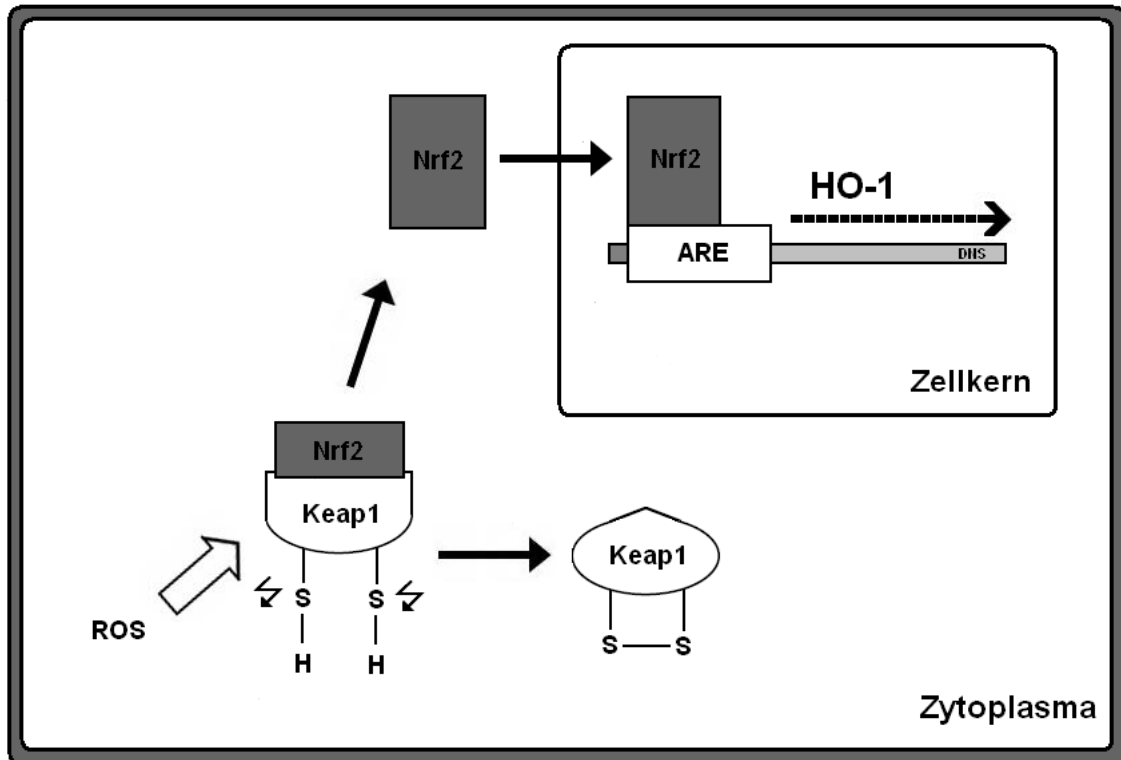


Abb. 1.6 Schema der Signaltransduktion für die Nrf2 Kaskade
(Abbildung modifiziert nach Dinkova-Kostova et al., 2002)

Bei der HO-1 handelt es sich um eine Isoform des Enzyms. Sie ist im Gegensatz zur HO-2 durch intrazellulären Stress, z.B. nach Aktivierung des o. g. Signalweges mit konsekutiver *de novo* Synthese, induzierbar. Die HO-1 ist ein Enzym, das die Reaktion von Häm zu Biliverdin katalysiert. Es wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert, weshalb es als ursprünglich von Keyse und Tyrell im Jahre 1989 als „Stressprotein“ bezeichnet wurde. Vermutlich wirkt es zum einen über die Herstellung des antioxidativ wirkenden Biliverdins und Bilirubins (Stocker et al., 1987) und zum anderen über die Verringerung des toxisch wirkenden Häm (Hunt et al., 1996). Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Poss und Tonegawa aus dem Jahre 1997 gestützt, die eine verstärkte Anfälligkeit von HO-1-defizienten Zellen gegenüber oxidativem Stress beobachteten.

1.7 Der Transkriptionsfaktor NFκB und die Onkogenese

NFκB kommt eine Schlüsselposition im Rahmen der zellulären Regulationsmechanismen zu. Durch das Zusammenspiel eines pleiotropen Signalweges (Abb. 1.7) vermag er zum einen eine Apoptose zu verhindern (van Antwerp et al., 1996), zum anderen bewirkt er über die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen die Auslösung von Immunreaktionen und Entzündungen (Tak & Firestein, 2001). Auf Grund der vielseitigen Einflüsse wird NFκB eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten von einer großen Bandbreite an Krankheiten zugeschrieben. Sie erstreckt sich von autoimmunologischen Prozessen bis hin zur Onkogenese. So kommt es hierbei neben positiven Wachstumsstimuli durch pro-inflammatorische Zytokine auch zu sog. „rescue“-Prozessen vor der Apoptose, was mit dem Überleben von fehlerhaften Zellen einhergeht.

Einen schematischen Überblick über die möglichen Prozesse im Zusammenhang mit der NFκB-Aktivierung gibt Abb. 1.7:

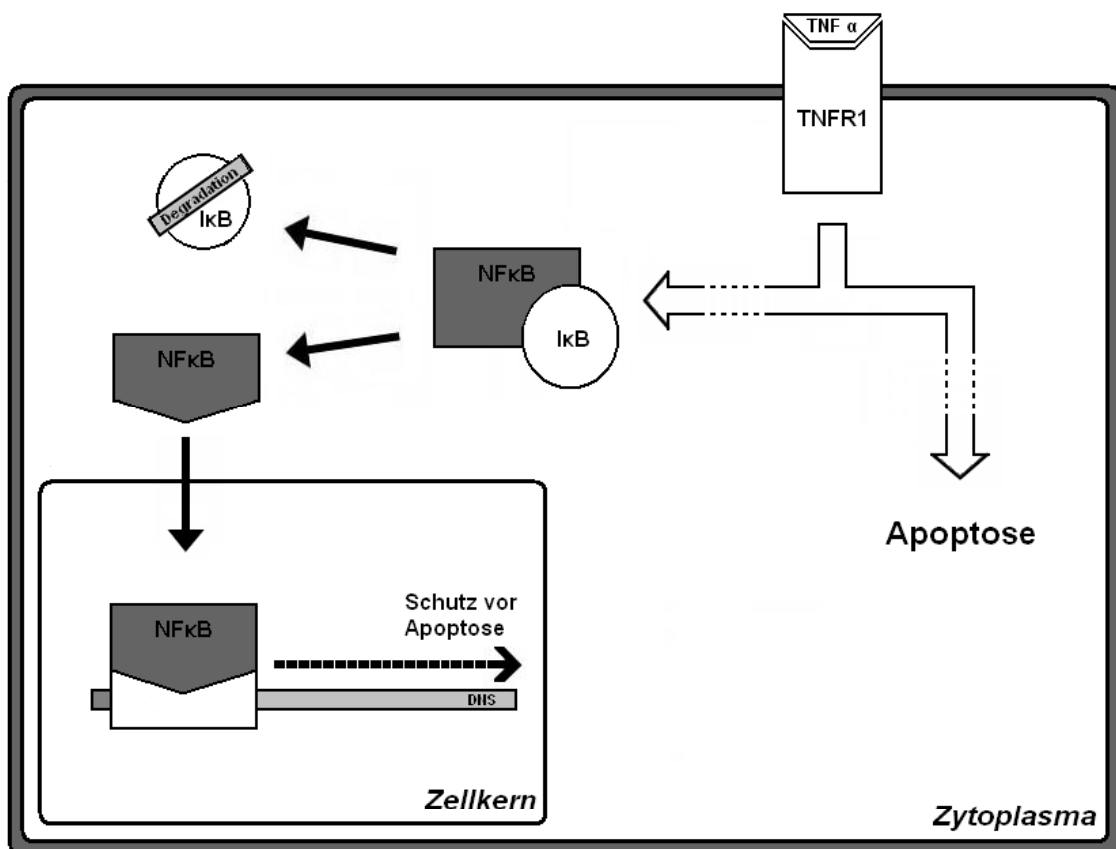


Abb. 1.7 Schema der Signaltransduktion für die NFκB Kaskade (Abbildung modifiziert nach Foo & Nolan 1999)

Im inaktiven Zustand befindet NFκB sich im Zytoplasma und ist an seinen natürlichen Inhibitor IκB gebunden. Im Falle der Aktivierung kommt es zur Dissoziation der beiden Komponenten mit Ubiquitinierung und anschließendem Abbau von IκB. NFκB hat nun die Möglichkeit in den Zellkern zu translozieren und an eine entsprechende Promotor-Region zu binden (Abb. 1.7). Anschließend kommt es zu der Transkription und Translation von den entsprechenden Zielgenen (Foo & Nolan, 1999).

Durch eine Daueraktivierung dieses Faktors (z.B. durch insuffiziente Interaktion zwischen NFκB und IκB) könnte der zweite Schritt der Onkogenese, die Promotion, induziert sein und ein weiteres Tumorstadium stattfinden. Jedoch wird durch NFκB auch das finale Stadium der Karzinogenese, die Progression, weiter vorangetrieben. So sind neben einer weiteren Größenzunahme auch die Angiogenese des Tumors und schlussendlich auch die Metastasierung möglich, da NFκB in eine Reihe von Regulationsmechanismen involviert ist. Als da wären z.B. die Expression von proinflammatorischen Enzymen wie der COX-2, Wachstumsfaktoren wie VEGF oder „Metastasierungsmolekülen“ wie ICAM-1 (Garg & Aggarwal, 2002). Des Weiteren geht eine Daueraktivierung von NFκB mit einer zunehmenden Resistenz gegenüber einer Chemotherapie, sowie einer Strahlentherapie einher, sodass die Blockade dieses Faktors einen logischen Ansatz für die Entwicklung einer neuen Therapiemethode darstellt.

1.8 Zielsetzung

Krebserkrankungen des Magen-Darm-Trakts standen im Jahre 2008 in Deutschland bezüglich der Neuerkrankungen an erster und bezüglich der tumorbedingten Todesfälle an zweiter Stelle (RKI & GEKID, 2012). Diagnostisch stehen zur Früherkennung Screening-Maßnahmen zur Verfügung, wie z.B. der Hämoccult-Test oder die Koloskopie. Sie kann auch therapeutisch eingesetzt werden, wenn im Rahmen einer Polypenabtragung direkt die Adenome, die Präkanzerosen des Kolon-Karzinoms, entfernt werden. Bei manifesten Karzinomen stellt die chirurgische Resektion mit Ausnahme von Palliativsituationen die Behandlungsmethode der Wahl dar. Ein wichtiger ergänzender Therapiepfiler in den höheren Stadien ist die systemische Radiochemotherapie, dessen Weiterentwicklung zu einem verlängerten Überleben der Patienten geführt hat. Dabei hatte sich das 5-Fluorouracil, ein

Pyrimidin-Antimetabolit, als Kernsubstanz etabliert, welches nach und nach durch Substanzen wie Irinotecan, einem Topoisomerase1-Hemmer, und schließlich den „biologicals“, wie Bevacizumab oder Cetuximab, ergänzt wurde (Carethers, 2008). Vor dem Hintergrund erschien die Durchführung der Untersuchungen mit humanen Darmkrebszellen (HCT116) im Rahmen dieser Doktorarbeit sehr sinnvoll. Zum Vergleich der Zytotoxizität und der Art des Zelltodes wurden die Versuche zusätzlich mit Hepatomzellen (H4IIE) aus Rattenlebern durchgeführt.

Das Ziel lag in der Eruiierung des möglichen Einsatzes von Avaron und seinen Derivaten als Therapeutika im Einsatz gegen kolorektale Tumoren. Aus diesem Grund wurden zunächst die toxischen Eigenschaften von den Substanzen untersucht, mit dem Ziel der Bestimmung der Art des Zelltodes. Da die Fähigkeit zur Beeinflussung antioxidativer Enzymsysteme bekannt ist und darüber die Vermittlung der Zytotoxizität vermutet wird (Batke et al., 1988), wurde zur näheren Beleuchtung mit dem Nrf2 Signalweg ein Teilaspekt des ROS-Haushalts untersucht.

Um weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Interaktion mit Regulationsmechanismen bzgl. der Auslösung und Unterdrückung der Apoptose zu erlangen, wurden weitere Daten durch Inkubation unaktivierter sowie durch Inkubation TNF- α aktivierter Zellen erhoben.

Schließlich sollten pharmakologische Eigenschaften mit Hilfe von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf spezifische Abschnitte der Moleküle zurückgeführt werden, um Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer Pharmaka zu erlangen.

2. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Untersuchung des Einflusses der Avaron-Derivate auf verschiedene Krebszelllinien. Initialen MTT-Assays zur Evaluation der Zytotoxizität folgte die Bestimmung der Art des Zelltodes. Bezüglich der Toxizität in HCT116-Zellen wurden zusätzlich weitere Naturstoffe einem Screening mit Hilfe von MTT-Assays unterzogen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Substanzen oxidativen Stress auslösen und die Nrf2 / ARE Signalkaskade aktivieren. Die Darstellung der Ergebnisse für Versuche im Zusammenhang mit Nrf2 erfolgt in der Reihenfolge der Signalkaskade. Sie beginnt mit der Frage, ob durch die Substanzen ROS generiert werden und führt über die Untersuchung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zum terminalen Abschnitt des Signalweges, der Synthese der HO-1-mRNA.

Als weiterer Signalweg wurde die Modulation des NFκB Signalweges analysiert, da hier ein Eingriff in die Wachstums- und Ausbreitungsprozesse eines Malignoms möglich ist.

2.1 Untersuchung von Zytotoxizität und Art des Zelltodes

2.1.1 Nachweis der Zytotoxizität in HCT116- und H4IIE-Zellen

Bei allen untersuchten Avaron-Derivaten zeigt sich eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Absorption im MTT-Assay (Abb. 2.1.1.1 a-c). Den stärksten Effekt zeigt hierbei Avaron. Von den HCT116 Darmkrebszellen sind bei einer Konzentration von 5,25 µM nur 50% der Zellen in der Lage die mitochondriale Reduktion des Tetrazoliums Salzes MTT ablaufen zu lassen (= EC₅₀-Wert). Mit einem EC₅₀-Wert von 9 µM liegt das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) in einem ähnlich toxischen Bereich. Avarol nimmt im Vergleich zu den restlichen Substanzen bezüglich der Toxizität eine Zwischenposition ein (EC₅₀= ca. 30 µM), während das N-Methylmeleleone A (AH-25) mit einem EC₅₀-Werte um 45 µM eher mäßig toxisch ist. Im Fall des 4'-Methylaminoavaron (AH-24) kann kein EC₅₀-Wert bis zu einer Konzentration von 50 µM bestimmt werden.

Ergebnisse

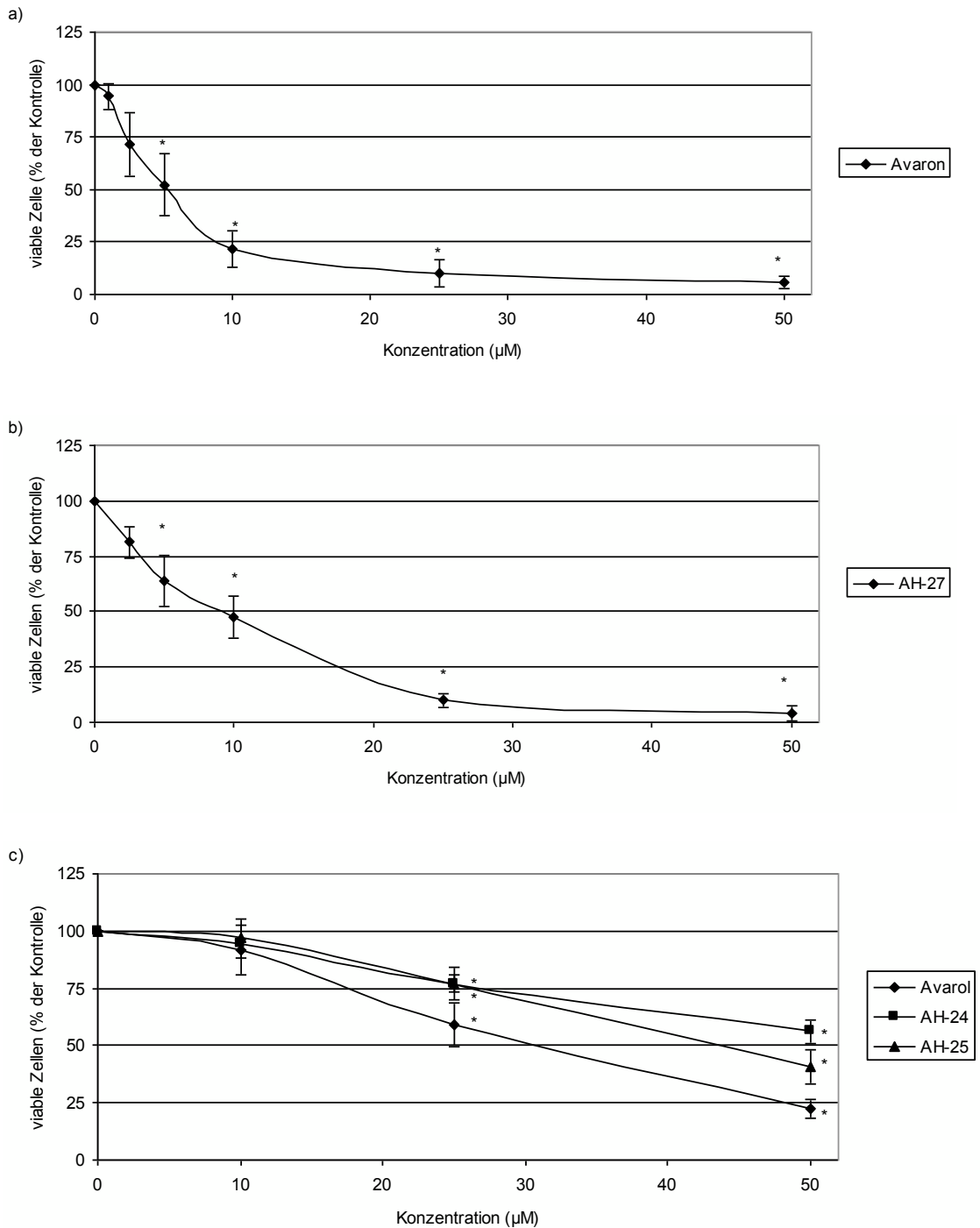


Abb. 2.1.1.1 a-c Zytotoxizität in HCT116 Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron (AH-27) (b), sowie Avarol, 4'-Methylaminoavaron = AH-24 und N-Methylmeleleone A = AH-25 (alle c).

10.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Auf die 2h MTT-Farbreaktion folgt nach Extraktion die photometrische Messung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der viablen Zellen im Bezug auf die Kontrolle (Mittelwerte +/- SD; alle mind. n=3, AH-27 und Avarol n=4; *: p<0,05 gegen 0 µM der realen Absorptionswerte).

Realwerte der Absorption bei 560nm für 0 µM: a) 0,659 +/- 0,132 b) 0,789 +/- 0,103 c) Avarol 0,791 +/- 0,132; AH-24 0,754 +/- 0,033; AH-25 0,751 +/- 0,061

Ergebnisse

Für die HCT116 Zellen wurden im Rahmen des LDH-Assays weitere MTT-Assays durchgeführt, wobei hierbei nur 5.000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Bei insgesamt geringeren Absorptionen zeigen sich nahezu gleiche EC_{50} -Werte: Avaron = 4 μM , 3'-Methylaminoavaron (AH-27) = 10 μM , Avarol = 28 μM , N-Methylmelemeleone A (AH-25) = 40 μM , 4'-Methylaminoavaron (AH-24) > 50 μM (s. Kapitel 5 „Rohdaten“).

Die gleichen Untersuchungen wurden auch in H4IIE Hepatomzellen durchgeführt. Avaron liegt mit einem EC_{50} -Wert von 5,5 μM am nächsten an den Werten der HCT116 Zellen. Die restlichen Substanzen weisen EC_{50} -Werte von über 25 μM auf. Im Fall von N-Methylmelemeleone A (AH-25) ist bei der maximalen Konzentration von 50 μM kein eindeutiger Effekt mehr nachweisbar.

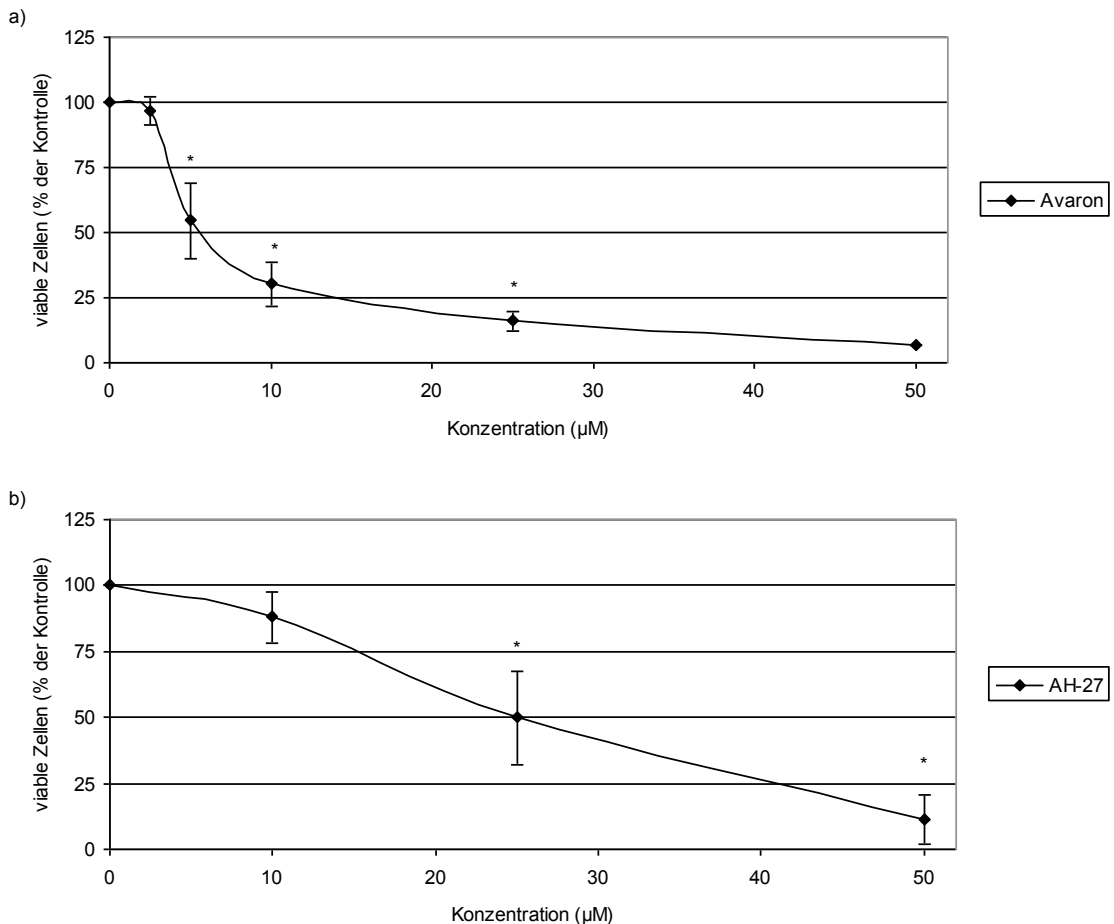


Abb. 2.1.1.2 a-b Zytotoxizität in H4IIE Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) (b).

10.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Auf die 2h MTT-Farbreaktion folgt nach Extraktion die photometrische Messung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der viablen Zellen im Bezug auf die Kontrolle (Mittelwerte +/- SD; n=3; *: $p < 0,05$ gegen 0 μM der realen Absorptionswerte).

Realwerte der Absorption bei 560nm für 0 μM : a) 0,303 +/- 0,041 b) 0,219 +/- 0,068

Ergebnisse

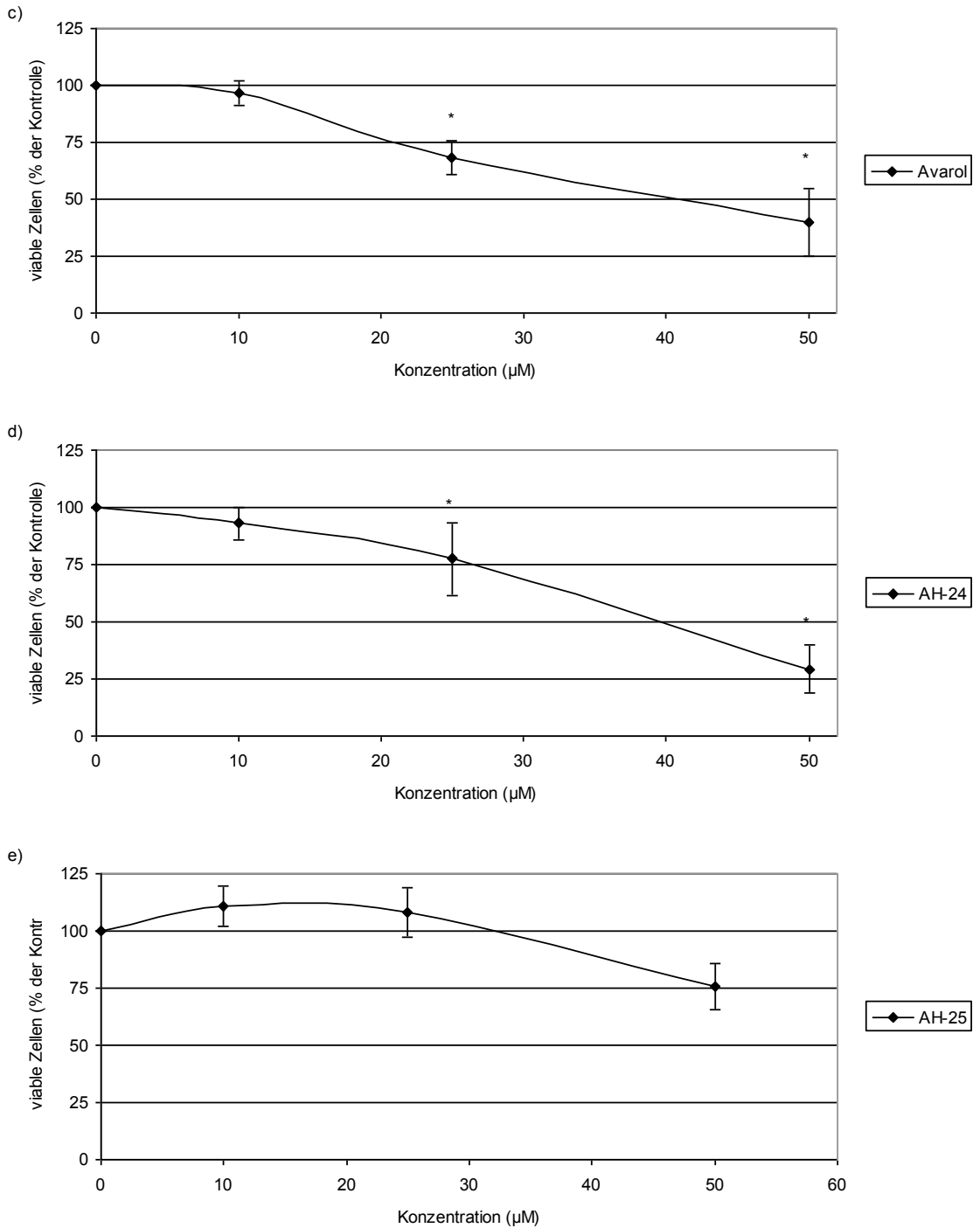


Abb. 2.1.1.2 c-e Zytotoxizität in H4IIE Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e).

