Vergleichende Untersuchungen protektiver und zytotoxischer Effekte von Polyphenolen in kultivierten Säugerzellen

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

vorgelegt von

Gudrun Michels aus Münster / Westf.

Düsseldorf, 2005

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

Referentin: Prof. Dr. Regine Kahl Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2005

Zusammenfassung

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in Obst und Gemüse, aber auch hochdosiert in Nahrungsergänzungsmitteln vorhanden sind.

In dieser Arbeit wurde für die Flavonoide Luteolin, Quercetin und Galangin sowie das Stilbenderivat Resveratrol vergleichend in H4IIE Rattenhepatomzellen und C6 Rattengliomzellen die zelluläre Aufnahme und Metabolisierung, protektive Effekte gegenüber oxidativ induzierten Zellschädigungen sowie zellschädigende Effekte durch höhere Konzentrationen dieser Polyphenole untersucht.

Die Substanzen wurden in H4IIE und C6 Zellen rasch aufgenommen. Für H4IIE wurde eine Metabolisierung von Quercetin und Luteolin zu Glucuronsäurederivaten nachgewiesen. In C6 Zellen konnte keine Metabolisierung nachgewiesen werden, es wurden daher z.T. sehr hohe intrazelluläre Konzentrationen erreicht. Mit Hilfe von Fluoreszenzsonden wurde eine Protektion der Polyphenole gegenüber H₂O₂ induziertem oxidativem Streß nachgewiesen. Für Luteolin wurde eine Protektion gegenüber H₂O₂ induzierten DNA Strangbrüchen belegt. Resveratrol und Galangin reduzierten die H₂O₂-vermittelte Phosphorylierung der MAPK ERK, die H₂O₂ induzierte p38 Phosphorylierung wurde durch Luteolin inhibiert.

Höhere Konzentrationen der Substanzen vermittelten in beiden Zelllinien z.T. bereits nach einer Stunde zytotoxische Effekte. In H4IIE Zellen bewirken Luteolin, Quercetin und Resveratrol einen apoptotischen Zelltod. Der Metabolit 5,3'-Dimethylluteolinether zeigte bei völliger Reduktion der antioxidativen Kapazität zytotoxische, jedoch keine proapoptotischen Effekte. In C6 Zellen konnte durch die Substanzen kein apoptotischer Zelltod nachgewiesen werden, Resveratrol führt in den Zellen zur Induktion von Nekrose. Quercetin bildet unter oxdidativen Bedingungen Addukte mit SH-Gruppen (Boersma *et al.*, 2000). Für Galangin konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Adduktbildung belegt werden. Neben der Induktion von DNA Strangbrüchen und Lipidperoxidation (Luteolin, Resveratrol) stellt die SH-Reaktivität der Flavonoide einen toxischen Wirkmechanismus dar. Eine Inhibition der Glutathion-S-Transferase durch Flavonoide konnte gezeigt werden.

Aus der Ergebnissen dieser Arbeit können toxikologisch unbedenkliche Konzentrationen nicht abgeleitet werden, da es zu Überschneidungen der protektiven und toxischen Effekte kommt. In Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie wird eine intrazelluläre Akkumulation der Substanzen beobachtet.

Summary

Polyphenols are ingredients of plants, which can be found in fruits and vegetables. Furthermore they are used as food supplements in relatively high concentrations.

In this work uptake and metabolism of the flavonoids luteolin, quercetin and galangin as well as of the stilbene derivate resveratrol was measured using H4IIE rat hepatoma and C6 rat glioma cells. Furthermore protective effects against oxidative cell damage and cytotoxic effects of these polyphenols in high concentrations were investigated.

The polyphenols were taken up rapidly in both cell lines. After an incubation with quercetin and luteolin glucuronic acid metabolites were detected in H4IIE cells. In C6 glioma cells the formation of metabolites could not be detected, therefore, at least in part, high intracellular polyphenol concentrations were found. Using fluorescent probes, protective effects of polyphenols against H_2O_2 induced oxidative stress were detected. Luteolin also reduced the H_2O_2 -mediated formation of DNA strand breaks in H4IIE cells. The H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK MAPK was reduced by resveratrol and galangin, the H_2O_2 -induced phosphorylation of p38 MAPK was inhibited by luteolin.

Cytotoxic effects were induced in both cell lines when higher concentrations of these substances were used. In C6 cells, toxic effects of the polyphenols occurred after 1 h. Luteolin, quercetin and resveratrol induced an apoptotic cell death in H4IIE cells. Luteolin-5,3´-dimethylether, a metabolite of luteolin without antioxidative capacity, caused cytotoxic effects in H4IIE cells without induction of apoptosis. In contrast to these results, in C6 cells no apoptotic cell death was detected, but necrosis was induced by resveratrol.

Quercetin forms adducts with SH-groups under oxidative conditions (Boersma *et al.*, 2000). In this work this effect was also shown for galangin. Beyond the induction of DNA strand breaks and lipid peroxidation (detected for luteolin and resveratrol), the reactivity with SH-groups is a further mechanism of flavonoid toxicity. An inhibition of glutathione-S-transferase was shown for luteolin, quercetin and galangin.

In conclusion, because of the overlap of protective and toxic concentrations in the experiments, a toxicologically safe dose of polyphenols can not be predicted. In dependence of the cell line used, an intracellular accumulation of these substances was detected.

Abkürzungsverzeichnis

Abb. ABTS	Abbildung 2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6- sulfonsäure)
Agarose NEEO	Agarose mit niedriger Elektroendosmose
AP-1	activator protein-1
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASK-1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATBC	α- tocopherol, β- carotene cancer preven-
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
CARET	carotene and retinol efficacy trial
Caspase	cvsteine aspartate protease
cDNA	complementary DNA
CDNB	Chlorodinitrobenzen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammo-
	nio]-1-propansulfonat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCF	2', 7'-Dichlorofluorescein
DD	death domain
DED	death effector domain
DEPC	Dietylpyrocarbonat
	death-inducing signaling complex
DMEM	Duibecco s modified Eagle s medium
	Dimetryisuiloxia
DNA	nukloinsäuro
ANTP	Desoxyribonukleotidtrinbosobat
	(dATP dCTP dGTP dTTP)
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	effective concentration (50%), Konzentra-
	tion, bei der 50 % der Individuen noch
	einen Effekt zeigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-
	N,N,N´,N´-tetraessigsäure
ERK	extracellular regulated kinase
ESI	electron spray ionisation
EtBr	Ethidiumbromid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FADD Fas-L Fas-B	<i>Fas-associated death domain protein</i> Fas-Ligand Fas-Bezeptor
FCS	fetal calf serum. Fötales Kälberserum
g GAPDH	Gramm, Erdbeschleunigung Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydro-
	genase
GDP	Glutathionolphosphat
	Glutathion
	Glutathiondisulfit
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Glutathiontriphosphat
h	Stunde
H ₂ DCF	2.7 Dichlorodihydrofluorescein
H ₂ DCF-DA	H ₂ DCF-Diacetat
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H ₂ Rh123	Dihydrorhodamin 123
HCI	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansul-
	fonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography,
	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichper-
	oxidase
i.v.	Intravenös
IC ₅₀	inhibitory concentration (50%),
	Konzentration, bei der zu 50 % ein inhi-
1045	bierender Effekt auftritt
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
IgG	
	I-KB KINASe
	international units
	LININUT OF KAPPA D
K	Kontrolle
K-HPO,	Dikaliumhydrogennhosnhat
kB	Kilohase
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihvdrogenphosphat
KS	Kühlschrank
LMP-Agarose	Low melting point agarose
LPO	Lipidperoxidation
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	least significant difference
M	Marker
mA	Milli-Ampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinase
МАРККК	MAPKK Kinase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MDA	Malondialdehyd
MDR	multi drug resistance associated protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MnSOD	Manganabhängige Superoxiddismutase
mS	milli Siemens
MS	Massenspektrometer
n	Anzahl der Versuche
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NF-rB	nuclear factor-kanna R
	Nonidet 40
NI -40	Noutrairet
	Optische Dichte
	Pereral Dereral
	reiolal
PERK	phosphoryllerte ERK
PgP	
PIDD	p53-inducible death domain containing
	protein
pJNK	Phosphorylierte JNK
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp38	phosphorylierte p38
PVDF	polyvinylidene difluoride
rfu	relative fluorescent unit
Rh123	Rhodamin 123
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RP-18	reverse phase 18
rpm	rotations per minute
ŔŢ	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain
	reaction
SAR	structure activity relationship
SC	subclone
SDS	Sodium dodecvl sulfate
SOD	Superoxiddismutase
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TBF	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-Borsäure-SDS Thiobarbitursäure
TBST	Tris-Borsäure-SDS-Tween
TE	
TEAC	trolov pouivalent antiovidative conceity
	N N N' N'-Tetramethylothylondiamin
IM	mening temperature

TNF TRADD	Tumornekrosefaktor TNF receptor associated death domain
	protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X 100	Polyethylenglycol-tetramethylbutyl-
	phenylether
Trx	Thioredoxin
U	units
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
V	Volt
W	Watt
WHI	women's health initiative

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitun	g	1
	1.1. Oxida 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3.	tiver Stress Oxidation von Makromolekülen Antioxidative Enzyme und niedermolekulare Antioxidantier Transkriptionsfaktoren und Stress-aktivierte Signalwege	1 2 1. 2 3
	1.2. Apopt 1.2.1. 1.2.2. 1.2.3. 1.2.4.	OSE. Ablauf der Apoptose. Caspase-Kaskade. Rezeptorvermittelte Aktivierung der Apoptose (extrinsisch) Der mitochondriale Signalweg (intrinsisch).	7 9 11 12 13
	1.3. Flavor 1.3.1. 1.3.2.	noide Wirkungen, strukturelle Voraussetzungen Resorption und Metabolisierung	14 16 17
	1.4. Resve 1.4.1.	eratrol Resorption und Metabolisierung	20 21
	1.5. Nahru 1.5.1. 1.5.2.	ngsergänzungsmittel Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel Nahrungsergänzungsmittel und Arzneimittel	21 23 23
	1.6. Zielse	tzung	24
2.	Ergebnis	Se	. 26
	2.1. Zellula 2.1.1. 2.1.2. 2.1.3.	äre Aufnahme der Polyphenole Zeitverlauf Metabolitenanalyse Intrazelluläre Verteilung der Polyphenole	. 27 . 27 . 29 . 32
	2.2. Einflus Vorgä 2.2.1. 2.2. 2.2.	ss von Polyphenolen auf oxidativ vermittelte nge in der Zelle Antioxidative Kapazität 1.1. Antioxidative Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC Assay) 1.2. Antioxidative Effekte von Polyphenolen im Zellsvtem	34 . 34 . 34
	2.2.2.	Protektion gegenüber H_2O_2 -induzierten DNA Strang- brüchen (<i>Comet</i> -Assay)	. 40
	2.2.3. 2.2.4.	Modulation der H_2O_2 -induzierten MnSOD Induktion durch Polyphenole H_2O_2 vermittelte NF- κ B Induktion	41 46

	2.2.5.	H ₂ O ₂ vermittelte MAPK Induktion	47
	2.3. Intrins 2.3.1. 2.3.2. 2.3.3. 2.3.4. 2.3. 2.3. 2.3. 2.	 ische Effekte der Polyphenole Viabilitätsassays Induktion von DNA Strangbrüchen durch Polyphenole Induktion der Lipidperoxidation durch Polyphenole Apoptoseauslösung 4.1. Oligonukleosomale DNA Fragmentation durch Polyphenole 4.2. Messung der Caspase-Aktivität 4.3. Induktion der Chromatinkondensation durch Polyphenole 4.4. Induktion nekrotischer Vorgänge 	51 56 57 58 61 64 66
	2.4. Thiolre 2.4.1. 2.4.2.	eaktivität der Polyphenole Oxidativ vermittelte Reaktionen von Polyphenolen mit GSH Modulation der GST-Aktivität durch Polyphenole	67 .67 .73
	2.5. Unters 2.5.1. 2.5.2. 2.5.3.	suchung von methylierten Luteolinetherverbindunger Antioxidative Kapazität <i>in vitro</i> (TEAC Assay) Viabilitätsassay Messung der Caspase-Aktivität	n.74 74 75 76
3.	Diskussi	on	77
	 3.1. Antiox 3.2. Zellulä 3.3. Einflus Vorgä 3.4. H₂O₂-v 3.5. Modul Indukt 3.6. Intrins 3.7. Apopte 3.8. Thiolre 3.9. Schlus 	kidative Kapazität der Polyphenole äre Aufnahme der Polyphenole ss von Polyphenolen auf oxidativ vermittelte nge in der Zelle vermittelte MAPK Aktivierung lation der H ₂ O ₂ induzierten MnSOD- bzw. NF-κB- tion durch Polyphenole ische Effekte der Polyphenole oseauslösung durch Polyphenole eaktivität der Polyphenole ssbetrachtung	78 79 81 83 85 86 89 93 94
4.	Material	und Methoden	98
	4.1. Materi 4.1.1. 4.1.2. 4.1.3. 4.1.4.	ial. Chemikalien. Zellkulturmedien und Zusätze. Antikörper. Enzyme.	98 98 100 100 101

		4.1.7.	Puffer und Lösungen	101
		4.1.8. 110	Gerate	105
		4.1.9.	Computerhard- und software	106
				100
	4.2.	Methoo	den	106
		4.2.1.	Zelllinien und ihre Kultivierung	106
		4.2.1	.1. H4IIE Zellen	106
		4.2.1	.2. C6 Zellen	106
		4.2.1	.3. Kultivierung der Zellen	107
		4.2.1	.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen	107
		4.2.2.	Authanme (HPLC-DAD und HPLC-MS-MS)	108
		4.2.3.	IEAC ASSAY	109
		4.2.4. 195	Finzelzell Gelelektrophoroco (Comet Accov)	109
		4.2.J. 126	Reverse Transkription PCR (RT-PCR)	112
		427	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	115
		4.2.8.	Westernblot	115
		4.2.9.	Proteinbestimmung modifiziert nach Bradford	118
		4.2.10.	Densitometrische Auswertung von Agarosegelen und	
			Filmen	118
		4.2.11.	NF-ĸB ELISA	118
		4.2.12.	Zellfraktionierung	118
		4.2.13.	Bestimmung der Viabilität mit dem Neutralrot Assay	119
		4.2.14.	Nachweis von Malondialdehyd	120
		4.2.15.	DNA-Leiter als Apoptosenachweis	121
		4.2.16.	Bestimmung der Aktivität von Caspasen	122
		4.2.17.	Nachweis der apoptotischen Kernfragmentation	122
		4.2.18. 4.2.10	Reaktivität von Eleveneiden mit Thielen	124
		4.2.19.	CST Aktivitätsbostimmung	124
		4.2.20.	$\Delta n_0 - ONE^{(B)} \Delta s_{S_2} v$	120
		4 2 22	Statistische Auswertung	126
				120
5.	Lite	eraturv	erzeichnis	127
_	-			
6.	An	hang		145
	6.1.	Rohda	ten	145
	6.2.	Veröffe	entlichungen	162
	6.3.	Danksa	agung	165
	6.4.	Eidess	tattliche Erklärung	166

1. Einleitung

1.1. Oxidativer Stress

Aerobe Stoffwechselvorgänge, körpereigene Abwehrprozesse und exogene Noxen (z.B. UV-Strahlung, Röntgenstrahlung, Ozon) führen im Organismus zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen freie Radikale wie das Superoxidradikalanion (O_2^{-}), das Peroxylradikal (ROO⁻) und das Hydroxylradikal (OH⁻), aber auch nicht-radikalische Verbindungen wie Singulettsauerstoff (1O_2), Peroxynitrit (ONOO⁻) oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂). H₂O₂ generiert in der sog. Fenton-Reaktion in Verbindung mit redoxaktiven Schwermetallen (z.B. Eisen, Kupfer, Chrom) das sehr reaktive Hydroxylradikal (Abb. 1.1. (1), Gille *et al.*,1995). In einer Folgereaktion wird das redoxaktive Schwermetall, welches in der Fenton-Reaktion oxidiert wurde, wieder reduziert. Fenton-Reaktion und Oxidation von redoxaktivem Schwermetall ergeben zusammen die sog. Haber-Weiss-Reaktion (2):



Abb. 1.1.: Reaktion von H_2O_2 mit redoxaktiven Schwermetallen (Fenton-Reaktion), Haber-Weiss-Reaktion

ROS können zelluläre Makromoleküle (z.B. Proteine, DNA) oxidieren, die Expression von antioxidativen Enzymen und niedermolekularen Antioxidantien beeinflussen bzw. Transkriptionsfaktoren und Stress-aktivierte Signalwegen beeinflussen.

Andererseits ist jedoch eine gewisse zelluläre ROS-Konzentration für das Überleben einer Zelle von Wichtigkeit. Aufgrund ihrer Reaktivität eignen sich ROS z.B. zur Zerstörung eindringender Mikroorganismen durch Makrophagen bzw. sind niedrige Dosen für die Zelle als Proliferationsstimulus essentiell. Übersteigt die ROS-Konzentration einen für jeden Zelltyp individuellen Schwellenwert, weil die Bildung von ROS gegenüber dem Abbau von ROS überwiegt, so entsteht in der Zelle oxidativer Stress, der zu einer Schädigung der Zelle führt (Sies, 1993).

1.1.1. Oxidation von Makromolekülen

Radikale können durch ihre starke Elektrophilie Makromoleküle oxidieren und so Zellschädigungen verursachen. Zielstrukturen von ROS sind DNA, Proteine und Zellmembranen. DNA-Schädigungen führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Bildung von DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukten (Croteau und Bohr, 1997), sowie zu Basenmodifikationen (Marnett, 2000). Oxidationsprozesse an den Proteinen lösen unter anderem Enzymdefekte und Veränderungen an Strukturproteinen aus. Bei der Lipidperoxidation kommt es zur Reaktion von ROS mit ungesättigen Fettsäuren, die in einer radikalischen Kettenreaktion zu einer starken Schädigung der Membran führt. Dadurch bedingt entsteht eine Störung des Ionengleichgewichts, der Zellfunktion und der Zellintegrität.

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung zahlreicher Erkrankungen (Knight, 1998). So wird oxidativer Stress als wichtiger Faktor bei der Kanzerogenese (Wallace, 1999), bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Arts und Hollmann, 2005) oder bei neurodegenerativen Erkrankungen (Williams, 1995; Floyd, 1999) angesehen. Außerdem werden oxidative Zellschädigungen als Schlüsselprozesse des Alterns angesehen (Finkel und Holbrook, 2000; Cottrell *et al.*, 2000), das sog. "Alterspigment" Lipofucsin stellt ein Addukt aus ROS-geschädigten Proteinen und Lipiden dar (Stadtmann, 1993).

1.1.2. Antioxidative Enzyme und niedermolekulare Antioxidantien

Die zelluläre ROS-Konzentration wird durch verschiedene antioxidative Systeme reguliert. Es ist zu unterscheiden zwischen antioxidativ wirksamen Enzymen und niedermolekularen Substanzen, die ROS nicht-enzymatisch reduzieren.

2 O ₂ * + 2 H ⁺	SOD		$H_2O_2 + O_2$	(1)
2 H ₂ O ₂	Katalase		2 H ₂ O + O ₂	(2)
H ₂ O ₂ + 2 GSH	GPx	•	2 H ₂ O + GSSG	(3)
ROOH + 2 GSH	GPx	•	H ₂ O + ROH + GSSG	(4)



Zu den antioxidativen Enzymen gehören die Katalase, die Glutathionperoxidase (GPx) und die Superoxiddismutasen (SOD).

Die Katalase, ein Hämprotein, disproportioniert H_2O_2 zu H_2O und O_2 (Gleichung **2**). Die Katalase ist vorwiegend in den Peroxisomen lokalisiert, eine sekretorische Isoform wurde in T-Lymphozyten beschrieben (Sandstrom und Buttke, 1993).

Die selenabhängige Glutathion-Peroxidase, kommt sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien vor und reduziert z.B. Peroxide oder organische Säuren mit Hilfe von Glutathion (GSH) als Kofaktor (Gleichung **3**, **4**).

Die Superoxiddismutasen (Gleichung 1) katalysieren die Reduktion von O₂⁻⁻ zu H₂O₂. Sie kommen in drei verschiedenen Isoformen vor (Fridovich, 1989; Halliwell, 1994; Whittaker, 2003): die manganabhängige SOD (MnSOD), ein Homotetramer, in der Matrix der Mitochondrien, die kupfer- und zinkabhängige SOD (CuZnSOD) als cytosolisches Enzym, sowie die CuZnSOD als sekretorisches Isoenzym. Die MnSOD wird als Proenzym im Kern synthetisiert und in das Mitochondrium transportiert. In einigen Tumorarten wurde die MnSOD in erniedrigter Konzentration gefunden.

Die Expression von SOD, aber auch von Katalase und GPx kann durch ROS induziert werden (Isoherranen *et al.*, 1997; Ji, 1998). Bei der Induktion der SOD spielen die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*Nuclear factor-\kappaB*) und AP-1 (*activator protein 1*) eine zentrale Rolle. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die MnSOD je nach Zelltypus auch unabhängig von NF- κ B induziert werden kann (Warner *et al.*, 1996; Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Borello und Demple, 1997).

Neben den antioxidativ wirksamen Enzymen gibt es niedermolekulare Antioxidantien, die ROS nicht-enzymatisch reduzieren. Dies sind z.B. Glutathion (GSH), Vitamin C, Vitamin E, Carotenoide und Flavonoide.

1.1.3. Transkriptionsfaktoren und Stress-aktivierte Signalwege

Neben den bereits beschriebenen zytotoxischen Effekten von ROS durch Schädigung von zellulären Makromolekülen, sind ROS auch an physiologischen Prozessen der Zelle beteiligt. Durch ROS kann es z.B. zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, aber auch des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwegs kommen (Kamata und Hirata, 1999).



Abb. 1.3.: Aktivierung des NF-κB und MAPK-Signalwegs durch exogene Noxen (schematische Darstellung)

Modifiziert nach Takeda et al. (2003) und Matsukawa et al. (2004)

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein Homo- oder Heterodimer aus verschiedenen Untereinheiten, u.a. p50 und p65. Im Cytosol liegt NF- κ B gebunden an seinen Inhibitor I- κ B *(inhibitor of kappaB)* vor. Nach Stimulation der Zelle durch z.B. LPS, Wachstumsfaktoren oder ROS erfolgt die Phosphorylierung von I- κ B durch IKK *(I-\kappaB kinase)*. I- κ B wird abgespalten, NF- κ B liegt frei im Cytoplasma vor und transloziert daraufhin in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert und im Promotorbereich der DNA bindet (κ B sites).

NF-κB kontrolliert eine Reihe von Genen, die für z.B Immunantwort, Entzündungsvorgänge, aber auch Tumorgenese codieren. Neben antiapoptotischen Eigenschaften (z.B. Kontrolle der Expression von Bcl-2 oder p53) werden NF-κB auch proapoptotische Eigenschaften zugeschrieben.

κB sites finden sich auch in Promotoren der Gene, die für die Membrantransporter MDR (*multi drug resistance associated protein*) und PgP (*Glycoprotein P*) codieren; NF-κB wird damit u.a. für Resistenzen von Tumorzellen in der Tumortherapie verantwortlich gemacht. Ferner konnte eine erhöhte NF-κB Aktivität in einigen Tumoren gemessen werden, die z.T. viral induziert waren (Cogswell *et al.*, 2000; Nakshatri *et al.*, 1997; Rayet und Gélinas, 1999; Knecht *et al.*, 2001; Kowalik *et al.*, 1993). Ebenso wurde bei entzündlichen Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis, Asthma) eine erhöhte NF-κB Aktivität beobachtet (Delhalle *et al.*, 2004).

Auf Grundlage dieser Beobachtungen werden einige Substanzen, die in den NF-κB-Signalweg eingreifen, als mögliche Therapieansätze bzw. Präventionsmaßnahmen von Erkrankungen diskutiert. Es ist z.B. in Tiermodellen gezeigt worden, dass Curcumin (ein Sesquiterpen der Javanischen Gelbwurz) über den NF-κB-Signalweg die Aktivität der COX-2 hemmt. Diese wird als mitverursachender Faktor von Darmkrebs diskutiert (Plummer *et al.*, 1999). Ebenso wurden NF-κB - bindende Oligonukleotide daraufhin getestet, ob möglicherweise die Senkung der NF-κB - Aktivität eine Linderung der Rheumatoiden Arthritis hervorrufen kann (Tomita *et al.*, 2000 a,b). Es konnte gezeigt werden, dass neben Sulfasalazin (Wahl *et al.*, 1998) und Prostaglandinen (Rossi *et al.*, 2000) auch Resveratrol (Holmes-McNary und Baldwin, 2000) und Curcumin (Siwak *et al.*, 2005) die IKK Aktivität hemmen können.

Neben den Einflüssen von ROS auf den Transkriptionsfaktor NF-κB kann auch die intrazelluläre Signaltransduktion über die MAPK-Familie beeinflusst werden, die aus hintereinandergeschalteten Serin-Threonin-Proteinkinasen besteht.

Die Aktivierung des MAPK Signalweges kann neben der Aktivierung durch ROS auch rezeptorvermittelt über einen Transmembranrezeptor (z.B. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) erfolgen. Eine zentrale Rolle spielt das Ras-Protein bzw. andere Mitglieder der Superfamilie der Ras-Proteine. Vom Ras-Protein aus wird das Signal über eine Kaskade von Kinasen ins Zellinnere transportiert. Zunächst aktiviert die MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase) die nachgeschaltete MAPKK (MAP-Kinase-Kinase) durch Phosphorylierung. Diese phosphoryliert wiederum die ihr nachgeschaltete MAPK (Takeda *et al.*, 2003). Die MAPK-Familie umfasst die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) sowie die p38-Kinase. Im allgemeinen werden JNK und p38 mit proapoptotischen, ERK mit antiapoptotischen Eigenschaften beschrieben (Cross *et al.*, 2000).

Die Aktivierung des ERK-Signalweges erfolgt über eine Aktivierung (Autophosphorylierung) des EGF-Rezeptors nach Bindung eines Liganden (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998). In Folge kommt es zur Aktivierung der MAPKKK Raf-1 durch Phosphorylierung, die wiederum die nachgeschaltete MAPKK MEK1/MEK2 phosphoryliert. ERK ist die nachgeschaltete MAPK. Die phosphorylierte ERK transloziert in den Zellkern und induziert die Expression bestimmter Gene. Trotz der meist postulierten antiapoptotischen Effekte wird diskutiert, dass ERK auch eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und damit eine Auslösung von Apoptose bewirken kann (Erhardt *et al.*, 1999; Horbinski *et al.*, 2005).

Die Aktivierung der MAPK p38 und JNK erfolgt über einen anderen Mechanismus. Vorgeschaltet ist die *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK-1), eine MAPKKK, die über Thioredoxin (Trx) in ihrer Aktivität gehemmt wird. Durch den Einfluss von ROS kann Trx oxidiert werden, so dass es aus dem Komplex dissoziiert (Ichijo *et al.*, 1997; Ichijo, 1999). ASK-1 phosphoryliert die nachgeschalteten MAPKK (MAPKK4/MAPKK7 bzw. MAPKK3/MAPKK6), die wiederum die MAPK JNK bzw. p38 phosphorylieren (Sumbayev *et al.*, 2005). pJNK und pp38 phosphorylieren zum einen Substrate wie Bcl-2, aber auch Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun, AP-1 oder p53. Hierdurch kommt es zur Induktion der Expression zahlreicher Gene, die proliferative oder apoptotische Ereignisse vermitteln. Die Aktivierung von JNK wird mit der Weiterleitung von apoptotischen, aber auch antiapoptotischen Signalen in Verbindung gebracht (Varfolomeev und Ashkenazi, 2004; Liu *et al.*, 2005). Es wird diskutiert, dass JNK z.B. zur Inaktivierung der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie führt.