10.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Auf die 2h MTT-Farbreaktion folgt nach Extraktion die photometrische Messung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der viablen Zellen im Bezug auf die Kontrolle (Mittelwerte +/- SD; n=4; *: p<0,05 gegen 0 µM der realen Absorptionswerte). Realwerte der Absorption bei 560nm für 0 µM: c) 0,325 +/- 0,048 d) 0,281 +/- 0,049 e) 0,208 +/- 0,043

Die toxischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen sorgten auch im Hinblick auf das morphologische Erscheinungsbild der Zellen für Veränderungen. Die differenzierte Zellform der jeweiligen Zelltypen geht verloren und es kommt zu einer Verkleinerung mit Abkugelung. In den Abbildungen 2.1.1.3 und 2.1.1.4 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von geschädigten Zellen beider Zelllinien nach Inkubation mit der im MTT-Assay toxischsten Substanz, dem Avaron, dargestellt.

HCT116:

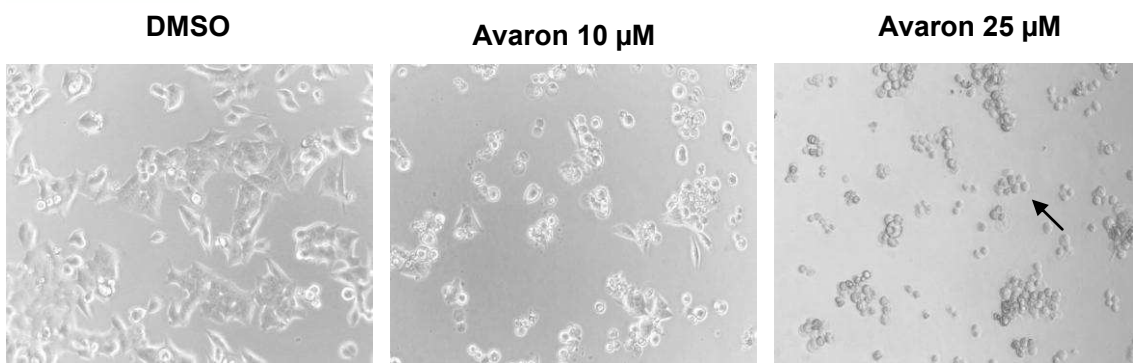


Abb. 2.1.1.3 Morphologische Veränderungen der HCT116 Darmkrebszellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron

10.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit Avaron in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden diese repräsentativen Aufnahmen mit der Motic Moticam 2300 durch das Lichtmikroskop Zeiss Axiovert 100 in 320-facher Vergrößerung angefertigt.

H4IIE:

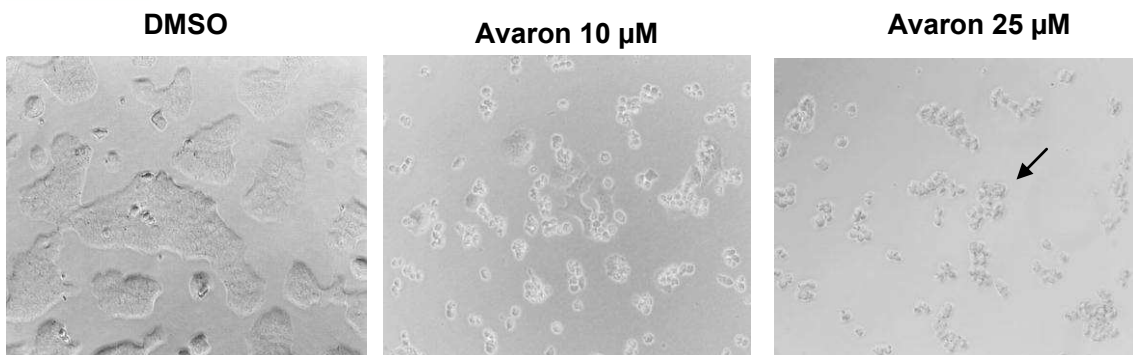


Abb. 2.1.1.4 Morphologische Veränderungen der H4IIE Hepatomzellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron

10.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit Avaron in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden diese repräsentativen Aufnahmen mit der Motic Moticam 2300 durch das Lichtmikroskop Zeiss Axiovert 100 in 320-facher Vergrößerung angefertigt.

Die Screening-Ergebnisse bezüglich der Toxizität weiterer Naturstoffe in HCT116-Zellen befinden sich in Kapitel 5 „Rohdaten“.

2.1.2 Untersuchung der Art des Zelltodes: Apoptosenachweis

Im Rahmen der Apoptose wird in den Zellen eine Kaskade von Caspasen aktiviert, die unter anderem dazu beitragen die DNA zu fragmentieren. Bei den Caspasen 3 und 7 handelt es sich um Enzyme, die mit großer Überlappung das Apo ONE[®]-Substrat spalten und dessen Aktivität im Apo ONE[®]-Assay gemessen werden kann.

In den Versuchen konnte kein signifikanter Anstieg der Caspase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb.2.1.2 a-c). Im Fall des Avaron und des 3'-Methylaminoavaron (AH-27) zeigt sich in HCT116-Zellen allenfalls eine leichte Tendenz in Richtung Apoptose. Avarol und die übrigen untersuchten Substanzen zeigen keine Zunahme der Caspase-Aktivität.

In H4IIE-Zellen zeigt keine der Substanzen einen proapoptotischen Effekt.

Für nicht aufgeführte Daten siehe Kapitel 5 „Rohdaten“.

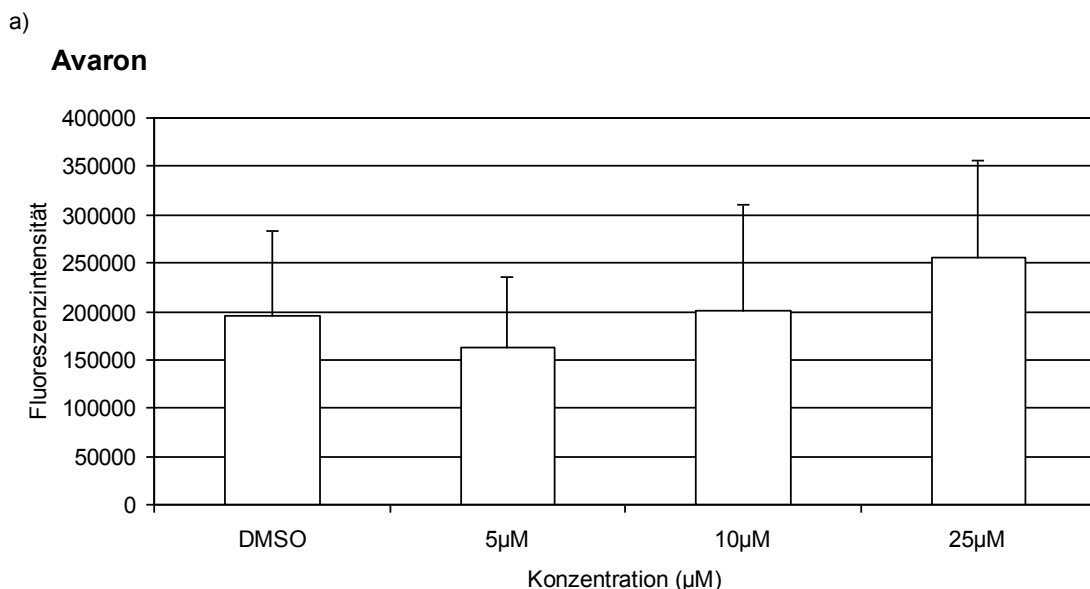


Abb. 2.1.2 a Caspase 3/7 Aktivität in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a).

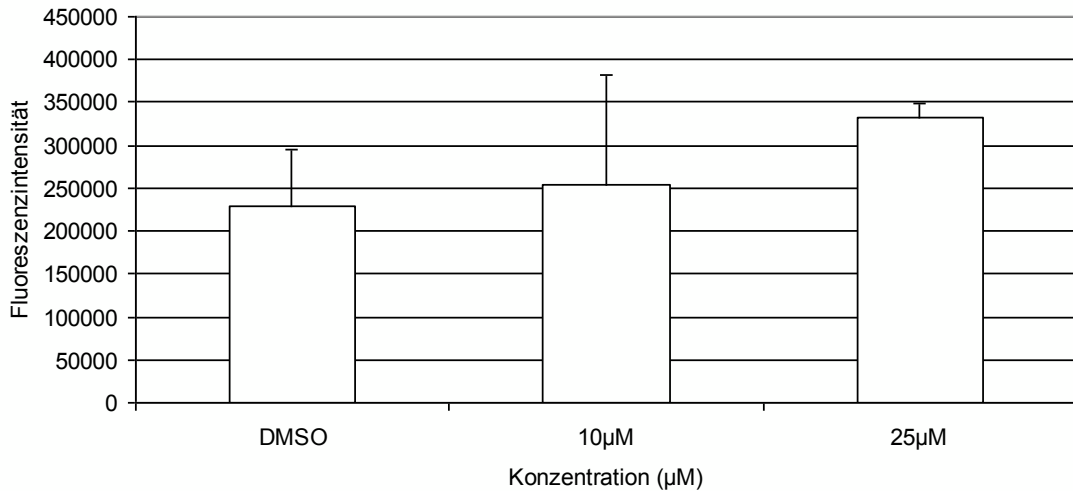
50.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Es folgte die Messung der Fluoreszenz für 3 h im Wallac Victor bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm nach Zugabe des Apo ONE[®]-Reagenzes.

Dargestellt ist der Fluoreszenzanstieg über 3 h (Mittelwerte + SD; n=4; *: p<0,05 gegen 0µM)

Ergebnisse

b)

AH-27



c)

Avarol

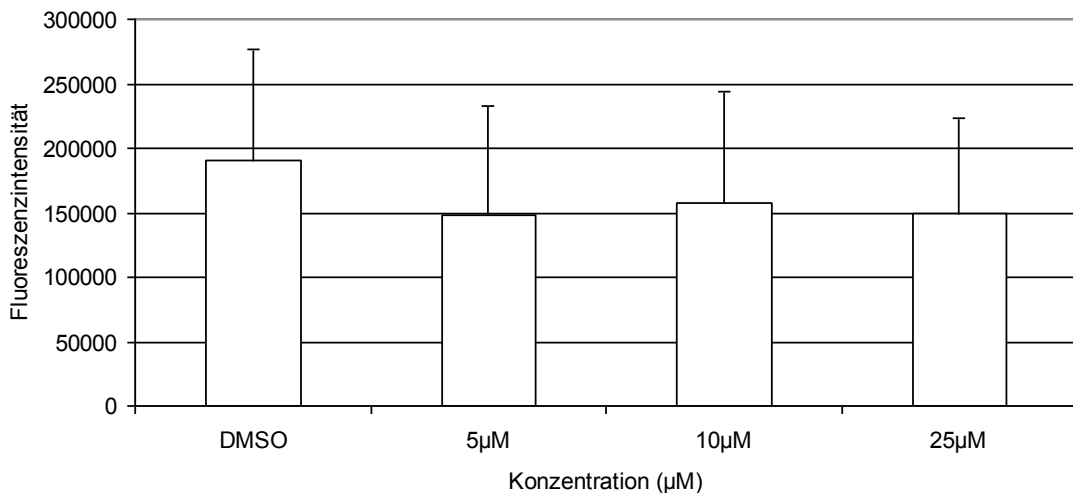


Abb. 2.1.2 b-c Caspase 3/7 Aktivität in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit 3'-Methylaminoavarol = AH-27 (b) und Avarol (c).

50.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Es folgte die Messung der Fluoreszenz für 3 h im Wallac Victor bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm nach Zugabe des Apo ONE®-Reagenzes.

Dargestellt ist der Fluoreszenzanstieg über 3 h (Mittelwerte + SD; Avarol n=4; AH-27 n=3;

*: p<0,05 gegen 0µM)

2.1.3 Untersuchung der Art des Zelltodes: Nekrosenachweis

Sterben Zellen durch Nekrose, so reißt deren Zellmembran auf und der intrazelluläre Inhalt gelangt zusammen mit zytosolischen Enzymen ins extrazelluläre Medium, wodurch im Organismus Entzündungen ausgelöst werden. Eines dieser zytosolischen Enzyme ist die Laktatdehydrogenase

Ergebnisse

(LDH), dessen Aktivität im Zellüberstand als Marker für defekte Zellmembranen gewertet wird. Da dies eine nicht-destruktive Untersuchungsmethode ist, konnten mit der gleichen Probe auch noch MTT-Assays durchgeführt werden. In den HCT116-Zellen (Abb. 2.1.3.1 a-c) zeigen sich für das Avaron und das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) signifikante Ergebnisse sowohl in der LDH-Reaktion, als auch in der MTT-Reaktion. Avarol zeigt einen toxischen Effekt im MTT-Assay, scheint jedoch keine im LDH-Assay messbare Wirkung zu haben. Das 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und das N-Methylmelemeleone A (AH-25) zeigen praktisch keinen Effekt (s. Kapitel 5 „Rohdaten“).

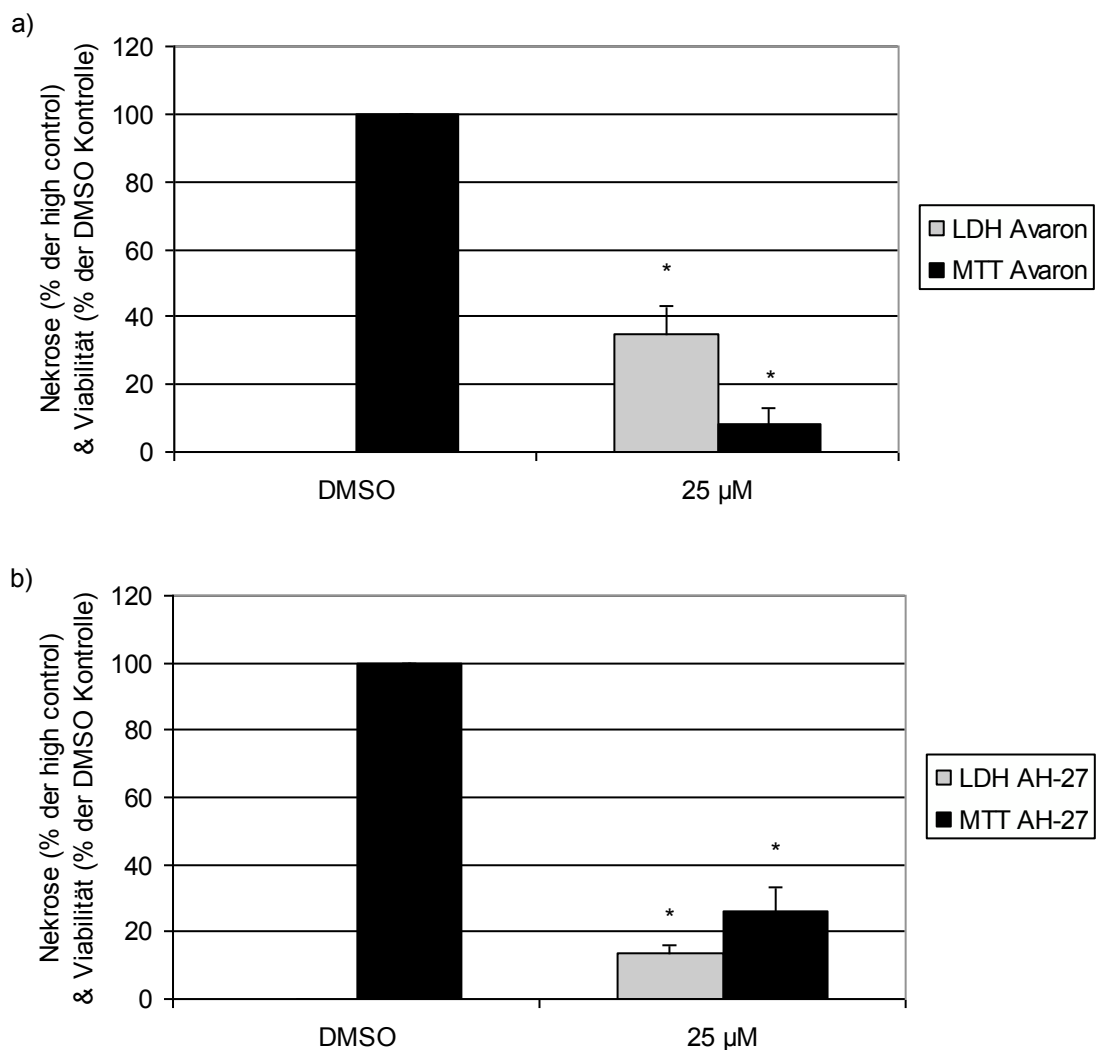


Abb. 2.1.3.1 a-b LDH-Aktivität und MTT-Messung in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a) und 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b).

5.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h inkubiert. In dem Überstand wurde die LDH-Aktivität für 15 Minuten photometrisch gemessen. Mit dem Zellrasen wurde die 2h MTT-Farbreaktion durchgeführt gefolgt von Extraktion und photometrischer Messung. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die Kontrolle: LDH-Daten abzüglich der DMSO-Werte wurden auf die high control bezogen, MTT-Daten auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=4; *: p<0,05 gegen 0µM)

Ergebnisse

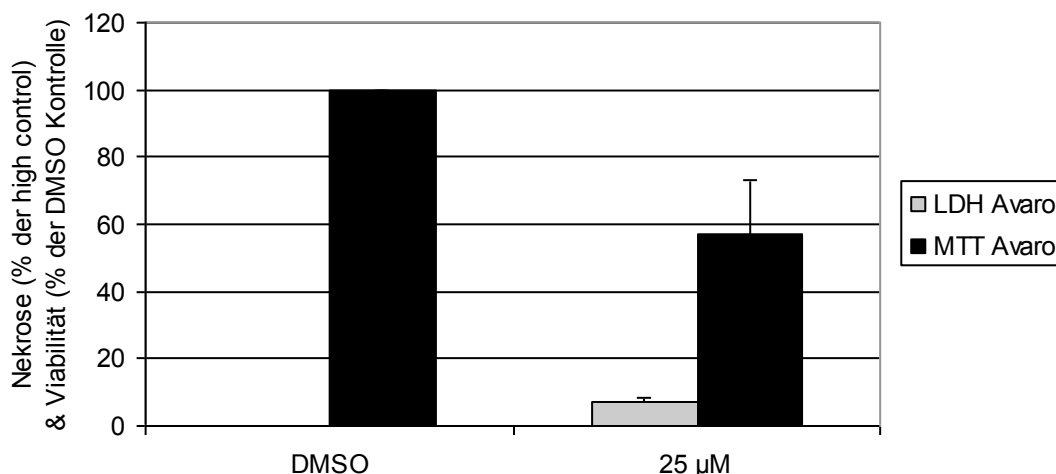


Abb. 2.1.3.1 c LDH-Aktivität und MTT-Messung in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avarol.

5.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h inkubiert. In dem Überstand wurde die LDH-Aktivität für 15 Minuten photometrisch gemessen. Mit dem Zellrasen wurde die 2h MTT-Farbreaktion durchgeführt gefolgt von Extraktion und photometrischer Messung. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die Kontrolle: LDH-Daten abzüglich der DMSO-Werte wurden auf die high control bezogen, MTT-Daten auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=4; *: p<0,05 gegen 0µM)

Die Untersuchungen in den H4IIE-Zellen zeigten einen tendenziell ähnlichen, meistens jedoch schwächeren Effekt (Abb. 2.1.3.2 a-c). Während das Avaron auch in den Hepatomzellen einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität bewirkt, ist dieser im Fall des 3'-Methylaminoavaron (AH-27) nicht mehr zu verzeichnen, obwohl es zu einer Abnahme der Zellviabilität kommt. Im Fall des Avarol konnte im Rahmen dieses Assays kein Effekt nachgewiesen werden; weder in der LDH-Reaktion, noch in der MTT-Reaktion.

4'-Methylaminoavaron (AH-24) und N-Methylmelemeleone A (AH-25) zeigen wiederum praktisch keinen Effekt. Die Daten hierzu befinden sich in Kapitel 5 „Rohdaten“.

Ergebnisse

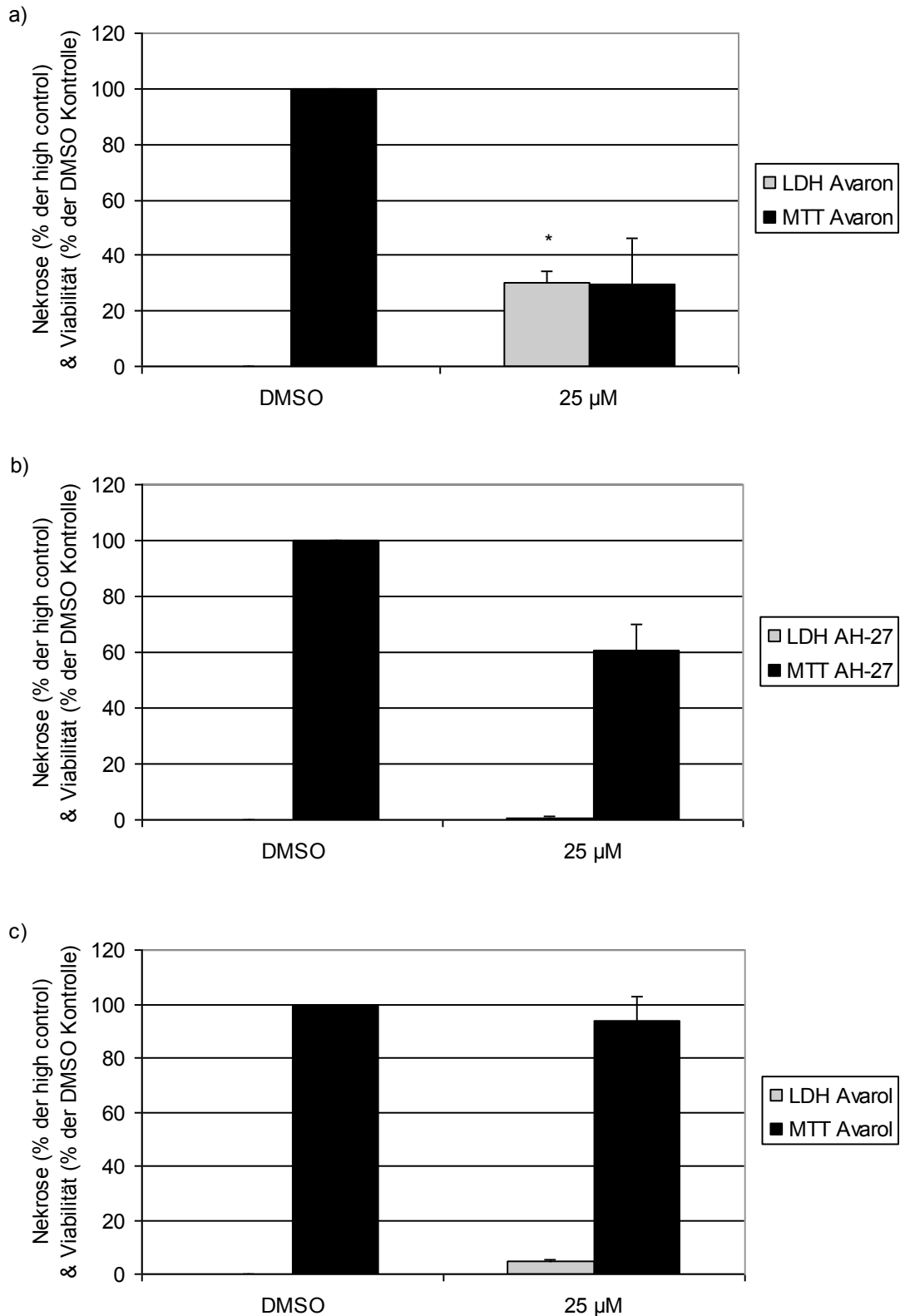


Abb. 2.1.3.2 a-c LDH-Aktivität und MTT-Messung in H4IIE-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b) und Avarol (c).

5.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h inkubiert. In dem Überstand wurde die LDH-Aktivität für 15 Minuten photometrisch gemessen. Mit dem Zellrasen wurde die 2h MTT-Farbreaktion durchgeführt gefolgt von Extraktion und photometrischer Messung. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die Kontrolle: LDH-Daten abzüglich der DMSO-Werte wurden auf die high-control bezogen, MTT-Daten auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=3; *: p<0,05 gegen 0µM)

2.2 Untersuchung der Beeinflussung des Nrf2 Signalweges

Die hier gezeigten Daten zur Translokation von Nrf2, der ARE-Aktivierung und der HO-1-Induktion durch tBHQ wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes zusammen mit A. Bergemann und R. Rohrig erhoben (Rohrig et al., 2009).