Durch p38 MAPK werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen aktiviert, weshalb der p38 Signaltransduktionsweg mit den unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle in Verbindung gebracht wird. Es konnte gezeigt werden, dass p38vermittelt z.B. IL-1ß, COX-2 oder auch iNOS reguliert werden. Die Aktivierung von p38 wird daher mit z.B. Entzündungen, rheumatoider Arthritis, Morbus Alzheimer, apoptotischen Vorgängen und Tumorsuppression in Verbindung gebracht (Zarubin *et al.*, 2005). Wie auch für JNK und ERK gilt für p38 derzeit die Annahme, dass abhängig vom Zelltyp p38-vermittelt Apoptose, Zellwachstum und Zelldifferenzierung gezeigt werden können.

1.2. Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt (Kerr *et al.*, 1972). Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, regulierten Prozess des Zelltodes, der auch als programmierter oder physiologischer Zelltod bezeichnet wird. Die Apoptose ist zu trennen von der Nekrose, dem pathologischen Zelltod. Neben diesen beiden Formen des Zelltodes gibt es Zwischenformen, wie z.B. die Aponekrose (Bröker *et al.*, 2005).

Die Nekrose ist ein unkontrollierter, passiv ablaufender Prozess. Infolge einer Schädigung der Zellmembran und Schädigungen von Ionenpumpen kommt es zu einer Verschiebung des Elektrolytgleichgewichts: Na⁺ und Ca²⁺ strömen in die Zelle. Es folgt ein Wassereinstrom und Anschwellen von Zelle und Zellorganellen durch osmotische Vorgänge, was in einer Lyse der Zelle mündet. Zelltrümmer und Enzyme werden in den Extrazellularraum freigesetzt und provozieren entzündliche Reaktionen und nachfolgend eine Schädigung des umgebenden Gewebes (Golstein *et al.*, 1991; Kroemer *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Prozess. Im Verlauf der Apoptose schrumpft die Zelle und löst sich aus dem Zellverband. Die Plasmamembran bildet an ihrer Oberfläche Bläschen. Im Zellkern kondensiert das Chromatin, während

die anderen Zellorganellen Struktur und Funktion behalten. Die genomische DNA wird durch die Aktivierung von spezifischen Endonukleasen zunächst in größere Bruchstücke (50 – 300 kB) und schliesslich zwischen den Nukleosomen geschnitten. Hierbei entstehen oligonukleosomale Fragmente mit Vielfachen von 180 - 200 Basenpaaren (Nagata, 2000). Die Zelle zerfällt in kleine membranumschlossene Partikel, sog. apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*), welche die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten. Die apoptotischen Körperchen werden von benachbarten Zellen phagozytiert. Im Unterschied zur Nekrose erfolgt dadurch keine Ausschüttung von Zellbestandteilen in den extrazellulären Raum.



Abb. 1.4.: Morphologische Veränderungen im Verlauf des Zelltodes: Vergleich von Apoptose und Nekrose (schematische Darstellung)

A: intakte Zelle; B, C: nekrotischer Zelltod; D, E, F: apoptotischer Zelltod

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einem Schrumpfen der Zelle, das Chromatin kondensiert und fragmentiert (D), die Zelle fragmentiert in Form von membranumhüllten Vesikeln (E), die dann von anderen Zellen phagocytiert werden (F). Im Verlauf des nekrotischen Zelltodes kommt es durch einen unkontrollierten Wassereinstrom zunächst zu einem Anschwellen der Zelle (B), schließlich platzt die Zelle, zelluläre Bestandteile werden freigesetzt (C) und lösen eine Entzündungsreaktion aus (Aktivierung von Makrophagen).

Die Apoptose hat bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Funktion, indem nicht mehr benötigte Zellen gezielt ausgeschaltet werden. Die Apoptose spielt z.B. eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Plazenta (Stras-

zewski-Chavez et al., 2005), der embryonalen Morphogenese (z.B. Bildung der Finger- und Zehenzwischenräume), der Ausbildung des Nervensystems (Yuan und Yankner, 2000; Raff et al., 1993) oder der Entstehung und Funktion des Immunsystems (Krammer, 2000). Als Gegenspieler der Mitose ist die Apoptose auch bei adulten Organismen an der Formgebung von Organen und Geweben durch die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (z.B. lymphatische Organe, Leber, Darm) beteiligt. Störungen des Gleichgewichts zwischen Mitose und Apoptose können schwerwiegende Konsequenzen haben: man nimmt an, dass bei einigen Erkrankungen wie z.B. AIDS (Gougeon und Montagnier, 1999; Roshal et al., 2001), Morbus Alzheimer (Barinaga, 1998; Mattson et al., 2001) oder Parkinson (Burke et al., 1998) zuviel Apoptose stattfindet, bei anderen (z.B. rheumatoider Arthritis, Krebs) jedoch zuwenig. Defekte an apoptotischen Regulationsmechanismen (z.B. p53-Gen) kommen bei etwa 50 % aller Tumore beim Menschen vor (Lundberg und Weinberg, 1999). Einige Substanzen, die in der Chemotherapie bei Krebserkrankungen eingesetzt werden, wirken durch Induktion von Apoptose in den dafür sensiblen Tumorzellen (Mashima et al., 2005).

Es wurde generell für eine Reihe von Substanzen gezeigt, dass sie den apoptotischen Zelltod beeinflussen: Inhibitoren der Apoptose sind z.B. Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Cyproteronacetat und bestimmte Viren; Induktoren sind hingegen Substanzen wie toxische Schwermetalle, oxidativer Stress, UV-Strahlung oder die Arzneistoffe Etoposid, Cisplatin, Tamoxifen (Xia *et al.*, 2005).

1.2.1. Ablauf der Apoptose

Die Apoptose kann auf verschiedene Arten induziert werden: Zum einen kann die Induktion über einen rezeptorvermittelten Mechanismus (Bindung eines "Todesliganden" an einen spezifischen Todesrezeptor) erfolgen (1), zum anderen über eine mitochondrienvermittelte Aktivierung der apoptotischen Kaskade z.B. über Stimuli von aussen (UV-Licht, Chemikalien, ROS, 2). Eine Auslösung von Apoptose ist auch über die Aktiverung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) möglich. Es kann durch z.B. Amyloid-β oder Trypsin die Calciumhomöostase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zerstört werden. Als Folge dieses sog. "ER-Stresses" wird Procaspase-12 von der Cysteinprotease Calpain durch Spaltung aktiviert. Calpain ist im Inneren des ER und Procaspase-12 an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert (Nakagawa *et al.*, 2000; Nakagawa und Yuan, 2005). Caspase-12 aktiviert di-

rekt ohne Ausbildung eines Apoptosoms Caspase-9 (**3**, Groenendyk und Michalak, 2005). Ausserdem kann ein apoptotischer Zelltod durch DNA-Schädigungen, p53 und Caspase-2 ausgelöst werden (**4**).





Aufgrund der zentralen Bedeutung der Caspasen im Verlauf des apoptotischen Geschehens wird zunächst auf diese Proteasen näher eingegangen. Im Anschluss werden der rezeptorvermittelte Weg mit der Ausbildung des DISC (*death-inducing signaling complex*) und der mitochondriale mit der Ausbildung des Apoptosoms näher charakterisiert.

1.2.2. Caspase-Kaskade

Sowohl der rezeptorvermittelte als auch der mitochondriale Signalweg münden in einer Aktivierung von Caspasen (*cysteine aspartate proteases*). Die Familie der Capasen (bei Säugern) umfasst bisher 14 Caspasen. Caspasen werden konstitutiv in allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind im Zytoplasma sowie z.T. in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum vorhanden.

Caspasen sind apoptose-spezifische Cystein-Proteasen, die ihre Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz C-terminal von einem Aspartat-Rest schneiden (Nicholson, 1999; Thornberry, 1999; Stennicke *et al.*, 2002). Zu den Substraten der Caspasen zählen Strukturproteine, Inhibitoren, Enzyme und Procaspasen. Caspasen tragen somit entscheidend zur spezifischen Degradation zellulärer Komponenten während der Apoptose bei. Caspasen liegen im Cytoplasma als inaktive Procaspasen vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998). Es erfolgt zunächst eine zweifache Spaltung der Procaspasen, wobei eine Prodomäne, eine grosse (ca. 20 kDa) und eine kleine (ca. 10 kDa) Untereinheit entstehen. Nach Abspaltung der Prodomäne bilden grosse und kleine Untereinheit eine neue Proteinstruktur aus. Durch Dimerisierung zweier aktivierter Procaspasen entsteht schliesslich das aktive Enzym.





Das Konzept einer Caspase-Kaskade, die zu einer vielfältigen Amplifikation des Signals führt, liefert eine Erklärung für das schnelle Ablaufen des apoptotischen Zelltodes (Strasser *et al.*, 1999).

Die Weiterleitung des apoptotischen Signals wird neben der sequentiellen Aktivierung der Caspasen auch durch die Differenzierung in Initiator- und Effektorcaspasen gewährleistet (Zhivotovsky *et al.*, 2005): Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-2, -8, -9 und -12) bilden durch Interaktion der Prodomänen mit Adaptermolekülen wie FADD (*Fasassociated death domain protein*) oder Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor* 1) Homodimere, die sich aufgrund ihrer geringen Basalaktivität selbst aktivieren (Autoprozessierung). Damit sind die Initiatorcaspasen eine wichtige Schaltstelle für die Weiterleitung des proapoptotischen Signals. Für die Aktivierung der Procaspase-2 werden derzeit mehrere mögliche Wege diskutiert. So wird zum Beispiel eine Bindung an PIDD (*p53-inducible death domain containing protein*) oder eine Dimerisierung und damit autokatalytische Aktivierung der Caspase-2 als Voraussetzung für die Aktivierung diskutiert (Seth *et al.*, 2005; Zhivotovsky *et al.*, 2005). Auch für die Aktivierung unabhängig vom DISC bzw. Apoptosom diskutiert (Chao *et al.*, 2005).

Die Substrate der Initiatorcaspasen sind die Effektorcaspasen. Die Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -6, -7) spalten z.T. weitere Caspasen und verstärken so das apoptotische Signal (Slee *et al.*, 2001), vor allem aber sind sie verantwortlich für zahlreiche zelluläre Effekte, die im Verlauf der Apoptose zu beobachten sind: sie spalten zelluläre Strukturproteine, induzieren eine spezifische Degradation der DNA, inaktivieren verschiedene Enzyme (z.B. DNA-Reparaturenzmye) und führen zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (Signal für Phagozytose) (Fadok *et al.*, 2001; Henson *et al.*, 2001).

1.2.3. Rezeptorvermittelte Aktivierung der Apoptose (extrinsisch)

Todesrezeptoren, z.B. Fas-R, werden durch Bindung spezifischer Liganden (z.B. Fas-L) aktiviert und können Apoptose auslösen. Bindet ein Ligand an einen Todesrezeptor erfolgt die Trimierisierung des Rezeptors über die DD (*death domain*). Das Adapterprotein TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*) kann nun intrazellulär an die DD des aktivierten Rezeptorkomplexes binden. FADD bindet ebenfalls über seine DD an TRADD. FADD enthält neben der DD eine DED (*death*

effector domain), über die Caspase-8 und -10 an den Rezeptorkomplex rekrutiert werden. Es entsteht der *death-inducing signaling complex* (DISC), der zur Aktivierung von Caspase-8 und -10 durch Abspaltung der Prodomäne führt. Nach Aktivierung der Caspase-8 kann es zum einen zur Spaltung von Procaspase-3 und damit Aktivierung der zentralen Effektorcaspase, zum anderen über Bid zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommen, die auch bei Apoptoseaktivierung über den mitochondrialen Signalweg stattfindet (Rust *et al.*, 2000). Im Folgenden wird eine proteolytische Kaskade in Gang gesetzt, die über die Aktivierung weiterer Procaspasen schliesslich zum apoptotischen Tod führt (Slee *et al.*, 1999; van de Craen *et al.*, 1999).

1.2.4. Der mitochondriale Signalweg (intrinsisch)

Ein weiterer Signalweg zur Aktivierung von Caspasen kann u.a. durch ROS initiert werden. Zunächst wird in der äusseren Membran des Mitochondriums eine Pore ausgebildet (*mitochondrial permeability transition pore*), deren Öffnen eine Schädigung des Elektrolytgleichgewichts an der mitochondrialen Membran und damit eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials bedingt. Es erfolgt eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Interchristaeraum der Mitochondrien (Cai *et al.*, 1998). Nach Freisetzung aus den Mitochondrien fusioniert Cytochrom c mit Apaf-1, dATP und Procaspase-9 zum sog. Apoptosom (Cain *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000), was eine Aktivierung der Caspase-9 zur Folge hat (Stennicke und Salvesen, 1999). Caspase-9 spaltet und aktiviert neben der Procaspase-7 auch die Procaspase-3. Die aktivierte Caspase-3 ist das zentrale Schlüsselenzym der weiteren apoptotischen Schritte.

Verschiedene andere zytoplasmatische Proteine sind an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt (Bortner und Cidlowski, 2002; Bras *et al.*, 2005). Es handelt sich hauptsächlich um die Mitglieder der Bcl-2 Familie. Zu den antiapoptotischen Mitgliedern zählen z.B. Bcl-2 und Bcl-xl, während Bax und Bid zu den proapoptotischen Mitgliedern gehören. Bax und Bid können Poren in der äusseren Membran des Mitochondriums bilden (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1999), was durch Bcl-2 und Bcl-xl verhindert werden kann (Korsmeyer, 1999; Mikhailov *et al.*, 2001; Scorrano, 2003). Das Gleichgewicht zwischen den antiapoptotischen und den proapoptischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie determiniert, ob ein apoptotischer Stimulus auch zu einem apoptotischen Zelltod führt.

1.3. Flavonoide

Die Stoffklasse der Flavonoide (lat. *flavus* gelb) umfasst ca. 6000 polyphenolische Verbindungen. Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen vor, sie fehlen hingegen bei Bakterien, Algen und Pilzen, ebenso im gesamten Tierreich. Flavonoide dienen als Schutz vor Schäden durch z.B. UV-Licht, daher sind sie vor allem in den äusseren Teilen der Pflanze angereichert.

Das Diphenylpropan-Grundgerüst der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (A-Ring und B-Ring), die über eine C3-Brücke (C-Ring) zu einem O-Heterozyklus verbunden sind (Abb. 1.7.). Die aromatischen Ringe können unterschiedlich substituiert sein. Der C-Ring weist unterschiedliche Oxidationsgrade auf und dient der Einteilung der Flavonoide in Unterklassen. In dieser Arbeit wurden Flavone und Flavonole verwendet. Flavone sind durch eine Doppelbindung und eine Keto-Gruppe im C-Ring charakterisiert, Favonole weisen zusätzlich eine OH-Gruppe an Position 3 auf.

Die Strukturvielfalt der Flavonoide ergibt sich darüber hinaus durch variable Substitutionen an A-Ring und B-Ring (z.B. Hydroxylierungen, O-Methylierungen, Veresterungen, O- und C-Glykosidierung mit unterschiedlichen Zuckerresten), sowie Kondensationen zu Di- und Polymeren.



Abb. 1.7.: Allgemeine Formel der Flavonoide

In dieser Arbeit wurden das Flavon Luteolin und die Flavonole Galangin und Quercetin verwendet.



Abb. 1.8.: Strukturformeln der Flavonoide Luteolin, Galangin und Quercetin

Flavone sind weit verbreitet in Gemüse (z.B. Paprika, Artischocke, Kohl), Gewürzkräutern (z.B. Pfefferminz, Salbei, Rosmarin, Petersilie, Thymian, Kümmel), sowie in Getreide, Reis, Honig oder Zitrusfrüchten.

Flavonole sind in allen Obstsorten, in Blatt- und Wurzelgemüse sowie einigen Getreidesorten und Mais anzutreffen. Flavonole konnten zwar in Reis, Weizen und Hafer nicht nachgewiesen werden, stellen aber trotzdem in pflanzlicher Nahrung das grösste Stoffkontingent unter den Flavonoiden dar. Quercetin ist das am häufigsten vorkommende Flavonol.

Flavonole und Flavone kommen im Pflanzenreich in folgenden Varianten vor: als freie Aglykone, als Glykoside, durch Isopren substituiert, mit O-Methylierung ("lipophile Flavone") oder als Kaliumsulfatester. In den Niederlanden wurde eine tägliche Flavonol- und Flavonaufnahme von 23 mg / Person ermittelt (Hertog *et al.*, 1993). Das in dieser Arbeit verwendete Quercetin ist z.B. in Zwiebeln (340-347 mg / kg Frischgewicht), Äpfeln (20-36 mg / kg Frischgewicht) oder grünen Bohnen (39 mg / kg Frischgewicht) vorhanden (Hollmann und Arts, 2000). Luteolin findet man

in Sellerieblättern (200 mg / kg Frischgewicht), grünen Oliven, Paprika oder Ginkgo biloba Blättern. Galangin kommt in Propolis oder Honig vor.

1.3.1. Wirkungen, strukturelle Voraussetzungen

Zahlreiche pharmakologische Wirkungen der Flavonoide sind nachgewiesen worden: antioxidative (Manach *et al.*, 1996), antiallergische, antiphlogistische (Brownson *et al.*, 2002; Mouria *et al.*, 2002), antimikrobielle (di Carlo *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 2000), sowie antiproliferative und antikarzinogene Wirkungen (Birt *et al.*, 2001; Le Marchand, 2002; Lambert *et al.*, 2005).

Therapeutisch genutzt werden flavonoidhaltige Arzneidrogen als Herz-Kreislauf-Mittel (Weissdornblätter), Diuretika (Birkenblätter, Schachtelhalmkraut), Spasmolytika bei Magen-Darm-Beschwerden (Kamillenblüten, Pfefferminzblätter) oder Lebertherapeutika (Mariendistelfrüchte und -kraut). Auch in der Protektion altersbedingter ZNS-Erkrankungen werden flavonoidhaltige Präparate eingesetzt wie z.B. Ginkgo Extrakte (Dajas *et al.*, 2003; Youdim *et al.*, 2004 a,b). Die synthetisch hergestellte Chromoglicinsäure, die einen Flavonoidgrundkörper besitzt, wird als Antiallergikum genutzt.

In dieser Arbeit stehen die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide im Fokus der Untersuchungen. Man geht davon aus, dass die Fähigkeit der Flavonoide, durch Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen ROS abzufangen, den Schwerpunkt der antioxidativen Aktivität darstellt (McPhail *et al.*, 2003).

Drei Strukturmerkmale sind Voraussetzung für gute Radikalfängereigenschaften und damit für die antioxidative Wirkung: eine *ortho*-Dihydroxystruktur (Catechol) im B-Ring, eine 2, 3-Doppelbindung in Kombination mit einer 4-Oxogruppe im C-Ring und die zusätzliche Anwesenheit einer 3- und 5-Hydroxylgruppe im A-Ring (Rice-Evans *et al.*, 1996; Lien *et al.*, 1999; Heijnen *et al.*, 2001). Hierdurch wird die Stabilität des entstehenden Radikals durch die Möglichkeit der Delokalisation des Elektrons über das komplette π -System gewährleistet. Strukturbedingt gibt es grosse Unterschiede des antioxidativen Potentials der Flavonoide. So zeigt z.B. Chrysin (ohne Hydroxylierungen im B-Ring) eine deutlich niedrigere antioxidative Eigenschaft als Luteolin (Arora *et al.*, 1998).

Neben der Abgabe von Wasserstoffatomen können Flavonoide mit redoxaktiven Metallionen, wie z.B. Eisen und Kupfer, unter Bildung von Metallchelaten reagieren. Auch hier gibt es strukturell große Unterschiede im Chelatisierungspotential. Durch die Chelatisierung wird der Ablauf der Fenton-Reation verhindert, wodurch der zelluläre oxidative Stress vermindert wird (van Acker *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 1998; Pietta, 2000; Silva *et al.*, 2002).

Neben der antioxidativen, schützenden Aktivität der Flavonoide wird bei höheren Konzentrationen eine prooxidative, schädigende Aktivität der Flavonoide beschrieben (Cao *et al.*, 1997; Rietjens *et al.*, 2002). Eine Phenol- oder Catecholgruppe im B-Ring wird dabei mit einer höheren prooxidativen Aktivität in Verbindung gebracht, während 3, 5, 7-Hydroxylierung und Fehlen von OH - Gruppen im B-Ring mit einer niedrigen prooxidativen Aktivität korrelieren (Heijnen *et al.*, 2002). Dem Galangin wird daher eine niedrige prooxidative Wirkung zugeschrieben (Heo *et al.*, 2001).

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Flavonoide unter oxidativen Bedingungen radikalische oder chinoide Verbindungen bilden können. Diese können dann wiederum mit SH-Gruppen von Enzymen reagieren, so dass eine Enzyminaktivierung stattfindet (Boersma *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 2002; Rietjens *et al.*, 2002).

1.3.2. Resorption und Metabolisierung

Flavonoide liegen zum überwiegenden Teil als Glykoside in Pflanzen vor. Derzeit wird angenommen, dass die Glykoside für die Resorption zunächst durch Glykosidasen oder durch Hydrolasen im oberen Dünndarm gespalten werden müssen. Die dabei entstehenden Aglykone bzw. entstehende Metaboliten werden als Wirkformen diskutiert (Abb. 1.9.).



Abb. 1.9.: Resorption und Metabolisierung der Flavonoide (schematische Darstellung) Modifiziert nach Walle (2004)

Die durch Spaltung im Darmlumen entstehenden Aglykone werden in die Enterozyten und weiter ins Blut aufgenommen (**1**). Die in die Enterozyten aufgenommenen Aglykone können allerdings auch nach Konjugation als Flavonoidglucuronide oder -sulfate über MDR-Transporter (*multi-drug-resistance associated protein*) wieder ins Darmlumen zurücktransportiert werden (**2**). Dort werden sie von der Mikroflora des Dickdarms zu CO₂ und Aglykonen metabolisiert.

Für einige Glykoside (Quercetin-4´-β-glykosid, Luteolin-7-O-β-glykosid) konnte im Gegensatz zu bisherigen Annahmen gezeigt werden, dass sie Substrate für den Na⁺- abhängigen D-Glukose-Cotransporter SGLT1 im Dünndarm sind. Das über den Cotransport in die Enterozyten aufgenommene Glykosid (**3**), kann entweder über β-Glykosidasen zum Aglykon gespalten oder über MDR auf der apikalen Seite der Intestinalzellen wieder ins Lumen ausgeschleust werden (Shimoi *et al.*, 1998). Die Art des Glykosids sowie die Stellung des Zuckers im Flavonoidmolekül spielen demnach eine entscheidene Rolle bei der Aufnahme bzw. der Zuckerspaltung (Paganga und Rice-Evans, 1997; Graefe *et al.*, 2001).

Die resorbierten Flavonoidaglykone werden in der Leber abgebaut. Die Hauptmetaboliten sind Abbauprodukte des B-Ringes. Die wichtigsten Reaktionen sind Flavonoidringspaltung, Hydroxylierung, O-Methylierung bzw. Demethylierung und Konjugation mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure. Der A-Ring wird entweder zu CO₂ oder Phloroglucinsäure abgebaut (Manach *et al.*, 1998; Spencer *et al.*, 1999; Walle *et al.*, 2001; Rechner *et al.*, 2002; Halliwell *et al.*, 2005).

In humanen Hepatozyten wird Galangin nicht nur glucuronidiert und sulfatiert, sondern auch durch CYP2C9 3-hydroxyliert (Otake *et al.*, 2002 a,b). In Studien mit Quercetin konnte gezeigt werden, dass dessen Catechol-Struktur durch COMT (Catechol-O-Methyltransferase) O-methyliert wird (Graefe *et al.*, 2001) bzw. Glucuronierungen und Sulfatierungen stattfinden.

Nach p.o. Aufnahme von Quercetin werden im Plasma von Probanden ausschliesslich konjugierte Metaboliten gefunden. Die Eliminationshalbwertzeiten variieren zwischen 11 und 28 Stunden. Luteolin liegt nach p.o. Gabe als Aglykon oder gebunden an Glucuronsäure im Plasma vor (Manach und Donovan, 2004; Manach *et al.*, 2005; Williamson und Manach, 2005). Nach p.o. Aufnahme isolierter Quercetinglykoside in Form von Pflanzenextrakten werden diese relativ gut resorbiert. Quercetinglykoside aus pflanzlichen Extrakten werden besser resorbiert (52 %) als die entsprechenden Aglyka (24 %) (Hollmann und Katan, 1999; Prior, 2003).

Da Flavonoide in der Leber stark metabolisiert werden, sind potentielle biologische Effekte der Metaboliten von grossem Interesse.

Quercetin-3-glucuronid wies z.B. eine höhere antioxidative Kapazität als Quercetin-4'-glucuronid auf (Moon *et al.*, 2001). Bei der Metabolisierung der Flavonoide finden jedoch auch Giftungsreaktionen statt: Für oxidiertes Quercetin konnte gezeigt werden, dass es an DNA oder zelluläre Proteine binden kann (Walle et al., 2003; Galati *et al.*, 2001), 3'-O-methyliertes Quercetin zeigte eine höhere Toxizität als Quercetin (Spencer *et al.*, 2003), Quercetin und Galangin können unter oxidativen Bedingungen Addukte mit SH-Gruppen bilden (Boersma *et al.*, 2002; Michels *et al.*, 2005).

1.4. Resveratrol

Resveratrol ist ein Polyphenol, das in mehr als 70 Pflanzenarten vorkommt. So wird Resveratrol z.B. in der Haut von Trauben (50-100 µg / g, Jang *et al.*, 1997), in Erdnüssen und in Beeren gefunden. Resveratrol ist ein Stilbenderivat (3,4,5´-Trihydroxy*trans*-stilben), welches UV-abhängig zu *cis*-Resveratrol isomerisieren kann. In der Pflanze erfüllt Resveratrol die Funktion eines Phytoalexins, d.h. einer niedermolekularen antimikrobiell wirkenden Verbindung, die von der Wirtspflanze synthetisiert wird und innerhalb bestimmter Wirtszellen akkumuliert, nachdem der Wirt mit Mikroorganismen in Kontakt gekommen ist.



Abb. 1.10.: Strukturformeln trans-Resveratrol (A) und cis-Resveratrol (B)

Zahlreiche pharmakologische Wirkungen konnten bisher für Resveratrol belegt werden. Resveratrol hat im Tierversuch ein antikarzinogenes Potential. Es inhibiert Tumorinitiation, -promotion und -progression. Bei Verwendung höherer Konzentrationen Resveratrol wurden *in vitro* proapoptotische Effekte gefunden (Zhou *et al.*, 2003). Es konnte z.B. in humanen Leukämiezellen für Resveratrol gezeigt werden, dass eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung von Caspase-3 stattfindet (Park *et al.*, 2001). Die proapoptotischen Effekte könnten in einer Tumorbehandlung von Nutzen sein, um die Tumorzellen durch Apoptose zu vernichten. Die genauen Mechanismen dieser tumorprotektiven Effekte von Resveratrol sind derzeit jedoch noch unklar. Als mögliche Wirkungsweise wird die Inhibition TNF-induzierter NF-κB-Aktivierung, die Aktivierung von JNK und p38, aber auch die Inhibition von ERK diskutiert (Manna *et al.*, 2000; Pervaiz, 2003).