2.2.1 Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Assay)

Im DCF-Assay reagieren ROS mit der Sonde, die daraufhin fluoreszente Eigenschaften aufweist. Die Fluoreszenz der Sonde wird im Anschluss als Maß für den oxidativen Stress gemessen.

Den deutlichsten Effekt im Bezug auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in HCT116-Zellen zeigt das Avaron (Abb. 2.2.1 a). Bei einer Konzentration von 25 μM zeigt diese Substanz einen zumindest mäßigen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg. Substanzen wie das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) und das Avarol scheinen keinen Einfluss auf die Menge an ROS in der Zelle zu haben (Abb. 2.2.1 b-c). Im Fall des 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und des N-Methylmeleleone A (AH-25) ist kein Anstieg zu verzeichnen. Die Fluoreszenzintensität bleibt hier sowohl in der Kontrolle, als auch in inkubierten Wells in Bereichen um 95.000 (s. Kapitel 5 „Rohdaten“).

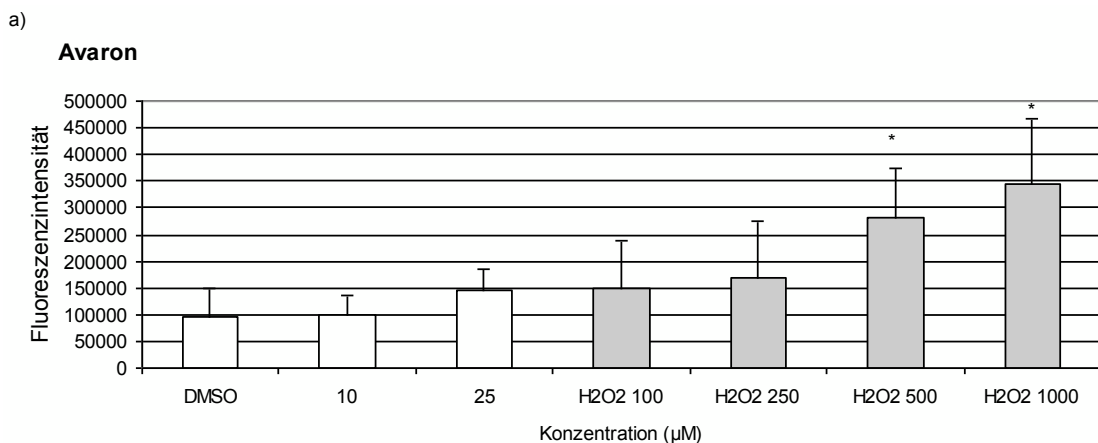
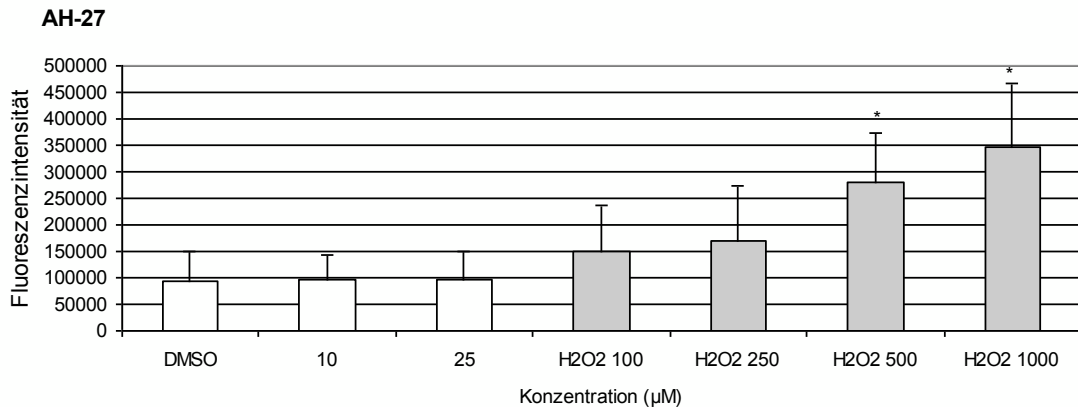


Abb. 2.2.1 a Fluoreszenz im DCF-Assay in HCT116-Zellen nach Inkubation mit Avaron (a). 50.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 30 min. mit farblosen DCF-haltigem Medium (50 μM) inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und die Messung der Fluoreszenz für 2 h im Wallac Victor durchgeführt. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenzwerte über 2 h (Mittelwerte + SD; n=6; *: p<0,05 gegen 0 μM)

Ergebnisse

b)



c)

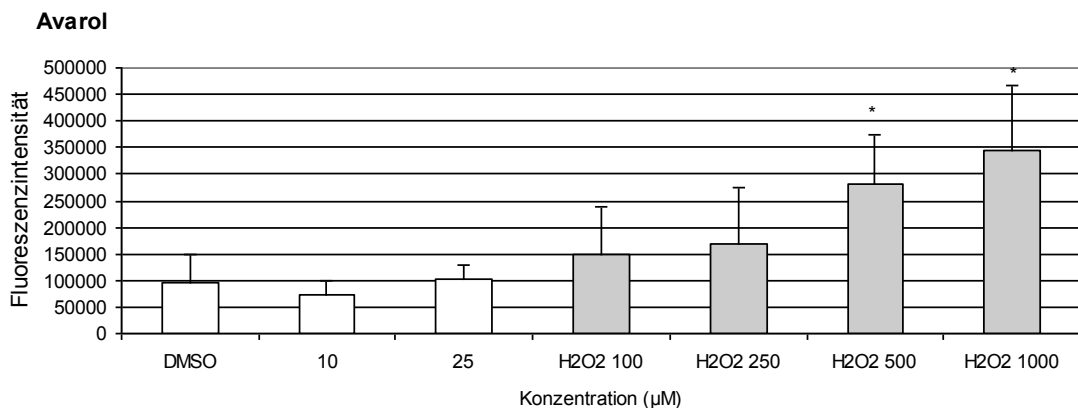


Abb. 2.2.1 b-c Fluoreszenz im DCF-Assay in HCT116-Zellen nach Inkubation mit 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b) und Avarol (c).

50.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 30 min. mit farblosen DCF-haltigem Medium (50 µM) inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und die Messung der Fluoreszenz für 2 h im Wallac Victor durchgeführt

Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenzwerte über 2 h (Mittelwerte + SD; n=6; *: p<0,05 gegen 0µM)

2.2.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 (Western Blot)

Beim Western Blot können mit Hilfe von Antikörpern spezifische Proteine im Hinblick auf ihre Expression untersucht werden.

Um einschätzen zu können nach welcher Inkubationsdauer sich das Maximum der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 befindet, wurde zunächst eine Kinetik mit dem klassischen Induktor tert-Butylhydrochinon (tBHQ) durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass sich das stärkste Signal eher im Bereich der kurzen Inkubationszeiten zeigt und am höchsten bei einer Inkubation über 3 Stunden ist (Abb. 2.2.2.1). Aus diesem Grund ist die Inkubationsdauer auch für die Avaron-Derivate auf diesen Wert festgesetzt worden.

Ergebnisse

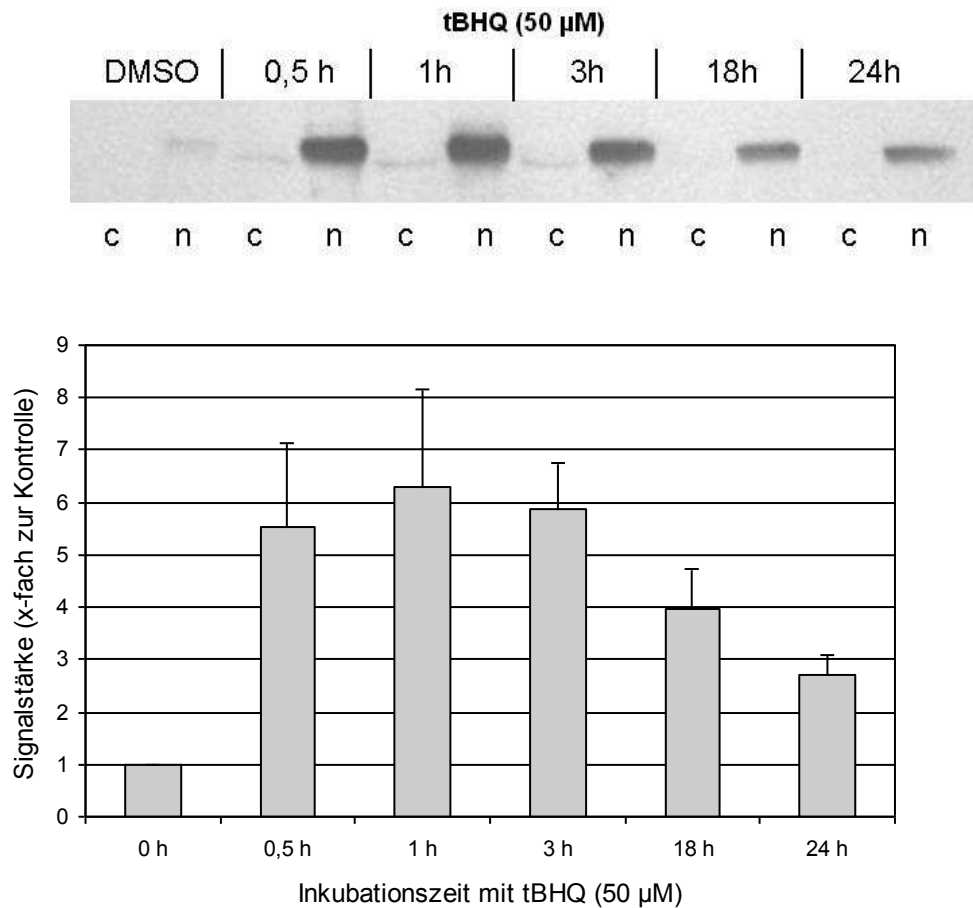


Abb. 2.2.2.1 Western Blot mit dem Target Nrf2 in HCT116-Zellen nach Inkubation mit 50 µM tert-Butylhydrochinon (tBHQ) über verschiedene Zeiträume.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für verschiedene Zeiten mit 50 µM tBHQ inkubiert. Die Proteine der Zellen wurden fraktioniert (c = zytosolisch; n = nukleär) und anschließend die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersucht.

Dargestellt ist die densitometrisch ermittelte Signalstärke im Bezug auf die Kontrolle (Mittelwerte + SD; n=3).

Die Western Blots für die Avaron-Derivate zeigen, dass alle Substanzen das Potential zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 haben (Abb. 2.2.2.2 a-b). Den stärksten Effekt zeigt hierbei das N-Methylmeleleone A (AH-25). Es bewirkt eine Steigerung des Signals um den Faktor 9,5. 4'-Methylaminoavaron (AH-24) führt zu einer 6-fachen und Avarol zu einer 3-fachen Steigerung des Signals.

3'-Methylaminoavaron (AH-27) ruft eine Zunahme um einen Faktor von ca. 6 hervor. Den vermeintlich schwächsten Effekt zeigt das Avaron mit einer Verdopplung des Signals. Aus Gründen der Zytotoxizität wurden die Zellen jedoch nur mit jeweils 10 µM 3'-Methylaminoavaron (AH-27) und 10 µM Avaron inkubiert.

Ergebnisse

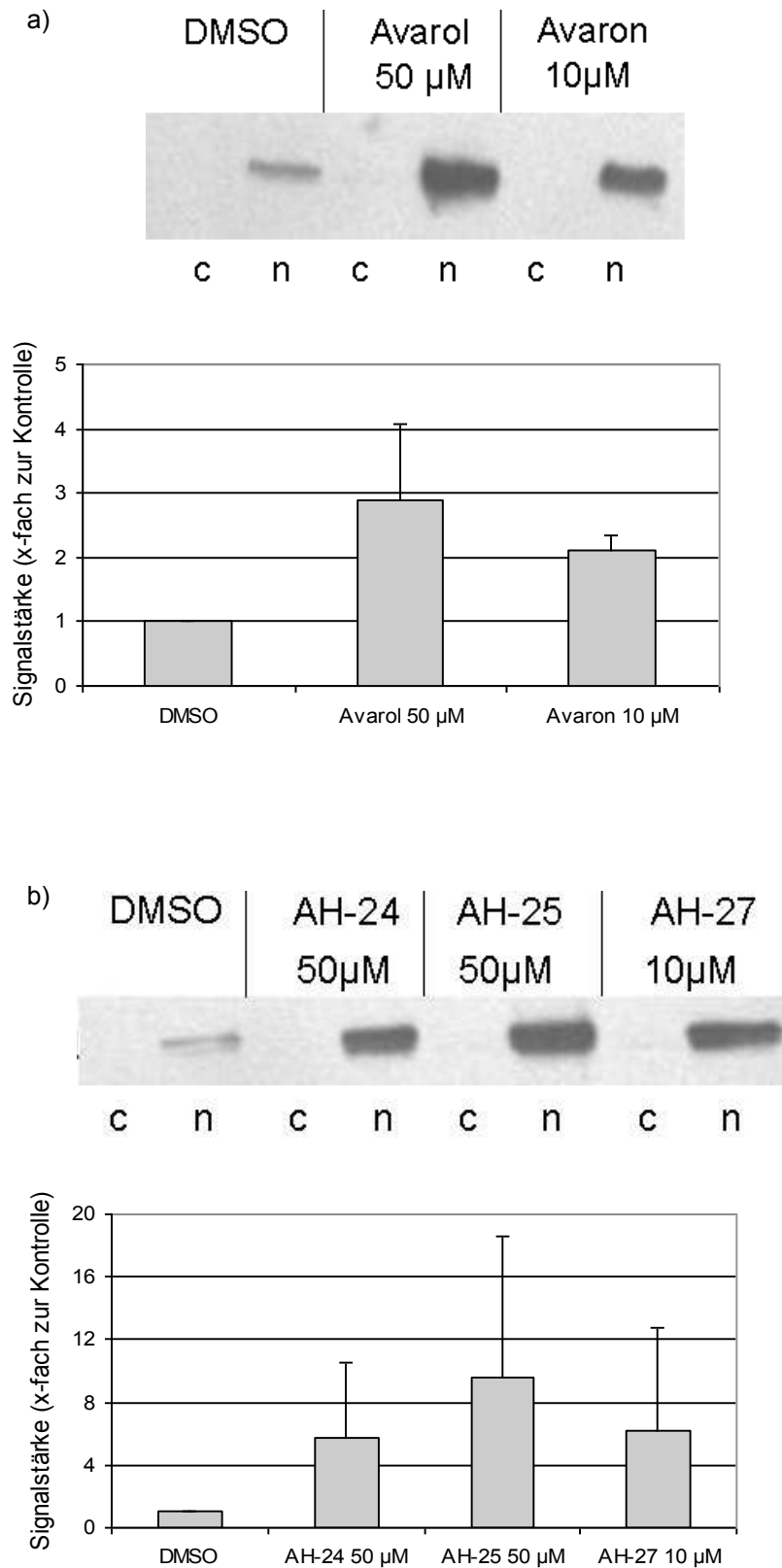


Abb. 2.2.2.2 a-b Western Blots mit dem Target Nrf2 in HCT116-Zellen nach Inkubation mit Avaron-Derivaten in unterschiedlichen Konzentrationen über 3 h.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 3 h mit Avaron-Derivaten inkubiert. Die Proteine der Zellen wurden fraktioniert (c = zytosolisch; n = nukleär) und anschließend die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersucht. Dargestellt ist die densitometrisch ermittelte Signalstärke im Bezug auf die Kontrolle (Mittelwerte + SD; n=3).

2.2.3 Aktivierung des „antioxidant response element“ (Luciferase-Assay)

Das „antioxidant response element“ (ARE) ist ein DNA-Element im Promotorbereich von verschiedenen antioxidativen Proteinen. Durch die Transfektion eines ARE-Luciferase-Plasmids kann nachgewiesen werden in welchem Ausmaß die Transkription von Enzymen abläuft, deren Synthese an diesen Promotor gekoppelt ist.

Analog zum Western Blot wurde auch hier zunächst eine Kinetik mit tert-Butylhydrochinon (tBHQ) durchgeführt (Abb. 2.2.3.1). Hierbei zeigt sich der deutlichste Anstieg bei einer Inkubation über 24 h in allen drei Konzentrationen (25 μ M, 50 μ M & 100 μ M). Aus diesem Grund wurde für die Avaron-Derivate eine Inkubationszeit von 24 h gewählt.

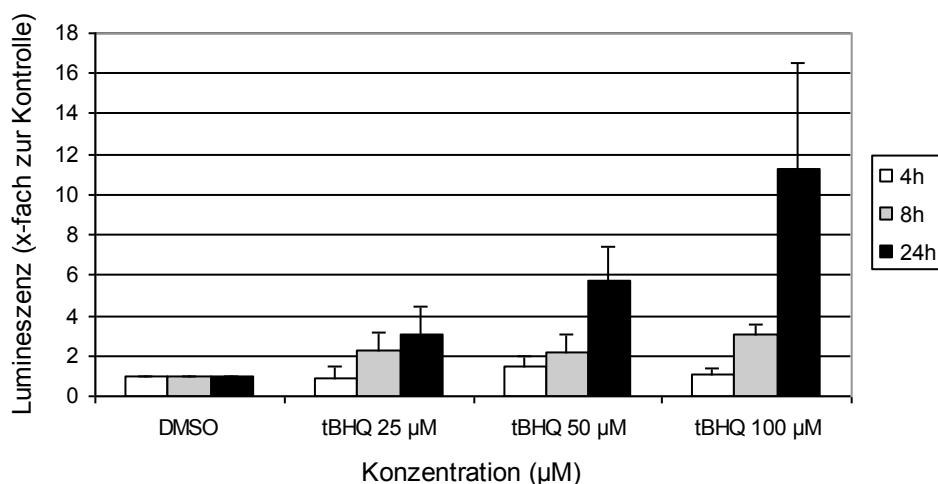


Abb. 2.2.3.1 Luciferase-Assay zur Messung der ARE- Aktivierung in transfizierten HCT116-Zellen nach Inkubation mit 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M tBHQ über verschiedene Zeiträume.

200.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für verschiedene Zeiten mit tBHQ inkubiert. Neben dem Luciferase-Assay wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung durchgeführt und im Rahmen der Auswertung der Quotient aus beiden gebildet.

Dargestellt sind die auf die DMSO-Kontrolle bezogenen Quotienten (Mittelwerte + SD; n=3).

Mit Anstiegen um den Faktor 2,8 im Bezug auf die DMSO-Kontrolle zeigen Avarol bei 50 μ M und auch das 3'-Methylaminoavaron (AH-27), trotz seiner im Vergleich relativ niedrigen Konzentration von 10 μ M, die stärkste Aktivierung des ARE. Avaron bewirkt mit seiner höchsten Konzentration von ebenfalls 10 μ M eine Steigerung um den Faktor 2,4. Das 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und das N-Methylmelemeleone A (AH-25) bewirken eine Verdopplung der Aktivierung (Abb. 2.2.3.2 a-c).

Ergebnisse

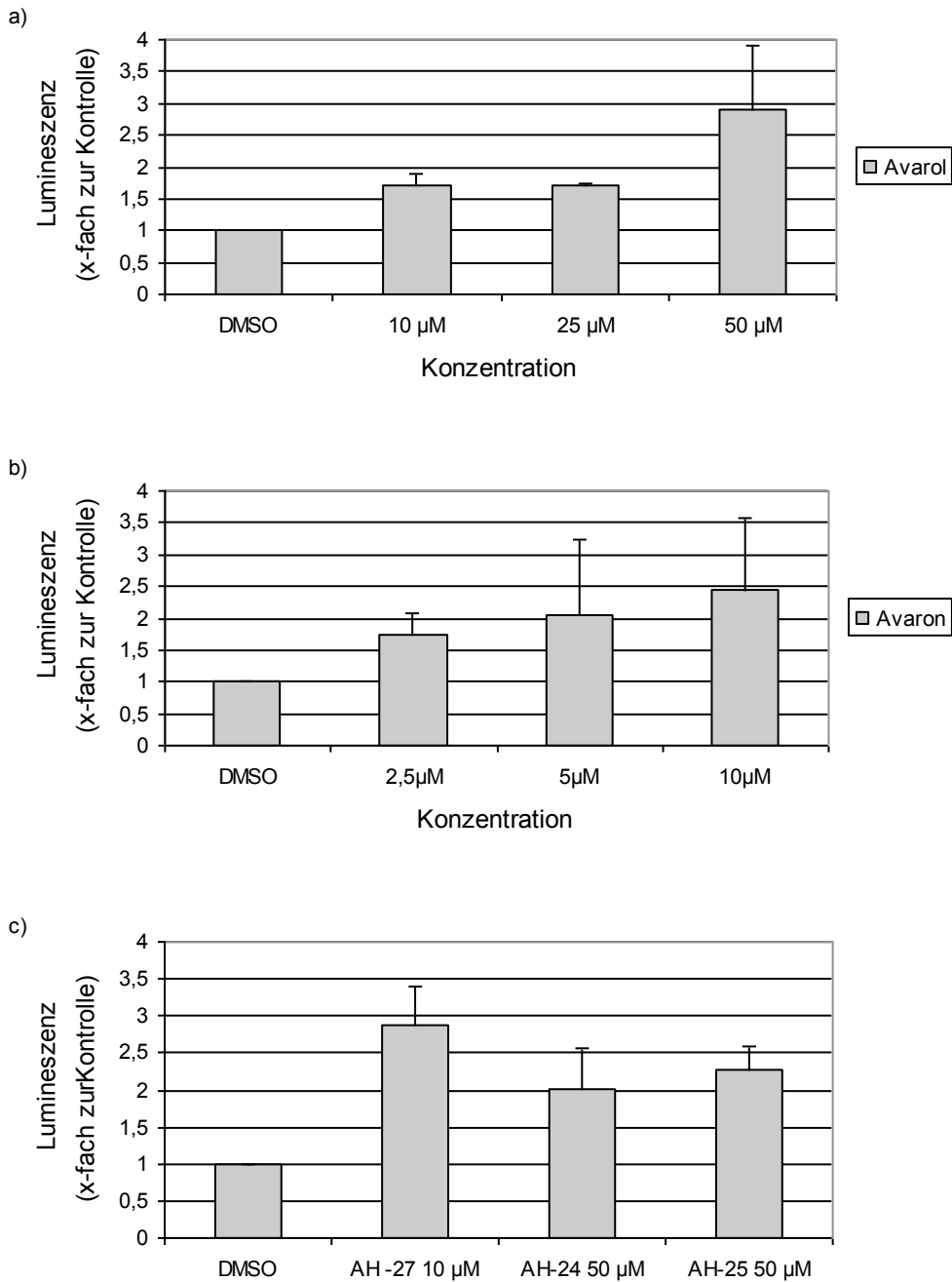


Abb. 2.2.3.2 a-c Luciferase-Assay zur Messung der ARE-Aktivierung in transfizierten HCT116- Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avarol (a), Avaron (b), sowie 3'-Methylaminoavaron = AH-27, 4'-Methylaminoavaron = AH-24 und N-Methylmeleleone A = AH-25 (alle c).

200.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den Avaron-Derivaten inkubiert. Neben dem Luciferase-Assay wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung durchgeführt und im Rahmen der Auswertung der Quotient aus beiden gebildet. Dargestellt sind die auf die DMSO-Kontrolle bezogenen Quotienten (Mittelwerte + SD; n=3).

2.2.4 Induktion der Hämoxxygenase-1 (RT-PCR)

Mit Hilfe der reversen Transkriptions Polymerase Kettenreaktion (*RT-PCR*) kann eine Abschätzung bzgl. der Menge einer bestimmten mRNA gemacht werden. Da die mRNA als „Anleitung“ für die Synthese dieses bestimmten Proteins dient, lässt ihre Menge indirekt Rückschlüsse auf die Syntheseleistung der Zelle im Bezug auf das Zielprotein zu.

Zunächst wurde in einem arbeitsgruppeninternen Vorversuch eine Kinetik mit tert-Butylhydrochinon (tBHQ) durchgeführt, um die Inkubationsdauer mit der maximalen HO-1-Synthese herauszufinden (Abb. 2.2.4.1). Auf Grund dieser Daten wurde die Inkubationszeit auf 8 Stunden festgelegt.

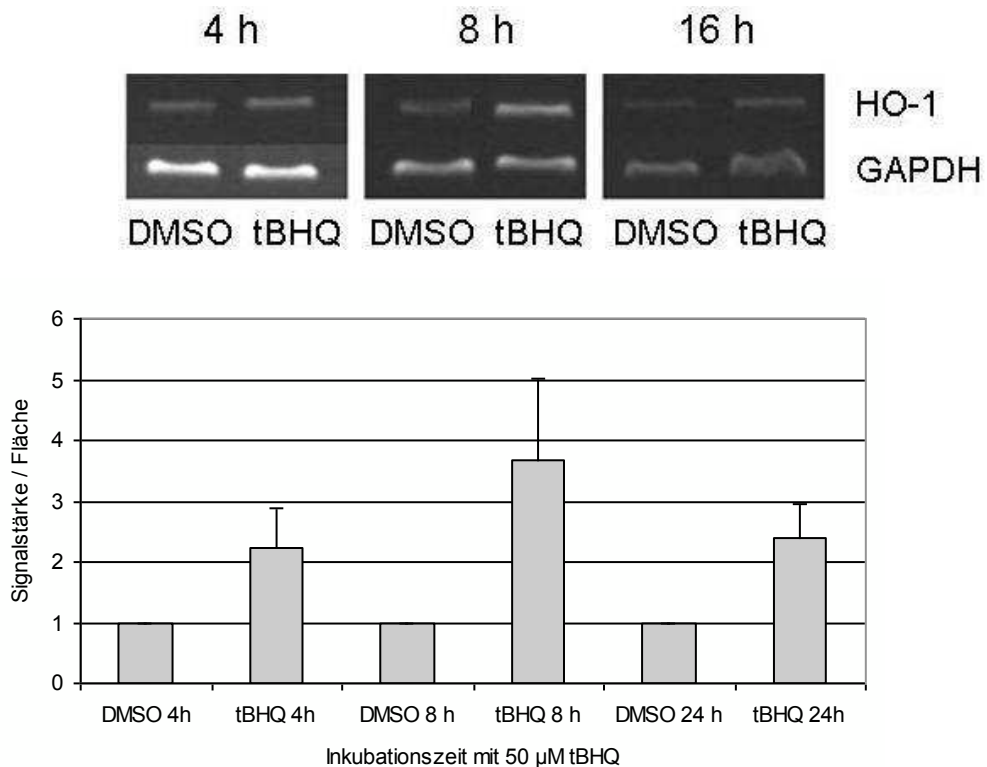


Abb. 2.2.4.1 RT-PCR zur Darstellung der HO-1 Expression in HCT116-Zellen nach Inkubation mit 50 µM tBHQ über verschiedene Zeiträume.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für verschiedene Zeiten mit 50 µM tBHQ inkubiert. Aus den Zellen wurde im Anschluss die mRNA isoliert, umgeschrieben und die entstandene cDNA mit Hilfe von spezifischen Primern für HO-1 und GAP-DH vervielfältigt. Dargestellt sind die auf die DMSO-Kontrolle bezogenen Signalanstiege pro konstanter Flächeneinheit nach Angleichung an die durch die GAP-DH ermittelte aufgetragene DNA-Menge. (Mittelwerte + SD; n=3)

Ergebnisse

Von den Avaron-Derivaten haben die drei Substanzen Avarol, 3'-Methylaminoavaron (AH-27) und N-Methylmelemeleone A (AH-25) einen Effekt auf die Expression der Hämoxxygenase-1. Sie führen alle zu einer Steigerung der Transkription der zugehörigen mRNA um den Faktor 2. Avaron und 4'-Methylaminoavaron (AH-24) zeigen im Mittelwert praktisch keinen Effekt (Abb. 2.2.4.2). Aus Gründen der höheren Zytotoxizität wurde für Avaron und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) eine Konzentration von nur jeweils 10 μM eingesetzt.