Neben den proapoptotischen Eigenschaften sprechen anti-angiogenetische Eigenschaften von Resveratrol ebenfalls für einen Einsatz in der Tumortherapie (Dulak, 2005).

Resveratrol inhibiert den Zellzyklus in der G₂/S-Phase (Della Ragione *et al.*, 1998; Joe *et al.*, 2002; Briviba *et al.*, 2002), deshalb wird die Verwendung von Resveratrol auch in der Tumorprävention diskutiert (Stewart *et al.*, 2003).

Aufgrund seiner polyphenolischen Struktur zeigt Resveratrol auch antioxidative Eigenschaften (Yen *et al.*, 2003). Ferner wurden antiinflammatorische, antivirale und kardioprotektive Wirkungen von Resveratrol gezeigt (Palamara *et al.*, 2005). Epidemiologische Studien belegen, dass die Bevölkerung des Mittelmeerraumes ein niedrigeres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen hat, obwohl relativ fettreich gegessen und regelmässig Rotwein konsumiert wird (Stanley *et al.*, 1999). Dieses Phänomen, *french paradox* genannt, wird auf das im Rotwein vorhandene Resveratrol zurückgeführt (1,5 – 3 mg / I; Sato *et al.*, 1997; Goldberg *et al.*, 1999; Gambuti *et al.*, 2004). Verantwortlich für diese Effekte sind wahrscheinlich zum einen die Fähigkeit von Resveratrol die Aktivität von COX (Cyclooxygenase) zu hemmen, zum anderen aber auch die Hemmung der Plättchenaggregation durch Resveratrol.

1.4.1. Resorption und Metabolisierung

Resveratrol wird sehr schnell metabolisiert, jedoch konnte nur eine geringe Bioverfügbarkeit in humanen Studien gemessen werden (Walle, 2004). Nichtmetabolisiertes Resveratrol wurde nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Plasma nachgewiesen. In Ratten wurde Resveratrol 5-10 Minuten nach p.o. Gabe in Form seiner Metaboliten (Glucuronide, Sulfate) im Plasma gefunden (Yu *et al.*, 2002). Die Eliminationshalbwertzeit betrug 12-15 Minuten, die Absorptionsrate 50-75 % (Andlauer *et al.*, 2000; Soleas *et al.*, 2001).

1.5. Nahrungsergänzungsmittel

Nahrungsergänzungsmittel (NEM) sind Lebensmittel, die dazu bestimmt sind, die normale Ernährung zu ergänzen. Es sind Konzentrate von Nährstoffen (Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente) oder "sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischen oder physiologischen Wirkungen", die in dosierter Form in den Verkehr gebracht

werden (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung). Nahrungsergänzungsmittel werden in lebensmitteluntypischer Form, z.B. als Tabletten, Kapseln oder Dragees angeboten. Sie unterliegen keiner Registrierungs- oder Zulassungspflicht, lediglich einer Anzeigepflicht beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Laut der NEM-Verordnung ist es verboten, dem Verbraucher mit der Aufmachung des Nahrungsergänzungsmittels oder mit krankheitsbezogener Werbung zu suggerieren, dass ein Arzneimittel vorliegt. Da Nahrungsergänzungsmittel allerdings meist in Kapsel- oder Tablettenform abgegeben werden, hat der Verbraucher in der Regel sehr hohe Ansprüche an die Wirkung von Nahrungsergänzungsmitteln.

Derzeit sind z.B. Rotweinkapseln, Fruchtfasertabletten, Grapefruitextrakte, Apfelessigdragees, Carotintabletten, Obst- oder Gemüsepresslinge, aber auch Reinsubstanzen wie z.B. Quercetin oder Resveratrol als Nahrungsergänzungsmittel sowohl über das Internet als auch z.T. in Apotheken erhältlich. Hierdurch soll dem Verbraucher die Möglichkeit der gezielten Ergänzung seiner Ernährung gegeben werden.

Ein Problem der meisten Nahrungsergänzungsmittel ist, dass im Gegensatz zu Arzneimitteln nicht das Extraktionsverfahren angegeben werden muss. Es bleibt also unklar, ob z.B. die deklarierten Polyphenole auch wirklich quantitativ isoliert werden konnten. Ferner muss berücksichtigt werden, dass eine Einzelstoffgabe nicht die Wirkungen des Gemüses oder Obstes mit einer Vielzahl an Inhaltsstoffen haben kann.

Ein weiteres Problem der sog. *"nutraceuticals"* besteht darin, dass die Dosis der eingesetzten Stoffe z.T. sehr hoch ist. Dies ist möglich, da die Nahrungsergänzungsmittel nicht dem Arzneimittelgesetz, sondern lediglich dem Lebensmittelgesetz unterliegen. Im Gegensatz zu Arzneimitteln entfällt daher für Nahrungergänzungsmittel die konsequente toxikologische Testung. Lediglich auf der Verpackung angegebene Wirkungen des Inhaltsstoffes müssen durch Studien belegt werden. Für einige Stoffe, wie z.B. Flavonoide, Vitamin E oder Betacarotin sind allerdings toxische Effekte höherer Dosen in Tierversuchen beschrieben worden (Bast *et al.*, 2002).

Auch beim Menschen sind die Auswirkungen von Nahrungsergänzungsmitteln auf die Gesundheit nicht immer vorhersehbar bzw. protektiv. In der ATBC-Studie (α -*tocopherol, B-carotene cancer prevention*), die 1985-1993 in Finnland durchgeführt wurde, sowie der CARET-Studie (*carotene and retinol efficacy trial*), die 1996 in den USA gestartet wurde, sollte ein Schutzeffekt von Betacarotin (20 mg / d, ATBC bzw.

30 mg / d, CARET) und DL- α -Tocopherolacetat (50 mg / d, ATBC) bzw. Retinolpalmitat (25000 IU / d, CARET) u.a. gegenüber Lungenkarzinomen und kardiovaskulären Erkrankungen bei besonders belasteten Personen (Rauchern) nachgewiesen werden. Die ATBC-Studie wurde 1999 nach 6-jährigem *follow-up* beurteilt. Dabei ergab sich, dass für die Supplemente keine Schutzwirkungen gegenüber Schlaganfall (Leppälä *et al.*, 2000), Blasenkrebs (Virtamo *et al.*, 2000), Parnkreaskrebs (Rautalahti *et al.*, 1999) und kardiovaskulären Erkrankungen (Törnwall *et al.*, 2004) gezeigt werden konnten. Hingegen muss davon ausgegangen werden, dass kardiovaskuläre Ereignisse und Lungenkarzinome vermehrt bei Rauchern bei Einnahme von Betacarotin und / oder DL- α -Tocopherolacetat auftreten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die CARET Studie, sie musste wegen des vermehrten Auftretens von Lungenkarzinomen und kardiovaskulären Ereignissen der an der Studie beteiligten Raucher vorzeitig beendet werden (Goodman *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 2004; Fiala *et al.*, 2005).

Obwohl das BfR (Bundesamt für Risikobewertung, Stellungnahme am 8. März 2005) derzeit einen Tagesbedarf von 2 mg Betacarotin in isolierter Form für Nahrungsergänzungsmittel empfielt, sind Nahrungsergänzungsmittel mit 10-20 mg pro Tagesdosis im Handel.

1.5.1. Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel

Aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide werden diese sowohl in Nahrungsergänzungs- als auch in Arzneimitteln verwendet.

Flavonoide sind z.B. in Sojazubereitungen oder Rotkleepräparaten in Nahrungsergänzungsmitteln mit z.T. sehr hohen Flavonoidkonzentrationen zu finden. Ausserdem findet oft eine kombinierte Gabe mit z.B. Vitamin E oder Vitamin C statt, um eine Verstärkung der protektiven Effekte zu erreichen, aber auch um technisch die Stabilität der Zubereitungen zu erhöhen. Mögliche Interaktionen der in hochdosierten Kombinationspräparaten verwendeten Stoffe sind noch zu untersuchen. Ferner sollten die prooxidativen Effekte der Flavonoide in Betracht gezogen werden (Mennen *et al.*, 2005).

1.5.2. Nahrungsergänzungsmittel und Arzneimittel

Bei der Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln müssen auch Wechselwirkungen mit Arzneimitteln berücksichtigt werden. Meist handelt es sich um Stoffwechsel- oder

Transport-Interaktionen. Zu nennen sind hier Interaktionen mit Glypoprotein P (PgP) oder MDR, aber auch mit dem Cytochrom P450 System (CYP), welches Fremdstoffe oxidativ metabolisiert. So konnte z.B. für Konzentrate aus Sojabohnen gezeigt werden, dass sie die CYP Enzymaktivität in Ratten induzieren (Ronis et al., 2004), wenn auch bisher nicht geklärt werden konnte, ob die enthaltenen Isoflavone Genistein und Daidzein für den Effekt verantwortlich sind (Kishida et al., 2004). Die Einnahme von sojahaltigen Nahrungsergänzungsmitteln an Stelle einer Hormonersatztherapie mit Estrogenen / Gestagenen während der Menopause der Frau findet nach Bekanntwerden der Nebenwirkungen einer Hormonersatztherapie immer häufiger statt (WHI Studie (Women's health initiative) Anderson et al., 2004 a,b; Wylie-Rosett, 2005). Wechselwirkungen mit Arzneimitteln können auch schon bei der Einnahme von Grapefruitsaft auftreten (Bailey et al., 1998). Durch den inhibitorischen Einfluss der darin vorhandenen Flavonoide (Naringin, Naringenin) und Psoralene (Furocumarinderivate) auf die CYP3A4 Familie kann es zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen der verabreichten Arzneimittel kommen, da die Metabolisierungsrate der Arzneistoffe durch Inhibition der Enzyme gesenkt wird. Vor allem bei Substanzen mit geringer therapeutischer Breite (z.B. Digoxin, Nifedipin, Phenytoin, Theophyllin) kann es zu toxischen Arzneimittelinteraktionen kommen.

1.6. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten zum einen protektive Effekte sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf oxidativ vermittelte Zellvorgänge und zum anderen der Einfluss höherer Konzentrationen auf Zellviabilität und apoptotische Vorgänge in H4IIE Rattenhepatomzellen und C6 Rattengliomzellen untersucht werden.

Hierzu sollte zunächst die Aufnahme und Metabolisierung der Flavonoide Luteolin, Quercetin und Galangin sowie des Stilbenderivats Resveratrol in H4IIE und C6 Zellen charakterisiert werden.

Als Modell für oxidativ vermittelte Zellvorgänge wurde die Induktion der MnSOD durch H₂O₂ und die Aktivierung der MAPK durch H₂O₂ untersucht. Im Folgenden sollte das antioxidative Enzym MnSOD durch H₂O₂ induziert werden, um mögliche Effekte der Polyphenole auf die Expression der MnSOD zu zeigen. Ferner sollten die MAPK JNK, ERK und p38 durch oxidativen Stress aktiviert werden, um auch hier die

Einflüsse der Polyphenole zu untersuchen. Des Weiteren sollte das antioxidative Potential *in vitro* als auch protektive Effekte der Flavonoide in zellulären Systemen gegenüber H_2O_2 im *Comet* Assay und mittels der Fluoreszenzsonden H_2DCF -DA und H_2Rh123 gezeigt werden.

Die Effekte höherer Polyphenolkonzentrationen auf die Zellviabilität sollten zunächst im Neutralrot Assay analysiert werden. Danach sollte untersucht werden, ob die Zytotoxizität über Induktion von Apoptose vermittelt wird (DNA-Leiter Experimente, Caspaseaktivitätsmessungen und Bestimmungen der Chromatinkondensation).

Darüberhinaus sollte der Einfluss der zu untersuchenden Substanzen auf die Aktivität der GST sowie die Reaktivität mit SH-Gruppen unter oxidativen Bedingungen untersucht werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch Metabolisierung (Methylierung) von Flavonoiden eine Inaktivierung bewirkt wird, oder ob die Metaboliten noch pharmakologische Effekte bewirken. Hierfür standen die Luteolinderivate Luteolindimethylether und Luteolintetramethylether zur Verfügung.
2. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit ist in drei Abschnitte unterteilt: Im ersten Abschnitt wird die zelluläre Aufnahme und Metabolisierung der Polyphenole dargestellt (HPLC Messungen, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen).

Im zweiten Teil wird der Einfluss der Polyphenole auf oxidativ vermittelte Vorgänge in der Zelle gezeigt. Zum einen werden die antioxidative Kapazität der Polyphenole und ihre protektiven Wirkungen gegenüber H_2O_2 -induzierter DNA-Schädigung, zum anderen der modulierende Effekt von Polyphenolen auf die H_2O_2 - vermittelte Induktion intrazellulärer Signalkaskaden (NF- κ B, MAPK) und antioxidativer Enzyme (MnSOD) untersucht.

Der dritte Abschnitt stellt intrinsische Effekte der Polyphenole in höheren Konzentrationen dar. Es wurden Viabilitätstests, *Comet*-Assay, Lipidperoxidationsmessungen und Apoptosenachweise im Zellsystem durchgeführt. Ferner werden mechanistische Untersuchungen zur Erklärung der toxischen Effekte von Polyphenolen *in vitro* geschildert (GST-Aktivitätsmessung).

2.1. Zelluläre Aufnahme der Polyphenole

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Polyphenole in die Zellen aufgenommen werden. Dazu wurde zum einen ein Zeitverlauf der intrazellulären Konzentration (0,5 bis 8 bzw. 24 h) mittels HPLC gemessen und zum anderen die Lokalisation der Polyphenole im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.1.1. Zeitverlauf

Die Analyse der intrazellulären Konzentration der Polyphenole ergab, dass sowohl H4IIE als auch C6 die Stoffe rasch (30 min) aufnehmen. Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien sind erstens in der aufgenommenen Menge und zweitens im zeitlichen Verlauf zu sehen.

H4IIE nehmen die Polyphenole schnell auf, jedoch sinkt die intrazellulär nachzuweisende Menge des Polyphenols innerhalb von 4 h ab.

Auch C6 nehmen die Polyphenole rasch auf, jedoch in wesentlich höheren Mengen als dies für H4IIE der Fall ist. Die nach 30 Minuten intrazellulär nachzuweisende Menge Quercetin bzw. Resveratrol sind für C6 um den Faktor 2-6 höher als für H4IIE. Die nachzuweisenden Mengen Galangin bzw. Luteolin liegen sogar um das 4-40fache höher als für H4IIE.

Für C6 ist kein Absinken der intrazellulären Konzentration der Polyphenole zu messen, was darauf hindeutet, dass im Gegensatz zu H4IIE in den C6 keine Metabolisierung stattfindet.





Abb. 2.1.: Zelluläre Aufnahme der Polyphenole, Zeitverlauf

Die Zellen wurden mit den Polyphenolen (100 μ M) inkubiert, lysiert und in der HPLC gemessen. *p<0,05 vs. 0,5 h Wert, SEM, Analyse-it / ANOVA

- A H4IIE, n=3-4
- B C6, n=3-4
- C C6 mit Serumentzug, n=3-4

2.1.2. Metabolitenanalyse

Im Folgenden sollten die entstehenden Metaboliten für H4IIE und C6 untersucht werden. Hier sind zunächst exemplarisch die HPLC-Chromatogramme zu 2.1.1. nach einer 60-minütigen Inkubation dargestellt. Die Retentionszeiten der jeweiligen Muttersubstanzen sind zur Verdeutlichung hervorgehoben. Die Spektren der Resveratrolinkubation weisen je einen Peak für *cis*- und *trans*-Resveratrol auf.

Es zeigt sich, dass vor allem in den H4IIE polare Metaboliten entstehen. Dies unterstützt die vorherige These, dass die Abnahme der intrazellulär messbaren Menge Polyphenol aufgrund von Metabolisierungen abnimmt. Andererseits kann belegt werden, dass insgesamt die Höhe der Peaks für C6 und damit die Menge aufgenommenen Polyphenols größer ist als für H4IIE.

Für Galangin zeigten die Ergebnisse des Zeitverlaufs (Abb. 2.1.B) eine Akkumulation in C6. Anhand der HPLC Spektren kann gezeigt werden, dass C6 keine messbaren Metaboliten nach Galangininkubation aufweisen.



<u>A) H4IIE</u>





C) C6 mit Serumentzug



C6 mit Serumentzug



Abb. 2.2.: HPLC-Chromatogramme

H4IIE und C6 wurden 60 Minuten mit 100 μ M des jeweiligen Polyphenols inkubiert und mittels HPLC die aufgenommene Menge Polyphenol sowie entstandene Metaboliten ausgewertet. Gezeigt sind die HPLC-Chromatogramme bei 254 nm, die zugehörigen UV-Spektren der Substanzen zeigten flavonoid-ähnliche Strukturen, werden hier jedoch nicht dargestellt. Die unterschiedlichen Retentionszeiten der Muttersubstanzen ergeben sich durch das Verwenden unterschiedlicher HPLC-Säulen. n=3.

- A H4IIE
- B C6
- C C6 mit Serumentzug

Um die metabolischen Vorgänge näher zu untersuchen, wurden HPLC-MS-MS Messungen durchgeführt. Sowohl für Quercetin als auch für Luteolin konnten dadurch anhand der Molekulargewichte Glucuronide als Metaboliten identifiziert werden.

2.1.3. Intrazelluläre Verteilung der Polyphenole

Die Aufnahme der Polyphenole in die Zellen wurde außer durch Quantifizierung ihrer intrazellulären Konzentrationen in der HPLC auch mikroskopisch analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit den Polyphenolen (100 μ M, 1 h) inkubiert und danach im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Sowohl bei den H4IIE als auch bei den C6 (mit bzw. ohne Serumentzug; hier dargestellt: C6 ohne Serumentzug) konnte eine zelluläre Aufnahme der Polyphenole fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Quercetin in H4IIE und C6 (mit bzw. ohne Serumentzug), sowie Resveratrol in H4IIE Verteilung über die gesamte Zelle zeigt, die anderen Polyphenole im Gegensatz dazu eher cytosolisch lokalisiert sind.

	H4IIE Zellen	Fluoreszenzlicht (Excitation 475 nm,
	Durchlicht	Emission 535 nm)
DMSO		
Quercetin		
Luteolin	A THE ST	
Galangin	Tour and	
Resveratrol		

	C6 Zellen	Fluoreszenzlicht (Excitation 475 nm,
	Durchlicht	Emission 535 nm)
DMSO		
Quercetin		
Luteolin		
Galangin		
Resveratrol		

Abb. 2.3.: Intrazelluläre Verteilung der Polyphenole H4IIE bzw. C6 wurden 1 h mit Polyphenolen (100 μ M) inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop un-tersucht. Die Abbildungen zeigen je ein Beispiel aus mehreren durchgeführten Versuchen. n=3

2.2. Einfluss von Polyphenolen auf oxidativ vermittelte Vorgänge in der Zelle

2.2.1. Antioxidative Kapazität

2.2.1.1. Antioxidative Kapazität in vitro (TEAC Assay)

Zur Messung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole wurde der *trolox equivalent antioxidative capacity* (TEAC) Assay durchgeführt. Dieser *in vitro* Assay dient zur Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Substanzen. Hierbei wird die Reduktion des stabilen tiefgrün gefärbten Radikals ABTS⁻ durch antioxidative Stoffe zum farblosen ABTS photometrisch gemessen. Als Referenzsubstanz für die antioxidative Kapazität wird das synthetische Vitamin E – Derivat Trolox verwendet.

Die gemessenen Absorptionswerte sanken bei Verwenden von 10 µM Trolox auf ca. 50 %. Es wurden sowohl die Flavonoide Quercetin, Luteolin und Galangin als auch das Stilbenderivat Resveratrol im Vergleich zu Trolox gemessen (Abb. 2.4.). Man sieht, dass Quercetin eine höhere antioxidative Kapazität als Trolox aufweist. Die anderen Polyphenole haben eine dem Trolox vergleichbare antioxidative Kapazität.





Abb. 2.4.: Antioxidative Aktivität der Polyphenole in vitro (TEAC Assay)

Zur Bestimmung der *trolox equivalent antioxidant capacity* wurden die Polyphenole mit einer ABTS-Radikal-Lösung versetzt und die Absorption nach 2,5 Minuten gemessen. In den Graphiken für die Polyphenole ist die Absorption von Trolox zur besseren Vergleichbarkeit als gestrichelte Linie gezeigt. x±SEM, n=3-7, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

A Trolox, n=7

- B Quercetin, n=4
- C Luteolin, n=3
- D Galangin, n=3
- E Resveratrol, n=3

Die Messung der Absorption erfolgte 2,5 Minuten nach Zugabe der ABTS-Radikal-Lösung zu der Lösung des Antioxidans. Dieses Zeitinterval wurde gewählt, da innerhalb der ersten 90 Sekunden nach Mischen der beiden Lösungen die Absorption z.T. noch starken Schwankungen unterworfen ist. Nach 2,5 Minuten sind die Absorptionswerte relativ stabil und wurden für den Assay verwendet (van den Berg *et al.*, 1999; Rice-Evans, 2000).

2.2.1.2. Antioxidative Effekte von Polyphenolen im Zellsystem

Um die antioxidative Kapazität der Polyphenole in zellulären Systemen zu analysieren, wurden die beiden Substanzen H₂DCF-DA und H₂Rh123 verwendet. Nach Spaltung durch Esterasen liegen in den Zellen aktive Fluoreszenzsonden vor, die mit reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle reagieren. Hierbei entstehen fluoreszente Verbindungen, deren Fluoreszenzintensität gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole wurden H4IIE und C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) mit den zu untersuchenden Substanzen vorinkubiert (10 μ M, 1 h), bevor H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen als ROS-Quelle dazu gegeben wurde. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität, wobei eine erniedrigte Fluoreszenz eine niedrigere intrazelluläre Konzentration der ROS bedeutet.

A) H₂DCF-DA Assay

Die Ergebnisse der Versuche mit H4IIE (Abb. A) zeigen im H₂DCF-DA Assay eine Erniedrigung der intrazellulären ROS-Konzentration nach Vorinkubation mit 10 μ M Quercetin, Luteolin oder Resveratrol. Diese Polyphenole haben im Gegensatz zu Galangin eine Schutzwirkung vor oxidativem Stress für die Zelle.

Auch die endogene ROS-Produktion (keine H₂O₂ Zugabe) wurde durch Quercetin, Luteolin und Resveratrol, jedoch nicht durch Galangin in H4IIE signifikant reduziert.





Abb. 2.5.: Protektive Wirkung von Polyphenolen auf die intrazelluläre ROS Konzentration (H₂DCF-DA Assay)

Die Zellen wurden 1 h mit 10 µM der jeweiligen Polyphenole vorinkubiert. Anschliessend wurde H_2O_2 (100 – 1000 µM) hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität von DCF ist ein Maß für die Fähigkeit der Polyphenole, die durch H_2O_2 Zugabe entstehenden ROS zu inaktivieren. Angegeben sind relative Fluoreszenzeinheiten, x±SEM, n=3-8, *p<0,05 vs. H_2O_2 , Analyse-it /ANOVA

- A H4IIE, n=3-6
- B C6, n=3-6
- C C6 mit Serumentzug, n= 3-8

Die schützende Wirkung der Polyphenole konnte in C6 (Abb. B, C) ebenfalls gezeigt werden, wobei auch Galangin in C6 im Gegensatz zu H4IIE eine schützende Wirkung zeigt. Die Resveratrol vermittelten protektiven Effekte in C6 (Abb. B) sind nur schwach ausgeprägt. Die endogene ROS Produktion (keine H₂O₂ Zugabe) wird in C6 jedoch nur durch Quercetin und Luteolin beeinflusst.

B) H₂Rh123 Assay

Im H₂Rh123 Assay wurde ebenfalls eine Protektion durch Quercetin gegenüber der endogenen ROS-Produktion der Zelle gemessen (H4IIE). Die Vorinkubation der Zellen zeigte eine protektive Wirkung von Quercetin, Luteolin und Resveratrol gegenüber H₂O₂ -induzierter ROS-Bildung. Im Gegensatz zu den anderen Polyphenolen zeigt Galangin wie auch im H₂DCF-DA Assay keine protektive Wirkung.

Bei der Untersuchung der C6 (Abb. B) zeigte sich ein den H4IIE ähnliches Ergebnis: Quercetin, Luteolin und Resveratrol zeigen antioxidative Effekte auch gegen eine endogene ROS Produktion, wohingegen Galangin keine Protektion gegenüber H₂O₂ vermittelt.

Das Ergebnis des H₂Rh123 Assays der C6 Zellen mit Serumentzug (Abb. C) zeigte antioxidative Eigenschaften der verwendeten Polyphenole, wobei nur Resveratrol hier die endogene ROS Produktion beeinflussen kann.







С

В



Abb. 2.6.: Protektive Wirkung von Polyphenolen auf die intrazelluläre ROS Konzentration (H₂Rh123 Assay)

Die Zellen wurden 1 h mit 10 μ M der jeweiligen Polyphenole vorinkubiert. Anschliessend wurde H₂O₂ (100 – 1000 μ M) hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität von Rh123 ist ein Maß für die Fähigkeit der Polyphenole, die durch H₂O₂ -Zugabe entstehenden ROS zu inaktivieren. Angegeben sind relative Fluoreszenzeinheiten, x±SEM, n=3-8, *p<0,05 vs. H₂O₂, Analyse-it /ANOVA

- A H4IIE, n=3
- B C6, n=3-6
- C C6 mit Serumentzug, n=3-8

2.2.2. Protektion gegenüber H₂O₂-induzierten DNA Strangbrüchen (Comet-Assay)

Um die protektiven Effekte von Luteolin gegenüber ROS-induzierten DNA Strangbrüchen herauszuarbeiten, wurden H4IIE mit Luteolin (50 μM) eine Stunde vor der H₂O₂ Zugabe (500 µM, 2 h) inkubiert. Die Zellen wurden in der Einzelzellgelelektrophorese ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation mit Luteolin den durch H₂O₂ ausgelösten DNA Schaden reduzieren kann.



В

С



Abb. 2.7.: Protektion gegenüber H₂O₂ -induzierten DNA Strangbrüchen

H4IIE wurden mit Luteolin (1 h, 50 μM) vor einer Inkubation mit H₂O₂ (500 μM, 2 h) inkubiert. DNA Strangbrüche wurden mittels Comet-Assay analysiert. Gezeigt ist die Kometenlänge in µm. x±SEM, n=3-6, [#]p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA, *p<0,05 vs. H₂O₂ 500 μM, ANOVA

- H4IIE, Einzelzellgelelektrophorese, n=3-6 А
- В repräsentatives Bild der Kontrollzellen
- С repräsentatives Bild der mit H₂O₂ (500 µM, 2 h) inkubierten Zellen
- D repräsentatives Bild mit Luteolin (50 µM, 1 h) vor H₂O₂ Zugabe vorinkubierter Zellen

2.2.3. Modulation der H_2O_2 -induzierten MnSOD Induktion durch Polyphenole

Die MnSOD ist ein antioxidatives Enzym in den Mitochondrien, welches die Zellen vor oxidativem Stress schützt, indem sie die Disproportionierung des O_2^{\bullet} zu O_2 und H_2O_2 katalysiert.

Es sollte zunächst eine Induktion der Expression der MnSOD durch H₂O₂ oder LPS erzielt werden, um im Anschluss eine mögliche Modulation dieses Effektes mit Flavonoiden zu untersuchen.

Die Expression der MnSOD wurde auf RNA-Ebene (RT-PCR) in H4IIE und C6 sowie auf Proteinebene (Westernblot) in C6 analysiert.

A) RT-PCR

Es konnte in H4IIE nach einer 24-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ (250, 500, 1000, 2500 μ M) keine Induktion der MnSOD Expression gezeigt werden. Ferner wurde eine 8-stündige Inkubationszeit ausgetestet, wobei auch hier keine Induktion der MnSOD mit H₂O₂ (100, 300, 500 μ M) oder LPS (10 μ g / ml) gezeigt werden konnnte.

A







Die MnSOD Expression wurde auch in C6 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 (250, 500, 1000 μ M) untersucht (Abb. 2.9.). Es konnte weder in C6 (Abb. A) noch in C6 mit Serumentzug (Abb. B) eine Induktion der MnSOD Expression gezeigt werden.

C6 wurden ferner mit LPS (10 μ g / ml) inkubiert, jedoch konnte auch hier keine Induktion der MnSOD Expression auf der Ebene der RNA erzielt werden (Abb. A).

В



В

Α





C6 wurden 24 h mit H₂O₂ bzw. LPS inkubiert. Die Expression der MnSOD wurde mit der RT-PCR gemessen. x±SEM, n=3-4, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A C6, 24 h
- B C6 mit Serumentzug, 24 h

B) Westernblot

Für die Untersuchung der Proteine im Westernblot wurden C6 (mit Serumentzug) verwendet und 6 bis 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 (bzw. LPS und PMA als weitere Induktoren) inkubiert. Ebenso wurden Inkubationen mit Quercetin oder Luteolin durchgeführt. Es konnte jedoch lediglich bei einer 24-stündigen Inkubation mit 100 µg / ml LPS eine moderate signifikante Induktion der MnSOD gezeigt werden (Abb. A).



 H_2O_2 LPS Quercetin Luteolin







Abb. 2.10.: Induktion der MnSOD (C6 mit Serumentzug)

C6 wurden 24 h bzw. 8 h mit den angegebenen Substanzen inkubiert und anschliessend die Expression der MnSOD im Westernblot untersucht. x±SEM, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A C6 mit Serumentzug, 24 h Inkubation, n=7 (H₂O₂, LPS), n=3 (Quercetin, Luteolin)
- B C6 mit Serumentzug, 8 h Inkubation, n=2-3

2.2.4. H₂O₂ vermittelte NF-кВ Induktion

Es sollte eine oxidativ vermittelte Aktivierung von NF- κ B und daraus resultierende Translokation aus dem Cytosol in den Kern gezeigt werden. H₂O₂ (100-300 μ M, 45 min) aktivierte jedoch in C6 Zellen (mit Serumentzug) NF- κ B nicht, während die Aktivierung durch LPS sowohl im Westernblot als auch im ELISA nachgewiesen werden konnte.

A) Westernblot



Abb. 2.11.: Aktivierung von NF-kB in C6 Zellen (mit Serumentzug)

Die Zellen wurden 45 Minuten mit verschiedenen H₂O₂ Konzentrationen bzw. LPS inkubiert und die Proteine der Cytosolfraktion und der Kernfraktion getrennt voneinander aufgetragen. Die Aktivierung von NF-kB wurde im Westernblot untersucht. n=3.

B) ELISA





C6 (mit Serumentzug) wurden 45 Minuten mit H_2O_2 (100 – 300 μ M) bzw. LPS (10 μ g / ml) inkubiert und die Proteine des Cytosols und des Kerns mittels Zellfragmentation getrennt. Die Aktivität von NF- κ B wurde im ELISA untersucht. n=3, x±SEM, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA.

2.2.5. H₂O₂ vermittelte MAPK Aktivierung

Im Folgenden wurde versucht, die drei MAPK p38, ERK1/ERK2 und JNK mit H_2O_2 zu aktivieren, um modulierende Effekte einer Vorinkubation mit Polyphenolen (25 μ M, 50 μ M) auf die Aktivierung untersuchen zu können.

P38 konnte mit H₂O₂ aktiviert werden, ferner konnte die Aktivierung durch Vorinkubation mit Luteolin reduziert werden.

Die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 konnte ebenfalls mit H_2O_2 ausgelöst werden. Hier zeigte die Vorinkubation mit Galangin und Resveratrol (50 μ M) eine Reduktion der oxidativ vermittelten Aktivierung.

JNK konnte in C6 nicht mit H_2O_2 aktiviert werden.

<u>A) pp38 / p38</u>

Die Phosphorylierung von p38 ist durch H_2O_2 (3 h, 500 µM) in C6 Zellen (mit Serumentzug) aktivierbar. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass diese nach Vorinkubation mit Luteolin weniger ausgeprägt war. Die densitometrische Auswertung zeigt die Aktivierung von pp38 bezogen auf die obere unspezifische Bande. Es konnte nicht auf die p38-Bande normiert werden, da die Kontrollbande von pp38 nicht auf 100 % gesetzt werden konnte, was für diese Auswertemethode nötig gewesen wäre. Dargestellt sind daher exemplarisch je ein pp38 und ein p38-Blot.



K H₂O₂ +Quer. +Lut. +Gal. +Resv. 25 μ M

←p38

K H₂O₂ +Quer. +Lut. +Gal. +Resv. $25 \,\mu\text{M}$



Abb. 2.13.: Aktivierung von pp38

C6 mit Serumentzug wurden 3 h mit H2O2 (500 µM) bzw. wurde vor der H2O2 Zugabe eine Vorinkubation mit 25 µM Polyphenol (1 h) durchgeführt. Die Expression von pp38 und p38 wurde im Westernblot ausgewertet. n=3, x±SEM, *p<0,05 vs. H₂O₂, ANOVA

(unspezifische Bande)

B) pERK / ERK

Die Aktivierung von pERK konnte durch Inkubation mit H₂O₂ (750 µM, 2 h) in C6 Zellen mit Serumentzug gemessen werden. Eine Vorinkubation mit Resveratrol und Galangin reduzierte die H₂O₂ aktivierte pERK2-Expression. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Westernblotanalysen, die pERK-Banden sind jeweils auf die ERK-Banden normiert.





Abb. 2.14.: Auswertung Westernblot pERK und ERK

C6 mit Serumentzug wurden 60 min mit Polyphenolen und 2 h H_2O_2 750 μ M oder nur mit H_2O_2 inkubiert und im Westernblot die Expression von pERK und ERK gemessen. n=3, x±SEM, *p<0,05 vs. Kontrolle, [#]p<0,05 vs. H₂O₂, Analyse-it / ANOVA.

C) pJNK / JNK

Die Phosphorylierung von pJNK ist in C6 Zellen (mit Serumentzug) nicht durch H_2O_2 (500 μ M, 0,5 – 8 h) aktivierbar. Es konnte lediglich eine konstante basale Expression von JNK gezeigt werden.



Abb. 2.15.: Westernblot pJNK und JNK

C6 mit Serumentzug wurden mit 500 μ M H₂O₂ (0,5 – 8 h) inkubiert und im Westernblot ausgewertet. n=3.

2.3. Intrinsische Effekte der Polyphenole

2.3.1. Viabilitätsassays

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen nach Inkubation mit Polyphenolen wurde der Neutralrot Assay verwendet. Zunächst wurden H4IIE 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Polyphenol bzw. H₂O₂ inkubiert und dann die Neutralrotaufnahme (Absorption 540 nm) als Maß für die Viabilität bestimmt. Folgende EC₅₀ -Werte wurden für H4IIE bestimmt: Quercetin 120 ± 0,04 μ M, Luteolin 95 ± 0,079 μ M, Galangin 120 ± 0,123 μ M, Resveratrol 75 ± 0,047 μ M und H₂O₂ 220 ± 0,04 μ M.



Abb. 2.16.: Neutralrot Assay H4IIE, Konzentrationsverlauf

H4IIE wurden für 24 Stunden mit variablen Konzentrationen an Polyphenolen bzw. H_2O_2 inkubiert. Angegeben sind die Absorptionswerte bei 540 nm als Maß für die zelluläre Neutralrotakkumulation. x±SEM, n=3-4, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A H4IIE, Quercetin, n=3
- B H4IIE, Luteolin, n=4
- C H4IIE, Galangin, n= 3
- D H4IIE, Resveratrol, n=4
- E H4IIE, H_2O_2 , n=4

Ferner wurde eine Zeitreihe aufgenommen, bei der die H4IIE Zellen mit verschiedenen Polyphenolen (100 μ M) bzw. H₂O₂ (250 μ M) bis zu 24 Stunden inkubiert wurden. Die Fähigkeit zur Neutralrotakkumulation der Zellen sinkt bei einer Inkubation mit Quercetin nach 3 h signifikant ab, hingegen bei Luteolin und Resveratrol erst nach 8 h. Nach Inkubation mit H₂O₂ sinkt die Fähigkeit zur Neutralrotakkumulation schon nach 1 h.



Abb. 2.17.: Neutralrot Assay H4IIE, Zeitverlauf

H4IIE wurden für bis zu 24 Stunden mit Polyphenolen (100 μ M) bzw. H₂O₂ (250 μ M) inkubiert. Die Absorption bei 540 nm ist als Maß für die zelluläre Neutralrotakkumulation gezeigt. x±SEM, n=4-7, *p< 0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A H4IIE, Quercetin, n=6
- B H4IIE, Luteolin, n=7
- C H4IIE, Resveratrol, n=4
- D H4IIE, H₂O₂, n=4

Der Neutralrot Assay wurde ebenfalls für C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) durchgeführt. Zunächst sind hier die Ergebnisse des Neutralrot Assays für C6 dargestellt.

Die Zellen wurden 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Polyphenole inkubiert. Es wurden folgende EC_{50} -Werte bestimmt: Quercetin 120 ± 0,124 µM, Luteolin 70 ± 0,044 µM, Galangin 20 ± 0,146 µM, Resveratrol 150 ± 0,078 µM.



Abb. 2.18.: C6, Konzentrationsverlauf

C6 wurden für 24 Stunden mit Polyphenolen inkubiert. Die Kontrolle stellt eine DMSO Inkubation für 24 Stunden dar. Die Absorption bei 540 nm ist als Maß für die zelluläre Neutralrotakkumulation gezeigt. x±SEM, n=4-6, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A C6, Quercetin, n=6
- B C6, Luteolin, n=6
- C C6, Galangin, n=4
- D C6, Resveratrol, n=6

Ebenso wurden für C6 Zeitverläufe aufgenommen, wobei die Zellen für bis zu 24 h mit Quercetin (100 μ M), Luteolin (100 μ M), Resveratrol (100 μ M) oder H₂O₂ (250 μ M) inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigen für Quercetin bereits nach 1 h eine signifikante Abnahme der Viabilität, für Luteolin und H₂O₂ ist dies nach 3 h Inkubation nachweisbar. Bei der Inkubation mit Resveratrol ist erst nach 8 h ein signifikanter Effekt zu messen.



Abb. 2.19.: Viabilitätsassay, Zeitverlauf, C6

C6 wurden für bis zu 24 Stunden mit Polyphenolen (100 μ M) bzw. H₂O₂ (250 μ M) inkubiert. Die Absorption bei 540 nm dient als Maß für die zelluläre Neutralrotakkumulation. x±SEM, n=4-7, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A C6, Quercetin 100 μM, n=4-5
- B C6, Luteolin 100 μM, n=7
- C C6, Resveratrol 100 μM, n=6
- D C6, H₂O₂ 250 μM, n=4

ERGEBNISSE

Während die C6 im 96er Well gemessen werden konnten, mussten für die Zellen mit Serumentzug aufgrund des Mediumwechsels 24-Well-Platten verwendet werden. Die Ergebnisse dieser 24-Well-Neutralrot Assays der C6 befinden sich im Anhang (mit bzw. ohne Serumentzug). Die EC₅₀ -Werte der C6 zeigen Abweichungen von den EC₅₀ -Werten der Versuche mit 96-Well-Platten. Es ergeben sich für C6 folgende EC₅₀ -Werte für 24-Well-Platten: Quercetin 160 \pm 0,1 μ M, Luteolin 50 \pm 0,113 μ M, Galangin 70 ± 0,166 μ M, Resveratrol 130 ± 0,158 μ M, H₂O₂ 170 ± 0,16 μ M. Für C6 mit Serumentzug wurden folgende Werte bestimmt: Luteolin 50 \pm 0,024 μ M, Galangin 40 ± 0,057 μ M, Resveratrol 90 ± 0,05 μ M und H₂O₂ 170 ± 0,043 μ M. Für Quercetin (C6 mit Serumentzug) kann kein EC₅₀ -Wert angegeben werden. Bis zu einer Konzentration von 100 µM Quercetin ändert sich nach 24-stündiger Inkubation die Fähigkeit zur Neutralrotaufnahme nicht. Jedoch zeigte die lichtmikroskopische Betrachtung der inkubierten Zellen nadelförmige Kristalle. Spätere Löslichkeitsversuche belegten, dass Quercetin in FCS-freiem Medium nur bis zu einer Konzentration von ca. 70 µM löslich ist. Bei diesen Versuchen wurde Quercetin in FCS-freiem und FCS-haltigem Medium in Konzentrationen von 10 µM

bis 100 μ M gelöst und die Absorption bei 375 nm gemessen. Es zeigte sich lediglich bis zu einer Konzentration von 70 μ M eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und gemessener Absorption in FCS-freiem Medium.

2.3.2. Induktion von DNA Strangbrüchen durch Polyphenole (*Comet*-Assay)

Der *Comet*-Assay ist ein Genotoxizitätstest, der eine Untersuchung von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur in einzelnen Zellen ermöglicht.

Der *Comet*-Assay wurde in H4IIE durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Luteolin (100 μ M, 2 h) und Resveratrol (100 μ M, 2 h) die Bildung von Kometen (DNA-Schäden) induzieren.



С





Abb. 2.20.: Induktion von DNA Strangbrüchen durch Luteolin, Resveratrol

H4IIE wurden 2 h mit Luteolin bzw. Resveratrol inkubiert und danach die Induktion von DNA Strangbrüchen im *Comet*-Assay analysiert. Dargestellt ist die Kometenlänge in μm. x±SEM, n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A H4IIE, Luteolin, n=3
- B H4IIE, Resveratrol, n=3
- C H4IIE, repräsentatives Bild der Kontrollzellen
- D H4IIE, repräsentatives Bild der mit Luteolin inkubierten Zellen

2.3.3. Induktion der Lipidperoxidation durch Polyphenole (MDA-Assay)

Als Maß für die Lipidperoxidation wurde MDA als Endprodukt der Fettsäureoxidation nach Inkubation mit Polyphenolen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Luteolin (100 μ M, 24 h) die Menge an MDA in H4IIE Zellen signifikant erhöht. Für Resveratrol wurden erste Untersuchungen durchgeführt, es ist ein vergleichbarer Anstieg der MDA Menge zu vermuten (n=2).



Resveratrol [µM]

Abb. 2.21.: Induktion der Lipidperoxidation durch Polyphenole

H4IIE wurden 24 h mit Resveratrol oder Luteolin inkubiert und das in den Zellen entstandene MDA quantifiziert (HPLC). x±SEM, n=2-3, *p< 0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- Á H4IIÈ, Luteolin n=3
- B H4IIE, Resveratrol, n=2

2.3.4. Apoptoseauslösung

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Polyphenole die Viabilität der H4IIE und C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) senken. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Polyphenolen konnten in beiden Zelllinien EC₅₀ -Werte ermittelt werden. Im Folgenden sollte herausgearbeitet werden, ob Polyphenole in H4IIE und C6 Apoptose oder Nekrose auslösen.

Hierzu wurde zunächst die oligonukleosomale DNA Fragmentation (DNA-Leiter) nach Inkubation mit Polyphenolen untersucht. Caspaseaktivierungen durch Polyphenole wurden zur Klärung mechanistischer Fragen gemessen. Ferner wurden der apoptotische und der nekrotische Index nach 48-stündiger Inkubation bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen (50 - 350 μ M) wurden so gewählt, dass sie oberhalb der ermittelten EC₅₀-Werte lagen. Die Inkubationszeiten betrugen 24 oder 48 Stunden.

Wegen Löslichkeitsproblemen höherer Konzentrationen Quercetins in FCS-freiem Medium (C6 Zellen mit Serumentzug), wurden die entsprechenden Experimente nicht durchgeführt.

2.3.4.1. Oligonukleosomale DNA Fragmentation durch Polyphenole

Im Verlauf der Apoptose schneidet eine Endonuklease spezifisch die DNA in den Linkerregionen, wodurch oligonukleosomale DNA-Fragmente entstehen, die im Agarosegel gezeigt werden können.

Es wurden sowohl H4IIE als auch C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) untersucht. Die Zellen wurden hierzu jeweils 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert.

In den H4IIE Zellen konnte nach Inkubation mit Luteolin (100 μ M) und Resveratrol (150 μ M) eine apoptotische DNA-Fragmentation gezeigt werden. Im Unterschied zu den anderen Polyphenolen konnte für Galangin keine DNA-Fragmentation in H4IIE gezeigt werden.

In C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) war es nicht möglich, eine oligonukleosomale DNA-Fragmentation nach 24-stündiger Inkubation nachzuweisen.





Abb. 2.22.: Induktion von oligonukleosomaler DNA Fragmentation durch Polyphenole (H4IIE und C6)

Die Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Polyphenole inkubiert, die DNA isoliert und auf ein Agarosegel (4 μ g/*lane*, 1,75 %) aufgetragen. Die Abbildungen zeigen je ein Beispiel aus mehreren durchgeführten Versuchen. n=3-4

- A H4IIE: Quercetin, Luteolin, Galangin, Resveratrol, H₂O₂
- B C6 / C6 mit Serumentzug: Quercetin (nur in C6), Luteolin, Galangin, Resveratrol, H₂O₂

2.3.4.2. Messung der Caspase-Aktivität

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die im Verlauf der Apoptose aktiviert werden. Gemessen wurde die Aktivität der Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9 sowie der Caspase-10.

Es wurden H4IIE und C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) mit Polyphenolen inkubiert und die Caspaseaktivität gemessen. Zunächst wurden H4IIE mit verschiedenen Konzentrationen der Polyphenole inkubiert (Abb. 2.23). Hier konnten folgende Induktionen der Aktivität der Caspasen beobachtet werden: Nach Inkubation der H4IIE Zellen mit den Flavonoiden Luteolin und Galangin steigt die Aktivität der Caspasen-3 und -9 bei Verwendung von 250 μ M signifikant an. Die Inkubation mit 250 μ M Quercetin führt nur zu einem Anstieg der Capase-3-Aktivität nach 24 Stunden Inkubation. Nach Inkubation mit Resveratrol (250 μ M) kann hingegen nach 24stündiger Inkubation kein signifikanter Anstieg von Caspase-3 oder –9 gezeigt werden.

Für Galangin wurden darüberhinaus die Aktivitäten der Caspasen-2 und -10 bestimmt. Es konnte ein Anstieg der Aktivität der Caspase-2 gemessen werden, nicht jedoch der Caspase-10.


Abb. 2.23.: Aktivierung von Caspasen durch Polyphenole in H4IIE, Konzentrationsverlauf H4IIE wurden 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen inkubiert und die Enzymaktivität gemessen. Angegeben sind die Aktivitätswerte pro mg Gesamtprotein. x±SEM, n=3-10 *p<0,05, Analyse-it/ANOVA

- A H4IIE, Quercetin, n=3-10
- B H4IIE, Luteolin, n=3-10
- C H4IIE, Resveratrol, n=3-7
- D, E H4IIE, Galangin, n=4

ERGEBNISSE

Für die Inkubation der H4IIE Zellen mit Luteolin und Resveratrol wurde zusätzlich eine Zeitreihe aufgenommen. Die Zellen wurden mit 250 μM Polyphenol für 0,5 bis 24 Stunden inkubiert und dann die Aktivität der Caspasen gemessen. Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Aktivitäten der Caspasen-2, -3, -9 und -10 erst nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 250 μM Luteolin. Nach Inkubation mit Resveratrol ist nach bereits 6-stündiger Inkubationszeit ein Anstieg der Aktivitäten der Caspasen-2, -3 und -10 zu messen. Die Aktivität der Caspase-3 ist jedoch nach 24 Stunden nicht mehr messbar (vgl. Abb. 2.23.C). Es kann demnach auch bei kürzerer Inkubationsdauer als 24 Stunden mit Resveratrol kein Anstieg der Caspase-9-Aktivität gezeigt werden.



Abb. 2.24.: Aktivierung von Caspasen durch Polyphenole in H4IIE, Zeitverlauf H4IIE wurden bis zu 24 Stunden mit Polyphenolen (250 μM) inkubiert und die Enzymaktivitäten photometrisch bestimmt. Angegeben sind die Aktivitätswerte pro mg Gesamtprotein. Die Kontrolle stellt eine Inkubation mit DMSO über 24 Stunden dar. x±SEM, n=3-10, *p<0,05 vs. Kontrolle, Ana-

lyse-it / ANOVA

A H4IIE, Luteolin, n=3-10

B H4IIE, Resveratrol, n=3-7

C6 (mit bzw. ohne Serumentzug) zeigten keinen signifikanten Anstieg der Capaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation mit den Polyphenolen (siehe Anhang).

2.3.4.3. Induktion der Chromatinkondensation durch Polyphenole

Der apoptotische Index gibt die Zahl apoptotischer Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl an.

Nach Inkubation der H4IIE mit Resveratrol sind bei Verwendung von 100 μ M (48 h) apoptotische Zellen detektierbar, wohingegen Luteolin, Galangin und Quercetin erst in höheren Konzentrationen (250 μ M, 48 h) einen signifikanten Anstieg der Zahl der apoptotischen Zellen zeigen.



Abb. 2.25.: Induktion der Chromatinkondensation durch Polyphenole (H4IIE)

H4IIE wurden 48 Stunden mit der zu testenden Substanz inkubiert. Die Zahl der apoptotischen Zellen, sowie die Gesamtanzahl der Zellen wurde nach Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und der apoptotische Index (Anzahl apoptotischer Zellen / Gesamtzellzahl) errechnet. x±SEM, n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A H4IIE, Resveratrol, Luteolin, n=3
- B H4IIE, Galangin, Quercetin, n=3

ERGEBNISSE

Ein anderes Bild ergibt die Bestimmung des apoptotischen Index in C6. Bei der Inkubation von C6 mit den Flavonoiden ist ein geringer Anstieg der apoptotischen Zellen zu messen, während dieser Effekt bei dem Stilbenderivat Resveratrol nicht signifikant wurde (Abb. A). Die C6 mit Serumentzug (Abb. B) zeigen nach Inkubation mit der höheren Konzentration von Resveratrol (250 μ M) einen Anstieg der apoptotischen Zellen. Die Flavonoide zeigen für C6 mit bzw. ohne Serumentzug ein nahezu vergleichbares Potential, apoptotische Zellen zu induzieren.

Der gemessene apoptotische Index gibt einen Hinweis auf das apoptotische Potential der Flavonoide in H4IIE und C6, jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Zahl der gebildeten apoptotischen Zellen nach Flavonoidinkubation in H4IIE höher liegt als in C6 Zellen.



Abb. 2.26.: Induktion der Chromatinkondensation durch Polyphenole (C6)

C6 (mit und ohne Serumentzug) wurden 48 Stunden mit 100 bzw. 250 μ M Polyphenol inkubiert. Die Zahl der apoptotischen Zellen, sowie die Gesamtanzahl der Zellen wurde nach Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und der apoptotische Index (Anzahl apoptotischer Zellen / Gesamtzellzahl) errechnet. x±SEM, n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA A C6, n=3

- A C6, n=3
- B C6 mit Serumentzug, n=3

2.3.4.4. Induktion nekrotischer Vorgänge durch Polyphenole

Zur Abgrenzung zwischen apoptotischen und nekrotischen Vorgängen in C6 bzw. H4IIE durch Polyphenolinkubation wurden diese exemplarisch mit 100 µM Resveratrol (24 h) inkubiert. Der nekrotische Index gibt die Zahl nekrotischer Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl an. Die Ergebnisse des Assays zeigen, daß Resveratrol in C6 nekrotische Vorgänge induziert, während diese in H4IIE nicht nachweisbar sind.



Abb. 2.27: Induktion nekrotischer Vorgänge

H4IIE bzw. C6 wurden 24 h mit Resveratrol (100 μ M) inkubiert. Die Zahl der nekrotischen Zellen, sowie die Gesamtanzahl der Zellen wurde nach Färbung mit Propidiumiodid und Acridinorange fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und der nekrotische Index (Anzahl nekrotischer Zellen / Gesamtzellzahl) errechnet. x±SEM, n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

2.4. Thiolreaktivität der Polyphenole

2.4.1. Oxidativ vermittelte Reaktionen von Polyphenolen mit GSH

Phenole können mit Thiolgruppen unter Bildung eines reaktiven Chinons zu Glutathion-Addukten reagieren. Dies führt zu einem Verlust von Hydroxylgruppen der Flavonoide, so dass das antioxidative Potential verändert wird.

Die Thiolreaktivität der Flavonoide wurde in einer Umsetzung mit GSH unter vorheriger Zugabe von HRP/H₂O₂ getestet und in der HPLC ausgewertet. Es zeigte sich, dass sowohl Quercetin (Boersma *et al.*, 2000) als auch Galangin Addukte mit GSH bilden, wobei für Quercetin zwei und für Galangin nur ein Addukt nachweisbar sind. Die UV-Spektren und die HPLC-Chromatogramme belegen die Reaktion. Die Reaktionsprodukte wurden spektrophotometrisch jeweils bei pH 2,2 und 7,4 vermessen, weil das Elutionsmittel der HPLC einen pH von 2,2 aufwies.

Gezeigt sind zunächst folgende UV-Spektren (240-500 nm):

- Reaktionen von Quercetin bzw. Galangin mit HRP/H₂O₂ ± GSH bei pH 7,4 (Abb. A und C)
- Reaktionen von Quercetin bzw. Galangin bei pH 2,2 (Abb. B und D)

Dargestellt sind die UV-Spektren des Flavonoids, des oxidativ umgesetzten Flavonoids (chinoides Zwischenprodukt), sowie des Produkts der Reaktion von oxidativ umgesetzem Flavonoid mit GSH.

Es ist eine Änderung der Maxima der UV-Spektren der Flavonoide nach oxidativer Umsetzung zu detektieren. Nach Zugabe von GSH ergibt sich ein UV-Spektrum mit nur einem Maximum.

UV-Spektren

Α



В





Abb. 2.28.: Thiolreaktivität der Polyphenole

Quercetin und Galangin wurden spektrophotometrisch vermessen unter Zugabe von HRP/H₂O₂ bzw. unter Zugabe von HRP/H₂O₂ und GSH. Die Reaktionen wurden jeweils bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. n=3

- A Quercetin, pH 7,4
- B Quercetin, pH 2,2
- C Galangin, pH 7,4
- D Galangin, pH 2,2

Die oxidative Umsetzung der Flavonoide mit oder ohne GSH wurde des Weiteren mittels HPLC detektiert. Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme sowie zugehörige UV-Spektren (290 nm), die mit den UV-Spektren der vorher gezeigten spektrometrischen Messung bei pH 2,2 vergleichbar sind (Abb. 2.28 B und D).



HPLC-Chromatogramm



300

325

350

375

400 n

m



B oxidativ umgesetztes Quercetin



Das spektrometrisch messbare oxidativ umgesetzte Quercetin konnte in der HPLC nicht detektiert werden, was auf eine Instabilität dieses Produkts hinweist, da die HPLC-Messung länger als die spektrometrische Messung dauerte.

C Quercetin-Addukte

HPLC-Chromatogramm



UV-Spektrum (6,93 min)



UV-Spektrum (8,31 min)



D Galangin HPLC-Chromatogramm

UV-Spektrum (31,09 min)





Das HPLC-Chromatogramm des oxidativ umgesetzten Galangins zeigt im Gegensatz zu dem des oxidativ umgesetzten Quercetins ein Produkt der Reaktion. Das UV-Spektrum dieses Produkts ist mit dem aus der UV-Spektrometrie (pH 2,2, Abb. 2.28 D) vergleichbar. Es kann daher angenommen werden, dass das oxidativ umgesetzte Galangin stabiler ist als oxidativ umgesetztes Quercetin (Abb. 2.29.B).