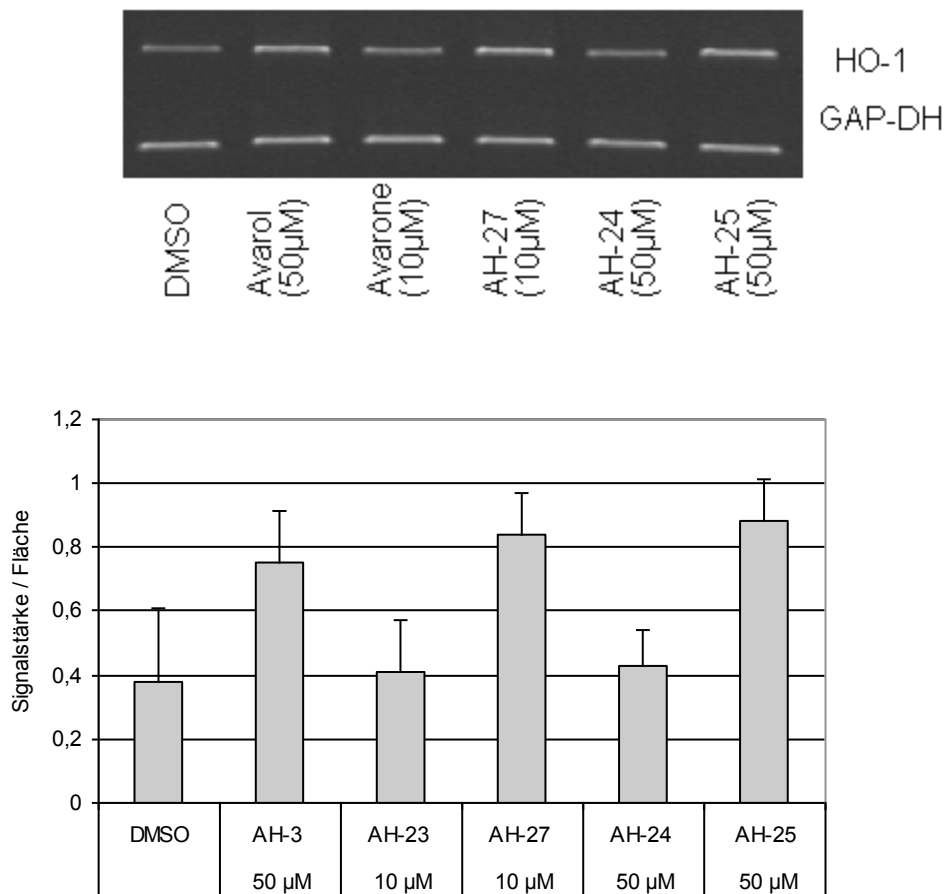


Abb. 2.2.4.2 RT-PCR zur Darstellung der HO-1 Expression in HCT116-Zellen nach Inkubation über 8 h mit den Avaron-Derivaten.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 8 h mit den Avaron-Derivaten inkubiert. Aus den Zellen wurde im Anschluss die mRNA isoliert, umgeschrieben und die entstandene cDNA mit Hilfe von spezifischen Primern für HO-1 und GAP-DH vervielfältigt. Dargestellt sind die Signalanstiege pro konstanter Flächeneinheit nach Angleichung an die durch die GAP-DH ermittelte aufgetragene DNA-Menge. (Mittelwerte + SD; n=3)

2.3 Untersuchung der Beeinflussung des NFκB Signalweges

2.3.1 Modulation des unstimulierten NFκB Signalweges (SEAP-Assay)

Der NFκB Signalweg spielt in der Zelle eine zentrale Rolle u. a. im Bezug auf Entzündungen. Da er antiapoptotische Wirkungen hat und des Weiteren das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren unterstützt, ist er in den Fokus für Forschungen zur Behandlung von malignen Entartungen gerückt (Gaarg & Aggarwal, 2002). Die Aktivierung kann über ROS und TNF-α erfolgen. Um den Einfluss der Avaron-Derivate auf diesen Signalweg näher zu beleuchten, wurden zunächst Versuche unter unstimulierten Bedingungen durchgeführt.

Hier verwenden wir ein Assaysystem, welches NFκB-Aktivierung durch Sekretion eines Markerenzym, der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase (SEAP), bestimmt. Die Aktivität des ins Medium sezernierten Enzyms ist also proportional zu dem Ausmaß der NFκB-Aktivierung.

Die Untersuchungen in H4IIE Hepatomzellen haben jedoch gezeigt, dass bei keiner der Substanzen eine signifikante Modulierung der basalen NFκB-Aktivität zu verzeichnen ist (Abb. 2.3.1). Untersuchungen in HCT116 waren derzeit nicht möglich, da nur eine Hepatom-Zelllinie (H4IIE) zur Verfügung stand, die konstant mit dem NFκB-Konstrukt transfiziert war.

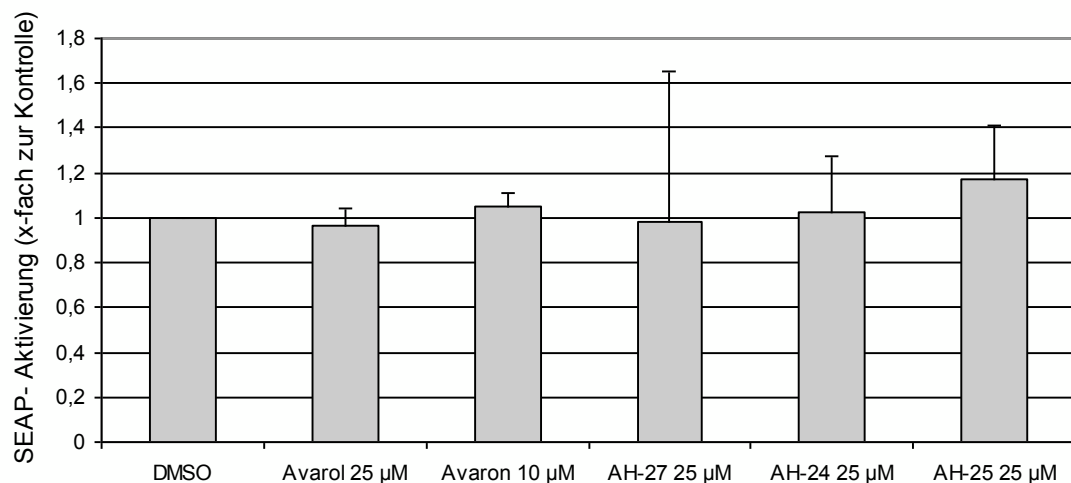


Abb. 2.3.1 SEAP-Aktivität zur Darstellung der NFκB-Modulierung in H4IIE-Zellen nach Inkubation über 24 h mit den Avaron-Derivaten.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 24 h mit den Avaron-Derivaten inkubiert. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität im Überstand der Zellen gemessen. Mit dem Zellrasen wurde eine MTT-Reaktion zur Abschätzung der Zellviabilität durchgeführt. Dargestellt sind die Quotienten aus den SEAP- und MTT-Werten, nach Normierung auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=3)

2.3.2 Inhibierung des NFκB Signalweges (SEAP-Assay)

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Avaron-Derivate einen inhibierenden Einfluss auf den NFκB Signalweg haben. Um einen hemmenden Effekt nachweisen zu können, muss generell eine gewisse Aktivität vorhanden sein. Diese Aktivität wurde dadurch sichergestellt, dass nach einstündiger Vorinkubation mit den Avaron-Derivaten für 24 h mit TNF-α, einem Zytokin, welches unter anderem zur NFκB-Aktivierung führt, inkubiert wurde.

Einen signifikanten und gleichzeitig den deutlichsten Effekt zeigten Avarol und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) mit einer Abnahme des TNF-Einflusses auf ca. 60% bei einer Konzentration von 25 μM (Abb. 2.3.2. a, b). Ähnliche Werte erzielt das 4'-Methylaminoavaron (AH-24), während das Avaron eine Abnahme auf ca. 70% bewirkt (Abb. 2.3.2. c, d). Das N-Methylmelemeleone A (AH-25) zeigt mit einer Reduktion auf ca. 85% keinen signifikanten Abfall der SEAP-Aktivität (Abb. 2.3.2. e).

Ergebnisse

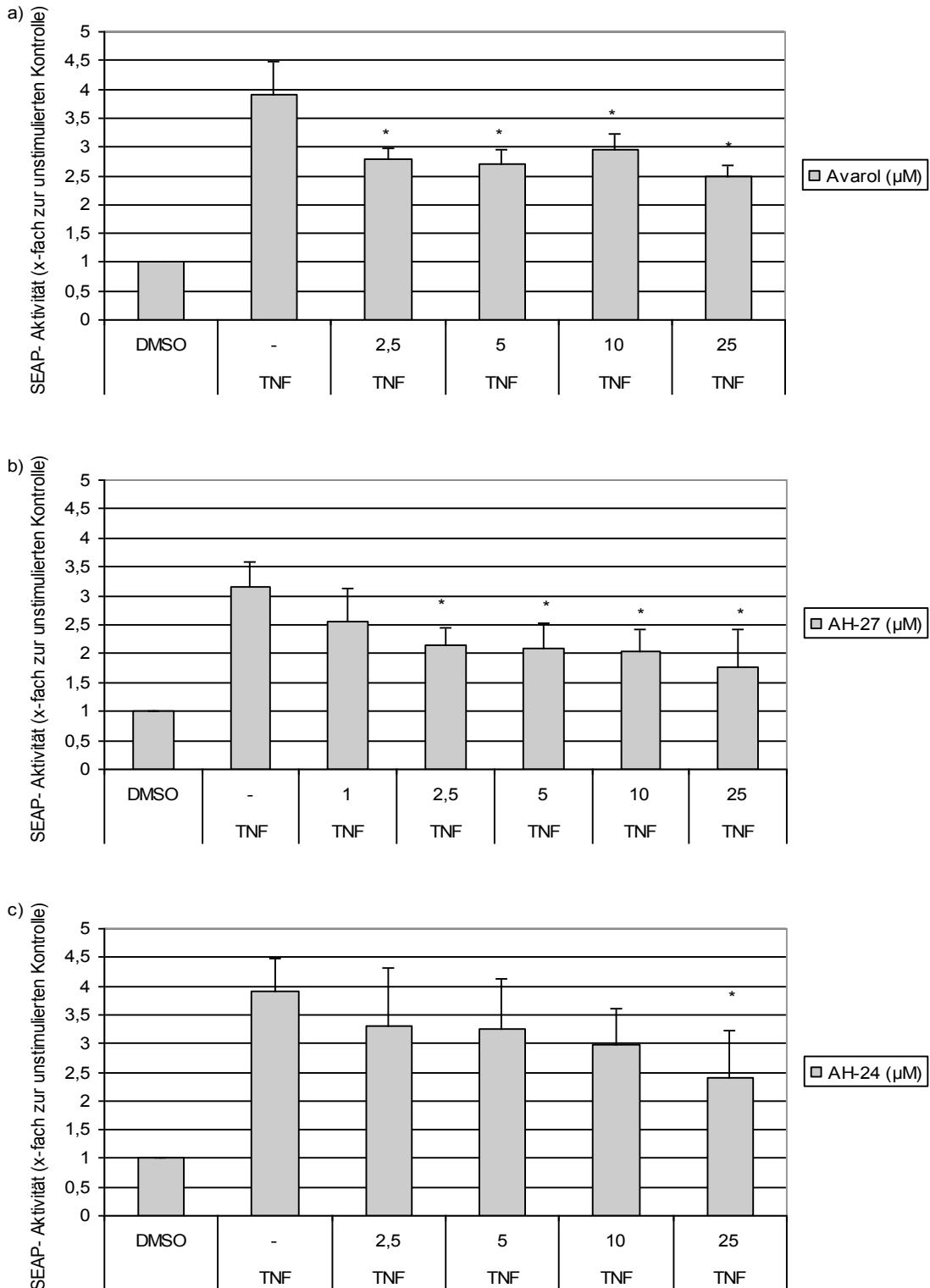


Abb. 2.3.2 a-c SEAP-Aktivität zur Darstellung der NFκB-Inhibition in H4IIE- Zellen nach einstündiger Vorinkubation mit Avarol (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b) und 4'-Methylaminoavaron (c) und anschließender TNF-α Inkubation über 24 h.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachszeit von 24 h für 1 h mit den Avaron-Derivaten vorinkubiert und danach für 24 h mit TNF- α inkubiert. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität im Überstand der Zellen gemessen. Mit dem Zellrasen wurde eine MTT-Reaktion zur Abschätzung der Zellviabilität durchgeführt.

Dargestellt sind die Quotienten aus den SEAP- und MTT-Werten, nach Normierung auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=3; *: p<0,05 gegen TNF-α-stimulierte SEAP-Aktivität)

Ergebnisse

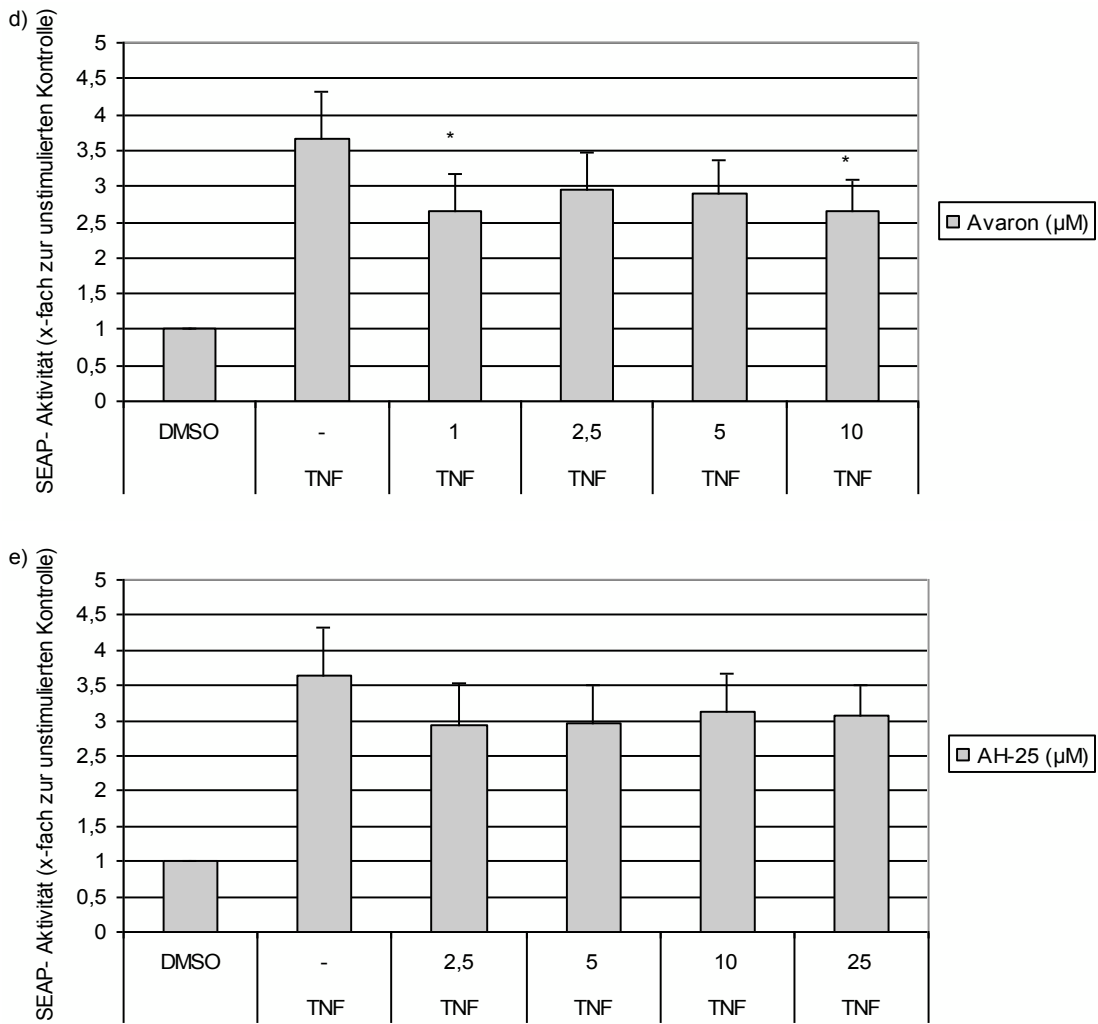


Abb. 2.3.2 d-e SEAP-Aktivität zur Darstellung der NFκB-Inhibition in H4IIE-Zellen nach einstündiger Vorinkubation mit Avaron (d) und N-Methylmeleleone A (e) und anschließender TNF-α Inkubation über 24 h.

500.000 Zellen / Well wurden nach einer Anwachzeit von 24 h für 1 h mit den Avaron-Derivaten vorinkubiert und danach für 24 h mit TNF- α inkubiert. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität im Überstand der Zellen gemessen. Mit dem Zellrasen wurde eine MTT-Reaktion zur Abschätzung der Zellviabilität durchgeführt.

Dargestellt sind die Quotienten aus den SEAP- und MTT-Werten, nach Normierung auf die DMSO-Kontrolle. (Mittelwerte + SD; n=3; *: p<0,05 gegen TNF-α-stimulierte SEAP-Aktivität)

3. Diskussion

Avaron und seine Derivate werden in der wissenschaftlichen Presse mit den verschiedensten Effekten in Zusammenhang gebracht (Sladić & Gašić, 2006). Speziell Avaron und seine reduzierte Form, das Avarol, sind bisher Gegenstand verschiedenster Studien gewesen.

Grundlegende Forschungen mit diesen Substanzen befassen sich mit Effekten auf Leukämie-Zellen (Müller et al., 1985 a) und berichten von selektiver Zytotoxizität in vitro und einer Verlängerung der Lebensspanne bei befallenen Mäusen in vivo. Außerdem wurde festgestellt, dass es nach Inkubation von murinen Lymphomzellen mit den Substanzen zu einem Abfall der Superoxiddismutasen (SOD) und gegenläufig zu einem Anstieg der Glutathionperoxidase (GSH) kommt. Es wird diskutiert, ob für die zytotoxischen Effekte ein Anstieg von Superoxidradikalen mit verantwortlich ist (Batke et al., 1988). Die Forschung beschränkt sich jedoch nicht nur auf den onkologischen Bereich, sondern sieht in den Avaron-Derivaten potentielle Substanzen z.B. zur Thromboseprophylaxe (Belisario et al., 1996), HIV-Therapie (Sarin et al., 1987) und der Behandlung der Psoriasis (Amigó et al., 2006).

Da die Substanzen nur aus seltenen marinen Organismen gewonnen werden können, auf der anderen Seite aber das Interesse stark zugenommen hat, ist die künstliche Synthese ein wichtiger Forschungsschwerpunkt geworden (Sakurai et al., 2008). Zudem spielt die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen eine wichtige Rolle. So zeigten Alkylthio- und Arylthio-Avaron-Derivate starke zytotoxische Eigenschaften in humanen Zervixkarzinomzellen, HeLa-Zellen und humanen Melanomzellen (Božić et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Effekte von Avaron und verschiedenen Derivaten bzgl. der Generierung von ROS und dessen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege untersucht.

3.1 Zytotoxizität von Avaron und dessen Derivaten

Schon im Jahre 1985 publizierte die Arbeitsgruppe um Werner Müller einen Artikel, in dessen Fokus der Schwamm *Dysidea avara* stand. Damals fiel auf, dass dieser Organismus mit vergleichsweise wenig Bakterien besiedelt war. Auf der Suche nach molekularen Ursachen für diese Tatsache fand man heraus, dass der Schwamm verhältnismäßig große Mengen an Avaron und Avarol beinhaltet (Müller et al., 1985 b). Als Folge wurde im Weiteren das zytotoxische Potential der Avaron-Derivate in verschiedenen Zelllinien untersucht, was in Abhängigkeit der behandelten Zelllinie zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen bzgl. der EC₅₀-Werte geführt hat: Nach einer Inkubationszeit von 72 h zeigten sich z.B. für Avaron in den 5 untersuchten Zelllinien EC₅₀-Werte zwischen 0,62 µM (L5178Y Maus Lymphomzellen) und 76,4 µM (humane Gingivazellen). Eine ähnliche Spannweite zeigte sich im Fall des Avarol, wobei hier ein leicht abgeschwächter Effekt zu verzeichnen war. 3'-Methylaminoavaron (AH-27) und 4'-Methylaminoavaron (AH-24) wurden nur in den Lymphomzellen untersucht, mit dem Ergebnis einer 6-fach (EC₅₀ = 4,16 µM) bzw. 16-fach (EC₅₀ = 10,02 µM) geringeren toxischen Potenz im Vergleich zu Avaron (Müller et al., 1985 a). Man vermutete damals einen zellspezifischen zytotoxischen Effekt, dessen Ausmaß in HCT-116 Darmkrebszellen und in H4IIE Hepatomzellen im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Hierbei wurde mit Hilfe des MTT-Assays für die meisten Derivate eine Toxizität mit EC₅₀-Werten von 50 µM oder weniger nachgewiesen.

Avaron und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) erwiesen sich hierbei als die Substanzen mit den mit Abstand niedrigsten benötigten Konzentrationen um die MTT-Reaktion in 50% der Zellen zu unterbinden. In den HCT-116 Darmkrebszellen zeigten sich EC₅₀ -Werte von 5,25 µM bzw. 9 µM bei einer im Vergleich zu Müller dreifach kürzeren Inkubationszeit von 24 h.

Auch in den H4IIE Hepatomzellen zeigt sich bzgl. der Zytotoxizität eine ähnliche Verteilung: das Avaron weist wiederum das stärkste toxische Potential auf, gefolgt von 3'-Methylaminoavaron (AH-27), Avarol, sowie dem 4'-Methylaminoavaron (AH-24). Insgesamt sind die toxischen Effekte der Substanzen in den Leberkrebszellen geringer als in den Darmkrebszellen, was am Beispiel des N-Methylmeleleone A (AH-25) sehr deutlich wird. Bei gleicher Konzentration (50 µM) überleben in den Hepatomzellen 75% der Zellen im

Gegensatz zu 50% der Darmkrebszellen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte auf der Tatsache beruhen, dass die Leberzellen auf Grund ihrer Enzymausstattung in der Lage sind, die Substanzen zu einem anderen Ausmaß zu metabolisieren und so möglicherweise in ihrer Toxizität einzuschränken oder durch eine andere Ausrüstung mit antioxidativen Enzymen den Effekt der ROS zu minimieren.

Insgesamt decken sich die hier neu erhobenen Erkenntnisse über die toxischen Effekte dieser Substanzen in den HCT116- und H4IIE-Zellen mit denen der Arbeitsgruppe Müller bzgl. der oben genannten Zelllinien. Obwohl die Inkubationszeit in den Arbeiten von Müller et al. 3-mal länger war als in unseren Versuchsansätzen, reagieren die HCT116-Zellen auf Avaron in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen. Mit einem EC_{50} -Werte von 5,25 μM sind das die Zellen mit der zweitgrößten Sensibilität für diese Substanz, gefolgt von humanen HeLa-Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 8,7 μM . Das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) wies in den Lymphomzellen einen EC_{50} -Wert von 10,02 μM auf, der in den HCT116-Zellen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Inkubationszeiten deutlich unterboten wird.

Das Avaron hat sich somit auch hier als wirksamste Substanz hervor getan. Damalige Untersuchungen bzgl. der Struktur-Wirkungs-Beziehungen geben Anlass zu der Vermutung, dass der Chinon-Ring im Avaron stark zu der Toxizität der Substanz beiträgt. Ein Ersetzen dieser Struktur durch ein Hydrochinon bzw. das Anhängen von Methylamino-Gruppen reduziert den Effekt dieser Substanz teilweise erheblich (Müller et al., 1985 a), wobei die Position der Methylamino-Gruppe laut den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. Auch die Ergebnisse in den HCT116- und H4IIE-Zellen spiegeln diese Erkenntnisse wider. So liegt zwischen dem Chinon-Ring im Avaron und dem Hydrochinon im Avarol ein ca. 6-fach niedrigerer EC_{50} -Wert zugunsten des Avaron. Ebenso bewirkt eine Verlagerung der Methylamino-Gruppe von Position 4 (AH-24) zu Position 3 (AH-27) eine mehr als 5-fache Verringerung des EC_{50} -Werts von über 50 μM auf 9 μM . Auffällig ist jedoch, dass im Gegensatz zu Müller et al. hier nicht das Avarol die zweittoxischste Substanz ist, sondern das 3'-Methylaminoavaron (AH-27).