F Galangin-Addukt

HPLC-Chromatogramm

UV-Spektrum (12,31 min)



Abb. 2.29.: Thiolreaktivität der Polyphenole

Quercetin (A) bzw. Galangin (D) wurden mit HRP/H₂O₂ mit (C, F) und ohne GSH (B, E) versetzt und in der HPLC vermessen. Dargestellt sind sowohl die HPLC Chromatogramme als auch die UV-Spektren der jeweils entstandenen Produkte der Reaktionen (290 nm) (repräsentative Bilder), n=3

2.4.2. Modulation der GST-Aktivität durch Polyphenole

Die Glutathion-S-Transferase ist ein wichtiges Enzym für die Entgiftungsreaktionen des Phase-II-Metabolismus. In einem *in vitro* Experiment wurde die Hemmung der GST gemessen. Es zeigte sich, dass Quercetin (25 μ M), Luteolin (10 μ M) und Galangin (50 μ M) die GST hemmen, während Resveratrol (bis 50 μ M) keinen Effekt auf die Aktivität der GST aufweist.



Abb. 2.30.: Einfluss von Polyphenolen auf die GST-Aktivität

Die GST-Aktivität wurde *in vitro* bestimmt. Hierbei werden GST, GST-Substrat CDNB und Polyphenol nach 2 Minuten Inkubation photometrisch über 2,5 Minuten vermessen. Die Änderung der Absorption ist ein Maß für die GST-Aktivität. x±SEM, n=3-4, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

- A Quercetin, n=3
- B Luteolin, n=3
- C Galangin, n=4
- D Resveratrol, n=3

2.5. Untersuchung von methylierten Luteolinetherverbindungen

Mögliche Metaboliten von Luteolin können neben den Glucuroniden auch methylierte Verbindungen sein. Um diese näher zu charakterisieren, wurden die zwei Methylluteolinderivate, Luteolin-5,3´-dimethylether und Luteolin-5,7,3´,4´-tetramethylether, näher charakterisiert.



Abb. 2.31.: Strukturformeln von Luteolin-5,3´-dimethylether (A) und Luteolin-5,7,3´,4´-tetra-methylether (B)

2.5.1. Antioxidative Kapazität in vitro (TEAC Assay)

Zunächst wurde die antioxidative Kapazität der Luteolinderivate *in vitro* gemessen, da die beiden Derivate weniger OH-Gruppen als Luteolin aufweisen und damit ein geringeres antioxidatives Potential haben müssten. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich Luteolin im TEAC Assay antioxidative Eigenschaften zeigt, nicht aber die beiden Derivate.





Zur Bestimmung der *trolox equivalent antioxidant capacity* wurden die zu testenden Substanzen (10 μM) mit einer ABTS-Radikal-Lösung versetzt und die Absorption nach 2,5 Minuten gemessen. x±SEM, n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, ANOVA

2.5.2. Viabilitätsassay

Des Weiteren wurde mittels des Neutralrot Assays der Einfluss der Substanzen auf die Viabilität der H4IIE untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass neben Luteolin (250 μ M, 24 h) auch Luteolindimethylether (250 μ M, 24 h) Zytotoxizität vermittelt.



Abb. 2.33.: Neutralrot Assay, H4IIE

H4IIE wurden mit 250 μ M der jeweiligen Substanz inkubiert (24 h) und im Neutralrot Assay ausgewertet. n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, Analyse-it / ANOVA.

2.5.3. Messung der Caspase-Aktivität

Da in vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass das Luteolindimethylderivat (250 µM, 24 h) Zytotoxizität vermittelt, sollte nun geklärt werden, ob dieser Zelltod apoptotisch vermittelt wird. Hierzu wurde mittels des Apo-ONE[®] Assays die Aktivität der Caspase-3 ermittelt.

Es konnte allerdings für die Luteolinderivate (250 µM, 24 h) keine Induktion der Caspase-3 gezeigt werden, so dass von einem nicht-apoptotischen Zelltod durch das Luteolindimethylderivat ausgegangen werden muss.



Abb. 2.34.: Caspase-3 Messung, H4IIE

H4IIE wurden 24 h mit 250 μ M der jeweiligen Substanzen inkubiert und mittels des Apo-ONE[®] Assays die Aktivität der Caspase-3 ermittelt. Dargestellt sind relative Fluoreszenzeinheiten (rfu). n=3, *p<0,05 vs. Kontrolle, Analyse-it / ANOVA.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zelluläre Effekte der Flavonoide Quercetin, Luteolin und Galangin sowie des Stilbenderivats Resveratrol in H4IIE und C6 Zellen untersucht.

Zunächst wurde die zelluläre Aufnahme der Substanzen sowie deren Metabolismus in den jeweiligen Zellsystemen analysiert. Danach wurden antioxidative Eigenschaften der Polyphenole in niedrigen Konzentrationen im zellfreien System (TEAC Assay) sowie in Zellsystemen untersucht (H₂DCF-DA und H₂Rh123 Assay).

Im Weiteren sollte zum einen der Einfluß niedriger Polyphenolkonzentrationen auf die oxidativ vermittelte Induktion des antioxidativen Enzyms MnSOD und zum anderen die oxidativ vermittelte Aktivierung zellulärer Signaltransduktionswege (MAPK) untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zelluläre Effekte der Polyphenole in hohen Konzentrationen untersucht. Hierbei wurde die Zytotoxizität der Substanzen erfaßt und überprüft, ob die Substanzen einen apoptotischen Zelltod auslösen (oligonukleosomale DNA-Fragmentation, apoptotischer Index, Caspase-Aktivität) und welche Mechanismen dabei potentiell involviert sind (Induktion von oxidativem Stress / DNA-Strangbrüche).

3.1. Antioxidative Kapazität der Polyphenole

Drei Strukturmerkmale der Flavonoide werden als Voraussetzung für gute Radikalfängereigenschaften und damit für die antioxidative Wirkung genannt: eine Catecholstruktur im B-Ring, eine 2,3-Doppelbindung in Kombination mit einer 4-Oxogruppe im C-Ring und die zusätzliche Anwesenheit einer 3,5-Dihydroxystruktur im A-Ring (Arora *et al.*, 1998). Mittels TEAC Assay wurde die antioxidative Kapazität der Polyphenole *in vitro* gemessen. Quercetin (EC₅₀ 4 μ M) konnte in diesem Assay das ABTS-Radikal deutlich besser abfangen als die anderen Polyphenole, wobei die antioxidative Kapazität von Resveratrol (EC₅₀ 7 μ M) höher als die von Galangin (EC₅₀ 10 μ M) bzw. Luteolin (EC₅₀ 12 μ M) lag.

Die höhere antioxidative Kapazität des Quercetins ist aufgrund des Vorhandenseins der drei o.g. Strukturelemente im Quercetinmolekül erklärbar. Luteolin und Galangin haben jeweils nur zwei der drei antioxidativen Strukturelemente, wodurch die niedrigere antioxidative Kapazität erklärt werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass Quercetin auch im DPPH Assay eine höhere antioxidative Kapazität als Luteolin zeigt (Silva *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003).

Für die beiden Luteolinetherderivate Luteolin-5,3´-dimethylether und Luteolin-5,7,3´,4´-tetramethylether konnten im TEAC Assay keine Radikalfängereigenschaften gemessen werden. Begründet werden kann dies für das Luteolintetramethylethermolekül mit dem vollständigen Fehlen freier OH-Gruppen. Für das Dimethylderivat sind ebenfalls im Vergleich zu Luteolin die beiden nötigen Strukturelemente durch Methylgruppen abgeschirmt. Lemanska *et al.* (2004) belegen, dass Luteolin-3´-methylund Luteolin-4´-methylether bei physiologischem pH-Wert aufgrund ihres pk_a -Wertes weniger deprotoniert vorliegen als Luteolin und daher eine geringere antioxidative Kapazität gemessen wird. Bei höheren pH-Werten nähern sich die TEAC-Werte der Derivate dem Wert des Luteolins an. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die von Lemanska *et al.* untersuchten Luteolinderivate im Vergleich zu den in dieser Arbeit getesteten die Catecholstruktur im A-Ring noch aufwiesen.

Die antioxidativen Eigenschaften von Galangin im TEAC Assay sind geringer als die von Quercetin, aber denen von Luteolin vergleichbar. Dieser Befund ist insofern erstaunlich, da die Zahl der OH-Gruppen von Quercetin über Luteolin zum Galangin hin abnimmt und Galangin zudem im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Flavonoiden eine Catecholstruktur fehlt. Bisher galt die Annahme, daß das

antioxidative Potential direkt mit der Zahl der vorhandenen OH-Gruppen korreliert (Cao *et al.*, 1997). Die Ergebnisse des TEAC Assays deuten darauf hin, dass die 3-OH Gruppe des Galangins die 3'-4'-OH-Substitution im B-Ring des Luteolins im Bezug auf die antioxidative Aktivität im TEAC Assay nahezu vollständig kompensieren kann. Bisher wurde in Studien zur Inhibition einer Fe²⁺/Fe³⁺-induzierten Lipidperoxidation (Arora *et al.*, 1998) lediglich gezeigt, dass eine fehlende OH-Substitution im B-Ring durch eine Catechol-Struktur im A-Ring kompensiert werden kann.

3.2. Zelluläre Aufnahme der Polyphenole

Die Messungen der intrazellulären Konzentrationen der Polyphenole zeigen für die vier untersuchten Polyphenole rasche Aufnahmen (30 Minuten) in die jeweiligen Zellen. Es fällt hierbei auf, dass die in H4IIE Zellen nachweisbare Menge Polyphenol im Vergleich zu C6 Zellen deutlich niedriger ist. Ferner sinkt die Polyphenolkonzentration in H4IIE Zellen innerhalb von 4 Stunden deutlich ab, was auf einen metabolischen Abbau bzw. eine Ausschleusung aus der Zelle schließen läßt.

Quercetin und Resveratrol werden von H4IIE Zellen zu gleichen Mengen aufgenommen (ca. 3 nmol / 10⁶ Zellen, 30 Minuten), während die nachweisbare Luteolinmenge ca. 6fach niedriger liegt. Galangin wird hingegen deutlich höher angereichert als die anderen Polyphenole (ca. 8,5 nmol / 10⁶ Zellen, 30 Minuten). Die vergleichsweise hohe Konzentration von Galangin in H4IIE Zellen könnte mit dem apolaren Charakter von Galangin im Vergleich zu den deutlich hydrophileren Flavonoiden oder mit einer geringeren Abbaurate erklärt werden.

In C6 Zellen ergibt sich im Vergleich zu H4IIE Zellen ein anderes Bild. Sie werden ebenfalls rasch aufgenommen, jedoch sinkt bei längerer Dauer der Inkubation die intrazelluläre Polyphenolkonzentrationen nicht wie in H4IIE Zellen ab, sondern verbleibt auf einem Plateau. Für Galangin bzw. Luteolin sind in C6 Zellen sogar Akkumulationen der Flavonoide über die Zeit zu messen. Auch fällt auf, dass die nachweisbare Menge deutlich über der der H4IIE Zellen liegt. In C6 Zellen beträgt die Resveratrolkonzentration nach 30 Minuten ca. 20 nmol/ 10⁶ Zellen, während H4IIE Zellen lediglich ca. 3 nmol / 10⁶ Zellen nach 30 Minuten aufweisen. Die nachweisbare Menge Luteolin liegt ca. 20fach über der in H4IIE Zellen nachgewiesenen. Das Fla-

vonoid Galangin wird in C6 Zellen in hoher Menge aufgenommen und es kommt dort sogar zu einer Akkumulation des Flavonoids über die Zeit bis zu einer Menge von 150 nmol / 10⁶ Zellen. Das bedeutet, dass Galangin nahezu vollständig aus dem Medium in C6 Zellen aufgenommen wird, wobei die nachgewiesene Menge deutlich über der von H4IIE Zellen liegt. Die sehr hohe Menge des aufgenommenen Galangins ist vermutlich durch seinen apolaren Charakter zu erklären. Allerdings muss auch darüber spekuliert werden, dass es zu einer Anlagerung an äusseren Strukturen der Zelle kommen kann, die nicht durch das dreimalige Waschen der Zellen entfernt werden konnte.

Bei Durchsicht der Literatur ergibt sich, dass die Geschwindigkeit der Aufnahme der Polyphenole Unterschiede je nach Zelltyp aufweist. In den getesteten C6 und H4IIE Zellen waren die Polyphenole nach 30 Minuten nachweisbar. Für HL-60 Zellen werden ähnliche Daten berichtet (Yamashita und Kawanishi, 2000), während in humanen Lungenfibroblasten Quercetin erst nach 24 Stunden detektierbar war (Matsuo *et al.*, 2005).

Die Chromatogramme der HPLC Analysen zeigen für Quercetin drei, für Galangin und Resveratrol je zwei und für Luteolin einen polaren Metaboliten in H4IIE Zellen. Diese konnten mittels HPLC-MS-MS für Quercetin und Luterolin als Glucuronide analysiert werden. Für Resveratrol und Galangin war die Bestimmung des Molekulargewichts der Metaboliten nicht möglich. C6 Zellen metabolisieren Luteolin und Quercetin, wobei ein bzw. zwei polare Metaboliten detektiert werden konnten. Diese konnten aufgrund der geringen Menge vorliegender Metaboliten nicht in der HPLC-MS-MS identifiziert werden.

Der Vergleich mit Daten aus der Literatur lässt den Schluß zu, dass die entstehenden Metaboliten polyphenol- und zelltypspezifisch sind. In humanem Plasma konnten nach Quercetingabe z.B. Quercetinglucuronide und O-Methylderivate detektiert werden (Graefe *et al.*, 2001), im Plasma der Ratte hingegen nur Glucuronide (Moon *et al.*, 2001), während in humanen Hautfibroblasten Quercetin zu Glutathionylquercetin metabolisiert wird (Spencer *et al.*, 2003).

Bei der Biotransformation von Galangin entstehen nicht nur Glucuronide und Sulfate (Otake *et al.*, 2002 a,b; Kumazawa *et al.*, 2004), sondern durch CYP1A1-vermittelte Oxidation auch Quercetin (Silva *et al.*, 1997; Otake *et al.*, 2002 a,b). Dies muss bei

der Betrachtung der protektiven und der intrinsischen Effekte von Galangin berücksichtigt werden, da es abhängig vom verwendeten Zelltyp zur Addition der Effekte der beiden Flavonoide kommen kann. In H4IIE Zellen konnte jedoch nach Galangininkubation keine Oxidation zu Quercetin detektiert werden.

Resveratrol wird vergleichbar zum Galangin lediglich von H4IIE Zellen, nicht aber von C6 Zellen metabolisiert, wobei wahrscheinlich wie in der Muttersubstanz eine *cis*und eine *trans*-Verbindung entstehen. Wenzel *et al.* (2005) detektierten in einer Fütterungsstudie mit Ratten 3-O-Glucuronide und verschiedene sulfatierte Resveratrolderivate. Die Eliminationshalbwertzeit von Resveratrol wird in Mäusen (Sale *et al.*, 2004) und Ratten (Marier et al., 2002) als relativ niedrig eingestuft, bereits nach 60 Minuten ist Resveratrol nur noch in Form seiner Glucuronide nachweisbar. In Analogie zu diesen Befunden steht die Aussage von Walle *et al.* (2004), dass Resveratrol zwar nach oraler Aufnahme vom Menschen zu einem hohen Maße resorbiert wird, aber nur ein geringes Maß an Bioverfügbarkeit zeigt.

3.3. Einfluss von Polyphenolen auf oxidativ vermittelte Vorgänge in der Zelle

Die biologische Relevanz der zuvor *in vitro* im TEAC Assay gemessenen antioxidativen Kapazität der Polyphenole wurde im Zellsystem überprüft (H₂DCF-DA und H₂Rh123 Assay).

Es konnte mittels H₂DCF-DA Assay eine Erniedrigung der endogenen ROS-Konzentration in H4IIE Zellen nach Inkubation mit Quercetin, Luteolin oder Resveratrol gemessen werden, die durch Galangin nicht erreicht wurde. In C6 Zellen ließ sich mit einer Inkubation von Galangin oder Resveratrol ebenfalls keine Schutzwirkung gegenüber endogenem oxidativem Streß erzielen.

Ein ähnliches Bild der antioxidativen Kapazitäten ergab der H₂Rh123 Assay, wobei hier Unterschiede zwischen C6 Zellen und C6 Zellen mit Serumentzug liegen. Bei Verwendung dieser Fluoreszenzsonde zeigten Quercetin (H4IIE, C6), Luteolin (C6) sowie Resveratrol (C6, C6 mit Serumentzug) antioxidative Kapazitäten gegenüber endogenem oxidativem Streß der Zellen.

Aufgrund der vorher durchgeführten Messungen der intrazellulären Konzentrationen sowie der Messungen am Fluoreszenzmikroskop kann davon ausgegangen werden, dass die Polyphenole von den Zellen aufgenommen werden. Trotzdem sind die Ergebnisse der Versuche im Zellsystem nicht mit den Ergebnissen des TEAC Assays kongruent. Im TEAC Assay wurden die vier getesteten Polyphenole als antioxidativ bewertet, wobei Quercetin deutlich stärker antioxidativ wirkte als die anderen Polyphenole. Die Unterschiede der antioxidativen Kapazität der Flavonoide im Zellsystem sind u.a. in den Spezifitäten der beiden verwendeten Fluoreszenzsonden begründet. Die Spezifität von H₂DCF-DA (Keller *et al.*, 2004) und H₂Rh123 in biologischen Systemen ist bisher nicht genau geklärt. Untersuchungen von Wrona *et al.* (2005) haben gezeigt, dass beide Sonden mit Hydroxylradikalen (OH^{*}), Stickstoffradikalen (NO₂^{*-}) und Carbonatradikalen (CO₃^{*-}) reagieren, wobei die Geschwindigkeiten der Reaktionen sich unterscheiden. Beide werden in nur sehr geringem Maße durch O₂^{*-} oxidiert.

Ferner wurde mittels der beiden Assays die antioxidative Kapazität gegenüber exogenem oxidativem Streß ermittelt. Die vorher beschriebenen Unterschiede zwischen beiden Assays fielen hier deutlich geringer aus. Lediglich für Galangin konnte keine Protektion gegenüber H_2O_2 ermittelt werden. Die anderen getesteten Polyphenole konnten die Zellen vor H_2O_2 schützen.

Der gezeigte protektive Effekt von Resveratrol gegenüber endogenem und induziertem ROS wurde auch von King *et al.* (2005) für humane RPE Zellen gefunden.

Für Galangin konnten mittels TEAC Assay antioxidative Eigenschaften beschrieben werden, die denen des Luteolins vergleichbar waren. Dass Galangin daher die Zellen nicht vor Radikalen zu schützen vermag, ist aufgrund der intrazellulär gemessenen sehr hohen Mengen des Galangins nicht zu erklären. Luteolin wird zu einem sehr viel geringeren Anteil in den Zellen angereichert. Es muss daher diskutiert werden, ob Galangin in einer Form an zellulären Strukturen haftet, die seine antioxidativen Eigen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, die die Assoziation von Galangin mit dem Cytosol der Zelle bzw. mit der gesamten H4IIE Zelle erkennen lassen. Allerdings wären Messungen mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop notwendig, um zu differenzieren, ob Galangin in den Zellen lokalisiert ist oder an äusseren Strukturen haftet.

Die Protektionswirkung von Luteolin gegenüber oxidativem Stress wurde in H4IIE Zellen auch im *Comet*-Assay gezeigt. Eine Vorinkubation mit Luteolin und Quercetin (50 μ M) verminderte die durch H₂O₂ ausgelösten DNA Strangbrüche (Wätjen *et al.*, 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Noroozi *et al.* (1998), die in humanen Lymphozyten zeigen konnten, dass 51 μ M Luteolin den durch H₂O₂ -induzierten DNA-Schaden (100 μ M, 5 min, *Comet*-Assay) um ca. 50 % reduzieren können. Andererseits liegen auch Daten von Choi *et al.* (2003) vor, die keine Protektion von Luteolin (50 μ M) gegenüber H₂O₂ -induzierten DNA-Schäden zeigen konnten (250 μ M, 30 min, humane Endothelzellen). Musonda und Chipman (1998) konnten für Quercetin im *Comet*-Assay ebenso keine Protektion feststellen, wobei die hier verwendete Konzentration (10 μ M, HepG2 Zellen) deutlich niedriger lag als die von Wätjen *et al.* (2005) getestete.

3.4. H₂O₂ -vermittelte MAPK Aktivierung

Neben den gemessenen direkten antioxidativen Effekten der Polyphenole sollten weitere zelluläre Effekte auf oxidativ vermittelte Prozesse untersucht werden. Als Modellsystem sollte die Aktivierung verschiedener MAPK durch oxidativen Stress (H_2O_2) dienen. In C6 Zellen mit Serumentzug war H_2O_2 in der Lage, nach 3 Stunden die Aktivierung von p38 und ERK zu induzieren.

Im Folgenden wurden Effekte der Polyphenole auf die H_2O_2 -induzierte Aktivierung dieser MAPK untersucht. Eine 60minütige Vorinkubation der Zellen mit Polyphenolen zeigte, dass Luteolin die H_2O_2 -vermittelte Aktivierung von p38 und Resveratrol und Galangin die H_2O_2 -vermittelte Aktivierung von ERK reduzieren.

Die Aktivierung der p38 MAPK konnte durch Vorinkubation mit Luteolin (25 µM), nicht jedoch mit den anderen Polyphenolen reduziert werden. Für Luteolin sind bereits mechanistische Untersuchungen zur MAPK Aktivierung durch LPS von Xagorari et al. (2002) durchgeführt worden. Sie konnten für RAW 264.7 Zellen belegen, dass Luteolin die LPS-induzierte Aktivierung der vorgeschalteten MAPKK hemmt, so dass angenommen werden muss, dass Luteolin zumindest bei rezeptorvermittelter Aktivierung in einen weiter oben in der MAPK-Kaskade liegenden Mechanismus eingreift.

Die Phosphorylierung von ERK konnte durch Vorinkubation mit Galangin und Resveratrol (50 μ M) reduziert werden. Resveratrol beeinflusste die ERK Aktivierung, nicht jedoch die p38 Aktivierung. Literaturdaten belegen, daß in anderen Zelllinien Resveratrol z.T. alle drei getesteten MAPK moduliert. So konnten Yu *et al.* (2001) für HeLa Zellen (humane Cervixkarzinomzellen) zeigen, dass Resveratrol die UVC- und PMA - induzierte Aktivierung der MAPK ERK, JNK und p38 stark inhibiert. Dies konnte von El-Mowafy *et al.* (1999) für Koronarzellen des Schweines bestätigt werden. Andererseits konnten She *et al.* (2001) zeigen, dass Resveratrol (20 μ M, 2 bis 4 h) in Anwesenheit eines Stimulus in Maus-Epidermiszellen ERK, JNK und p38 aktiviert. Die Ergebnisse von Shih *et al.* (2002) für humane Schilddrüsenkarzinomzellen belegen, dass Resveratrol die Phosphorylierung von ERK induziert und über diesen Signalweg p53 und Apoptose vermittelt.

Galangin wird in C6 Zellen nach einer 60minütigen Inkubation in sehr hohen Konzentrationen angereichert, trotzdem blieb Galangin ohne Effekt auf die Phosphorylierung der p38 MAPK. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen des H₂DCF-DA und des H₂Rh123 Assays läßt dies einen spezifischen Effekt von Galangin auf den ERK Signalweg vermuten, da die stärker antioxidativen Flavonoide Quercetin und Luteolin keine Inhibition zeigten. Bisher findet man in der Literatur keine Angaben über Untersuchungen zu Auswirkungen von Galangin auf die MAPK Aktivität.

Die JNK konnte in C6 Zellen nicht durch H_2O_2 aktiviert werden, weshalb auch keine modulierenden Effekte der Polyphenole analysiert wurden. Diese Befunde differieren von Literaturangaben: Marangolo *et al.* (2001) beschrieben für C6 Zellen eine Aktivierung von p38 und JNK, nicht jedoch von ERK durch H_2O_2 . Die für C6 von Marangolo *et al.* gezeigte Aktivierung der JNK mit H_2O_2 war in dieser Arbeit nicht reproduzierbar, neben der p38 Aktivierung konnte jedoch eine deutliche Induktion der ERK durch H_2O_2 gezeigt werden.

Das Flavonoid Quercetin zeigte in C6 Zellen keinerlei Effekt auf die H₂O₂-induzierte MAPK Aktivierungen. Mu *et al.* (2001) und Ishikawa *et al.* (2000) konnten jedoch für ERK, p38 und JNK eine Reduktion LPS-induzierter bzw. H₂O₂-induzierter MAPK Aktivierung durch Quercetin belegen. Spencer *et al.* (2003) zeigten in primären corticalen Neuronen, dass Quercetin zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK führt. Choi *et al.* (2005) konnten eine Beeinflussung von JNK und p38 (H₂O₂, HUVEC)

durch Quercetin zeigen. Der Grund für die Ineffektivität von Quercetin in unserem System konnte nicht aufgeklärt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit für C6 Zellen gezeigt werden, daß die verwendeten Polyphenole nicht generell über ihre antioxidativen Eigenschaften in die Signaltransduktion eingreifen, sondern spezifisch distinkte Signalwege in der Zelle modulieren.

3.5. Modulation der H_2O_2 -induzierten MnSOD- und NF- κ B-Induktion durch Polyphenole

Als weiteres Modellsystem sollte die Induktion der MnSOD, eines antioxidativen Enzyms, durch oxidativen Stress (H_2O_2) dienen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression der MnSOD in primären Zellen und bestimmten Zelllinien (HeLa) durch H_2O_2 induzierbar ist.

Es sollte ferner untersucht werden, ob H_2O_2 die MnSOD Expression über NF- κ B-Aktivierung vermittelt oder alternative Mechanismen existieren. Es ist bekannt, dass sich Bindungsmotive für NF- κ B im Promotor der MnSOD sowie im 2. Intron befinden. Die Induktion der MnSOD nach TNF α bzw. LPS (rezeptorvermittelt) wird über eine NF- κ B-Aktivierung vermittelt. Ebenso ist eine NF- κ B-Aktivierung nach H_2O_2 bekannt (Musonda und Chipman, 1998). Ob die Induktion der MnSOD durch H_2O_2 jedoch über NF- κ B vermittelt wird, ist in der Literatur nicht beschrieben.

Zunächst war es nötig, in den verwendeten Zellsystemen (H4IIE, C6) die MnSOD Expression oxidativ zu steigern, um später potentielle Effekte der Polyphenole zu untersuchen. Sowohl für H4IIE als auch für C6 Zellen war es jedoch nicht möglich, die MnSOD Expression durch H_2O_2 zu induzieren, wobei verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten für die H_2O_2 Inkubation sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene untersucht wurden.

In C6 Zellen konnte auch keine Aktivierung von NF- κ B durch H₂O₂ beobachtet werden. Dass es prinzipiell möglich war, in C6 Zellen NF- κ B zu aktivieren und die MnSOD Expression zu induzieren, konnte durch Verwendung von LPS gezeigt werden.