Für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebserkrankungen ist neben der selektiven Abtötung der Tumorzellen zusätzlich die Art des ausgelösten Zelltodes ein wichtiges Kriterium für die Anwendbarkeit einer Substanz. Es ist von Vorteil, wenn potentielle Krebsmedikamente zur Induktion einer Apoptose führen, da der Organismus in dem Fall nicht noch zusätzlich zur ablaufenden Tumorlyse durch die begleitende inflammatorische Reaktion belastet wird.

Da es zu den Substanzen im Bezug auf Induktion von Apoptose und Nekrose noch keine Daten gibt, wurden der Apo ONE[®]-Assay und der LDH-Assay durchgeführt. Zunächst wurde zum Nachweis einer Apoptose die Aktivität der Caspase 3 / 7 nach Vorinkubation mit den Substanzen gemessen. Bei keiner der Substanzen hat sich hierbei eine signifikante Aktivitätssteigerung gezeigt. Die Versuche mit den HCT-116 Zellen zeigten allenfalls eine leichte apoptotische Tendenz im Fall des Avaron und des 3'-Methylaminoavaron (AH-27). Ein falsch negatives Ergebnis kann ausgeschlossen werden, da die Reaktion bei mit 1'-Deoxyrhodoptilometrin inkubierten Substanzen stattgefunden hat. Diese Substanz wurde arbeitsgruppenintern zum gleichen Zeitpunkt auf der gleichen Platte mit dem gleichen Versuchsansatz inkubiert und gemessen und dient somit als positiv Kontrolle für die Funktionalität des Assays (Daten nicht aufgeführt). Die gleichen Versuche wurden auch mit den H4IIE-Zellen durchgeführt, wobei sich hierbei keine Veränderung gegenüber der Kontrolle gezeigt hat.

Zusätzlich wurde zum Nachweis eines nekrotischen Zelltodes der LDH-Assay durchgeführt, bei dem die Aktivität eines physiologisch ausschließlich intrazellulär lokalisierten Enzyms, der Laktatdehydrogenase (LDH), im Zellkulturmedium gemessen wurde. Signifikante Ergebnisse waren in den HCT-Zellen für das Avaron und das 3'-Methylaminoavaron (AH-27) zu verzeichnen. Avarol zeigt eine leichte Tendenz zur Nekrose, während 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und N-Methylmelemeleone A (AH-25) keinen Effekt zeigen.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit den H4IIE-Zellen bestätigen die MTT-Ergebnisse: insgesamt scheinen die Substanzen auch hier ein schwächeres toxisches Potential zu haben. Besonders auffällig ist das Ausbleiben der LDH-Ausschüttung im Fall des 3'-Methylaminoavaron (AH-27) bei bestehender MTT-

Reaktion. Außerdem konnte im Rahmen des Versuchsansatzes für diesen Assay weder eine Toxizität (MTT) noch eine Induktion von Nekrose (LDH) für das Avarol nachgewiesen werden. Da alle Experimente mit einer einzigen Avarolprobe durchgeführt werden mussten, hat die Substanz möglicherweise durch das häufige Auftauen und Einfrieren ihre Wirksamkeit verloren. Für diese These spricht die Tatsache, dass sich bei den Screenings bzgl. der Zytotoxizität am Anfang dieses Projekts signifikante Ergebnisse für das Avarol in zwei Zelllinien zeigten. Eine Wiederholung dieses Versuches mit einer frischen Probe wäre mit Sicherheit aufschlussreich zur Klärung dieses Befundes.

Insgesamt lässt sich keine definitive Aussage bzgl. der Induktion von Apoptose oder Nekrose machen, allerdings ist allgemein ein stärkerer Effekt in Richtung Nekrose zu verzeichnen als in Richtung Apoptose. Es hat sich gezeigt, dass im Fall des Avaron laut MTT-Assay ca. 90% Zellen einen Schaden der Mitochondrien davon tragen, es jedoch lediglich bei knapp 40% der Zellen zur Perforation der Zellmembran gekommen ist. Dieses unterschiedliche Ergebnis bzgl. dieser beiden Endpunkte könnte möglicherweise dadurch zu erklären sein, dass sich die toxischen Wirkungen früher auf der Ebene der Mitochondrien als auf der Ebene der Zellmembranen zeigen. Eine längere Inkubationsdauer von z.B. 48 h könnte Aufschluss bzgl. dieser Hypothese geben.

Das insgesamt schwache Ansprechen von Avarol, 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und N-Methylmeleleone A (AH-25) könnte damit zu erklären sein, dass die maximale eingesetzte Konzentration von 25 µM zu niedrig war.

3.2 Beeinflussung des Nrf2 Signalweges

Zur Abwehr von regelmäßig im menschlichen Körper anfallenden sog. reaktiven Sauerstoffspezies verfügt der Organismus über ein System von enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen. Zu den enzymatischen Abwehrmechanismen zählen z.B. die Superoxiddismutase und die Glutathion-Peroxidase (Sies, 1997). Die Beeinflussung der Level von antioxidativen Enzymen durch Avaron und Avarol wurde von Batke et al. im Jahre 1988 beschrieben: Während es zu einer Hemmung der Superoxiddismutase (SOD) durch die Substanzen in murinen Lymphomzellen kam, wurde die Glutathion-

Peroxidase gegenläufig durch die erhöhten Spiegel an ROS innerhalb der Zelle hoch reguliert. So wird vermutet, dass die toxischen Eigenschaften der Substanzen zum einen auf den Eingriff in die o. g. antioxidativen Enzymsysteme zurückzuführen sind, zum anderen möglicherweise aber auch durch die Fähigkeit Superoxidanionen zu generieren wie z.B. im Falle von Avarol (Müller et al., 1987). Die Sensibilität der einzelnen Zelllinien gegenüber Avaron und Avarol wird in dem Zusammenhang auf eine unterschiedliche Ausstattung mit antioxidativen Enzymen zurückgeführt (Müller et al., 1987).

Die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, die Transkription von bestimmten Zielgenen des *ARE* und somit die Hochregulierung von Enzymen wie z.B. der Hämoxygenase-1 (HO-1) stellen eine weitere Antwortmöglichkeit des Körpers auf intrazellulären oxidativen Stress dar (Ryter & Choi, 2005). Um diesen Signalweg im Bezug auf die Einflussnahme von Avaron und Avarol näher zu beleuchten, wurden Versuche auf unterschiedlichen Ebenen dieser Signalkaskade durchgeführt.

Mit Hilfe des DCF-Assays konnte für Avaron bei der maximalen Konzentration von 25 μM lediglich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg um den Faktor 1,5 der intrazellulären ROS-Menge nachgewiesen werden. Im Falle der anderen Substanzen sind keine mit dem DCF-Assay detektierbaren Anstiege der Radikalkonzentrationen zu verzeichnen gewesen, obwohl Avarol unter bestimmten experimentellen Bedingungen bei Müller et al. im Jahre 1987 in der Lage sein soll Superoxidanionen in Anwesenheit von Sauerstoff generieren zu können. Von Amigo et al. wurde im Jahr 2004 jedoch nachgewiesen, dass Avarol die ROS-Konzentration in stimulierten neutrophilen Granulozyten sogar reduzieren kann. Möglicherweise bewirkt die Substanz in den nicht-aktivierten Darmkrebszellen auf einem direkten Weg die Aktivierung von Nrf2. Hypothetisch könnte die Generierung von ROS via Avaron und seiner Derivate lange genug dauern, damit die Zelle eine reaktive Gegenregulation mit anderen antioxidativen Enzymen, wie z.B. der Glutathionperoxidase (Batke et al. 1988), starten kann. Die entstandenen ROS sind im Gegensatz zum sofort aktiven H_2O_2 lediglich im DCF-Assay nicht mehr detektierbar, haben jedoch im Rahmen ihres langsamen Konzentrationsanstieges trotzdem ihre Wirkung auf die Zelle ausgeübt. Für diese These spricht die Tatsache, dass alle Substanzen im

nächsten Schritt der Signalkaskade eine Aktivierung von Nrf2 bewirken. Das zeigt sich durch eine deutliche Verstärkung des Antikörpersignals seitens der nukleären Fraktion im Western Blot. In Anlehnung an die Vorversuche zur Nrf2-Aktivierung mit dem klassischen Induktor tBHQ wurde eine Inkubationszeit von 3 h gewählt. Den deutlichsten Effekt zeigt das N-Methylmeleleone A (AH-25), gefolgt von 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und vom Avarol. Wegen ihrer vergleichsweise hohen Toxizität wurden die Zellen im Fall von Avarol und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) nur mit einer Konzentration von jeweils 10 µM inkubiert. Gesetzt dem Fall, dass die Toxizität der Substanzen tatsächlich auf der Generierung von Superoxidanionen beruht, könnte das relativ schwache Ansprechen der Zellen auf diese beiden Substanzen durch die 5-fach niedrigere Konzentration möglicherweise erklärt werden. Eine weitere Auffälligkeit liegt in der von Stewart et al. bereits im Jahre 2003 beschriebenen Tatsache, dass die zytosolischen Nrf2 Signale in den DMSO-Kontrollen unterhalb der Nachweisgrenze für die Western Blots liegen. Dies ist der Fall, obwohl die Proben vor dem Gelauftrag bei 95° C für 10 min. denaturiert worden sind. Nrf2 und Keap-1 müssten somit in ihrer Primärstruktur und von einander getrennt vorliegen. Dieser Befund könnte dadurch erklärbar sein, dass der Antikörper Nrf2 in der zytosolischen Fraktion nicht erkennen kann, weil die beiden Proteine trotzdem noch aneinander adhären sind und so die Antikörperbindungsstelle blockieren. Diese Hypothese würde eher für eine Translokation als für einer Induktion sprechen. Eine schnelle Hochregulierung von Nrf2 durch die Neusynthese dieses Transkriptionsfaktors ist eher unwahrscheinlich, Nahe liegend ist jedoch vielmehr dessen Stabilisierung. So konnte die Halbwertszeit von Nrf2, einem eher labilen Protein, nach Stimulation durch Cadmium von ~ 13 auf fast 100 Minuten erhöht werden (Stewart et al., 2003). Der dahinter vermutete Mechanismus liegt in einer nukleären Deubiquitinierung von Nrf2. Dadurch bleibt dessen anschließender Abbau in den Proteasomen aus und Nrf2 kann im Zellkern akkumulieren (He et al., 2008). Konsequenterweise ist in der zytosolischen Fraktion kein Signal detektierbar, weil das Nrf2-Molekül entweder transloziert oder abgebaut worden ist. Die nukleäre Bande in den Kontrollen entsteht auf Grund einer gewissen Grundaktivität des Nrf2.

Die sich fortsetzende Aktivierung der Signalkaskade spiegelte sich auch auf der Ebene des ARE wider. Bei allen untersuchten Substanzen zeigte sich im

Vergleich zur Kontrolle eine unterschiedlich ausgeprägte Verstärkung des Signals im Luciferase-Assay. Die schlussendliche Enzymtranskription wurde in Gestalt einer Verbreiterung der Banden in der RT-PCR für Avarol, 3'-Methylaminoavaron (AH-27) und N-Methylmeleleone A (AH-25) sichtbar, nicht jedoch im Fall von Avaron und 4'-Methylaminoavaron (AH-24). Möglicherweise liegt der Grund für den insgesamt schwachen Einfluss des Avaron auf allen Stufen des Nrf2 Signalweges in der erniedrigten Inkubationskonzentration. Theoretisch könnte er aber auch durch die erhöhte Zytotoxizität erklärt werden. Eine Auffälligkeit zeigte sich bei der Ermittlung der optimalen Inkubationszeiten: während das Maximum der ARE-Aktivierung im Bereich von 24 h liegt, deuten die Ergebnisse aus entsprechenden Vorversuchen auf ein maximales HO-1-Signal nach 8 h bei vorheriger Inkubation mit tBHQ. Für die Induktion der HO-1 stehen alternative Wege zu Nrf2 zur Verfügung. Zum einen wird der Inaktivierung des Repressors Bach 1 (BTB and CNC homology 1) eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Abhängig von der Gewebeart sorgt der Wegfall von Bach 1 in Herz, Leber und Lunge von Mäusen für eine leichtere Aktivierung der HO-1 Transkription durch Nrf2. Im Thymus hingegen findet eine Nrf2-unabhängige HO-1 Transkription durch den ausbleibenden negativen Einfluss von Bach 1 statt (Sun et al., 2002). Das o. g. Phänomen und der durch Avaron und 4'-Methylaminoavaron (AH-24) ausgebliebene Effekt könnten sich damit erklären lassen, dass durch die Avaron-Derivate selbst oder deren Einfluss eine Degradation von Bach 1 statt findet und somit eine maximale HO-1 Induktion bereits nach 8 Stunden eintritt. Zum anderen ist eine HO-1 Induktion durch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und p38 möglich (Elbirt et al., 1998). Möglicherweise greifen die Avaron-Derivate parallel auch in diese Signalkaskade ein und führen in der Endstrecke dieses Untersuchungsansatzes zu einem synergistischen Effekt.

Bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen decken sich für 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) die Ergebnisse des Nrf2 Signalweges mit den Daten zur Zytotoxizität. Unter Berücksichtigung der 5-fach niedrigeren Konzentration zeigt das 3'-Methylaminoavaron eine deutlich stärkere Aktivierung der einzelnen Stufen. Ein gegenläufiges Resultat bringt der Vergleich zwischen Avaron und Avarol, wobei hier auf Grund der

unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen keine absolute Aussage getroffen werden kann.

3.3 Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NFκB

NFκB wird eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten von Krankheiten zugeschrieben, mit besonderem Augenmerk auf die Onkogenese. Eine Aktivierung von NFκB geht mit dem Überleben von geschädigten Zellen einher, während eine Hemmung die Wahrscheinlichkeit einer durch TNF-α ausgelösten Apoptose erhöht (Foo & Nolan, 1999).

Zunächst wurde der Einfluss der Avaron-Derivate ohne Aktivierung des Signalweges durch TNF-α untersucht. Das zeigt keine Wirkung, sodass eine basale NFκB-Aktivierung unter den von uns untersuchten Bedingungen ausgeschlossen werden kann.

Im Gegensatz dazu sind die Substanzen in der Lage zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle bei künstlicher Aktivierung der Kaskade durch TNF-α zu führen (s. auch Abb. 1.7). Hierbei hat sich das Avarol als potenteste Substanz erwiesen. Vor allem diese Substanz und einige andere Derivate mit Schwefelresten sind von der Arbeitsgruppe um Maria Amigo im gleichen Zusammenhang untersucht worden. Dabei ging es zum einen um die Identifikation von Substanzen mit protektiven Eigenschaften gegenüber UVB-Strahlung, zum anderen um potentielle Medikamente zur Behandlung der Psoriasis. Die Versuche wurden mit humanen Keratinozyten durchgeführt, wobei es insofern zu einem positiven Ergebnis gekommen ist, als dass es auch hier zu einer Hemmung der NFκB-Aktivität bzw. Bindungsfähigkeit an die DNA gekommen ist (Amigo et al., 2006, 2007 & 2008).

Bezüglich der Beeinflussung der NFκB-Aktivität scheint die Position der Methylamino-Gruppe nicht ausschlaggebend zu sein. 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und 3'-Methylaminoavaron (AH-27) bewirken eine ähnlich starke Reduktion der NFκB-Aktivität. Auch im Bezug auf die Unterschiede zwischen dem Chinon-Ring im Avaron und dem Hydrochinon-Ring im Avarol zeigt sich hier eher ein Effekt zugunsten des Avarol.

Insgesamt scheint es sinnvoll weiterführende Versuche im Bezug auf die Hemmung von NFκB mit Avarol selbst bzw. seinen Abkömmlingen

durchzuführen. Die Tatsache, dass die untersuchten Substanzen nur bei Überstimulation durch TNF- α aktiv in die Organisation der Zelle eingreifen gibt Hoffnung, dass es sich hierbei um ein erfolgsversprechendes Therapeutikum der Zukunft handeln könnte.

3.4 Abschließende Betrachtungen

Die Versuche haben gezeigt, dass es sich bei den Avaron-Derivaten um Substanzen mit toxischen Eigenschaften in den HCT-116 Zellen sowie den H4IIE-Zellen handelt. Bei der Art des Zelltodes handelt es sich zum größten Teil um einen nekrotischen Untergang der Zellen. Trotzdem wären weitere Untersuchungen, insbesondere das Ausloten zytotoxischer Eigenschaften in nicht-entarteten Zellen, durchaus sinnvoll.

Die Untersuchungen zur Beeinflussung des Nrf2 Signalweges haben ergeben, dass es im Fall von den meisten Substanzen unter Berücksichtigung verschiedener Konzentrationen zu einer unterschiedlich starken Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 mit anschließender Aktivierung des ARE und schlussendlicher Synthese von mRNA für die HO-1 kommt. Somit ist es möglich, dass zumindest ein Teilaspekt der Zytotoxizität durch einen Eingriff in den ROS-Haushalt verursacht wird. Wegen des Potentials in diese Kaskade einzugreifen, wäre eine Untersuchung weiterer Angriffspunkte von wissenschaftlichem Interesse.

Die Ergebnisse aus den Versuchen im Bezug auf den Transkriptionsfaktor NF κ B haben nochmals den starken Einfluss der Substanzen, besonders den des Avarol, auf intrazelluläre Signalwege gezeigt. Es gibt keinen Anhalt dafür, dass die Avaron-Derivate der Apoptose im Wege stehen. Vielmehr ist ein Synergismus in Richtung der Auslösung einer Apoptose durch NF κ B-Suppression bei pathologisch erhöhter Aktivierung durch TNF- α wahrscheinlich. Somit wäre es denkbar, dass die Substanzen zumindest als Grundlage für die Entwicklung neuer Substanzen dienen können und somit wäre eine weiterführende Forschung in diese Richtung mit Sicherheit sinnvoll.

Vergleichende Betrachtungen im Hinblick auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen deuten darauf hin, dass bezüglich der Toxizität zum einen der Chinon-Ring im Avaron gegenüber dem Hydrochinon im Avarol, und zum anderen die Position 3

der Methylamino-Gruppe (AH-27) der Position 4 (AH-24) überlegen ist. Auch bei der Beeinflussung des Nrf2 Signalweges zeigt sich eine Überlegenheit für Position 3 der Methylamino-Gruppe (AH-27) gegenüber der Position 4 (AH-24). Es haben sich somit die Erkenntnisse von Müller et al. aus dem Jahre 1985 zum einen auch für die Zytotoxizität in HCT116- und H4IIE-Zellen bestätigt, zum anderen schlägt sich dieser Effekt auch bei der Beeinflussung der Nrf2-Signalsweges nieder. Dieser Erkenntnis sollte bei der weiteren Untersuchung der Substanzen, aber auch bei der möglichen Entwicklung neuer Pharmaka Rechnung getragen werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 getestete Naturstoffe

Die Substanzen (Tabelle 4.1.1.1 & Tabelle 4.1.1.2) stammen aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Proksch. Sie wurden in DMSO gelöst und auf 20 mM eingestellt.

Abkürzung	Substanzname	MW (g/mol)	Schwamm
AH-1	Manzacidin A	344	Stylissa carteri
AH-2	3'-Bromomanzacidin D	358	keine Angabe
AH-3	Avarol	314	Dysidea avara
AH-5	Agelongine	339	Stylissa carteri
AH-7	Dibromophakelline	389	Stylissa carteri
AH-8	Aldisine	164	Stylissa carteri
AH-9	2'-Bromoaldisine	242	Stylissa carteri
AH-10	4'-Bromo-1H-Pyrrole-2'-Carbamide	188	Stylissa carteri
AH-11	3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carbamide	269	Stylissa carteri
AH-13	Clathramide C	343	Stylissa carteri
AH-18	Ageliferin	620	Stylissa carteri
AH-19	Hymenialdisine	325	Stylissa carteri
AH-20	3'-Bromohymenialdisine (Spongiacidin A)	403	Stylissa carteri
AH-21	Axinohydantoin (Spongiacidin D)	323	Stylissa carteri
AH-22	Zonarol/Avarol	314/314	keine Angabe
AH-23	Avaron	312	Dysidea avara
AH-24	4'-Methylaminoavaron	340	Dysidea avara
AH-25	N-Methylmelemeleone A	449	Dysidea avara
AH-26	Longamide B	351	Acanthostylotella sp.
AH-27	3'-Methylaminoavaron	341	Dysidea avara
AH-30	3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxyamide	268	Acanthostylotella sp.
AH-31	3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxylsäure	269	Acanthostylotella sp.
AH-32	3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Methylcarboxylat	283	Acanthostylotella sp.
AH-33	2'-Debromostevensine	309	Stylissa carteri

Tabelle 4.1.1.1 Getestete Naturstoffe, isoliert von Dr. Ashraf Nageeb El-Sayed Hamed (Hamed, 2009)

Abkürzung	Substanzname	MW (g/mol)	
SE-1	Methyl-3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxylate	283	Acanthostylotella sp.
SE-2	4,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide	268	Acanthostylotella sp.
SE-3	3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide	268	Acanthostylotella sp.
SE-4	4,5-Dibromo-N-((Z)-3-(2,5-Dioximidazolidin-4-Ylidene)-Propyl)-1H-Pyrrole-2-Carboxamide	406	Acanthostylotella sp.
SE-6	3,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide	268	keine Angabe
SE-7	Longamide B	268	Acanthostylotella sp.
SE-10	Luteolin-3'-O-Glucouronide	462	Thalassia testudinum

Tabelle 4.1.1.2 Getestete Naturstoffe, isoliert von Dr. Sherif S.E. Elsayed (Elsayed, 2010)

4.1.2 Chemikalien

2-Butanol	Acros Organics, Geel, Belgien
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
6x Loading Dye (grün)	MBI Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APO-ONE® Caspase- 3/ -7 Assay	Promega, Wisconsin, USA
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
BM Chemiluminescence WB Kit	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Bio Rad, Kalifornien, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliantblau R 250	Serva, Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	MBI Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
DMEM Zellkulturmedium	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM Zellkulturmedium (farblos)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Entwickler Kodak GBX	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
H ₂ DCF-DA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Jet Pei Polyplus Transfection	Biomol, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdisulfid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumthiocyanat	Merck, Darmstadt, Deutschland
LDH-Kit	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Luminol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Luteolin	Extrasynthese, Genay, Frankreich
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MTT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Okadasäure	Calbiochem, Kalifornien, USA
Penicillin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plasmid Purification Maxi Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Protein Assay Kit	Bio Rad, Kalifornien, Deutschland
Proteinase Inhibitorcocktail	Calbiochem, Kalifornien, USA
Reporter Lysis Buffer	Promega, Wisconsin, USA
Ribonuclease Inhibitor, 40 U/l	MBI Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
RT PCR Kit	Promega, Wisconsin, USA
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
SEAP Substrat	Tropix Inc., Bedford, Massachusetts, USA
Streptomycin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Stripping Puffer	Pierce, Illinois, USA
Super Signal West Pico Trial Kit	Pierce, Illinois, USA
TEMED	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tert-Butylhydrochinon	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X 100	BioChemica, Deisenhofen, Deutschland
Trizma-Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trizol (Tri [®] Reagent)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TROLOX	Calbiochem, Kalifornien, USA
Trypsin (0,5 %)-EDTA (5,3 mM)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylenxyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturmedium (DMEM)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ε-Aminocaprionsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

4.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Anodenpuffer	200 mM Tris, 20 % MeOH, pH 10,4
Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Antikörper Blockier- / Inkubationslösung	5 % Milchpulver in TBST
APS 10 %	1 g APS ad 10 ml dH ₂ O, aliquotiert bei -20°C
Coomassie Färbelösung	40 ml Ethanol, 2 ml Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brilliantblau ad 100 ml dH ₂ O
dH ₂ O- DEPC	0,1 % Diethylpyrrolcarbonat in dH ₂ O: 12 h rühren, 10 min. unter UV- Licht, 2x autoklavieren
Dilutionspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4
DNA-Auftragspuffer	0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylenxyanol, 50 % [v/v] Glycerol, in TBE (1x)
DNA-Blaumarker	0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylenxyanol, 50 % [v/v] Glycerol, in 1x TBE

Material und Methoden

Entwickler Kodak GBX	250 ml Entwicklerlösung + 750 ml dH ₂ O
EtOH (75 %)	75 % Ethanol in dH ₂ O-DEPC
Fixierer	600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfit ad 2 l dH ₂ O
H ₂ -DCF-DA Stocklösung	50 mM H ₂ -DCF-DA in DMSO
Inhibitorcocktail	200 mM Imidazol, 100 mM Natriumfluorid, 115 mM Natriummolybdat, 100 mM Natriumvanadat, 400 mM Natriumtartrat in dH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20 % Methanol, ε-Aminocaprionsäure in dH ₂ O, pH 9,4
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin
MTT-Extraktionslösung	95 % [v/v] Isopropanol, 5 % [v/v] Ameisensäure
MTT-Färbelösung (1x)	20 % [v/v] MTT-Stammlösung, 80 % [v/v] Zellkulturmedium
MTT-Stammlösung (5x)	PBS, 0,35 % [w/v] MTT
PBS (10x)	1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na ₂ PO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
Phosphatase-Inhibitormischung	1 ml Ripa-Puffer, 10 µl Inhibitorcocktail, 1 µl Okadasäure
Puffer A (zytosolische Fraktion)	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, Inhibitorcocktail (1x)
Puffer B (nukleäre Fraktion)	200 mM HEPES, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF
RIPA-Gebrauchspuffer	RIPA-Puffer, 1 mM PMSF, Inhibitorcocktail (1x)
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] NP40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat
RNA-Auftragspuffer	900 µl Fomamid, 100 µl MOPS (10x), 161 µl 37 % Formaldehyd, 20 µl 1 % Bromphenolblau, 20 µl 1 % Xylenoxyanol, 10 µl [10 mg/ml] EtBr
Sammelgelpuffer (2x)	250 mM Tris, 0,2 % [w/v] SDS, pH 6,8
SDS 10 %	100 g SDS ad 1 l H ₂ O
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS
SDS-Probenpuffer (4x)	40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β-Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenolblau
SEAP-Assay Puffer	2M Diethanolamin, 28 mM L-Homoarginin
TBE (5x)	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8
TBS (10x)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
TBST	TBS (1x), 0,1 % [v/v] Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8
Tris HCl pH 8	0,1 M Trizma [®] -Base
Zellkulturmedium	500 ml DMEM (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin), 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin 100 µg/ml)
Zellkulturmedium (farblos)	500 ml DMEM (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin) ohne Phenolrot, 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin 100 µg/ml)

4.1.4 Antikörper & Enzyme

Go-Taq-Polymerase, 5 U/l	Promega, Wisconsin, USA
Goat-anti-Rabbit	Southern Biotech, Georgia, USA
Nrf2 rabbit monoclonal antibody	Biomol, Hamburg
Nrf2 rabbit polyclonal IgG (H-300)	Santa Cruz, Kalifornien
Reverse Transkriptase, 200 U/l	Promega, Wisconsin, USA
Taq-Polymerase, 5 U/l	Promega, Wisconsin, USA

4.1.5 Geräte

Blotting Aparatur	OWL HEP-1, Thermo Scientific
CO2-Inkubatoren	APT-Line CB, Binder
	IG 150, Jouan
Durchlichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Fluoreszenzspektrophotometer	Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac
Gel-Dokumentationsanlage	Gel Doc 200, Bio Rad
Heizblock	Ori-Block OB 3, Techne
Mikroskop-Kamera	Motic Motacam 2300, Wetzlar
pH-Meter	PHM93 Reference pH-Meter, Radiometer Copenhagen
Rührer	MR 2002, Heidolph
Schüttler	Roto Shake Genie, Scientific Industries
Spektralphotometer	UV/VIS Spectrometer Lambda 12, Perkin Elmer
Sterilbänke	BSB4, Bartholomei Labortechnik
	LC2, Jouan
Thermocycler	GeneAMP PCR System 2400, Perkin Elmer
	T-Personal, Biometra
Waage	3716 MP Analysnwaage, Sartorius
Wasserbad	Certomat WR, B. Braun
	Thermomix 1420, B. Braun
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore
Zentrifugen	Avanti J-25, Beckmann Coulter
	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
	Minifuge 2, Heraeus
	MR 1812. Jouan
	Universal 30 F, Hettich

4.1.6 Software

Analyse-it für Microsoft Excel 2003 Version 2.12	Analyse-it Software, Ltd
Quantity ONE Version 4.1.1	Bio Rad
UV-Winlab No 1.0	Perkin Elmer
Wallac 1420 Workstation Version 2.00.035	Perkin Elmer

4.1.7 Sonstige Materialien

24-Well	Greiner bio-one
6-Well	Becton Dickinson
75 cm ² Gewebekulturflasche	Greiner bio-one
96-Well	Greiner bio-one
Chromatographie-Papier 3MMCCHR	Whatman
Falcon Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one
Filme (X-OMAT AR Film XAR-5)	Kodak
Proteinmembranen	PVDF-Western Blotting Membranes, Roche
Safe Lock Tubes 1,5 ml / 2,0 ml	Eppendorf
Zählkammer	Neubauer

4.2 Kultivierung der Zelllinien

Bei den beiden Zelllinien handelt es sich um humane Kolonkarzinomzellen (HCT116) und Leberkarzinomzellen (H4IIE) aus Ratten. In regelmäßigen Abständen (3 x wöchentlich) müssen sie unter sterilen Bedingungen passagiert werden, damit es nicht zu einer Kontaktinhibition durch zu enges Wachstum kommt. Die Kultivierung findet in 75 cm² Zellkulturflaschen statt, an dessen Boden die Zellen adhären. „Ernährt“ werden die Zellen durch ein DMEM Medium, welches zu 10% aus FCS besteht und zur Unterdrückung von Keimen zusätzlich mit Penicillin und Streptomycin supplementiert wurde. Der Brutschrank sorgt für eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre bei einer Temperatur von 37° Celsius und einem CO₂-Anteil von 5%.