Modulierende Effekte von Polyphenolen auf eine H₂O₂ -induzierte NF-κB Aktivierung und daraus folgende MnSOD Expression konnten in den in dieser Arbeit verwendeten Zellkultursystemen daher nicht untersucht werden. Bezüglich des Einflusses von Flavonoiden auf die NF-κB-Aktivierung wurde in der Literatur über inhibierende Effekte von Quercetin auf die H₂O₂ -induzierte NF-κB Translokation in HepG2 Zellen berichtet (Musonda und Chipman, 1998). Ebenso konnten Rangan *et al.* (1999) für Primärzellen der Ratte eine LPS vermittelte Induktion von NF-κB zeigen, die durch Vorinkubation mit Quercetin reduziert werden konnte. Ferner konnten Kim *et al.* (2003) eine Reduktion der LPS-induzierten NF-κB Aktivierung durch Luteolin für Rat-1 Fibroblasten zeigen.

3.6. Intrinsische Effekte der Polyphenole

Neben den vorher beschriebenen Effekten geringer Polyphenolkonzentrationen wurden auch die Effekte gemessen, die durch höhere Polyphenolkonzentrationen in C6 und H4IIE Zellen vermittelt werden. Zunächst wurde ein Viabilitätsassay (Neutralrot-Aufnahme) durchgeführt. Nach 24stündiger Inkubationszeit konnten für H4IIE Zellen EC_{50} Werte gemessen werden, die für Quercetin bzw. Galangin bei 120 µM lagen, für Luteolin bei 95 µM und für Resveratrol bei 75 µM. C6 Zellen waren gegenüber Galangin sensitiver als H4IIE Zellen im Neutralrot Assay. So konnte eine Reduktion der Viabilität bereits nach 24stündiger Inkubation mit 20 µM (C6 Zellen) bzw. 40 µM (C6 mit Serumentzug) Galangin gemessen werden. Gegenüber Resveratrol sind die C6 Zellen hingegen insensitiver als H4IIE Zellen. Der EC_{50} Wert lag mit 150 µM 2fach höher als der für H4IIE Zellen.

Auch für C6 Zellen mit Serumentzug wurden Viabilitätsassays durchgeführt. Aufgrund des fehlenden FCS im Medium ergaben sich für Quercetin Löslichkeitsprobleme, weshalb kein EC_{50} Wert ermittelt werden konnte. Es kann jedoch aufgrund von Untersuchungen zur Löslichkeit in zellfreien Systemen davon ausgegangen werden, dass die Grenze der Löslichkeit in serumfreiem Medium über 70 µM liegt. Für die anderen Polyphenole bestand dieses Problem nicht, so dass EC_{50} Werte ermittelt werden konnten. Diese lagen in etwa in dem selben Rahmen wie die o.g. EC_{50} Werte der Polyphenole in C6 Zellen. Da in den Westernblotexperimenten nur maximal 50

µM Flavonoid für 1-3 Stunden eingesetzt wurden, sind diese Experimente vom Löslichkeitsproblem nicht betroffen.

Die in der Literatur beschriebenen EC_{50} -Werte für Galangin differieren ebenfalls je nach Zelltyp. Kajiya *et al.* (2001) beschreiben für V79 Zellen einen EC_{50} -Wert (4 h) von 35 µM, Cipak *et al.* (2003) konnten in L1210 Zellen keine toxischen Effekte von Galangin (20 µM, 24 h) nachweisen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der H4IIE bereits nach 3 h Quercetin (100 μ M) bzw. nach 8 h Luteolin oder Resveratrol beeinträchtigt wird. Das Absinken der Viabilität wurde auch in C6 gemessen, wobei die Viabilität bereits nach 3 h Luteolin bzw. 1 h Quercetin reduziert war.

Auch wenn die EC₅₀ Werte der Polyphenole in H4IIE und C6 Zellen sich im grossen und ganzen nicht wesentlich unterscheiden, konnte in den Zeitversuchen belegt werden, dass H4IIE Zellen nach Inkubation mit Polyphenolen länger viabel sind. Bedenkt man, dass C6 Zellen die Polyphenole in grösseren Mengen anreichern als H4IIE Zellen, ergibt sich die These, dass die Metaboliten weniger toxisch sind als die Muttersubstanzen.

Das Luteolinderivat Luteolintetramethylether vermittelt keine toxischen Effekte. Eine Dimethylierung hingegen war nicht ausreichend, um die Toxizität des Luteolins zu supprimieren. Demnach kann zwar die antioxidative Kapazität durch Dimethylierung unterdrückt werden, nicht aber der zytotoxische Effekt. Dies ist ein wichtiger Befund, der vermuten läßt, daß die pharmakologischen Wirkungen von Polyphenolen nicht nur von der Muttersubsanz, sondern auch von aktiven Metaboliten vermittelt werden. Guerrero *et al.* (2002) zeigten für 3,7-Dimethylquercetin sogar eine stärkere pharmakologische Wirkung als für das unmethylierte Quercetin (Relaxation von Aortenringen der Ratte). Allerdings konnten Spencer *et al.* (2003) für methylierte Derivate des Quercetins (3´-O-Methyl- und 4´-O-Methylquercetin) nachweisen, dass diese im Vergleich zu Quercetin weniger zytotoxisch sind.

Aufgrund der durchgeführten HPLC-MS-MS Untersuchungen konnten jedoch nur Luteolinglucuronide, keine methylierten Verbindungen, als Metaboliten in H4IIE detektiert werden. Diese müßten nun im Folgenden mittels Neutralrot Assay daraufhin analysiert werden, ob sie weniger zytotoxisch sind als die Muttersubstanz Luteolin. Allerdings ist zu vermuten, dass Luteolinglucuronide nicht in ausreichender Menge in die Zellen aufgenommen werden. Literaturdaten belegen, dass Glucuronide in den

meisten Fällen weniger zytotoxisch sind als die Muttersubstanz. Eine Ausnahme stellt Morphin da, bei dem durch Glucuronierung eine Aktivitätssteigerung bekannt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Polyphenol-vermittelten intrinsischen Effekte zum einen vom jeweils untersuchten Polyphenol, zum anderen aber auch von der Zelllinie abhängig sind. Hierzu vergleichbar gibt es einige Befunde in der Literatur. Für Luteolin variieren die EC_{50} -Werte von 107 μ M in humanen, embryonalen Lungenfibroblasten (Matsuo *et al.*, 2005) bis zu 15-25 μ M für A431 Zellen (Huang *et al.*, 1999) bzw. für MiaPACA-2 Zellen (Lee *et al.*, 2002). Ebenso findet man abhängig vom jeweils verwendeten Zelltyp grosse Differenzen in der Quercetintoxizität mit EC_{50} -Werten von <10 μ M bis 300 μ M (Spencer *et al.*, 2003). Die Toxizität von Galangin in Zellsystemen ist bisher wenig beschrieben.

Auch wenn in dieser Arbeit die EC_{50} -Werte für Resveratrol zwischen den getesteten Zelllinien sich um den Faktor 2 unterschieden, liegen sie in etwa in den selben Konzentrationsbereichen, wie sie von anderen Gruppen gefunden wurden (Sgambato *et al.*, 2001; Hayashibara *et al.*, 2002; Ding und Adrian, 2002; Ferry-Dumazet *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die Aussagen von Yen *et al.* (2003), die in humanen Lymphozyten keinen zytotoxischen Effekt von Resveratrol (bis 100 μ M) detektieren konnten.

Neben dem Einfluss auf die Viabilität wurden auch andere zelluläre Effekte der Polyphenole untersucht.

Im *Comet*-Assay konnte gezeigt werden, dass 100 μ M Luteolin bzw. Resveratrol DNA Strangbrüche in H4IIE Zellen induzieren. In früheren Versuchen konnte ebenso in H4IIE Zellen ein DNA-schädigendes Potential für 100 μ M Quercetin nachgewiesen werden (Wätjen *et al.*, 2005).

Darüberhinaus zeigen Messungen der Lipidperoxidation (MDA-Assay), dass Luteolin (100 μ M) die Menge an MDA in H4IIE Zellen erhöht. Auch für Resveratrol ist eine leichte, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der Lipidperoxidation zu messen. Für Quercetin hingegen konnte keine signifikante Erhöhung der Lipidperoxidation detektiert werden (Wätjen *et al.*, 2005).

3.7. Apoptoseauslösung durch Polyphenole

Nachdem gezeigt worden war, dass die vier getesteten Polyphenole die Viabilität von H4IIE und C6 Zellen beeinträchtigen, wurde untersucht, ob an der zytotoxischen Wirkung die Induktion von Apoptose beteiligt ist.

Hierzu wurde zunächst die oligonukleosomale DNA Fragmentation durch Polyphenole (DNA-Leiter) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß nach 24stündiger Inkubation mit Quercetin (50 μ M), Luteolin (50 μ M) und Resveratrol (100 μ M) die elektrophoretisch aufgetrennte DNA von H4IIE Zellen das charakteristische Bandenmuster einer DNA-Leiter aufweist. Für Galangin konnte keine DNA-Leiter in H4IIE Zellen gezeigt werden. Die o.g. Konzentrationen der Polyphenole sind in guter Übereinstimmung mit den wirksamen Konzentrationen in den Viabilitätsassays für H4IIE. Es konnte gezeigt werden, dass erste zytotoxische Effekte in H4IIE Zellen bei Verwendung dieser Konzentrationen auftreten.

Zur weiteren Verifizierung des proapoptotischen Potentials der Polyphenole in H4IIE Zellen wurden Messungen der Caspase-Aktivitäten durchgeführt.

Zum Zeitpunkt 24 h nach Inkubationsbeginn ist die Aktivität der Effektorcaspase-3 in H4IIE Zellen durch Luteolin, Quercetin und Galangin gesteigert, ebenso die Aktivität der Initiatorcaspase-9. Um aufzuklären, warum Resveratrol bei dieser Versuchsanordnung nicht zur Caspaseaktivierung führte, wurden Zeitversuche durchgeführt. Eine Inkubation mit Resveratrol löst schon nach 6 h eine Aktivitätssteigerung von Caspase-2 und -10, sowie nach 12 h eine Aktivitätssteigerung von Caspase-3 aus. Nach 24stündiger Resveratrolinkubation ist die nach 12 h gemessene Aktivitätssteigerung von Caspase-3 nicht mehr nachzuweisen. Parallelversuche mit Luteolin ergaben Aktivierungen aller gemessenen Caspasen erst nach 24 h. Der Grund für den unterschiedlichen Zeitverlauf konnte nicht aufgeklärt werden.

Die Caspase-3-Aktivität nach 24stündiger Inkubation von H4IIE Zellen wurde auch mit Luteolin-5,3'-dimethylether und Luteolin-5,7,3',4'-tetramethylether gemessen. Diese beiden Luteolinderivate waren nicht in der Lage, die Aktivität von Caspase-3 in H4IIE Zellen zu erhöhen. Auf der einen Seite sind diese Ergebnisse zumindest für Luteolintetramethylether im Zusammenhang mit dem vorher durchgeführten Neutralrot Assay stimmig, da für dieses Derivat auch keine Reduktion der Zellviabilität detektiert werden konnte. Auf der anderen Seite muss nach Analyse des Zeitverlaufs der

Resveratrolwirkung auch bedacht werden, dass für bestimmte Polyphenole das Maximum der Caspaseaktivierung bei 12 h liegt und die Aktivität der Caspasen nach 24 h eventuell nicht mehr erhöht ist. Daher müßte für eine definitive Aussage zum Fehlen der Apoptose-Induktion durch Luteolin-5,3´-dimethylether die Caspase-3 Aktivität nach 6 und 12 h erneut ermittelt werden. Dies war aufgrund der limitierten Substanzmenge nicht möglich.

Aufgrund der Ergebnisse aus den DNA-Leiter Experimenten und den Messungen der Caspaseaktivitäten wurde als weitere Messung der proapoptotischen Eigenschaften der apoptotische Index nach 48 h Inkubation mit 100 und 250 µM der Polyphenole bestimmt. Nach Inkubation von H4IIE Zellen mit Luteolin sterben 40 % der Zellen apoptotisch, im Gegensatz dazu ist der Anteil der apoptotischen Zellen nach Inkubation mit den anderen Polyphenolen deutlich geringer. C6 Zellen zeigen nahezu keine Apoptose nach Polyphenolinkubation; ca. 7 % der Zellen sind nach einer Inkubation als apoptotisch zu deklarieren.

Insgesamt kann aus den durchgeführten Experimenten geschlossen werden, dass H4IIE Zellen nach Inkubation mit Polyphenolen apoptotisch sterben, wobei hier zwischen den Polyphenolen differenziert werden muss.

Eine Inkubation mit Quercetin führt zur DNA-Leiterbildung (50 μ M, 24 h) und auch zur Induktion von Caspase-3 und -9 (250 μ M, 24 h). Das Verhältnis aus apoptotischen Zellen und Gesamtzellzahl ist jedoch mit 11 % (250 μ M, 48 h) vergleichsweise gering.

Luteolin löst in den gleichen Konzentrationen wie Quercetin oligonukleosomale DNA-Fragmentationen in H4IIE Zellen aus und führt zu einer Induktion der Caspaseaktivitäten, der Anteil apoptotischer Zellen ist mit 40 % jedoch wesentlich höher als nach einer Inkubation mit Quercetin.

Anders als bei den beiden anderen Flavonoiden ist das proapoptotische Potential von Galangin zu bewerten. Galangin induziert zwar die Aktivität von Caspase-2, -3 und -9 (250 μ M, 24 h), aber es konnte keine Induktion einer oligonukleosomalen DNA-Fragmentation nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnten lediglich 7 % apoptotische H4IIE Zellen nach Galangininkubation gemessen werden.

Das Stilbenderivat Resveratrol zeigt ähnliche proapoptotische Eigenschaften wie die Flavonoide Quercetin und Luteolin. H4IIE Zellen sterben nach Resveratrol zu ca.

15 % apoptotisch und es kommt zur oligonukleosomalen DNA-Fragmentation. Ferner werden die Caspasen-2, -3 und -10 durch Resveratrol aktiviert.

In den C6 Zellen ist noch nach 24 h die Konzentration der Muttersubstanzen hoch; Metabolite werden kaum detektiert. In diesen Zellen findet keine Apoptose statt. In den H4IIE Zellen erreicht unter den eingesetzten Polyphenolen Galangin die höchste Konzentration und Luteolin die geringste; Galangin weist in diesen Zellen kaum eine proapoptotische Wirkung auf, Luteolin dagegen eine sehr deutliche. Man könnte aus diesen Unterschieden die Spekulation ableiten, dass hohe Konzentrationen der nichtmetabolisierten Polyphenole das Verhältnis zwischen Apoptose und Nekrose in Richtung Nekrose verschieben. Die schnelle Elimination der Muttersubstanzen in den H4IIE Zellen würde bedeuten, dass schon in der ersten Stunde der Schalter auf Apoptose gestellt wird, wenn sich auch die Symptome der Apoptose erst nach 6 h (Resveratrol) bzw. 24 h manifestierten. Weniger wahrscheinlich erscheint die reziproke Interpretation, dass Metabolite für die proapoptotische Wirkung verantwortlich sind.

Die Ergebnisse der Apoptosemessungen fallen für C6 Zellen (mit und ohne Serumentzug) deutlich anders aus als für H4IIE Zellen. Es muß davon ausgegangen werden, dass die Polyphenole nicht in der Lage sind, in C6 Zellen Apoptose auszulösen. Es konnte keine DNA-Leiterbildung und keine Induktion der Caspaseaktivitäten mittels der gemessenen Polyphenolkonzentrationen (bis 250 bzw. 350 μ M) gemessen werden. Dass C6 Zellen prinzipiell apoptotisch sterben können, konnte in DNA-Leiter Versuchen mit H₂O₂ und Paraquat als Positivkontrolle gezeigt werden. Die Ausbildung einer DNA-Leiter durch H₂O₂-Behandlung konnte nur mit einer 72stündigen statt einer 48stündigen Anwachszeit der Zellen gezeigt werden. Bei Verwendung von Resveratrol konnte unter diesen Versuchsbedingungen ebenfalls kein apoptotischer Zelltod der C6 Zellen gezeigt werden.

Der Neutralrot Assay zeigt deutlich, dass die Viabilität der C6 Zellen nach Inkubation mit Polyphenolen abnimmt. Daher wurde zur weiteren Verifizierung der Form des Zelltodes der Zellen der nekrotische Index bestimmt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass C6 Zellen nach Inkubation mit Resveratrol zu ca. 20 % nekrotisch sterben, wohingegen nur 2-3 % der H4IIE Zellen nekrotisch sterben. Verwendet wurden für diesen Assay 100 μ M Resveratrol, wobei der EC₅₀ -Wert der C6 Zellen 150 μ M betrug.

Sucht man nach Erklärungen für die unterschiedlichen Formen des Zelltods in H4IIE und C6 Zellen, so bietet sich als Ansatz die sehr unterschiedliche Konzentration der Muttersubstanzen und die unterschiedliche Metabolisierungsrate an.

In der Literatur sind noch weitere Zelllinien zur Untersuchung der proapoptotischen Wirkung der Polyphenole herangezogen worden, wobei allerdings intrazelluläre Konzentrationen nicht gemessen wurden. Eine apoptoseinduzierende Wirkung von Luteolin wurde in HL-60 Zellen gezeigt. Hier wurden schon proapoptotische Eigenschaften bei Inkubation mit 15-30 μ M detektiert (Yamashita und Kawanishi, 2000; Lee *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005). Diese Konzentrationen liegen niedriger als die in dieser Arbeit getesteten, wobei Ko *et al.* (2002) in HL-60 Zellen ebenfalls erst ab einer Konzentration von 50 μ M DNA-Leiter-Bildung nachweisen konnten. Die Aktivitätsmessungen der Caspasen benötigten in H4IIE Zellen relativ hohe Konzentrationen im Vergleich zur DNA-Leiter-Bildung. Dieser Effekt lässt sich anhand der Literatur nicht unterstützen, für HL-60 Zellen werden Aktivitätssteigerungen der Caspasen-3 und -9 bereits mit 60 μ M (12 h) Luteolin gemessen, wobei bei dieser Konzentration ebenfalls DNA-Leitern detektiert wurden (Cheng *et al.*, 2005).

Im Vergleich zu den Daten für Luteolin zeigte Quercetin in den hier dargestellten Apoptosemessungen in etwa den gleichen Konzentrationen wie Luteolin proapoptotische Effekte. Die Daten aus der Literatur ergeben ein ähnliches Bild für Quercetin. In Leukämiezellen der Maus zeigten Cipak *et al.* (2003) bereits mit 10 μM Quercetin proapoptotische Effekte, während Nguyen *et al.* (2004) in A549 Zellen 58 μM bzw. Mouria *et al.* (2002) in Pankreaskarzinomzellen der Ratte 100 μM Quercetin benötigten, um die Caspase-3 zu aktivieren. Jakubowicz-Gil *et al.* (2005) zeigten in HeLa Zellen, dass nach Quercetininkubation (50 μM) Chromatinkondensation als apoptotisches Merkmal auftritt.

Durch Inkubation mit Galangin (bis 350 μ M) war es in den dargestellten Versuchen nicht möglich, Apoptose in H4IIE und C6 Zellen zu induzieren. Galangin-induzierte Apoptose konnte im Gegensatz dazu von Monasterio *et al.* (2004) für humane Leukämiezellen gezeigt werden, wobei eine Aktivierung von Caspase-3 und -8, nicht jedoch von Caspase-9 auftrat.

Das Stilbenderivat Resveratrol wies in H4IIE, nicht aber in C6 Zellen proapoptotische Eigenschaften auf. Ähnliche zelltypspezifische Effekte werden in der Literatur berichtet. In HL-60 Zellen ist es möglich, Apoptose mittels Resveratrol auszulösen (Su *et al.*, 2005). Ebenso ist es möglich, in humanen Gliomazellen bzw. humanen Pankre-

askarzinomzellen einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität zu induzieren (Mouria *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005).

Szende *et al.* (2000) berichten über proliferationssteigernde Effekte niedrigerer Konzentrationen (0,1 µg/ml, 48 h) und über proapoptotische und antimitogene Effekte in höheren Dosen (100 µg / ml, 24-48 h). Auch Kuwajerwala *et al.* (2002) postulieren gegensätzliche Effekte für Resveratrol: in niedrigen Konzentrationen (5-10 µM) konnte in diversen Krebszelllinien der Anstieg der DNA-Synthese gezeigt werden, in höheren Konzentrationen (>15 µM) wurde eine Inhibition der DNA-Synthese gemessen. Um die proliferationssteigernden Effekte des Resveratrols in niedrigen Konzentrationen zu bewerten, sollte in Betracht gezogen werden, dass für Resveratrol eine Wirkung als *"endocrine disruptor"* nachgewiesen werden konnte. Resveratrol wird wegen seiner Interaktion mit den Estrogenrezeptoren- α und – β auch als Phytoestrogen bezeichnet (Harris *et al.*, 2005).

3.8. Thiolreaktivität der Polyphenole

Polyphenole sind in der Lage H-Atome abzugeben, wodurch sie selber oxidiert werden. Diese Eigenschaft zeichnet sie als Radikalfänger bzw. Antioxidans aus. Aus den protektiven Eigenschaften der Polyphenole resultieren jedoch auch prooxidative Wirkungen, da bei dieser redoxaktiven Reaktion radikalische oder chinoide Verbindungen aus den Polyphenolen entstehen. Diese radikalischen oder chinoiden Verbindungen können wiederum mit anderen Strukturen der Zelle reagieren und diese dadurch schädigen. Es kann allerdings auch zu einer Rückgewinnung des Antioxidans unter Oxidation eines anderen Antioxidans kommen (antioxidatives Netzwerk der Zelle, z.B. Vitamin C Regeneration durch Vitamin E).

Flavonoide weisen z.T. als Strukturmerkmale Catecholelemente auf. Am Beispiel des Quercetins wurde gezeigt, dass durch Oxidation diese Struktur in ein reaktives *or-tho* -Chinon umgebildet werden kann. Dieses kann mit SH-Gruppen Addukte bilden (Galati *et al.*, 1999; Boersma *et al.*, 2000; Awad *et al.*, 2000; Galati *et al.*, 2001; Awad *et al.*, 2002 a,b). Diese Befunde konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden: Bei der Reaktion von Quercetin unter oxidativen Bedingungen (HRP, H₂O₂) konnten zwei Glutathionaddukte in der HPLC mittels UV-VIS nachgewiesen werden. Awad et

al. (2000) wiesen nach, dass es sich um 6-Glutathionyl- und 8-Glutathionylquercetin handelt. Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass auch Luteolin unter oxidativen Bedingungen Glutathionaddukte bildet, wobei hier keine NMR-Analyse erfolgte. Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden wird für Luteolin jedoch eine Adduktbildung im B-Ring postuliert (Galati *et al.*, 2001).

Laut Literatur sollte eine Kopplungsreaktion von Flavonoiden mit GSH jedoch nur bei Vorhandensein von OH-Gruppen im B-Ring möglich sein (Boersma *et al.*, 2000; A-wad *et al.*, 2000; Galati *et al.*, 2001). Daher sollte das Flavonoid Galangin keine SH-Reaktivität unter oxidativen Bedingungen zeigen. In dieser Arbeit konnte durch HPLC und spektroskopische Nachweise hingegen belegt werden, dass Galangin - auch ohne dass es OH-Gruppen im B-Ring besitzt - mit SH-haltigen Verbindungen ein Ad-dukt formt. Die 3,5,7-Trihydroxy-4-en-4-on-Struktur des Galangins ist demnach für eine Reaktivität hinreichend. Eine Strukturaufklärung des GSH-Adduktes mittels NMR-Spektroskopie war aufgrund geringer Mengen des Addukts nicht möglich.

Eine toxikologische Bedeutung kann die SH-Reaktivität erlangen, indem Flavonoide mit essentiellen SH-Gruppen von Enzymen reagieren und diese so inhibieren. Für Quercetin, Luteolin und Galangin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivität der Glutathion-S-Transferase gehemmt wird. Eine 50 %ige Hemmung der Aktivität dieses Phase-II-Enzyms wurde durch 10 μ M Luteolin, 25 μ M Quercetin oder 50 μ M Galangin erreicht. Im Gegensatz zu den Flavonoiden konnte kein Einfluß des Stilbenderivats Resveratrol auf die GST Enzymaktivität nachgewiesen werden (bis 50 μ M Resveratrol). Den Ergebnissen des zellfreien Assays stehen Literaturdaten gegenüber, die für GSTP1-1 transfizierte MCF7 Zellen belegen, dass in diesem Zellsystem Galangin die Enzymaktivität stärker inhibiert als Quercetin (van Zanden *et al.*, 2004).

3.9. Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die untersuchten Polyphenole in niedrigen Konzentrationen antioxidative Effekte auf H4IIE und C6 Zellen ausüben, in höheren Konzentrationen jedoch zytotoxische und z.T. proapoptotische Effekte vermitteln. Die beiden Konzentrationsbereiche können allerdings nicht scharf voneinander getrennt

werden. So konnte für 10 μ M Luteolin eine Reduktion von ROS in H4IIE und C6 Zellen, aber auch eine Reduktion der GST-Aktivität *in vitro* gezeigt werden. 50 μ M Luteolin schützten gegen H₂O₂ -induzierte DNA-Stangbrüche, 100 μ M Luteolin lösten selbst DNA-Strangbrüche aus.

Im Folgenden sollen daher die in dieser Arbeit verwendeten Polyphenolkonzentrationen mit den beim Menschen zu erwartenden Plasmakonzentrationen verglichen werden. In zahlreichen Literaturdaten sind Mengenangaben zur täglichen Flavonoidaufnahme veröffentlicht. Hier muss jedoch eine genaue Differenzierung erfolgen, ob Gesamtflavonoidmenge oder die Menge einer Untergruppe der Flavonoide gemessen wurde. Ebenso muss ein verändertes Essverhalten der Bevölkerung berücksichtigt werden, derzeit wird aufgrund eines anderen Gesundheitsbewusstseins sicherlich mehr Obst und Gemüse verzehrt als dies früher der Fall war.

Für die täglich aufgenomme Gesamtflavonoidmenge liegen Daten zwischen 100 - 300 mg (Hollmann und Katan, 1999) bis zu ca. 650 mg / d vor (Kühnau, 1976), wobei bei der Bewertung dieser Daten sicherlich auch die Tatsache neuerer Analyseverfahren berücksichtigt werden muss. Die Menge aufgenommener Flavonole und Flavone ermittelten Hertog *et al.* (1993) mit ca. 23 mg / d, wobei Quercetin den Hauptvertreter mit ca. 16 mg / d darstellt. Insgesamt variieren die Angaben über die tägliche Aufnahmemenge an Flavonolen in der sog. *"Western diet"* von 6 bis 60 mg / d (Hollmann und Arts, 2000).

Im Pflanzenreich kommen Flavonole und Flavone meist in Form ihrer Glykoside vor. Generell wird von einer Absorption von 20-50 % der verschiedenen Quercetinglykoside ausgegangen, da die jeweils im Glykosid gebundenen Zucker sowie individuelle Parameter die Absorptionsrate beeinflussen können. Nach Gabe von z.B. vier Dosen Quercetin-Aglykon (250 mg / d) wurden Plasmakonzentrationen von 1,5 μ M detektiert (Conquer *et al.*, 1998). Wurde hingegen Quercetinglykosid in Studien eingesetzt, wurden weitaus höhere Plasmakonzentrationen gemessen: 7 μ M Quercetin nach Gabe von Quercetin-4´-O-glykosid (entsprechend 100 mg Quercetin; Graefe *et al.*, 2001); 4,5 μ M nach Gabe von 150 mg Quercetin-4´-O-glykosid und 5 μ M nach 150 mg Quercetin-3-glykosid (Olthoff *et al.*, 2000). Bei Gabe von Quercetinglykosiden aus Zwiebeln oder Äpfeln wurden beim Menschen Quercetin-Plasmaspiegel von 0,05 μ M (entsprechend Gabe von 15 mg Quercetin; de Vries *et al.*, 2001), $0,63 \mu$ M (entsprechend Gabe von 68-94 mg Quercetin; Moon *et al.*, 2000) und 7,65 μ M (entsprechend Gabe von 100 mg Quercetin; Graefe *et al.*, 2001) detektiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei täglicher Aufnahme von Quercetinglykosiden eine *steady-state* Konzentration eintritt, da für Quercetin lange Eliminationshalbwertzeiten (10-30 h) gefunden wurden.

Für Resveratrol wurde eine Absorptionsrate von 50-75 % (p.o., Ratte) gefunden (Gescher und Steward, 2003). In Studien am Menschen (Walle *et al.*, 2004) konnte jedoch nur eine geringe Bioverfügbarkeit gezeigt werden. Goldberg *et al.* (2003) konnten 30 Minuten nach Gabe von 360 μ g / kg Resveratrol eine Konzentration von 2 μ M Resveratrol in humanem Plasma detektieren. Für Resveratrol ist eine Hauptquelle der Rotwein mit ca. 1,5-5 mg / I Resveratrol. Bei moderatem Rotweingenuss (250 ml; 70 kg KG) errechnet sich daraus eine Aufnahme von ca. 5-18 μ g / kg KG.

Für eine Nutzen-Risiko-Abschätzung polyphenolhaltiger Nahrungsergänzungsmittel sollen die in dieser Arbeit gezeigten *in vitro* Ergebnisse in Bezug auf die zu erwartenen Plasmakonzentrationen beim Menschen gesetzt werden. Geht man davon aus, dass Nahrungsergänzungsmittel mit 1-2 g Quercetin eingenommen werden, kann bei täglicher Einnahme basierend auf o.g. Daten von einer Plasmakonzentration von 10 μ M bis maximal 50 μ M ausgegangen werden. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass in Zellsystemen bei Verwenden dieser Konzentrationen bereits erste toxische Wirkungen des Quercetins vorliegen.

Derzeit erhältliche Nahrungsergänzungsmittel beinhalten ca. 0,1 bis 1 g Resveratrol. Geht man davon aus, dass sich aus 1,25 mg Resveratrol / 250 ml Rotwein eine Aufnahme von ca. 18 μ g / kg KG (70 kg KG) ergibt, errechnet sich für die Nahrungsergänzungsmittel eine Aufnahme von ca. 1,4 bzw. 14 mg / kg KG. Basierend auf den Daten von Goldberg *et al.* (2003) errechnet sich hieraus eine Plasmakonzentration von ca. 8 μ M bzw. 80 μ M. Bei Verwenden dieser Konzentrationen treten im Zellsystem bereits erste toxische Wirkungen des Resveratrols auf. Ein möglicher Vorteil der Nahrungsergänzungsmittel liegt im Fehlen des Alkohols im Vergleich zum Rotwein. Nachteilig ist allerdings das Fehlen weiterer sekundärer Inhaltsstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln, wenn diese nur Resveratrol enthalten.

Für Luteolin sind nur sehr wenige *in vivo* Daten über Plasmaspiegel in der Literatur vorhanden, so dass kein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit möglich ist. Ebenso sind für Galangin bisher keine Daten über Plasmaspiegel erhältlich.

Da Galangin in Form von Propolis als "Bioantibiotikum" derzeit eine Renaissance erlebt (Seitz, 2005), sollte die Bewertung der Toxizität von Galangin stringent erfolgen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und den bisher in der Literatur dargestellten Ergebnissen sollte auch die Reaktion der Flavonoide mit SH-haltigen Strukturen berücksichtigt werden. Ferner sollte berücksichtigt werden, dass Nahrungsergänzungsmittel als Lebensmittel nicht dem analytischen Standard von Arzneimitteln unterliegen. Die Herkunft von z.B. Propolis als Galanginquelle bestimmt Menge und Art der Inhaltsstoffe, es kann daher in Nahrungsergänzungsmitteln ohne Normierung zu sehr unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen kommen (Marcucci *et al.*, 2000). Neben der Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln wird derzeit die Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Polyphenolen diskutiert (z.B. Margarine, Säfte). Auch hier muss die Nutzen-Risiko-Abwägung sorgfältig erfolgen, da besonders suszeptible Subpopulationen wie Kinder oder Schwangere diese Produkte zu sich nehmen, ohne sich darüber Rechenschaft abzulegen, dass das Lebensmittel pharmakologisch aktive Substanzen enthält.
4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

1, 1, 3, 3 - Tetraethoxypropan 2 - Thiobarbitursäure ABTS Ac-DEVD-PNA, Caspase-3-Substrat Acetonitril (HPLC) Ac-IETD-PNA, Caspase-10-Substrat Ac-LEHD-PNA, Caspase-9-Substrat Acridinorance Acrylamid-Bisacrylamidlösung 30% Ac-VDVAD-PNA, Caspase-2-Substrat Agarose NEEO für DNA, RNA Ameisensäure Ammoniumpersulfat Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay Aprotinin BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Borsäure Bradford- Reagenz Bromphenolblau Butylhydroxytoluol Calciumchlorid CDNB CHAPS Chloroform dATP, dCTP, dGTP, dTTP Deoxycholat DEPC **DMSO** DTT **EDTA** EGTA Entwickler (Kodax GBX *developer and replenisher*) Essigsäure Ethanol Ethidiumbromid [10 mg/ml] FCS (Gold) Formaldehyd 37% [v/v] Galangin Glycerol Glycin GSH H₂DCF-DA H₂Rh123

Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen ICN Biomedicals, Ohio, USA Biosolve, NL ICN Biomedicals, Ohio, USA ICN Biomedicals, Ohio, USA Sigma, Deisenhofen Roth. Karlsruhe ICN Biomedicals, Ohio, USA Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Promega Sigma, Deisenhofen Roche, Mannheim Merck, Darmstadt BioRad Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen ICN Biomedicals, Ohio, USA Merck. Darmstadt **MBI** Fermentas Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen ICN Biomedicals, Ohio, USA ICN Biomedicals, Ohio, USA Serva, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Riedel de Haen, Seelze Roth. Karlsruhe PAA. Osterreich Merck. Darmstadt Fluka, Schweiz Sigma, Deisenhofen Serva, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen

HEPES

Hoechst 33342 Imidazol Isopropanol K₂HPO₄ Kaliumdisulfit KCI KH₂PO₄ Leupeptin LMP Agarose *Loading dye solution* (6 x) LPS from Escherichia coli Serotyp 0111:B4 Luteolin

Luteolintetramethylether Magnesiumchlorid für PCR Meerrettichperoxidase Typ II [1 U = 1 mg]Methanol MaCl₂ für PCR M-MLV RT 5x Puffer N-(1-Naphtyl)ethylendiamin Na₂HPO₄ $Na_2S_2O_3$ NaCl NANOpur-Wasser NaOH Natrium(meta)vanadat Natriumfluorid Natriummolybdat Natriumtartrat Neutralrot NF-kB ELISA Kit N-Laurylsarcosin-Natriumsalz Nonidet P 40 Okadasäure

Ortho-Phosphorsäure 85 % [v/v] PCR-Puffer, MgCl₂ frei Phosphorsäure 25% [v/v] PMA PMSF Propidiumiodid Proteinstandard BSA

Quercetin Resveratrol Roti-Phenol, gepuffert, pH 7,5 – 8,0 RT-Puffer Salzsäure 37 % [v/v] SDS Serva Blau[®] (Coomassiefärbung) Biosolve, Valkenswaard, NL ICN Biomedicals, Ohio, USA Merck. Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck. Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Gibco, Spanien **Fermentas** Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Extrasynthese, Frankreich Extrasynthese, Frankreich Promega, USA Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Promega, USA Promega, USA Sigma, Deisenhofen Merck. Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Barnstead Merck, Darmstadt Fluka, Neu-Ulm Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Active Motif, Belgien Merck, Darmstadt Fluka, Neu-Ulm **Research Biochemicals Inter**national, Natick, USA Merck. Darmstadt Promega, USA Caelo ICN Biomedicals, Ohio, USA Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Bio Rad Sigma, Deisenhofen Calbiochem Roth, Karlsruhe Promega, USA Merck. Darmstadt Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg

MATERIAL UND METHODEN

TEMED Serva, Heidelberg Tetrahydrofuran Merck, Darmstadt Thermophilic DNA Polym. 10x Buffer Promega, USA TRI[®] Reagent (Trizol) Sigma, Deisenhofen Trifluoressigsäure Uvasol® Merck, Darmstadt Triton-X 100 Merck, Darmstadt Fluka, Neu-Ulm Trizma[®]-Base (Tris) Sigma, Deisenhofen Trockenmilch (*nonfat-dried milk*, *bovine*) Sigma, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Calbiochem Trolox Gibco, Spanien Trypsin Tween 20 ICN Biomedicals, Ohio, USA Wasserstoffperoxid 30 % [v/v] Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt β-Mercaptoethanol Sigma, Deisenhofen ε-Aminocaprionsäure

4.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM	4500 mg / I D-Glucose, L-Glutamine, Phenolrot, ohne Py-		
	ruvat (Gibco, Spanien)		
DMEM ohne Phenolrot	4500 mg / I D-Glucose, L-Glutamine, ohne Pyruvat (Gibco,		
	Spanien)		
Williams E-Medium	(PAA Österreich)		
Penicillin-Streptomycin	10000 u / ml Penicillin-G-Natrium, 10000 µg / ml Strepto-		
	mycinsulfat (Gibco, Spanien)		
FCS Gold	(PAA Österreich)		

4.1.3. Antikörper

Anti-MnSOD Anti-ERK sc-94 Anti-p-ERK sc-7383 Anti-JNK1 sc-474 Anti-p-JNK sc-12882 Anti-p38 sc-535 Anti-p-p38 sc-17852-R Anti- NF-κB sc-109 Pig-anti-goat Goat-anti-mouse IgG Goat-anti-rabbit IgG

polyklonal, Kaninchen IgG (Upstate cell signaling solutions)
polyklonal, Kaninchen IgG (Santa Cruz Biotechnology)
monoklonal IgG₂, Maus (Santa Cruz Biotechnology)
polyklonal, Kaninchen IgG (Santa Cruz Biotechnology)
polyklonal, Ziege IgG (Santa Cruz Biotechnology)
polyklonal, Kaninchen IgG (Santa Cruz Biotechnology)
polyklonal, Schwein (Biocarta)
HRP Konjugat (Serotec)
HRP Konjugat (Southern Biotechnology Ass., USA)

4.1.4. Enzyme Polymerasen Sonstige Enzyme	Taq-Polymerase (Promega, USA) M-MLV-Reverse Transcriptase (Promega, USA) RNase Inhibitor (MBI Fermentas) RNase A (Serva, Heidelberg) GST aus humaner Plazenta (Sigma, Deisenhofen) [14,6 U / mg]
4.1.5. Molekular DNA-Marker	Gene Ruler [®] 1 kB DNA ladder: 10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1000 / 750 / 500 / 250 kB (MBI Fermentas) Gene Ruler [®] 100 bp DNA ladder 1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100 / 80 kB (MBI Fermentas)
Proteinmarker	Page Ruler [®] Protein Ladder: 200 / 150 / 120 / 100 / 85 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 25 / 20 / 15 / 10 kDa, unstained (MBI Fermentas) Page Ruler [®] Prestained Protein Ladder: 170 / 130 / 100 / 72 / 55 / 40 / 33 / 24 / 17 / 11 kDa (MBI Fermentas)

4.1.6. Synthetische Primer

MnSOD 3 Primer:	5´ AAG CTT AGT AAG CGT GCT CCC ACA CAT C 3´		
	(Fermentas)		
MnSOD 5'Primer:	5' GGA TCC ACG TGA ACA ATC TGA ACG TCA CC 3'		
	(Fermentas)		
GAPDH 3'Primer:	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'		
	(Operon Europe)		
GAPDH 5'Primer:	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'		
	(Operon Europe)		
Oligo-(dT) ₁₆ -Primer	(Promega, USA)		

4.1.7. Puffer und Lösungen Aufnahme (HPLC-DAD und HPLC-MS-MS):

0,15 % [v/v] Phosphorsäure	85 % ortho-Phosporsäure in NANOpur-Wasser zu 0,15 % [v/v] verdünnt, pH 2,0
0,1 % [v/v] Ameisensäure	Ameisensäure mit NANOpur-Wasser zu 0,1 % [v/v] verdünnt
TEAC Assay:	
TEAC-Lösung	14 mM ABTS (Wasser, 1 Woche haltbar, lichtge- schützt, im KS) und 4,9 mM APS (Wasser, 1 Woche haltbar, lichtgeschützt, KS) am Vorver- suchstag 1:1 mischen, Lagerung lichtgeschützt, RT
Trolox	100 mM in Ethanol

H2DCF-DA und H2Rh123 Assay:	
H ₂ DCF-DA-Gebrauchslösung	H ₂ DCF-DA-Stocklösung (100 mM Stammlösung H ₂ DCF-DA in DMSO) 1:1000 in DMEM ohne Phe- nolrot
H ₂ Rh123-Gebrauchslöusng	H ₂ Rh123-Stocklösung (50 mM Stammlösung in DMSO) 1:1000 in DMEM ohne Phenolrot
Einzelzell-Gelelektrophorese (Co	omet-Assav).
Lyse-Stammlösung	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma [®] -Base, 50 ml N-Laurylsarcosin-Natriumsalz-Lösung 10 % [w/v], pH 10
Lyse-Gebrauchslösung	1 ml Triton-X 100, 10 ml DMSO, 89 ml Lyse- Stammlösung, vor Gebrauch mindestens 1 Stunde bei 4 °C aufbewahren
Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, Leitfähigkeit 60-65 mS, Lagerung bei 4 $^{\circ}$ C
Neutralisationspuffer Färbelösung	0,4 M Trizma [®] -Base in Wasser, pH 7,5 Ethidiumbromidstammlösung (0,5 mg / ml in Was- ser) 1:25 mit Wasser verdünnen (Endkonz: 20
LMP-Agarose	µg / mi) 0,5 % [w/v] LMP Agarose in Wasser, vor Gebrauch Agarose bei 95 ℃ schmelzen und bei 37 ℃ lagern
<u>RT-PCR:</u> DEPC-H ₂ O 75% DEPC-Ethanol [v/v]	0,01 % DEPC in dH ₂ O, üN rühren, autoklavieren Ethanol absolut mit DEPC-H ₂ O auf 75 % verdün- nen, üN rühren, autoklavieren
<u>Westernblot:</u> RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCI (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM ED- TA, 1 % [w/v] NP-40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat in Wasser, pH 8.0 Lagerung bei 4 °C
RIPA-Gebrauchspuffer	1 ml RIPA-Puffer, 10 μ l PMSF (100 mM, DMSO), 6,7 μ l Aprotinin (1,5 mg / ml, DMSO) und 10 μ l Leupeptin (1 mg / ml, DMSO) frisch herstellen
Phosphatase-Inhibitormischung	1 mM Natriumvanadat, 1,15 μ M Natriumfluorid, 1 mM Natriummolybdat, 2 mM Imidazol, 4 mM Natriumtartrat, kurz vor Gebrauch 1 μ M Okadasäu- re dazu geben; 8,8 μ I der Mischung in 800 μ I RIPA- Gebrauchspuffer
10 % [w/v] APS	1 g APS ad 10 ml Wasser, aliqoutiert bei –20 $^{\circ}$ C
50 mM Kaliumphosphatpuffer	0,626 g KH ₂ PO ₄ , 10,361 g K ₂ HPO ₄ ad 1 l dH ₂ O, pH 7,8, Lagerung bei 4 °C
10 % [w/v] SDS	100 g SDS ad 1 l dH ₂ O, unter langsamem Rühren lösen
Sammelgelpuffer (2x)	250 mM Trizma [™] -Base, 0,2 % [w/v] SDS in Wasser, pH 6,8, Lagerung bei 4 ℃
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Trizma [™] -Base, 0,4 % [w/v] SDS in Wasser, Lagerung bei 4 ℃, pH 8,8

SDS-Probenpuffer (4x)	40 % [w/v] Glycerol, 20 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % [w/v] Bromphenolblau in 2x
Laufpuffer (10x)	250 mM Trizma [®] -Base, 1,92 M Glycin in Wasser,
SDS-Laufpuffer	25 mM Trizma [®] -Base, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v]
Kathodenpuffer	25 mM Trizma [®] -Base, Methanol 20% [v/v], ϵ -
Anodenpuffer	Trizma [®] -Base 200 mM, Methanol 20 % $[v/v]$ in Wasser, pH 10.4
Blockierlösung	3 % Trockenmilch (Sigma) in dH ₂ O, 5 % Trocken- milch (Roth) in dH ₂ O
Ponceau Färbelösung (Membra	n) 0,2 % [w/v] Ponceau S, 3 % [v/v] Trichloressig- säure, 3 % [w/v] Sulfosalicylsäure ad 1 I dH ₂ O
TBS-Puffer (10x)	100 mM Trizma [®] -Base, 1,5 M NaCl in Wasser, pH 7.4
TBST-Puffer PBS Puffer (10x)	10 x TBS –Puffer 10 % [v/v], 0,1 % [v/v] Tween 20 1,37 M NaCl, 27 M KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ in Wasser, pH 7.4, autoklavieren
Fixierer	300 g Natriumthiosulfat, 30 g Kaliumdisulfit ad 1 l dH_2O
Entwickler Färbelösung (Membran)	250 ml Konzentrat der Fa. Sigma, 750 ml dH ₂ O 80 ml Methanol, 4 ml Essigsäure, 0,28 g Serva Blau [®] Reagenz, ad 200 ml dH ₂ O, filtrieren, kann
Entfärbelösung (Membran)	50 % Methanol [v/v], 1 % Essigsäure [v/v]
Zellfraktionierung: Puffer A	1 ml 10 mM HEPES (pH 7,9), 0,1 ml 1 M KCl, 0,1 ml 10 mM EDTA (pH 8.0) 0.1 ml 10 mM EGTA 10
Puffer B	μ I 1 M DTT, 50 μI 100 mM PMSF (DMSO), 100 μI Leupeptin (1 mg / mI DMSO), 67 μI Aprotinin (1,5 mg / mI DMSO), dH ₂ O ad 10 mI, frisch herzustellen 2 mI 100 mM HEPES (pH 7,9), 4 mI 1 M KCI, 1 mI 10 mM EDTA, 1 mI 10 mM EGTA, 10 μI 1 M DTT, 100 μI 100 mM PMSF (DMSO), 100 μI Leupeptin (1 mg / mI DMSO), 67 μI Aprotinin (1,5 mg / mI DMSO) dH ₂ O ad 10 mI frisch herzustellen
NP-40	$10 \% [v/v] in dH_2O$
<u>Neutralrot Assay:</u> Neutralrot-Gebrauchslösung	20 ml DMEM Medium, 250 μl Neutralrotstammlö- sung (0,4 % [w/v], in Wasser), vor Gebrauch frisch
Fixierlösung Extraktionslösung	1 % Formaldehyd [v/v], 1 % Calciumchlorid [w/v] 50 % Ethanol [v/v], 1 % Essigsäure [v/v]
Nachweis von Malondialdehyd (H Phosphatpuffer	<u>HPLC):</u> Na ₂ HPO ₄ und KH ₂ PO ₄ 25 mM, pH 2,7
0,2 % [W/V] ButyInydroxytoluol	Butyinyaroxytoluol 0,2 % [w/v] in Methanol

0,6 % [v/v] Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran 0,6 % [v/v] in 5 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ - Lösung
Tetraethoxypropan	in 50 % [v/v] Methanol
DNA-Leiter:	
Lyse-Puffer	10 ml Tris-HCl (1 M, pH 8,0), 30 ml 20 % [w/v] SDS, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad 1 l, autoklavieren, Lagerung bei 4 $^{\circ}$ C
Ethidiumbromidstocklösung	10 mg Ethidiumbromid / ml dH ₂ O, Lagerung in Braunglas bei 4 ℃, pro 100 ml Agarosegel 100 µl verwenden
TBE-Puffer (10x)	108 g Trizma [®] -Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l dH ₂ O, autoklavieren
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA pH 8,0, au- toklavieren, Lagerung bei 4 °C
RNase A	10 mg RNase A in 1 ml Wasser 10 min bei 100 ℃ denaturiert, Lagerung bei –20 ℃.
5 M NaCl Lösung	5 M NaCl, autoklavieren
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA, pH 8, autoklavieren.
Tris-HCI	0,1 M Trizma ^w -Base, pH 8, autoklavieren
PBS (10x)	1,37 M NaCl, 27 M KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH_2PO_4 in Wasser, pH 7,4, autoklavieren
Bestimmung der Aktivität von Ca	ispasen:
Lysispuffer Caspase	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 μM EDTA, pH 7,4, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
Assaypuffer Caspase	55 mM HEPES, 110 mM NaCl, 110 μ M EDTA, pH 7,4, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
Lyse-Gebrauchslösung	5 mg CHAPS , 5 µl DTT Lösung (1 M) in 4,990 ml Lysispuffer, frisch herzustellen
Assay-Gebrauchslösung	5,334 ml Assaypuffer, 6 mg CHAPS, 60 μl 1 M DTT Lösung, 600 μl Glycerol, frisch herzustellen
Reaktivität von Flavonoiden mit	Thiolen:
Natriumphosphatpuffer	NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 25 mM, pH 7,4
GST-Aktivitätsbestimmung:	
Kaliumphosphatpuffer pH 6,5	K_2HPO_4 und KH_2PO_4 100 mM, pH 6,5
Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	K_2HPO_4 und KH_2PO_4 100 mM, pH 7,4
Giutathion-S-Iransterase	In Kallumphosphatputter (pH /,4) gelost zu einer
	C Furg / ml hai Varauahan varauandat
CDNR	$0.5 \ \mu\text{g} \ / \ \text{ml}$ bei Versuchen verwendet
CDNB GSH	$0.5 \ \mu\text{g} / \text{ml}$ bei Versuchen verwendet CDNB 20 mM in Ethanol 20 mM Lösung in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.5)

MATERIAL UND METHODEN

4.1.8. Geräte	
Kamera Fluoreszenzmikroskop	CoolSNAP-Pro (Intas)
pH - Meter	Radiometer Copenhagen PHM 93
Blotting-Apparaturen	Biometra, Pharmacia LKB Multiphor II
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, HBO 50 (Zeiss)
Geldokumentationsanlage	Gel-Doc 2000 (Bio-Rad)
HPLC-MS-MS (Aufnahme)	Agilent HP 1100 (Photodiodenarray De-
	tektor)
	Finnigan LCQ ^{Deca} MS (Thermoquest)
	Ionenquelle: ESI (Thermoquest)
	Vakuumpumpe: Edwards 30 (BOC)
	Säule: Eurospher 100-C18 [5 μm, 227 x 2
	mm] (Knauer)
HPLC-DAD (Aufnahme)	Pumpe: P 580 (Dionex)
	Probengeber : ASI-100 (Dionex)
	Detektor: UVD 340S (Dionex)
	Saulenoten: STH 585
	Saule: Eurospher 100-C18 [5µm; 125 mm
HPLC (MDA)	HPLC 360 Autosampier
	REM 25 Spectrofluoromator (Kontron In
	strumonts)
	NovaPak® C18-Säule / um 3.9 v
	150 mm (Millinore)
HPLC (GSH-Addukte)	HPLC HP 1100 Diodenarray-Detektor
	C-18 Säule. 5 μ m. 3.2 x 150 mm
	(Supelco Inc.)
CO ₂ -Inkubator	IG 150 (Jouan)
Mikroskop Zellkultur	Axiovert 100 (Źeiss)
Photometer	Lamda-25 UV/VIS-Spektrophotometer
	Lamda-10 UV/VIS-Spektrophotometer
	(Perkin Elmer)
Plattenlesegerät	Wallac Victor ² 1420 multilabel counter
	(Perkin Elmer)
Rührer	Heidolph MR 2002
Schüttler	Edmund Bühler Swip KL-2
Sterilbänke	LC2 (Jouan)
	BSB 4 (Bartholomei Labortechnik)
Ihermocycler	Gene Amp PCR System 2400 (Perkin
	Elmer)
The second set of the second	I-Personal PCR System (Biometra)
Ultraschallspitze	Labsonic 1510 (Braun)
waage	Satorius backweigner AC 120S-00DC
Waaaaranlaga	
wasseraniage	Behropur® Wasservollentsalzer, Millipore
Zontrifugon	(Denir Labonechnik) Minifuga 2, Typ: 402 (Haraassa Obriat)
Zentinugen	$\frac{1}{10000000000000000000000000000000000$
	MR1812 (Journ) P 24 48 (Hottich)
	Microfuge R (Reckmann)
	wicioluge in (Deckillalili)

4.1.9. Sonstige Materialien

Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal Röntgenfilme Proteinmembranen (Brand) X-OMAT AR Film XAR-5 (Kodak) PVDF Western Blotting Membranen (Roche)

4.1.10. Computerhardware und -software

Geldokumentationsanlage	GelDoc 2000: Quantity One 4.1.0 (Bio-Rad)
Fluoreszenzmikroskop	Image-Pro plus, Version 4.5.1.22 (Media cybernetics)
HPLC (GSH-Addukte)	Agilent Chemstation for LC and LC/MS
HPLC (MDA)	PC Integration Pack Version 3.92
HPLC-Software (Aufnahme)	Chromeleon 6.30
Photometer	UV-Winlab (Perkin Elmer)
Plattenlesegerät	Wallac Victor ² Wallac 1420 software ver-
C C	sion 2.00 release 9 (Perkin Elmer)
Sonstige	Word, Exel, Powerpoint, Photo Editor
-	(Microsoft Corporation Version 2000)

4.2. Methoden

4.2.1. Zelllinien und ihre Kultivierung

4.2.1.1. H4IIE Zellen

Diese Zelllinie ist ein Subklon des H35 Reuber-Hepatoms (Rattenhepatom) und wurde 1964 von Pitot *et al.* isoliert und von Evans *et al.* (1977) und Kovacs *et al.* (1977) charaktierisiert. H4IIE Zellen sind relativ differenziert und werden als Modellsystem für Hepatozyten der Ratte benutzt.

4.2.1.2. C6 Zellen

Die Ratten C6-Gliom Zelllinie wurde nach Induktion mit N-Nitrosomethylharnstoff aus einer Glia-Sarkomzelle gewonnen (Benda *et al.*, 1968). Diese pluripotenten Glia-Progenitorzellen können in frühen Passagen durch Zugabe neuronaler Faktoren zu Oligodendrozyten differenzieren. Ohne diese Faktoren entwickeln die Zellen astrozytische Eigenschaften und stellen ein Modellsystem für Astrozyten im Labor dar. Da bei längerer Kultivierung eine Transdifferenzierung von C6-Gliomzellen auftritt, wurden in den Experimenten nur C6-Zellen bis zur Passage 50 verwendet. Die charakteristischen Eigenschaften von C6 Zellen bleiben über 80 Passagen (Parker *et al.*, 1980; Mangoura *et al.*,1989) erhalten.

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dieter Leibfritz (Universität Bremen, Institut für Organische Chemie) zur Verfügung gestellt.

4.2.1.3. Kultivierung der Zellen

Das Wachstumsmedium der Zellen (DMEM High Glucose) enthielt als Serumanteil 10 % (H4IIE) bzw. 5 % (C6) fötales Kälberserum (FCS). Ausserdem wurden dem Zellkulturmedium Penicillin (100 U / ml) und Streptomycin (100 μ g / ml) zugesetzt. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (5 % CO₂) gehalten. Pro 64 cm² (10 cm Durchmesser) Kulturschale wurden ca. 2 x 10⁶ Zellen (C6) als Monolayer herangezüchtet, pro 75 cm² Zellkulturflasche ca. 3 x 10⁶ Zellen (H4IIE). Der Verdopplungszeitraum betrug ca. 17 Stunden für C6 Zellen (Gosslau, 1998) bzw. 25 Stunden für H4IIE.