Durchführung:

Vor dem Passagieren werden die Zellen zunächst im Lichtmikroskop angeschaut und bzgl. Morphologie, Zellzahl und evtl. einer Kontamination beurteilt. In der Zwischenzeit werden sowohl das Medium als auch das Trypsin-EDTA im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt.

Unter der Sterilbank wird das alte Medium abgesaugt und 1ml Trypsin-EDTA für eine bestimmte Zeit auf die Zellen gegeben, um sie vom Boden der Flask zu lösen: ca. 1 Minute bei HCT116; ca. 5 Minuten bei H4IIE im Brutschrank. Anschließend werden die Zellen in 9ml Medium resuspendiert und in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Für die Zellzählung werden 50µl der Zellsuspension in einem Eppendorf-Cup mit 450µl Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt. In einer Neubauer Zählkammer werden 8 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} = \text{Zellen/ml}$$

Unterdessen wird das Falcon mit der Zellsuspension für 5 Minuten bei 560 Umdrehungen/Minute in der Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Danach kann das über dem Zellpellet stehende Medium abgesaugt werden und durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Medium eine Zellsuspension mit der Konzentration von 1 Million Zellen/ ml eingestellt werden.

Es folgt das Aussäen der Zellen in eine T-75er Flask mit 20ml Medium. Wegen der unterschiedlichen Teilungsraten werden verschiedene Zellzahlen weitergesetzt: 1 Mio. HCT116 für 4 Tage und 3 Mio. Zellen für 2 Tage; 2 Mio. H4IIE für 4 Tage und 4 Mio. Zellen für 2 Tage.

Alternativ können aus der Stocklösung (1 Mio. Zellen/ml) weitere Verdünnungen angefertigt werden, um geringere Zellzahlen in andere Plattenformate (z.B. ein 96er Well für den Toxtest) auszusäen.

Zum Schluss werden die Flasks und Platten wieder im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2.1 Kryokonservierung

Um für spätere Versuche Zellen in einer niedrigen Passage zu haben, kann ein Teil der Zellen bei -80°C eingefroren werden. Dazu wird das Pellet vorher in einer Lösung aus 90% FCS und 10% DMSO suspendiert und ein entsprechendes Gefäß überführt.

Frisch aufgetaute Zellen werden in einer Zellkulturflasche ausgeteilt und im Brutschrank akklimatisiert. Nach 24h erfolgt ein Mediumwechsel.

4.3 Bestimmung der Zellviabilität (MTT-Assay)

Die Mitochondrien sind als „Kraftwerke der Zellen“ hauptverantwortlich für den Energiehaushalt und sichern somit das langfristige Überleben einer Zelle. Mit dem MTT-Assay wird nachgewiesen, bis zu welchem Grad die mitochondrialen Enzyme noch in der Lage sind das gelbe, lösliche Tetrazoliumsalz MTT (3 (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zum blauen, unlöslichen Formazan zu reduzieren. Die Stärke der Farbintensität ist also proportional zur Zellviabilität und wird nach Lösung des Formazans photometrisch bei einer Wellenlänge von 560nm gemessen

Durchführung:

Für den Assay werden 10.000 Zellen/100µl Medium/Well in eine 96er-Well Platte ausgesät. Nach 24h können die Zellen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert werden. Dazu werden vorher Verdünnungen angesetzt, sodass pro Well jeweils nur ein Mikroliter zugegeben werden muss. Nach der

Inkubationszeit (24h) wird das Medium durch je 100µl MTT-Färbelösung (0,07% MTT) ersetzt und für zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Anschließend wird die Reaktionslösung abgenommen und entstandene Formazan-Kristalle durch Zugabe von 100µl MTT-Extraktionslösung pro Well gelöst. Durch Schütteln wird die gefärbte Lösung homogenisiert und danach die Absorption bei 560nm und 540nm im Wallac Victor 1420 photometrisch gemessen.

4.4 Bestimmung der Art des Zelltodes (Apoptose oder Nekrose)

4.4.1 Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität als Apoptosenachweis (Apo ONE®)

Sobald eine Zelle das Signal zur Apoptose bekommt, werden verschiedene Caspasen aktiviert. Dabei handelt es sich um Cystein-Proteasen, die spezifisch nach Asparaginsäureresten schneiden. Die gemeinsame Endstrecke der Caspasen stellt die Aktivierung der Caspase-3 dar, welche verantwortlich ist für z.B. die Aktivierung von DNAsen und die Chromatin-Kondensation.

Das Prinzip des Apo ONE®-Assays beruht auf der Entstehung eines grün fluoreszierenden Farbstoffes. Dies geschieht, wenn aus dem synthetischen Substrat durch die Caspase 3 oder 7 eine Aminosäuresequenz abgespalten wird (Abb. 4.4.1). Die Fluoreszenz wird im Fluoreszenzspektrometer gemessen und dessen Stärke steht für den Grad der Caspasenaktivierung.

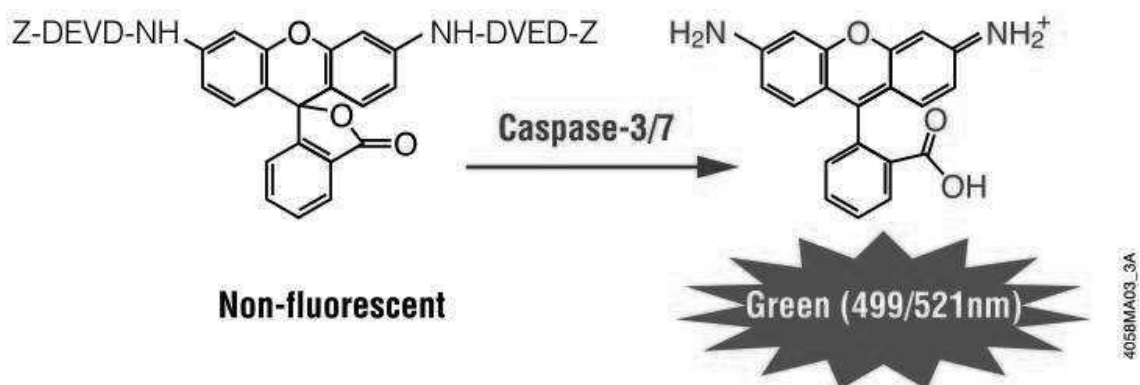


Abb. 4.4.1 Modifizierung des Apo ONE® Substrats durch die Caspase 3/7
(Quelle: Promega, 2009)

Permission for use from Promega Corporation, © 2009 Promega Corporation

Durchführung:

In eine 96-Well Platte werden pro Well 50.000 Zellen in jeweils 100µl Medium ausgesät und nach einer Anwachsungsphase von 24 h mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Nach 24 h Stunden Inkubationszeit wird das Medium in den Wells auf 50µl reduziert und mit 50µl der Apo ONE[®] Reaktionslösung aufgefüllt.

Anschließend wird im Wallac Victor 1420 für 3h gemessen: Anregung ($\lambda = 475$ nm), Emission ($\lambda = 535$ nm).

4.4.2 Bestimmung der LDH-Aktivität im Medium als Nekrosenachweis (LDH)

Bei der Laktatdehydrogenase handelt es sich um ein Enzym, welches unter physiologischen Bedingungen im Zytosol vorliegt und die Umwandlung von Pyruvat in Laktat bzw. die Rückreaktion katalysiert. Bei jeder Reaktion von Laktat zu Pyruvat wird ein Molekül NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Die LDH wird nicht sezerniert, weshalb eine Aktivität im Medium nur dann stattfinden kann, wenn die Zellmembran perforiert ist.

Beim LDH-Assay werden die Färbelösung mit dem gelben Tetrazoliumsalz und die beiden Substraten Laktat und NAD^+ zu dem abgenommenen Überstand hinzugefügt. Sollte sich in dem Überstand LDH befinden, so wird sie das Laktat zu Pyruvat umwandeln, wobei NADH/H^+ entsteht. Das NADH/H^+ wiederum gibt nun die beiden H^+ an das Tetrazoliumsalz ab, welches dadurch zu einem roten Formazan reagiert (Abb. 4.4.2). Die Stärke der Rotfärbung gibt also an, in welchem Maße die Reaktion der LDH im Medium stattgefunden hat und ist somit ein Marker für den Grad der Nekrose. Sie wird im Wallac Victor 1420 bei 490 nm und 590 nm Wellenlänge gemessen.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der jeweilige Messwert auf die dazugehörige high-control bezogen, nachdem zuvor von beiden Parametern der Wert der DMSO-Kontrolle abgezogen worden ist.

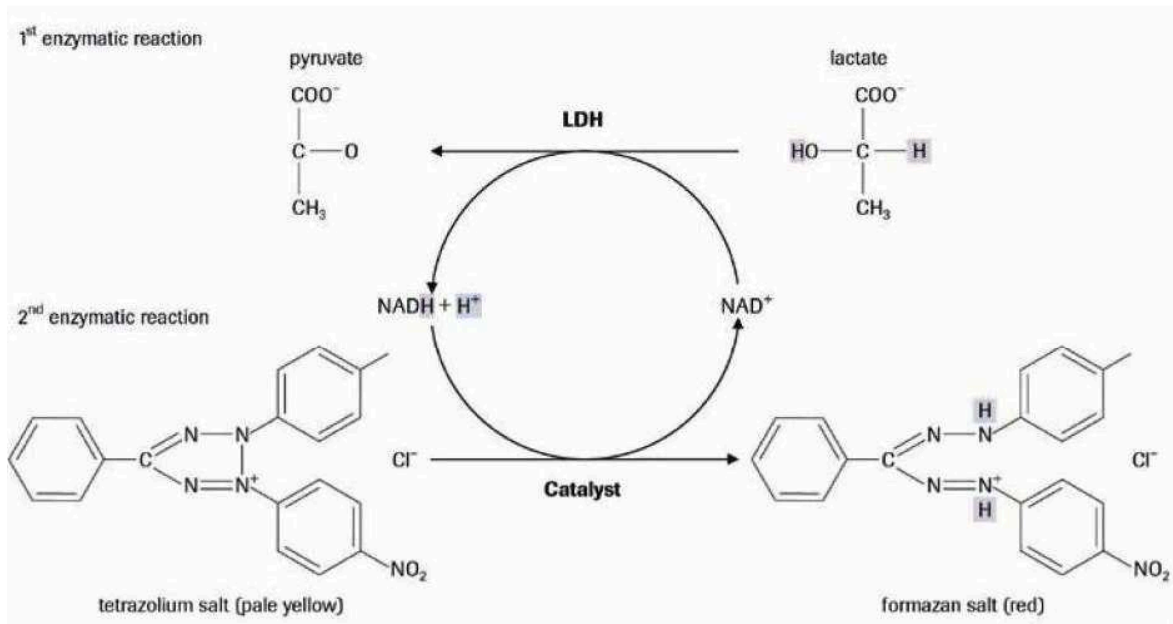


Abb. 4.4.2 Protonenübertragung beim LDH-Assay (Quelle: Roche, 2008)
 Permission for use from Roche Diagnostics, © 2008 Diagnostics GmbH

Durchführung:

In eine 96-Well Platte werden 10.000 Zellen/Well für H4IIE und 5.000 Zellen/Well für HCT116 in je 100 µl Medium ausgesät. Nach 24h im Brutschrank werden die Zellen mit den Substanzen für 24h inkubiert, wobei die Konzentrationen so eingestellt werden, dass jeweils 1µl hinzu pipettiert wird.

Vor der Messung wird zunächst zu den Leerkontrollen für die Bestimmung der High-control jeweils 5µl Lyselösung zugegeben und für 15 min. im Brutschrank inkubiert. Die High-control zeigt die maximale Farbreaktion, weil die gesamte LDH in dem entsprechenden Well aus den Zellen „befreit“ wurde.

Mit der Multikanal-Pipette werden 25µl des Mediums, bzw. des Zelllysates abgenommen und in eine neue 96-Well Platte überführt. Kurz vor Reaktionsbeginn wird die Reaktionslösung im folgenden Verhältnis angesetzt: 125 µl Katalysator / 5625 µl Färbelösung (Verhältnis 1 : 45).

Erst wenn die Platte im Wallac Victor 1420 steht werden jeweils 50µl der Reaktionslösung pro Well mit dem Stepper zugefügt und sofort die Messung bei 490nm und 590nm für 30 Minuten bei 37° C gestartet.

Da beim LDH-Assay nur mit dem Überstand der inkubierten Zellen gearbeitet wird, kann mit den Zellen selbst noch eine MTT-Reaktion durchgeführt werden. Nach Ersetzen des restlichen Mediums durch 100 µl der MTT-Färbelösung folgen die übrigen Schritte analog zur MTT-Reaktion in Kapitel 4.5.

4.5 Bestimmung des prooxidativen Potentials (DCF-Assay)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage andere Moleküle zu oxidieren. Diese Eigenschaft macht man sich beim DCF-Assay zunutze, bei dem durch ROS eine nicht-fluoreszierende Substanz (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein = H₂DCF) in eine fluoreszierende (Dichlorofluorescein = DCF) umgewandelt wird. Der Grund für die Fluoreszenz ist eine starke Erweiterung des π -Elektronensystems. Da das H₂DCF die Zellmembran praktisch nicht überwinden kann, wird das lipophile 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) eingesetzt. Im Inneren der Zelle wird durch Esterasen der Acetatrest abgespalten, sodass H₂DCF vorliegt (Abb. 4.5). Je höher die Konzentration an ROS innerhalb der Zelle ist, desto höher ist die im Wallac Victor 1420 gemessene Fluoreszenz.

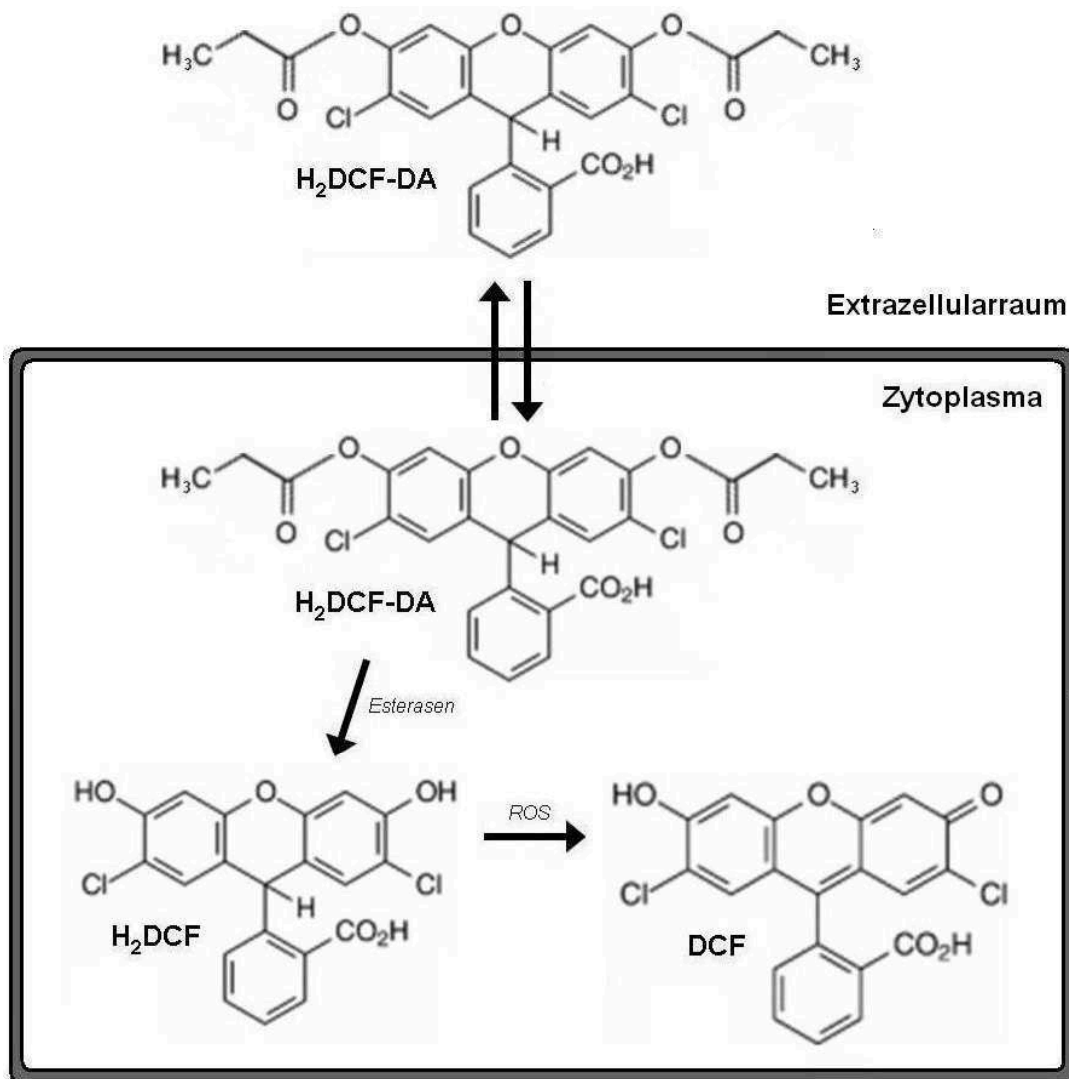


Abb. 4.5 Membranpassage und Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffes
(Abbildung modifiziert nach LeBel et al., 1992)

Durchführung:

In eine 96-Well Platte werden pro Well 50.000 Zellen in jeweils 100µl Medium ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Am Tag der Messung werden 15ml des farblosen und aufgewärmten Mediums mit 15 µl H₂DCF-DA (50 mM) unter Ausschluss von direktem Sonnenlicht gemischt. Anschließend wird das Medium von der Zellkulturplatte abgesaugt und durch 200 µl des H₂DCF-DA-Mediums pro Well ersetzt. Nach 30 Minuten im Brutschrank wird wiederum das Medium abgesaugt und durch 100 µl des einfachen farblosen Mediums wieder aufgefüllt. Es folgt die Inkubation mit den entsprechenden Substanzen und anschließender Messung im Wallac Victor 1420 für 2h bei folgenden Wellenlängen: Anregung ($\lambda = 475 \text{ nm}$), Emission ($\lambda = 535 \text{ nm}$).

4.6 Bestimmung der Nrf2-Aktivierung (Western Blot Analyse)

Beim Western Blot werden bestimmte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als allererstes werden dazu die aus den inkubierten Zellen gewonnenen Proben aufbereitet und die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt. Danach werden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern behandelt. Nach erfolgreicher Bindung des ersten Antikörpers folgt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, an dessen Fc-Teil eine Domäne gekoppelt ist, die unter Zufuhr der passenden Substrate eine Lumineszenz emittieren kann. Die Lumineszenz wird dann anschließend mit Hilfe von Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Durchführung:

Zunächst werden 0,5 Mio. HCT116-Zellen pro Well in 2 ml Medium ausgesät. Als Plattenformat dient hierbei die 6-Well Platte. Nach 24 h Anwachszeit im Brutschrank wird mit den Substanzen für den vorher festgelegten Zeitraum inkubiert. Zur Einsparung der Naturstoffe wurde im Vorfeld eine Volumenreduktion auf 1 ml pro Well vorgenommen. Anschließend beginnt die Isolierung und Fraktionierung der zellulären Proteine.

4.6.1 Isolierung und Fraktionierung von zytosolischen und nukleären Proteinen

Die Zellen werden mit einer Pipette von den Wells gespült und zentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wird mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert.

Zunächst werden die zytosolischen Proteine isoliert. Dazu werden die Zellen in 50 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min. auf Eis inkubiert. Nach endgültiger Lyse durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren folgt die Zugabe von je 25 µl Nonidet P40. Nach Vermischung durch Vortexen folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 1 min, 4°C). Der Überstand enthält die zytosolischen Proteine und wird in separaten Gefäßen bei -80°C eingefroren.

Die nukleären Proteine befinden sich in dem übrig gebliebenen Pellet und werden in Puffer B gelöst. Für die vollständige Resuspension sorgen kleine Rührstäbe (25min, 4°C). Nach Entfernen der Rührstäbe folgt eine erneute Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand enthält nun die nukleären Proteine und wird in separaten Gefäßen bei -80° C konserviert.

4.6.2 Proteinbestimmung

Mit Hilfe des Protein-Assays von Bio Rad wird der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Die Messung erfolgt in 96-Well Platten, wobei jeder Wert dreifach bestimmt wird. Als Referenz dient eine BSA-Eichgerade (0-5 µg), mit der die Werte der Proben nach Abzug des jeweiligen Puffers berechnet werden. Zunächst werden je 25 µl Working Reagent A¹(= 20 µl Reagent S + 1 ml Reagent A) in alle Wells vorgelegt und anschließend von den Standards und Proben je 5 µl zugeben. Zum Schluss pipettiert man mit dem Stepper je 200µl Reagent B hinzu und lässt die Platte für 15 min bei RT stehen. Es folgt die photometrische Messung bei 595 nm.

4.6.3 Gießen der Gele

Zwischen die beiden Glasplatten werden die Spacer eingelegt, mit Klammern befestigt und die Spalten zwischen den Spacern mit Agarose abgedichtet. Die nach Tabelle 4.6.3 hergestellte Trenngellösung wird in die Apparatur gegossen und mit Butanol ca. 1cm überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wird das Butanol abgegossen und mit dH₂O nachgespült.

Anschließend wird das Sammelgel nach Tabelle 4.6.3 pipettiert, auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingeschoben. Das Sammelgel polymerisiert ca. 30 min und kann nun verwendet oder feucht verpackt gelagert werden.

	Trenngel [10%]	Sammelgel [4,5%]
Acrylamid- Bisacrylamidlösung 30%	2 ml	0,6 ml
Trenn-/ Sammelgelpuffer	1,5 ml	2 ml
dH₂O	2,5 ml	1,388 ml
APS 10% [w/v]	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	4 µl

Tabelle 4.6.3 Zusammensetzung der Gele für die Proteinauftrennung

4.6.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine

Die Proben werden mit dH₂O und 4x SDS-Probenpuffer so zusammen pipettiert, dass die gewünschte Proteinmenge (35µg) entsteht und der SDS-Probenpuffer nur noch einfach konzentriert ist. Nachdem die Proben zur Denaturierung bei 95° C für 10 min inkubiert wurden, können sie bis zum Gelauftrag auf Eis gelagert werden. Die Elektrophorese-Apparatur wird mit einfachem SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Die angelegte Spannung beträgt maximal 150 V. Nach ca. zwei Stunden sind die Proteine hinreichend aufgetrennt.

4.6.5 Western-Blotting zum Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran

Innerhalb der Blotting-Apparatur werden die einzelnen Komponenten für den „semi-dry“-Blot in folgender Reihenfolge geschichtet:

1. Anode
2. 4 Whatman-Papiere (getränkt in Anodenpuffer)
3. PVDF-Membran (aktiviert in Methanol)
4. Gel
5. 4 Whatman-Papiere (getränkt in Kathodenpuffer)
6. Kathode

Anschließend wird der Deckel der Apparatur ausbalanciert und der Blot für 60 min bei 30 W, 200 mA und 300 V laufen gelassen.

4.6.6 Behandlung der Membran mit Antikörpern und Detektion des Signals

Nach dem Blot wird die Membran mit der Ponceau-Lösung gefärbt, um zu überprüfen ob der Proteintransfer erfolgreich gewesen ist. Ist das der Fall, so wird sie mit dH₂O wieder entfärbt und für 1 h bei RT in 5% Milchpulver in TBST unter Schütteln blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 4.6.6) auf Schüttelanlagen.

Erster Antikörper	Verdünnung	Dauer	Zweiter Antikörper	Verdünnung	Dauer	Waschschritte
Nrf2 Santa Cruz	1:1000 In 5 ml 5% Milchpulver	über Nacht (4° C)	Goat Anti-Rabbit	1:5000 in 25 ml 5% Milchpulver (RT)	1 h (RT)	2x 20 min vor und 2x 20 min nach 2 nd AK
Nrf2 Biomol	1:2000 in 10 ml 5% BSA/TBST	2 h (RT)	Goat Anti-Rabbit	1:1000 in 3 ml 5% Milchpulver	über Nacht (4° C)	3x 5 min vor und 2x 20 min nach 2 nd AK

Tabelle 4.6.6 Behandlung der PVDF-Membran mit Antikörpern

Nach dem letzten Waschschritt wird die Membran für die Lumineszenz-Messung im Fotolabor vorbereitet. Dazu werden die beiden Lösungen des Super Signal West Pico Trial Kit im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgt die Messung des Signals durch Belichtung der Röntgenfilme in einer Fotokassette für verschiedene Zeitintervalle. Zur Entwicklung wird der Film kurz in der Entwickler-Lösung geschwenkt, in Wasser gewaschen und anschließend in der Fixier-Lösung fixiert. Nachdem der Film getrocknet ist, kann er zur Dokumentation im Gel Doc 2000 digitalisiert und am PC mit Hilfe der Software Quantity One 4.1.1 (Bio Rad) densitometrisch ausgewertet werden. Auf der Membran können die Proteine anschließend noch durch die Comassie-Färbung sichtbar gemacht werden, um eine gleichmäßige Beladung der Membran zu bestätigen.

4.7 Bestimmung der ARE-Aktivierung (Luciferase-Assay)

Die Luciferase ist das Enzym, welches für die Entstehung des leuchtenden Farbstoffes der Glühwürmchen verantwortlich ist. Die Substrate für diese Reaktion sind Luciferin und ATP. Beim Luciferase-Assay wird ein Plasmid, in dem das Gen für dieses Enzym hinter der Region des ARE eingesetzt wurde, in die zu untersuchenden Zellen transferiert (= Transfektion). Jedes Mal, wenn in der Zelle ein Enzym mit ARE im Promotorbereich synthetisiert wird, wird

automatisch auch ein Luciferase-Enzym mit dem Plasmid als Matrize synthetisiert. Die Menge der Enzyme wird anschließend durch Messung der Lumineszenz im Wallac Victor 1420 mit Hilfe des Dispensers gemessen.

Durchführung:

Zunächst werden in eine 24-Well Platte pro Well 200.000 Zellen in je 1 ml Transfektionsmedium ausgesät und für 24h anwachsen gelassen.

4.7.1 Herstellung des Transfektionsmediums

Die ARE-Plasmidlösung und das Jet Pei werden in einem separaten Eppendorf-Cup mit der entsprechenden NaCl-Menge (150mM) gevortext (Tabelle 4.7.1). Beide Mischungen müssen nun in einem Gefäß zusammengebracht werden, wobei das Jet Pei **auf** die ARE-DNA gegeben werden muss. Nach erneutem Vortexen bildet sich der Transfektionskomplex nach 30 Minuten bei RT. Das Gemisch wird nun zu der Zellsuspension (4,8 Mio Zellen / 20ml) gegeben und erneut kurz gevortext. Nun können die Zellen ausgesät werden.

	pro Well	24-Well
ARE-DNA	1µl + 82,3 µl NaCl	24µl + 1976 µl NaCl
Jet Pei	2µl + 81,3 µl NaCl	48µl + 1952 µl NaCl
Zellen	200.000 / 833 µl Medium	4.8 Mio / 20 ml Medium

Tabelle 4.7.1 Zusammensetzung der Transfektionslösung

4.7.2 Herstellung der ARE-Plasmid-Lösung

Von der entsprechenden Stamm-Bakterienlösung werden 10 µl auf 100ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben gegeben. Zur Unterdrückung von Begleitflora werden 200 µl einer Ampicillin-Lösung (50 µg/µl) zugefügt, sodass sich ml im LB-Medium eine Konzentration von 100 µg/ml befindet. Über Nacht werden die Bakterien unter Schwenken (60 rpm) bei 37°C kultiviert. Die DNA-Isolierung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers Quiagen. Anschließend wird die DNA in DEPC-H₂O gelöst.

Zur Quantifizierung der DNA-Menge wird ein Teil der Lösung um den Faktor 50 verdünnt. Die Absorption dieser verdünnten Lösung wird im Perkin Elmer Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Mit

Hilfe der im Folgenden aufgeführten Formel kann der DNA-Gehalt der Probe berechnet werden:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor DNA (50)} \times 1/1000$$

Anschließend erfolgt die Einstellung der DNA-Lösung auf die gewünschte Konzentration.

Durchführung (Fortsetzung):

Nun können die Zellen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert werden. Nach der Inkubationsdauer wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Zur Lyse der Zellen werden jeweils 400 μl des zuvor 1:5 verdünnten Reporter-Lysis Buffer (RLB) zu jedem Well gegeben und für mindestens 15 Minuten auf den Rüttler gestellt. Das Lysat wird in Eppendorf Cups überführt und zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, 4°C). Jeweils 20 μl des Überstandes werden zusammen mit je 100 μl der Luciferin Lösung in ein schwarzes 96-Well pipettiert. Im Wallac Victor 1420 werden mit Hilfe des Dispensers 100 μl ATP-Substrat/Well kurz vor der Messung automatisch hinzugefügt.

Mit dem Überstand der eingesetzten Proben wird zusätzlich eine Proteinbestimmung (analog Kapitel 4.6.2) für jedes Well durchgeführt.

4.8 Bestimmung der Hänoxigenase-1- Induktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um ein Enzym, welches von verschiedenen Viren verwendet wird. Nach Infiltration der Wirtszelle schreibt das Virus mit Hilfe der reversen Transkriptase sein RNA-Genom in DNA um und integriert es in das Wirtszellgenom.

Im Rahmen der RT-PCR wird die messenger-RNA eines bestimmten Proteins zunächst in DNA „zurück übersetzt“ (RT). Mit der neu entstandenen DNA-Matrize (cDNA) wird anschließend eine sog. Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, erstmalig entdeckt bei *Thermophilus aquaticus*), den Primern für die Zielgene und einem Überschuss an Desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphaten

(dNTPs) kann nun unter den richtigen Temperaturbedingungen eine Vielzahl von Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize stromabwärts der Erkennungsstelle der Primer hergestellt werden. In einem 1,5 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) werden die DNA-Stücke elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und im Gel Doc 2000 unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Zahl der mRNA-Moleküle entspricht im Prinzip der Anzahl der gerade entstehenden Enzyme. Je mehr mRNA-Moleküle nach der Inkubation im Reaktionsansatz sind, desto deutlicher ist letztendlich die Intensität der Banden im Agarose-Gel. Die Intensität der Banden gibt also Aufschluss auf die Generierung von mRNA für die Synthese eines bestimmten Proteins.

Durchführung:

In eine 6-Well Platte werden pro Well 0,5 Mio. Zellen in je 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 h Anwachsungszeit werden die Zellen nach vorheriger Volumenreduktion mit den entsprechenden Substanzen inkubiert.

4.8.1 RNA-Isolierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen von dem Wells gespült und in Eppendorf Cups zentrifugiert (2.000 rpm, 10 min, 4°C). Die Zentrifugation wird nach einer Waschung mit 1 ml PBS-Puffer wiederholt. Anschließend wird das Pellet mit Hilfe einer Insulinspritze mit Subkutannadel in 800 µl Trizol resuspendiert, mit 300 µl Chloroform gemischt und gevortext. Nach 2-3 min Inkubation bei RT werden die Proben erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 15min, 4°C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit je 600 µl Isopropanol bei RT für 10 min inkubiert. Der letzte Zentrifugationsschritt wird wiederholt und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wird mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wird erneut verworfen. Nach ca. 10 min ist der restliche Alkohol weitestgehend abgedampft und das Pellet kann in DEPC-H₂O aufgenommen werden.

4.8.2 RNA-Quantifizierung

Analog zur Quantifizierung der DNA-Menge wird ein Teil der Lösung verdünnt, hierbei jedoch um den Faktor 100. Die Absorption wird ebenfalls im Perkin

Elmer Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Der RNA-Gehalt kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor RNA (40)} \times 1/1000$$

Anschließend wird die RNA-Lösung auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

4.8.3 reverse Transkription (RT)

Für die folgenden Versuchsteile wird das RT-PCR-Kit von Promega benutzt. Der Reaktionsansatz für jede einzelne Probe setzt sich zusammen wie in Tabelle 4.8.3 dargestellt. Zur Steigerung der Pipettiergenauigkeit wurde ein sog. „Master-Mix“ für alle Proben angesetzt, damit keine Volumina unter 1 μl pipettiert werden mussten.

Probe (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5x Puffer	dNTPs (10mM)	Oligo-dT Primer (50 μM)	RNasin [®] Inhibitor (40 U)	Reverse Transkriptase (200 U)	dH ₂ O	Summe
2 μl (2 μg)	5 μl (1x)	1,25 μl (0,5 mM)	1 μl (2 μM)	1 μl (1,6 U)	1 μl (8 U)	13,75 μl	25 μl

Tabelle 4.8.3 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription

Im Thermocycler wurden die Proben für 5 min bei 20° C akklimatisiert. Während der Reaktionszeit von 1 h herrscht eine Temperatur von 42° C. Danach wird die reverse Transkriptase bei 95°C denaturiert und die Reaktion somit gestoppt. Schließlich kühlt der Block auf 4°C zur Konservierung der Proben runter.

4.8.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Analog zur reversen Transkription wird auch bei der PCR „Master-Mix“ für alle Proben angesetzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.8.4 dargestellt.

Probe (x)	5x Puffer	MgCl ₂ (25mM)	dNTPs (10 μM)	3'Primer (10 μM)	5'Primer (10 μM)	Go-Taq	dH ₂ O	Summe
2 μl	5 μl (1x)	3 μl (3 mM)	0,5 μl (0,2 mM)	0,5 μl (0,2 mM)	0,5 μl (0,2 mM)	0,25 μl	13,75 μl	25 μl

Tabelle 4.8.4 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Neben den Primern für die HO-1 wird für jede Probe auch ein Ansatz mit GAP-DH Primern angesetzt. Bei der GAP-DH handelt es sich um die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, einem Enzym, welches bei Abbau von Glukose eine entscheidende Rolle spielt. Da es nicht induzierbar ist, wird es als sog. housekeeping-gene als Referenz verwendet.

Folgende Zyklen laufen im Thermocycler während der PCR ab, wobei die Schritte 2, 3 und 4 im Rahmen einer Schleife 32 Mal in dieser Reihenfolge wiederholt werden, bevor es mit Schritt 5 weitergeht:

1. 95°C für 5 min.
2. 95°C für 1 min.
3. 62°C für 1 min.
4. 72°C für 50 sek.
5. 72°C für 5 min.

Schließlich werden je 3 µl der GAP-DH Proben und je 5 µl der HO-1 Proben auf das Gel (1,5% Agarose, 100 µl 50 mM EtBr) aufgetragen und die Gelelektrophorese gestartet. Sie läuft für ca. 1 h bei maximal 80 mA. Im Gel Doc 2000 (Bio Rad) werden unter UV-Licht die Banden sichtbar gemacht und abfotografiert. Mit Hilfe des Software-Programms Quantity One 4.1.1 (Bio Rad) erfolgt die densitometrische Auswertung.

Die RT-PCR wurde arbeitsgruppenintern von Anja Bergermann durchgeführt.

4.9 Aktivierung/Inhibierung des NFκB Signalweges (SEAP-Assay)

NFκB ist ein Kernfaktor, dessen Aktivität immunologische Prozesse beeinflusst und außerdem eine Apoptose verhindern kann. Seine Untersuchung erfolgt mit Hilfe des sog. SEAP-Assays, bei dem eine konstant transfizierte H4IIE-Zelllinie (H4IIE-SEAP) verwendet wird. Die Besonderheit der Zellen besteht darin, dass sie ein Plasmid enthalten, bei dem sich hinter der NFκB-Bindungsstelle das Gen für die sog. sezernierte embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) befindet. Das hat zur Folge, dass bei jeder NFκB-Aktivierung im Idealfall auch immer ein SEAP-Molekül synthetisiert wird. Da sich das Enzym nicht in den

Zellen anreichert, sondern ins Medium sezerniert wird, reicht für die Messung der Aktivität der Überstand aus. Dazu wird ein Substrat zugefügt, das durch Reaktion mit der SEAP eine Lumineszenz generiert, die im Wallac Victor 1420 gemessen werden kann. Je stärker die Aktivierung des NF κ B Signalweges, desto stärker ist auch die detektierte Lumineszenz.

Um eine Inhibierung des NF κ B Signalweges untersuchen zu können, wird er nach Vorinkubation mit den entsprechenden Substanzen durch den klassischen Induktor TNF- α aktiviert. Die dadurch hervorgerufene 3-4 fache Erhöhung der Lumineszenz in der Kontrolle findet nun im Idealfall in den Proben mit den Substanzen nur im abgeschwächten Maße oder gar nicht statt.

Durchführung:

In eine 24-Well Platte werden pro Well 200.000 H4IIE-SEAP-Zellen in jeweils 500 μ l Medium ausgesät. Nach 24 h Anwachsungszeit wird das Medium gewechselt und die Zellen dem Inkubationsschema folgend für 1 h mit den entsprechenden Substanzen vorinkubiert. Anschließend werden die vorgesehenen Wells mit 4 ng/ml TNF- α für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird ein Teil des konditionierten Mediums abgenommen und im Verhältnis 1:4 mit Dilutionspuffer für den eigentlichen SEAP-Assay verdünnt (30 μ l konditioniertes Medium + 90 μ l Dilutionspuffer). Nach 30 minütiger Hitzeinaktivierung bei 65°C werden 30 μ l des verdünnten konditionierten Mediums mit 30 μ l SEAP-Assaypuffer gemischt und für 5 min bei RT in Eppendorf Cups inkubiert. Unter lichtgeschützten Bedingungen werden nun 30 μ l des SEAP-Substrats hinzugefügt und nach 15 min zur Messung in eine schwarze 96-Well Platte überführt. Die Messung findet schlussendlich im Wallac Victor 1420 statt.

Mit den übrigen Zellen am Boden der Platte wird eine MTT-Reaktion nach Kapitel 4.5 durchgeführt, um eine Abnahme des SEAP-Signals durch zytotoxische Effekte rausrechnen zu können.

5. Rohdaten

5.1 Untersuchung von Zytotoxizität und Art des Zelltodes

Tabelle 5.1.1 Daten zu Abb. 2.1.1.1 a-c

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), sowie Avarol, 4'-Methylaminoavaron = AH-24 und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (alle c) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Avaron

Messung	0 µM	1 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,526				0,173	0,063	0,043
2	0,573				0,092	0,068	0,047
3	0,553			0,373	0,162	0,116	
4	0,752	0,762	0,653	0,428	0,159	0,054	0,054
5	0,692	0,639	0,392	0,222	0,058	0,027	0,027
6	0,864	0,776	0,618	0,457	0,202	0,038	0,020

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

Messung	0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,760			0,347	0,068	0,008
2	0,635			0,226	0,047	0,019
3	0,785		0,475	0,374	0,077	
4	0,702	0,502	0,340	0,278	0,041	0,017
5	0,870	0,764	0,529	0,424	0,111	0,032
6	0,833	0,710	0,605	0,540	0,130	0,083
7	0,944	0,757	0,732	0,481	0,081	0,038

c) Avarol, 4'-Methylaminoavaron (AH-24) und N-Methylmelemeleone A (AH-25)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
Avarol				
1	0,577	0,509	0,361	0,101
2	0,579	0,523	0,293	0,118
3	0,591	0,482	0,308	0,158
4	0,658	0,705	0,466	0,164
AH-24				
1	0,601	0,551	0,467	0,353
2	0,591	0,568	0,474	0,352
3	0,599	0,570	0,438	0,300
AH-25				
1	0,580	0,534	0,431	0,251
2	0,583	0,537	0,419	0,189
3	0,565	0,603	0,480	0,264

Rohdaten

Tabelle 5.1.2 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (5.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmeleleone A = AH-25 (e) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Avaron

Messung	0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM
1	0,484	0,407	0,286	0,094	0,030
2	0,186	0,128	0,071	0,033	0,029
3	0,367	0,221	0,123	0,049	0,017
4	0,345	0,238	0,110	0,028	0,021

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

Messung	0 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,220	0,162	0,099	0,075	0,017
2	0,174	0,113	0,108	0,041	0,017
3	0,117	0,109	0,084	0,025	0,016
4	0,353	0,171	0,086	0,036	0,025

c) Avarol

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,596	0,490	0,320	0,141
2	0,167	0,195	0,124	0,079
3	0,308	0,244	0,132	0,124
4	0,418	0,283	0,188	0,068

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,534	0,455	0,393	0,210
2	0,187	0,184	0,178	0,187
3	0,329	0,325	0,229	0,203
4	0,333	0,265	0,234	0,176

e) N-Methylmeleleone A (AH-25)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,378	0,371	0,269	0,085
2	0,198	0,165	0,172	0,106
3	0,243	0,201	0,167	0,085
4	0,315	0,267	0,188	0,087

Rohdaten

Tabelle 5.1.3 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Manzacidin A = AH-1 (a), 3'-Bromomanzacidin D = AH-2 (b), Agelongine = AH-5 (c), Dibromophakelline = AH-7 (d), Aldisine = AH-8 (e), 2'-Bromoaldisine = AH-9 (f) und 4'-Bromopyrrole-2'-Carbamide = AH-10 (g) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Manzacidin A (AH-1)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,806	0,737	0,710	0,654
2	0,641	0,614	0,595	0,587
3	0,741	0,744	0,684	0,592

b) 3'-Bromomanzacidin D (AH-2)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,709	0,674	0,699	0,673
2	0,599	0,627	0,620	0,594
3	0,714	0,732	0,702	0,663

c) Agelongine (AH-5)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,558	0,613	0,571	0,506
2	0,518	0,600	0,606	0,570
3	0,578	0,652	0,625	0,520

d) Dibromophakelline (AH-7)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,570	0,540	0,561	0,553
2	0,586	0,541	0,579	0,579
3	0,567	0,578	0,532	0,630

e) Aldisine (AH-8)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,544	0,520	0,517	0,482
2	0,558	0,576	0,529	0,472
3	0,561	0,565	0,533	0,479

f) 2'-Bromoaldisine (AH-9)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,481	0,483	0,541	0,453
2	0,534	0,542	0,545	0,520
3	0,561	0,583	0,562	0,578

g) 4'-Bromopyrrole-2'-Carbamide (AH-10)

Messung	0 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1	0,616	0,589	0,634	0,542
2	0,562	0,549	0,547	0,569
3	0,624	0,582	0,645	0,644

Rohdaten

Tabelle 5.1.4 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carbamide = AH-11 (a), Clathramides C = AH-13 (b), Ageliferin = AH-18 (c), Hymenialdisine = AH-19 (d), 3'-Bromohymenialdisine = AH-20 (e), Axinohydantion = AH-21 (f) und Zonarol/Avarol = AH-22 (g) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carbamide (AH-11)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,574	0,571	0,551	0,524
2	0,537	0,571	0,573	0,499
3	0,627	0,623	0,671	0,553

b) Clathramides C (AH-13)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,637	0,631	0,637	0,612
2	0,597	0,572	0,601	0,536
3	0,705	0,652	0,627	0,642

c) Ageliferin (AH-18)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,812	0,807	0,484	0,354
2	0,650	0,623	0,452	0,320
3	0,806	0,773	0,478	0,414

d) Hymenialdisine (AH-19)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,695	0,595	0,379	0,362
2	0,601	0,431	0,300	0,266
3	0,667	0,540	0,371	0,329

e) 3'-Bromohymenialdisine (AH-20)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,752	0,688	0,551	0,552
2	0,607	0,618	0,477	0,450
3	0,754	0,658	0,533	0,545

f) Axinohydantion (AH-21)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,710	0,657	0,596	0,453
2	0,574	0,552	0,502	0,372
3	0,692	0,691	0,625	0,449

g) Zonarol/Avarol (AH-22)

Messung	0 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,574		0,475	0,351	0,135
2	0,569		0,459	0,318	0,093
3	0,600	0,609	0,506	0,364	
4	0,608	0,579	0,526	0,328	0,055
5	0,820	0,789	0,745	0,432	0,109

Tabelle 5.1.5 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Longamide B = AH-26 (a), 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxamide = AH-30 (b), 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxylsäure = AH-31 (c), 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Methylcarboxylat = AH-32 (d) und 2'-Debromostevensine = AH-33 (e) und als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Longamide B (AH-26)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,541	0,566	0,560	0,535
2	0,589	0,612	0,566	0,591
3	0,575	0,596	0,608	0,542

b) 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxamide (AH-30)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,787	0,752	0,747	0,673
2	0,646	0,611	0,628	0,622
3	0,768	0,743	0,739	0,711

c) 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Carboxylsäure (AH-31)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,763	0,742	0,857	0,659
2	0,623	0,650	0,605	0,295
3	0,726	0,769	0,735	0,650

d) 3'-4'-Dibromopyrrole-2'-Methylcarboxylat (AH-32)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,799	0,810	0,852	0,800
2	0,686	0,682	0,622	0,613
3	0,814	0,783	0,778	0,740

e) 2'-Debromostevensine (AH-33)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,768	0,827	0,740	0,796
2	0,631	0,664	0,656	0,669
3	0,550	0,812	0,831	0,820

Rohdaten

Tabelle 5.1.6 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Methyl- 3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxylate = SE-1 (a), 4,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide = SE-2 (b), 3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide = SE-3 (c) und 4,5-Dibromo-N-((Z)-3-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-Ylidene-Propyl)-1H-Pyrrole-2-Carboxamide = SE-4 (d) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Methyl-3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxylate (SE-1)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,142	0,114	0,073	0,054
2	0,452	0,354	0,292	0,310
3	0,199	0,189	0,130	0,081
4	0,345	0,306	0,300	0,269
5	0,402	0,367	0,328	0,309
6	0,501	0,489	0,486	0,475
7	0,373	0,347	0,326	0,260

b) 4,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide (SE-2)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,120	0,073	0,091	0,053
2	0,298	0,323	0,334	0,301
3	0,340	0,321	0,319	0,242
4	0,547	0,532	0,465	0,400
5	0,347	0,352	0,321	0,225

c) 3,4-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide (SE-3)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,208	0,140	0,087	0,048
2	0,397	0,417	0,280	0,082
3	0,219	0,192	0,113	0,094
4	0,337	0,347	0,272	0,274
5	0,411	0,319	0,276	0,263
6	0,462	0,421	0,387	0,223
7	0,363	0,332	0,314	0,291

d) 4,5-Dibromo-N-((Z)-3-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-Ylidene)-Propyl)-1H-Pyrrole-2-Carboxamide (SE-4)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,156	0,103	0,078	0,053
2	0,323	0,319	0,324	0,255
3	0,290	0,308	0,255	0,241
4	0,486	0,497	0,499	0,447
5	0,350	0,363	0,334	0,317

Tabelle 5.1.7 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Zytotoxizität in HCT116-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit 3,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide = SE-6 (a), Longamide B = SE-7 (b) und Luteolin-3'-O-Glucouronide = SE-10 (c) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) 3,5-Dibromo-1H-Pyrrole-2-Carboxamide (SE-6)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,213	0,233	0,156	0,168
2	0,337	0,351	0,314	0,306
3	0,445	0,466	0,522	0,524
4	0,595	0,631	0,383	0,490
5	0,440	0,426	0,445	0,405

b) Longamide B (SE-7)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,223	0,238	0,225	0,202
2	0,319	0,331	0,329	0,329
3	0,484	0,479	0,438	0,439
4	0,597	0,615	0,313	0,434
5	0,399	0,459	0,457	0,377

c) Luteolin-3'-O-Glucouronide (SE-10)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,153	0,229	0,212	0,183
2	0,474	0,461	0,466	0,436
3	0,603	0,571	0,348	0,440
4	0,453	0,438	0,430	0,392

Rohdaten

Tabelle 5.1.8 Daten zu Abb. 2.1.1.2 a-e

Zytotoxizität in H4IIE-Zellen (10.000 Zellen/Well) nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

a) Avaron

Messung	0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,294			0,098	0,035	0,020
2	0,255	0,230	0,104	0,045	0,042	
3	0,353	0,346	0,246	0,133	0,052	
4	0,312	0,314	0,165	0,099	0,065	

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,316	0,236	0,159	0,017
2	0,209	0,182	0,061	0,021
3	0,194	0,188	0,092	0,049
4	0,158	0,149	0,115	0,009

c) Avarol

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,341	0,351	0,254	0,114
2	0,253	0,235	0,149	0,056
3	0,345	0,318	0,255	0,172
4	0,360	0,356	0,237	0,192

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,290	0,254	0,206	0,096
2	0,256	0,263	0,206	0,079
3	0,346	0,305	0,210	0,049
4	0,232	0,216	0,227	0,090

e) N-Methylmelemeleone A (AH-25)

Messung	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,259	0,272	0,314	0,231
2	0,204	0,243	0,214	0,133
3	0,216	0,220	0,206	0,154
4	0,154	0,182	0,172	0,119

Rohdaten

Tabelle 5.1.9 Daten zu Abb. 2.1.2 a-c; AH-24 und AH-25 sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Caspase 3/7 Aktivität [rfu] in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e).

a) Avaron

Messung	DMSO	5µM	10µM	25µM
1	50530	40702	76326	119744
2	164439	165260	202878	287176
3	157440	160669	190374	249348
4	302110	277076	298327	363378
5	304204	222271	373326	
6	197574	142464	189838	
7	185597	125081	70787	

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	304204	367244	351034
2	197574	113893	315625
3	185597	278009	327482

c) Avarol

Messung	DMSO	5µM	10µM	25µM
1	41428	32843	41379	37892
2	161597	142489	169495	169836
3	170387	182655	163338	166393
4	276142	232984	312711	232477
5	304204		203589	226235
6	197574		111778	142416
7	185597		99094	66916

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	304204	193614	196166
2	197574	105412	134859
3	185597	153770	149039

e) N-Methylmelemeleone A (AH-25)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	304204	289229	234301
2	197574	159866	109009
3	185597	202657	62270

Tabelle 5.1.10 Daten sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Caspase 3/7 Aktivität [rfu] in H4IIE-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e).

a) Avaron

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	24981	31793	29266
2	76128	7230	57100
3	68422	18349	66118

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	24981	28796	25237
2	76128	52981	89138
3	68422	30478	40084

c) Avarol

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	24981	16616	15880
2	76128	69178	63074
3	68422	83699	76823

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	24981	27974	30337
2	76128	53452	94403
3	68422	60686	53429

e) N-Methylmelemeleone A (AH-25)

Messung	DMSO	10µM	25µM
1	24981	18651	36725
2	76128	53842	53926
3	68422	19808	26808

Rohdaten

Tabelle 5.1.11 Daten zu Abb. 2.1.3.1 a-c; AH-24 und AH-25 sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

LDH-Aktivität und MTT-Messung in HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a) und 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

Berechnung der Diagrammwerte: LDH-Wert = (Messwert - DMSO)/(High Ctrl - DMSO)*100

a) Avaron

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,164	0,549	1,010	0,484	0,030
2	0,261	0,599	1,177	0,186	0,029
3	0,225	0,426	0,970	0,367	0,017
4	0,160	0,332	0,744	0,345	0,021

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,184	0,293	1,010	0,220	0,075
2	0,261	0,370	1,177	0,174	0,041
3	0,225	0,349	0,970	0,117	0,025
4	0,160	0,242	0,744	0,353	0,036

c) Avarol

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,206	0,270	1,010	0,596	0,320
2	0,261	0,332	1,177	0,167	0,124
3	0,225	0,263	0,970	0,308	0,132
4	0,160	0,179	0,744	0,418	0,188

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,188	0,201	1,010	0,534	0,393
2	0,261	0,273	1,177	0,187	0,178
3	0,225	0,263	0,970	0,329	0,229
4	0,160	0,173	0,744	0,333	0,234

e) N-Methylmelemeleone A (AH-25)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,190	0,241	1,010	0,378	0,269
2	0,261	0,285	1,177	0,198	0,172
3	0,225	0,234	0,970	0,243	0,167
4	0,160	0,196	0,744	0,315	0,188

Rohdaten

Tabelle 5.1.12 Daten zu Abb. 2.1.3.2 a-c; AH-24 und AH-25 sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

LDH-Aktivität und MTT-Messung in H4IIE-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avaron (a) und 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmelemeleone A = AH-25 (e) als Absorption bei 560 nm Wellenlänge.

Berechnung der Diagrammwerte: LDH-Wert = (Messwert - DMSO)/(High Ctrl - DMSO)*100

a) Avaron

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,140	0,290	0,689	0,465	0,225
2	0,131	0,272	0,639	0,240	0,057
3	0,107	0,222	0,439	0,297	0,051

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,140	0,142	0,689	0,328	0,216
2	0,131	0,135	0,639	0,213	0,105
3	0,107	0,111	0,439	0,220	0,145

c) Avarol

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,140	0,169	0,689	0,539	0,538
2	0,131	0,154	0,639	0,289	0,283
3	0,107	0,121	0,439	0,259	0,216

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,140	0,127	0,689	0,538	0,408
2	0,131	0,135	0,639	0,281	0,192
3	0,107	0,104	0,439	0,220	0,145

e) N-Methylmelemeleone A (AH-25)

LDH				MTT	
Messung	DMSO	25 µM	High Ctrl	DMSO	25 µM
1	0,140	0,126	0,689	0,391	0,430
2	0,131	0,130	0,639	0,255	0,246
3	0,107	0,116	0,439	0,303	0,251

5.2 Untersuchung der Beeinflussung des Nrf2 Signalweges

Tabelle 5.2.1 Daten zu Abb. 2.2.1 a-c; AH-24 und AH-25 sind im Ergebnisteil graphisch nicht aufgeführt

Fluoreszenz im DCF-Assay [rfu] in HCT116-Zellen nach Inkubation mit Avaron (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b), Avarol (c), 4'-Methylaminoavaron = AH-24 (d) und N-Methylmeleleone A = AH-25 (e).

a) Avaron H₂O₂

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	76103	91653	157316	140992	126906		
2	113884	117270	148747	110330	114065		
3	41603	53449	103905	69253	72973		
4	71997	82291	126824	135330	164503	229848	263741
5	194912	161153	212696	319806	371192	387742	486692
6	71469	87237	128704	123933	170252	226822	286291

b) 3'-Methylaminoavaron (AH-27) H₂O₂

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	76103	90226	68892	140992	126906		
2	113884	106832	115289	110330	114065		
3	41603	39541	47352	69253	72973		
4	71997	75680	81377	135330	164503	229848	263741
5	194912	178138	196069	319806	371192	387742	486692
6	71469	82772	77004	123933	170252	226822	286291

c) Avarol H₂O₂

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	76103	87879	108065	140992	126906		
2	113884	79487	141783	110330	114065		
3	41603	38390	87349	69253	72973		
4	71997	65836	68217	135330	164503	229848	263741
5	194912	115179	125016	319806	371192	387742	486692
6	71469	58788	89034	123933	170252	226822	286291

d) 4'-Methylaminoavaron (AH-24) H₂O₂

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	76103	85265	80941	140992	126906		
2	113884	98853	95672	110330	114065		
3	41603	34833	37486	69253	72973		
4	71997	79903	72364	135330	164503	229848	263741
5	194912	176482	201632	319806	371192	387742	486692
6	71469	73222	74699	123933	170252	226822	286291

Rohdaten

e) N-Methylmeleleone A (AH-25) H₂O₂

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	76103	114671	79645	140992	126906		
2	113884	118715	86074	110330	114065		
3	41603	45469	57890	69253	72973		
4	71997	77925	77279	135330	164503	229848	263741
5	194912	172911	175676	319806	371192	387742	486692
6	71469	72929	80103	123933	170252	226822	286291

Tabelle 5.2.2 Daten zu Abb. 2.2.2.1

Densitometrische Auswertung des Western Blot mit dem Target Nrf2 in HCT116-Zellen nach Inkubation mit 50 µM tert-Butylhydrochinon (tBHQ) über verschiedene Zeiträume. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Rohdaten mit dem Faktor 10⁻³ multipliziert.

tert- Butylhydrochinon (50 µM)

Messung	0 h	0,5h	1h	3h	18h	24 h
1	113573680	451520883	488668243	557368006	434475965	269802994
2	96659091	693630682	773801136	587892045	322147727	301363636
3	157954545	852205387	1037702020	1043619529	757356902	420614478

Tabelle 5.2.3 Daten zu Abb. 2.2.2.2 a-b

Densitometrische Auswertung der Western Blots mit dem Target Nrf2 in HCT116-Zellen nach Inkubation mit Avaron-Derivaten in unterschiedlichen Konzentrationen über 3 h auf 2 Gelen (a und b). Die Rohdaten wurden mit dem Faktor 10⁻³ multipliziert.

a) Avarol und Avaron

Messung	DMSO	Avarol 50 µM	Avaron 10 µM
1	239306220	370442584	454132775
2	272802326	899686047	565005814
3	195974880	744312201	461734450

b) AH-24, AH-25 und AH-27

Messung	DMSO	AH-24 50 µM	AH-25 50 µM	AH-27 10 µM
1	187179487	529175824	587234432	402582418
2	168834688	532228997	984200542	438163957
3	28109756	317466125	557479675	385433604

Rohdaten

Tabelle 5.2.4 Daten zu Abb. 2.2.3.1

Luciferase-Assay zur Messung der ARE-Aktivierung in transfizierten HCT116-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an tBHQ über 4 h (a), 8 h (b) und 24 h (c). Die Daten sind bereits auf die spezifische Proteinmenge eingestellt.

4 h tBHQ

Messung	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM
1	79,64	18,17	114,99	67,92
2	13,52	10,24	14,50	14,15
3	10,23	16,03	20,15	14,84

8 h tBHQ

Messung	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM
1	62,18	163,86	198,22	160,06
2	15,03	43,95	26,69	53,05
3	14,20	17,45	23,94	45,42

24 h tBHQ

Messung	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM
1	96,19	140,83	736,98	1067,11
2	16,04	65,55	78,07	266,32
3	11,90	43,55	57,07	72,00

Tabelle 5.2.5 Daten zu Abb. 2.2.3.2

Luciferase-Assay zur Messung der ARE-Aktivierung in transfizierten HCT116-Zellen nach Inkubation über 24 h mit Avarol (a), Avaron (b), sowie 3'-Methylaminoavaron = AH-27, 4'-Methylaminoavaron = AH-24 und N-Methylmeleleone A = AH-25 (alle c). Die Daten sind bereits auf die spezifische Proteinmenge eingestellt.

a) Avarol

Messung	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM
1	10,01	18,92	17,19	37,89
2	12,78	22,05	22,26	22,95
3	15,51	24,02	25,96	48,11

b) Avaron

Messung	DMSO	2,5 µM	5 µM	10 µM
1	79,64			191,17
2	10,01	15,78	13,36	39,74
3	12,78	20,08	17,72	16,79
4	15,51	32,75	52,97	32,23

c) AH-27, AH-24 und AH-25

Messung	DMSO	AH-27 10 µM	AH-24 50 µM	AH-25 50 µM
1	10,01	23,50	15,87	26,34
2	12,78	36,56	23,40	27,55
3	15,51	52,75		
4	19,82		52,18	41,13

Rohdaten

Tabelle 5.2.6 Daten zu Abb. 2.2.4.1

Densitometrische Auswertung der RT-PCR zur Darstellung der HO-1 Expression in HCT116-Zellen nach Inkubation mit 50 µM tBHQ über 4 h, 8 h und 24 h.

Densitometrie RT-PCR tBHQ Kinetik

Messung	DMSO	tBHQ 4 h	DMSO	tBHQ 8 h	DMSO	tBHQ 24 h
1	0,273	0,773	0,275	0,897	0,444	0,883
2	0,163	0,255	0,119	0,311	0,088	0,268
3	0,214	0,499	0,059	0,306	0,198	0,421

Tab 5.2.7 Daten zu Abb. 2.2.4.2

Densitometrische Auswertung der RT-PCR zur Darstellung der HO-1 Expression in HCT116-Zellen nach Inkubation über 8 h mit den Avaron-Derivaten.

Densitometrie RT-PCR Avaron-Derivate

Messung	DMSO	AH-3 50 µM	AH-23 10 µM	AH-27 10 µM	AH-24 50 µM	AH-25 50 µM
1	0,494	0,637	0,245	0,821	0,321	0,898
2	0,120	0,685	0,420	0,713	0,437	0,748
3	0,528	0,938	0,565	0,975	0,535	1,007

5.3 Untersuchung der Beeinflussung des NFκB Signalweges

Tabelle 5.3.1 Daten zu Abb. 2.3.1

SEAP-Aktivität zur Darstellung der NFκB-Modulierung in H4IIE-Zellen nach Inkubation über 24 h mit den Avaron-Derivaten.

Berechnung der Diagrammwerte: SEAP (% der Kontrolle) / MTT (% der Kontrolle)

SEAP- Assay

SEAP- Messung	DMSO	AH-3 25 µM	AH-23 10 µM	AH-27 25 µM	AH-24 25 µM	AH-25 25 µM
1	3356	3602	2961		2948	3672
2	4485	4291	3817		4602	4808
3	2987	2799	2766		2884	3241
4	3356			1064		
5	4485			6284		
6	6872			4512		

MTT- Messung	DMSO	AH-3 25 µM	AH-23 10 µM	AH-27 25 µM	AH-24 25 µM	AH-25 25 µM
1	0,700	0,715	0,590		0,668	0,579
2	0,657	0,700	0,561		0,810	0,794
3	1,455	1,433	1,205		1,070	1,215
4	0,614			0,509		
5	0,949			0,779		
6	1,475			1,140		

Rohdaten

Tabelle 5.3.2 Daten zu Abb. 2.3.2 a-e

SEAP-Aktivität zur Darstellung der NFκB- Inhibierung in H4IIE-Zellen nach einstündiger Vorinkubation mit Avarol (a), 3'-Methylaminoavaron = AH-27 (b) und 4'-Methylaminoavaron (c) und anschließender TNF-α Inkubation über 24 h.

Berechnung der Diagrammwerte: SEAP (% der Kontrolle) / MTT (% der Kontrolle)

a) Avarol

SEAP-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	3356	11253	8332	8231	8558	7899
2	4485	14533	11232	10869	11232	10113
3	2987	10232	7779	7866	8555	5861
MTT-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	0,700	0,636	0,671	0,687	0,656	0,621
2	0,657	0,615	0,594	0,592	0,559	0,582
3	1,455	1,097	1,268	1,295	1,292	1,246

b) AH-27

SEAP-Messung	DMSO	- + TNF	1 µM + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	3356	10648		6292	5408	4803	3049
2	4485	15387		10166	9863	9581	7637
3	2987	9586	7231	5747	4944	4671	
4	5153	14077	11474				
5	6872	18510		12608	11709	12140	8653
MTT-Messung	DMSO	- + TNF	1 µM + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	0,614	0,667		0,569	0,533	0,543	0,467
2	0,949	0,948		0,841	0,767	0,789	0,651
3	1,185	1,005	0,968	1,075	0,987	0,930	
4	1,652	1,681	1,693				
5	1,475	1,365		1,422	1,418	1,322	1,139

c) AH-24

SEAP-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	3356	11253	8412	8597	8967	6227
2	4485	14533	11320	11331	11598	9977
3	2987	10232	8472	8775	7489	6491
MTT-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	0,700	0,636	0,616	0,607	0,629	0,622
2	0,657	0,615	0,630	0,655	0,721	0,827
3	1,455	1,097	0,923	1,007	1,015	0,950

Rohdaten

d) Avaron

SEAP-Messung	DMSO	- + TNF	1 µM + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF
1	3356	11253	8520	9622	7942	7783
2	4485	14533	10297	9989	9158	8920
3	2987	10232	8430	8604	7407	6700
4	6872	18510	15345	14548	16745	15044

MTT-Messung	DMSO	- + TNF	1 µM + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF
1	0,700	0,636	0,800	0,616	0,518	0,537
2	0,657	0,615	0,597	0,577	0,608	0,617
3	1,455	1,097	1,205	1,195	1,103	1,098
4	1,475	1,365	1,370	1,242	1,253	1,311

e) AH-25

SEAP-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	3356	11253	8659	8894	9947	7177
2	4485	14534	12528	11871	11871	12500
3	2987	10232	7876	8043	8612	8035
4	6872	18510	14678	14418	15629	20427

MTT-Messung	DMSO	- + TNF	2,5 µM + TNF	5 µM + TNF	10 µM + TNF	25 µM + TNF
1	0,700	0,636	0,639	0,610	0,582	0,576
2	0,657	0,615	0,614	0,593	0,628	0,648
3	1,455	1,097	1,037	1,092	1,161	1,096
4	1,475	1,365	1,409	1,361	1,314	1,334

6. Literaturverzeichnis

- Amigó M, Terencio MC, Mitova M, Iodice C, Payá M, De Rosa S (2004). Potential antipsoriatic avarol derivatives as antioxidants and inhibitors of PGE(2) generation and proliferation in the HaCaT cell line. J Nat Prod. 67(9): 1459-63
- Amigó M, Schalkwijk J, Olthuis D, De Rosa S, Payá M, Terencio MC, Lamme E (2006). Identification of avarol derivatives as potential antipsoriatic drugs using an in vitro model for kera-tinocyte growth and differentiation. Life Sci. 79(25): 2395-404
- Amigó M, Terencio MC, Payá M, Iodice C, De Rosa S (2007). Synthesis and evaluation of diverse thio avarol derivatives as potential UVB photoprotective candidates. Bioorg Med Chem Lett. 17(9): 2561-5
- Amigó M, Payá M, Braza-Boïls A, De Rosa S, Terencio MC (2008). Avarol inhibits TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in human cells and in animal models. Life Sci. 82(5-6): 256-64
- Batke E, Ogura R, Vaupel P, Hummel K, Kallinowski F, Gasić MJ, Schröder HC, Müller WE (1988). Action of the antileukemic and anti-HTLV-III (anti-HIV) agent avarol on the levels of superoxide dismutases and glutathione peroxidase activities in L5178y mouse lymphoma cells. Cell Biochem Funct. 6(2): 123-9
- Belisario MA, Maturo M, Avagnale G, De Rosa S, Scopacasa F, De Caterina M (1996). In vitro effect of avarone and avarol, a quinone/hydroquinone couple of marine origin, on platelet aggregation. Pharmacol Toxicol. 79(6): 300-4
- Bozić T, Novaković I, Gasić MJ, Juranić Z, Stanojković T, Tufegdžić S, Kljajić Z, Sladić D (2010). Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone. Eur J Med Chem. 45(3): 923-9
- Carethers JM (2008). Systemic treatment of advanced colorectal cancer: tailoring therapy to the tumor. Therap Adv Gastroenterol. 1(1):33-42
- Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM (1994). The respiratory burst oxidase. J Biol Chem. 269(40):24519-22
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(18): 11908-13
- Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL (1998). Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. J Biol Chem. 273(15): 8922-31
- Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4):495-516
- Elsayed SSE (2010). Isolierung und Strukturaufklärung von bioaktiven Sekundärmetaboliten aus marinen Organismen. Dissertation aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Foo SY, Nolan GP (1999). NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. Trends Genet. 15(6): 229-35
- Garg AK, Aggarwal BB (2002). Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. Mol Immunol. 39(9): 509-17

Literaturverzeichnis

- Genova-Kalou P, Dundarova D, Idakieva K, Mohammed A, Dundarov S, Argirova R (2008). Anti-herpes effect of hemocyanin derived from the mollusk *Rapana thomasiana*. Z Naturforsch C. 63(5-6): 429-34
- Hamed ANE (2009). Cytotoxic constituents from some marine organisms. Thesis at the Faculty of Pharmacy, Minia University, Egypt
- He X, Chen MG, Ma Q (2008). Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. Chem Res Toxicol. 21(7): 1375-83
- Hunt RC, Handy I, Smith A (1996). Heme-mediated reactive oxygen species toxicity to retinal pigment epithelial cells is reduced by hemopexin. J Cell Physiol. 168(1): 81-6
- Keyse SM, Tyrrell RM (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. Proc Natl Acad Sci U S A. 86(1): 99-103
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol. 5(2): 227-31
- Lipp HP, Bokemeyer C (2005). Wirksamkeit und Toxizität der Taxane. Pharm Unserer Zeit. 34(2): 128-37
- Loya S, Hizi A (1990). The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives. FEBS Lett. 269(1): 131-4
- Minale L, Riccio R, Sodano G (1974). Avarol a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *dysidea avara*. Tetrahedron Lett. 15(38): 3401-4
- Mohamed-Ali H, Scholz P, Merker HJ (1993). Inhibition of the effects of rheumatoid synovial fluid cells on chondrogenesis and cartilage breakdown in vitro: possible therapeutical conclusions. A morphological--biochemical study. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 64(1): 45-56
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP (2009). Drug development from marine natural products. Nat Rev Drug Discov. 8(1): 69-85
- Müller WE, Maidhof A, Zahn RK, Schröder HC, Gasić MJ, Heidemann D, Bernd A, Kurelec B, Eich E, Seibert G (1985 a). Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. Cancer Res. 45(10): 4822-6
- Müller WE, Zahn RK, Gasić MJ, Dogović N, Maidhof A, Becker C, Diehl-Seifert B, Eich E (1985 b). Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. Comp Biochem Physiol C. 80(1): 47-52
- Müller WE, Sladić D, Zahn RK, Bässler KH, Dogović N, Gerner H, Gasić MJ, Schröder HC (1987). Avarol-induced DNA strand breakage in vitro and in Friend erythroleukemia cells. Cancer Res. 47: 6565-71
- Novaković I, Anđelković U, Zlatović M, Gasić MJ, Sladić D (2012). Bioconjugate of lysozyme and the antibacterial marine sesquiterpene quinone avarone and its derivatives Bioconjug Chem. 23(1): 57-65
- Ojima I, Das M (2009). Recent advances in the chemistry and biology of new generation taxoids. J Nat Prod. 72(3): 554-65
- Opferman JT (2008). Apoptosis in the development of the immune system. Cell Death Differ. 15(2):234-42

Literaturverzeichnis

- Papa S, Skulachev VP (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol Cell Biochem. 174(1-2):305-19
- Pettit GR, Knight JC, Herald DL, Pettit RK, Hogan F, Mukku VJ, Hamblin JS, Dodson MJ, Chapuis JC (2009). Antineoplastic agents. 570. Isolation and structure elucidation of bacillistatins 1 and 2 from a marine *Bacillus silvestris*. J Nat Prod. 72(3): 366-71
- Poss KD, Tonegawa S (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(20): 10925-30
- Promega Corporation (2009). Technical Bulletin: Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay. Promega Corporation Madison, WI, USA: Part# TB295
- Prudhomme J, McDaniel E, Ponts N, Bertani S, Fenical W, Jensen P, Le Roch K (2008). Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. PLoS One. 3(6): e2335
- Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008 - 8. Ausgabe ISBN 978-3-89606-214-7
- Roche Diagnostics GmbH (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation - 4th edition. Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany: Art.-Nr. 5242134001
- Ryter SW, Choi AM (2005). Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. Antioxid Redox Signal. 7(1-2): 80-91
- Sakurai J, Oguchi T, Watanabe K, Abe H, Kanno S, Ishikawa M, Katoh T (2008). Highly efficient total synthesis of the marine natural products (+)-avarone, (+)-avarol, (-)-neoavarone, (-)-neoavarol and (+)-aureol. Chemistry. 14(3): 829-37
- Sarin PS, Sun D, Thornton A, Müller WE (1987). Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus / lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone J Natl Cancer Inst. 78(4): 663-6
- Seibert G, Raether W, Dogović N, Gasić MJ, Zahn RK, Müller WE (1985). Antibacterial and antifungal activity of Avarone and Avarol. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 260(3): 379-86
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 82(2):291-5
- Sladić D, Gasić MJ (2006). Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order Dictyoceratida. Molecules. 11(1): 1-33
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. J Biol Chem. 278(4): 2396-402
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science. 235(4792): 1043-6
- Strother RM, Sweeney C (2008). Lessons learned from development of docetaxel. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 4(7):1007-19
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. EMBO J. 21(19): 5216-24

Literaturverzeichnis

- Tak PP, Firestein GS (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest. 107(1): 7- 11
- Tsoukatou M, Maréchal JP, Hellio C, Novaković I, Tufegdžić S, Sladić D, Gasić MJ, Clare AS, Vagias C, Roussis V (2007). Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. Molecules. 12(5): 1022-34
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. Science. 274(5288): 787-9
- Wall ME, Wani MC (1995). Camptothecin and taxol: discovery to clinic - thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. Cancer Res. 55(4): 753-60

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei auf der einen Seite bei denjenigen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Doktorarbeit fachlich betreut haben, aber auch bei denjenigen, die mich nach den teilweise frustrierenden Ergebnissen wieder aufgebaut und mir neuen Mut gemacht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wim Wätjen für eine im wahrsten Sinne des Wortes stets offen stehende Tür und die Bereitschaft jederzeit meine Fragen zu beantworten, bzw. Sorgen, Bedenken und Probleme in Luft aufzulösen. Auch wenn wir beim „Schnacken“ manchmal vom eigentlichen Thema etwas abgewichen sind.

Besonderer Dank gilt meiner „Leidensgenossin“ Anja Bergermann. Zum einen für die Durchführung der RT-PCR, ganz besonders aber für das Ertragen meiner phasenweise schlechten Laune und das Wiederaufbauen nach Rückschlägen. Im gleichen Atemzug bedanke ich für die Unterstützung bei meinen Eltern Frank und Rita, meinen Brüdern Basti und Manu, sowie Alexandra Stenzel.

Dem gesamten Team im Institut für Toxikologie sei an dieser Stelle sehr herzlich für die Zusammenarbeit gedankt, mit der Bitte um Nachsicht dafür, dass ich nicht jeden Einzelnen aufgezählt habe. Exemplarisch seien genannt meine „Büronachbarin“ Martina Bennat, die „Biologen“ Dr. Sven Ruhl und Ricarda Rohrig, die LTAs Kerstin de Mezzo und Hermine Kannengießer (besonderer Dank geht an Hermine für die Mitarbeit an den SEAP- Assays), sowie Frau Dr. Yvonne Chovolou für die Bereitstellung der SEAP-Zellen.

Außerdem möchte ich mich bei den Herren Prof. Dr. Peter Proksch, Dr. Sherif S. E. Elsayed und Dr. Ashraf Nageeb El-Sayed Hamed für die Isolierung und Bereitstellung der untersuchten Substanzen bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei der Person bedanken, die den Kontakt zum Institut für Toxikologie in meinem 3. Fachsemester hergestellt hat. Ohne das „Curriculum zur strukturierten Promotion“ von Frau Prof. Dr. Renate Deinzer wäre der Grundstein für diese Arbeit wohl nie gelegt worden.

9. Eidesstattliche Versicherung

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.

Roland Schmitz
Düsseldorf, den 17.12.2012