Da eine Kontaktinhibition auftritt, mussten die Zellen zweimal wöchentlich passagiert werden. Für die durchgeführten Experimente wurden nur Zellen der 23.- 40. (H4IIE) bzw. der 27. - 50. (C6) Passage verwendet. Die Morphologie der Zellen wurde vor Durchführung der Experimente lichtmikroskopisch überprüft.

Das Passagieren der Zellen (Subkultivierung) geschah durch Ablösen der Zellen von der Kulturschale mit Trypsin-EDTA und anschliessende Aufnahme in frischem Medium (H4IIE) bzw. durch Abspülen der Zellen von den Kulturschalen mit frischem Medium (C6).

4.2.1.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen (2 x 10⁶ (C6) bzw. 1,5 x 10⁶ (H4IIE)) wurden auf Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) ausplattiert und bis ca. 70 % Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wurde abgesaugt und adhärente Zellen mit frischem Medium von der Zellkulturschale abgenommen (C6) bzw. abtrypsinisiert (H4IIE) und in frischem Medium aufgenommen. Danach wurde zentrifugiert (500 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 1000 μ I FCS suspendiert. 900 μ I der Suspension wurden in Kryoröhrchen überführt, die 100 μ I DMSO enthielten (10 % [v/v] DMSO Endkonzentration). Die Kryoröhrchen wurden direkt bei –80 °C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen zwischen den Handflächen gerieben, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Dann wurde die Zellsuspension in eine 75 cm² Kulturflasche mit 20 ml DMEM (H4IIE) bzw. in eine 10 cm Zellkulturschale mit 15 ml DMEM (C6) überführt.

Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.2.2. Aufnahme (HPLC-DAD und HPLC-MS-MS)

1,5 x 10⁶ Zellen (H4IIE) bzw. 2 x 10⁶ Zellen (C6) wurden in Zellkulturschalen (10 cm) ausgesät.

Die Zellen wurden nach 72 Stunden Anwachszeit inkubiert oder nach 24 Stunden Anwachszeit für weitere 48 Stunden in serumfreiem Medium gehalten und danach mit der zu analysierenden Substanz inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden adhärente und bereits vom Boden der Zellkulturschale abgelöste Zellen im Medium suspendiert und zentrifugiert (5000 rpm, 2 min). Das Pellet wurde 3 x mit je 1 ml PBS Puffer gewaschen.

Vor der Messung wurde das Pellet mit 300 µl Methanol versetzt, suspendiert und die Zellen mit einer Ultraschallspitze (4 x 5 sec, 100 W) unter Eiskühlung lysiert.

Die darauf folgende Extraktion der lysierten Zellen sowie die Identifizierung und Quantifizierung der Polyphenole und ihrer Metaboliten wurde mit Hilfe der HPLC durchgeführt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Proksch, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, HHU Düsseldorf).

Zur Extraktion wurden die vorher gewonnenen Zelllysate 1 Minute im Ultraschallbad (Sonorex RK 510 H, Bandelin) und danach 5 Stunden unter Schütteln (200 rpm, Edmund Bühler) behandelt. Danach wurde zentrifugiert (13500 rpm, 5 min) und der ÜS in der HPLC analysiert. Es wurde eine binäre Gradientenelution nach unten angegebenem Schema verwendet. Die stationäre Phase bestand aus RP-18 Material, die Elutionsmittel waren 0,15 % [v/v] Phosphorsäure (pH 2,0) (Eluent A) und Methanol (Eluent B).

Zeit (min)	% Eluent A [v/v]	% Eluent B [v/v]
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
50	90	10
60	90	10

Das Injektionsvolumen betrug 20 μ l, die Flussrate betrug 1 ml / min bei einer konstanten Temperatur von 20 °C.

Die aufgenommenen Substanzen wurden über ihre UV-Spektren identifiziert. Die Quantifizierung der aufgenommenen Menge Substanz erfolgte mittels der Peakfläche (254 nm) des externen Standards (5 - 100 µM Sustanz in DMSO).

Zusätzlich wurden die Zellextrakte in der HPLC-MS-MS analysiert. Hierbei handelt es sich um eine Kopplung eines chromatographischen Verfahrens mit einem Massenspektrometer als Detektor. Anhand der UV-Spektren und Molekulargewichte konnten Metaboliten der untersuchten Substanzen identifiziert werden. Als Ionisierungsmethode wurde das ESI - Verfahren gewählt. Als Fließmittel wurden 0,1 % [v/v] Ameisensäure (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) verwendet. Es wurde nach oben beschriebenem Elutionsschema gearbeitet. Als stationäre Phase wurde RP-18 Material verwendet.

4.2.3. TEAC Assay

Der *trolox equivalent antioxidative capacity* (TEAC) Assay ist ein *in vitro* Assay, der zur Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Substanzen verwendet wird (Miller *et al.*, 1993). Hierbei wird die Reduktion eines stabilen tiefgrün gefärbten Radikals (ABTS⁻) durch antioxidative Stoffe zum farblosen ABTS photometrisch gemessen. Als Referenzsubstanz für die antioxidative Kapazität wird das synthetische Vitamin E – Derivat Trolox verwendet.

Zunächst wurde zur Generierung des ABTS-Radikals eine 14 mM ABTS-Lösung mit einer 4,9 mM Ammoniumpersulfat-Lösung 1:1 gemischt.

Zur Messung wurde die ABTS⁻ Lösung 1:30 mit Ethanol verdünnt. 500 µl Troloxlösung (100 mM, Ethanol) wurde zu Endkonzentrationen von 0 bis 25 µM mit 500 µl verdünnter ABTS⁻ Lösung gemischt. Die Abnahme der Absorption wurde im Photometer bei 734 nm über 2,5 Minuten aufgezeichnet. Der Absorptionswert nach 2,5 Minuten wurde als Maß für die antioxidativen Eigenschaften bzw. für die Radikalfänger-Eigenschaften der untersuchten Stoffe verwendet. Trolox diente als Referenzsubstanz für die antioxidative Wirkung.

4.2.4. Nachweis von ROS (H₂DCF-DA und H₂Rh123 Assay)

Zum fluorimetrischen Nachweis für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen wurde als Sonde 2´,7´-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) angewendet (Oyama *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994). H₂DCF ist ein nicht-fluoreszierendes Molekül, das durch ROS zu 2´,7´-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert werden kann. DCF besitzt gegenüber dem H₂DCF ein konjugiertes π - Elektronensystem und kann im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen werden. Da H₂DCF nicht membranpermeabel ist, wird die Substanz in modifizierter Form als 2´,7´-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) eingesetzt, welches lipophiler ist und über die Zellmembran diffundieren kann. In der Zelle wird es enzymatisch von Esterasen gespalten, und der hydrophilere Farbstoff liegt in seiner reduzierten, nicht-fluoreszenten Form in der Zelle vor. Durch den Einsatz von H₂DCF-DA wird ein Zurückdiffundieren des Fluoreszenzindikators verhindert.

Ferner wurde H₂Rh123 als Sonde verwendet, welches in der Zelle durch ROS zu Rh123 oxidiert wird. Rh123 kann durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden (Wrona *et al.*, 2005).

Zur Messung der ROS-Menge wurden 5 x 10^4 Zellen im 96er Well für 24 Stunden ausgesät. Es erfolgte ein Mediumwechsel (C6: serumfrei), weitere 48 Stunden Anwachszeit und erneuter Mediumwechsel (DMEM farblos, serumfrei) oder es erfolgte nur ein Mediumwechsel (C6 mit Serum, H4IIE; DMEM farblos mit 5 % (C6) bzw. 10 % FCS (H4IIE)).

Nach dem jeweiligen Mediumwechsel wurden die Zellen mit Flavonoiden inkubiert, um protektive Effekte nachzuweisen. Am Ende der Inkubationszeit wurden 100 μ l H₂DCF-DA-Gebrauchslösung bzw. H₂Rh123-Gebrauchslösung (DMEM farblos, 50 μ M H₂DCF-DA bzw. 25 μ M H₂Rh123) hinzugegeben und die Fluoreszenzintensität (Exzitation 485 nm, Emission 535 nm) gemessen. Nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden alle 15 Minuten die Fluoreszenz gemessen, um entstehende ROS in der Zelle zu detektieren.





Abb. 4.2.: Strukturformeln H₂DCF-DA (A), DCF (B), H₂Rh123 (C), Rh123 (D)

4.2.5. Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)

Zur Durchführung der Einzelzell-Gelelektrophorese (Singh *et al.*, 1988) wurden 5 x 10⁵ H4IIE Zellen / Well auf Sixwells ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachszeit erfolgte die Inkubation. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gespült.

Zum Ablösen der adhärenten Zellen wurden 100 µl Trypsin-EDTA / Well hinzupipettiert, die Suspension wurde in 900 µl DMEM Medium aufgenommen.

Zu je 20 µl Zellsuspension wurden 200 µl LMP-Agarose 0,5 % gegeben und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen.

Die Objektträger wurden im Kühlschrank gekühlt (4 - 5 min), das Deckglas nach dieser Zeit abgezogen und die Präparate über Nacht im Kühlschrank in Lysepuffer aufbewahrt.

Nach der alkalischen Lyse der Zellen wurden die Objektträger mit der Gelschicht nach oben in eine Elektrophoresekammer gelegt (Eiskühlung). Es wurde Elektrophoresepuffer (4 °C) eingefüllt, so dass die Objektträger 2 - 3 mm mit Puffer bedeckt waren. Nach einer Wartezeit von 25 Minuten (alkalische Denaturierung der DNA, Expression verschiedener Klassen alkalilabiler Stellen) erfolgte die Elektrophorese (25 V, 300 mA, 25 min).

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger zunächst kurz in Wasser getaucht, dann mit Neutralisationspuffer überschichtet (2 x 5 min). Nach erneutem Spülen mit Wasser wurden die Objektträger in Ethanol (80 % [v/v]) gestellt, bevor sie bei Raumtemperatur getrocknet wurden (mindestens 2 Stunden).

Nach dem Trocknen wurden 30 μ l Ethidiumbromidlösung (20 μ g / ml) auf die Objektträger pipettiert, mit Deckglas abgedeckt und die Kometenlänge wurde am Fluoreszensmikroskop (400fache Vergrößerung, Anregungswellenlänge 515 - 560 nm, Barrierefilter 590 nm) gemessen. Als *"image length"* wurde die Gesamtlänge von Kern und gewanderter DNA in μ m gemessen. Es wurden mindestens 50 Zellen pro Experiment ausgemessen.

Die Durchführung des Comet-Assays erfolgte durch Frau P. Niering.

4.2.6. *Reverse Transkription PCR* (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist eine zyklische Reaktion, bei deren Ablauf, ausgehend von einer denaturierten DNA-Matrize, unter Bindung von Primern und Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges spezifische DNA-Bereiche amplifiziert werden (Mullis und Faloona, 1992).

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Erweiterung der PCR-Reaktion. Bei dieser Form der PCR dient RNA als Matrize und wird in einem ersten Reaktionsschritt durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Als Startpunkt für die cDNA-Synthese dient die Bindung eines Oligo(dT)₁₆ -Primers an das polyadenylierte 3´-Ende des RNA-Strangs.

RNA – Gewinnung aus Zellen:

Für die RT-PCR wurden 1,5 x 10⁶ Zellen (H4IIE, 10 cm Zellkulturschalen) bzw. 8 x 10⁵ Zellen (C6, Sixwells) ausgesät und nach 48 Stunden Anwachszeit bzw. nach Serumentzug über 48 Stunden (C6) mit der zu testenden Sustanz inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden adhärente und bereits vom Boden der Zellkulturschalen / Sixwells abgelöste Zellen im Medium aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde mit 800 μ l TRI® Reagent versetzt und durch wiederholtes Pipettieren lysiert. Die RNA-Isolation erfolgte durch Zugabe von 300 μ l Chloroform. Der Ansatz wurde geschüttelt (15 sec) und anschliessend für 3 Minuten stehen gelassen (RT). Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 14000 rpm, 15 min). Die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen, mit 600 μ l Isopropanol versetzt und die RNA für 10 Minuten bei RT gefällt.

Nach Zentrifugation (4 ℃, 15000 rpm, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das RNA-Pellet mit 800 µl 75 % DEPC-Ethanol ge-

waschen (4 °C, 15000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 20 μ l DEPC-H₂O gelöst und die RNA spektrophotometrisch quantifiziert.

Die RNA wurde zunächst in unten beschriebener RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde die PCR-Reaktion zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen durchgeführt.

A) RT-Reaktion:

Der RT-PCR Reaktionsansatz wird nach folgendem Schema zusammengestellt:

	Stammlösungen	Endkonzentration	1 x Ansatz
Puffer	5 x	1 x	5 μl
dNTPs	5 mM	0,5 mM	Je 2,5 μl
Oligo(dT) ₁₆ -Primer	50 μM	2 µM	1 µl
RNase Inhibitor	40 u / µl	1,6 u / µl	1 µl
Reverse Transkriptase	200 u / μl	8 u / µl	1 µl
DEPC-H ₂ O			Х
RNA		1 µg	У
Summe			25 μl

Die Proben wurden zunächst für 5 Minuten bei 21 °C und dann für 1 h bei 42 °C inkubiert. Durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 99 °C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet (5 min bei 5 °C, danach 4 °C). Nach der cDNA-Synthese wurde mit spezifischen Primern eine PCR-Reaktion angeschlossen.

B) PCR-Reaktion:

Für die PCR-Reaktion wird eine spezielle DNA-Polymerase, die sogn. Taq-Polymerase verwendet. Diese wird aus *Thermophilus aquaticus* gewonnen und übersteht fast ohne Funktionsverlust Denaturierungstemperaturen von 90 - 95 °C. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet. Neben der Konzentration der Mg²⁺-Ionen ist der pH – Wert und die Anwesenheit von K⁺-Ionen für die Funktion des Enzyms von Bedeutung.

Eine PCR setzt sich aus drei Schritten zusammnen: Im ersten Schritt wird die DNA-Matritze bei 94 °C denaturiert, so dass beide komplementären Stränge als *Template* vorliegen. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, lagern sich die beiden Primer an. Im dritten Schritt werden die Transkripte in 5'-3'-Richtung durch die Taq-Polymerase verlängert. Die Neusynsthese der DNA-Stränge (Elongation) durch die TaqPolymerase erfolgte bei 72 °C. Bei dieser Temperatur hat das Enzym seine optimale Aktivität. Anschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C, um sicher zu stellen, dass die Polymerase alle noch offenen Transkripte beenden konnte. Die Annealingtemperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen (T_M) der Primer. Diese sollten annähernd gleich sein, um eine optimale Bindung beider Primer an die Templatestränge zu gewähren. Mit Hilfe einer "Faustformel" kann die spezifische *Annealing-Temperatur* eines Primers an der DNA-Matrize abgeschätzt werden.

"Faustformel" für die Berechnung der *"Primer-Annealing-Temperatur"*: $T_M(^{\circ}C) = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$

Die Spezifität der Primerbindung an die DNA-Matritze ist von der Temperatur, dem Anteil an GC-Basen im Primer sowie der Primerlänge abhängig. Die Primer sollten möglichst 20 Basen lang sein und einen GC-Gehalt von 50 % haben.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema auf Eis zusammenpipettiert:

	Stammlösungen	Endkonzentration	1 x Ansatz
Puffer	10 x	1 x	2,5 μl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	5 mM	0,2 mM	Je 1µl
5´Primer	10 µM	0,4 μM	1 µl
3´Primer	10 µM	0,4 μM	1 µl
Taq-Polymerase	5 U / μl	0,04 U /µl	0,2 μl
DEPC-H ₂ O			13,05 μl
Template			1,25 µl
Summe			25 µl

Folgende Zyklenzahlen wurden für die GAPDH- bzw. MnSOD-PCR verwendet:

	GAPDH	MnSOD
Denaturierung DNA	3 min	5 min
Annealing	45 sec	1 min
60 ℃	45 sec	1 min
Elongation	2 min	2 min
Finale Elongation	7 min	7 min

H4IIE: 25 Zyklen GAPDH, 31 Zyklen MnSOD <u>C6:</u> 28 Zyklen GAPDH, 29 Zyklen MnSOD Zur Auswertung wurden die PCR-Proben auf ein Agarosegel (1 %, Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 μ g / ml) aufgetragen und in der Geldokumentationsanlage GelDoc (BioRad) ausgewertet.

4.2.7. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten bei 260 nm im UV/VIS-Spektrophotometer. Die Konzentration wurde auf der Grundlage folgender Werte ermittelt:

> für DNA: 1 OD = 50 μ g / ml DNA für RNA: 1 OD = 40 μ g / ml RNA

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei λ = 260 nm und λ = 280 nm kann als Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA benutzt werden. Bei reiner DNA bzw. RNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

4.2.8. Westernblot

Für den Westernblot wurden 8 x 10⁵ / Well C6 Zellen auf Sixwells bzw. 1,5 Mio / 10 cm Petrischale (für p38 / pp38 Messung) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel (serumfrei) durchgeführt und nach weiteren 48 Stunden die Zellen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden adhärente und bereits vom Boden der Sixwells abgelöste Zellen im Medium suspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 2000 rpm), das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1000 rpm, 4 ℃).

Für den NF-κB Westernblot erfolgte eine Zellfraktionierung, während für die anderen Westernblots das Gesamtprotein eingesetzt wurde. Für die Gewinnung des Gesamtproteins wurde das Zellpellet mit 250 μl RIPA-Gebrauchspuffer bzw. 100 μl Phosphatase-Inhibitormischung (für p38 / pp38 Messung) versetzt und kurz suspendiert. Die Proben wurden zur Lyse bei -80 °C eingefroren (mind. 30 min), aufgetaut und wieder eingeforen. Nach Lyse der Zellen wurden die Proben zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 10 min) und der Überstand für Proteinbestimmung und Westernblot verwendet.

Für den Westernblot wurden nachstehend beschriebene Versuchsbedingungen verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

	Trenngel [%]	Sammelgel [%]	Proteinmenge [µg] / <i>lane</i>
MnSOD	15	4,5	4
ERK	10	4,5	0,75
pERK	10	4,5	6
JNK	10	4,5	6
pJNK	10	4,5	6
p38	10	4,5	4
pp38	10	4,5	6
NF-κB	9	4,5	8

Konzentrationen der verwendeten Gele, Proteinmengen:

Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel [9 %]	Trenngel [10 %]	Trenngel [15 %]	Sammelgel [4,5 %]
Acrylamid-Bisacrylamidlösung 30 %	1,8 ml	2 ml	3 ml	0,6 ml
Trenn-/ Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	2 ml
dH ₂ O	2,7 ml	2,5 ml	1,5 ml	1,388 ml
APS 10 % [w/v]	30 µl	30 µl	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	5 μl	5 μl	4 μl

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer (¹/₄ des Gesamtprobenvolumens zur Denaturierung des Proteins) und Kaliumphosphatpuffer bis zu einem Endvolumen von 16 µl versetzt. Vor Beladen des Gels wurden die Proben 10 Minuten bei 95 °C inkubiert.

Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 15 mA und für weitere 2 - 3 Stunden bei max. 150 V.

Vor dem Blotten wurde das Gel zunächst 5 Minuten in Kathodenpuffer gewaschen. Die Membran wurde 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend mit reichlich dH₂O gewaschen.

Auf die Anodenplatte der Blottingapparatur wurden übereinander 4 mit Anodenpuffer getränkte Whatmanpapiere und darauf die aktivierte PVDF-Membran gelegt. Auf die Membran wurden das Gel und zuoberst 4 mit Kathodenpuffer getränkte Papiere luftblasenfrei gelegt. Das Blotten erfolgte bei 200 mA über 54 Minuten (NF-κB), 60 Minuten (ERK, pERK, JNK, pJNK, p38, pp38) oder 90 Minuten (MnSOD).

Anschliessend wurde die Membran in TBS-Puffer gewaschen und mit Ponceau S Lösung zur Kontrolle des Blottingvorganges gefärbt. Nach dem Entfärben mit dH_2O wurde zur Blockierung non-fat-dried milk Sigma 3 % (0,1 ml x cm²) über 1 Stunde (MnSOD, JNK, pJNK; Edmund Bühler Swip KL-2) bzw. über Nacht bei 4 °C mit nonfat-dried milk Roth 5 % (0,1 ml x cm²) (ERK, pERK, p38, pp38, NF-κB; unter Rotieren) dazugegeben.

Danach wurde der primäre Antikörper in Milchlösung hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Rotieren (MnSOD, JNK, pJNK) bzw. 1 Stunde bei RT unter Schütteln (ERK, pERK, p38, pp38, 200 rpm, Edmund Bühler Swip KL-2) inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran mit 20 ml TBST-Puffer (s. Schema unten) gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper in Milchlösung für eine Stunde zu der Membran gegeben wurde. Im Anschluss wurde wiederum mit TBST-Puffer gewaschen.

Es wurden folgende Antikörperkonzentrationen sowie folgende Waschschritte nach der Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper verwendet:

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Waschschema (20 ml TBST)
MnSOD 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	3 x / 1 Stunde
ERK 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	3 x / 1 Stunde
pERK 1:400	Anti-mouse 1:2000	2 x / 1 Stunde
JNK 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	3 x / 1 Stunde
pJNK 1:1000	Anti-goat 1:3000	3 x / 1 Stunde
p38 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	2 x / 1 Stunde
pp38 1:1000	Anti-rabbit 1:5000	2 x / 1 Stunde
NF-кВ 1:500	Anti-rabbit 1:5000	3 x / 1 Stunde

Verwendete Antikörper, Waschschemata:

Zur Detektion wurde das frisch gemischte Chemilumineszenz-Reagenz (Roche, 1584 μ l Lösung 1, 16 μ l Lösung 2) für 2 Minuten auf die Membran gegeben. Im direkten Anschluss wurde der Film belichtet (Expositionszeiten: MnSOD 15-60 sec; ERK 15-30 sec; pERK 3-5 min; JNK 0,5-3 min; pJNK 1-10 min; p38 15-60 sec; pp38 15-60 sec; NF- κ B 1-3 min).

Zur abschliessenden Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Membran mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und durch zweimaliges Waschen mit Entfärbelösung wieder entfärbt.

4.2.9. Proteinbestimmung modifiziert nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Bradford (1976).

Dazu wurden 20 μl Probe mit 1 ml Bradford-Farbreagenz (1:5 mit dH₂O verdünnt, filtriert) in Plastikküvetten gemischt. Es wurde 15 Minuten bei RT inkubiert und die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen einen Blankwert (20 μl des jeweiligen Puffers, 1 ml Bradford-Farbreagenz) im Photometer gemessen.

Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer BSA-Eichkurve (25 – 300 μ g / ml) bestimmt.

4.2.10. Densitometrische Auswertung von Agarosegelen und Filmen

Die densitometrische Auswertung der Filme und der Agarosegele erfolgte mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Geldoc 2000 (BioRad) in Verbindung mit der Auswertesoftware Quantity One 4.1.0.

4.2.11. NF-кВ ELISA

NF-κB wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen p65 NF-κB - ELISA-Kits (Active motif) bestimmt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet (Version B). Die inkubierten Zellen wurden mit Hilfe der Zellfraktionierung aufgearbeitet, jeweils 10 μg Protein / Well wurden für den ELISA eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenlesegerät bei 450 nm.

4.2.12. Zellfraktionierung

Zur Trennung von Kern- und Cytosolproteinen wurde eine Zellfraktionierung verwendet. Hierfür wurden am Ende der Inkubationszeit adhärente und bereits vom Boden der Zellkulturschale abgelöste Zellen im Medium vereint und zentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Das erhaltene Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 2000 rpm), wobei der letzte Zentrifugationsschritt 15 Sekunden bei 13000 rpm erfolgte. Das so erhaltene Pellet wurde in 150 µl Puffer A (pro Well einer Sixwellplatte) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Zellsuspension 4 x durch eine 25G Kanüle gezogen. Es wurden 25 μ l 10 % [v/v] NP-40 hinzugegeben und suspendiert. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand (Cytosolfraktion) abgenommen und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 50 μ l Puffer B aufgenommen und 25 Minuten bei 4 °C mit einem Metallrührer lysiert. Der nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) erhaltene Überstand (Kernfraktion) wurde wiederum bei -80 °C eingefroren.

Die Proteinbestimmung beider Fraktionen erfolgte mit Bradford-Reagenz.

4.2.13. Bestimmung der Viabilität mit dem Neutralrot Assay

Der Neutralrot-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Zellviabilität (Borenfreund und Puerner, 1986). Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der von lebenden Zellen aus dem Medium aufgenommen und intrazellulär in den Lysosomen angereichert wird. Innerhalb der Lysosomen findet aufgrund des niedrigeren pH-Wertes eine Protonierung des Farbstoffs statt, wodurch der Farbstoff an der Rückdiffusion gehindert wird (*ion trap*).

Zur Durchführung des Viabilitätstests wurden ca. 10^4 Zellen / Well auf einer 96-Wellplatte (bzw. 2,5 x 10^4 auf 24-Wellplatten) ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachszeit wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen versetzt.

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und 200 µl / 96-Well (bzw. 1000 µl / 24-Well) Neutralrot-Gebrauchslöung hinzugegeben. Nach dreistündiger Inkubation (37 °C) mit dem Farbstoff wurde die Neutralrot-Gebrauchslösung abgenommen und die Zellen mit Fixierlösung (200 µl / Well) fixiert. Nach wenigen Sekunden wurde die Fixierlösung abgenommen und die Zellen durch Zugabe von Extraktionslösung (200 µl / 96-Well bzw. 1000 µl / 24-Well) lysiert, so daß der intrazellulär gespeicherte Farbstoff frei wurde. Nach ca. 2 Stunden leichten Schüttelns bei Raumtemperatur (200 rpm, Edmund Bühler Swip KL-2) bzw. Stehenlassens über Nacht bei 4 °C wurde die Absorption im Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

Bei Verwendung der 24-Wellplatte wurden vor der Absorptionsmessung 200 µl auf eine 96-Wellplatte umpipettiert und die Extinktion im Plattenlesegerät bei 560 nm gemessen. Das Umpipettieren erfolgte um die Assays miteinander vergleichen zu können.

Da die C6 Zellen in den Westernblot Versuchen 48 Stunden vor Versuchsdurchführung in serumfreies Medium überführt wurden, wurde auch der Viabilitätstest entsprechend modifiziert.

Es wurden hierfür 2 x 10⁴ C6 Zellen / Well auf einer 24-Wellplatte ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachszeit wurden die Zellen für weitere 48 Stunden in serumfreiem Medium gehalten und danach mit den zu analysierenden Substanzen inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.



Abb. 4.3.: Strukturformel Neutralrot

4.2.14. Nachweis von Malondialdehyd

Freie Radikale können mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren freie Fettsäureradikale bilden, indem aus der den Doppelbindungen benachbarten Methylengruppen ein Wasserstoffatom abgespalten wird. Die entstandenen Fettsäureradikale können mit O₂ zu hochreaktiven Peroxidradikalen reagieren. Diese Reaktion leitet den Zerfall der Fettsäurekette zu Malondialdehyd, 4-Hydroxy-2-*trans*-hexenal und weiteren Produkten ein. Dieser membranschädigende Prozess wird Lipidperoxidation genannt.

Malondialdehyd (MDA) als Endprodukt der Oxidation von zellulären Lipiden wurde als Maß für die Lipidperoxidation im Kulturüberstand der Zellen bestimmt. MDA wurde nach einer Reaktion mit Thiobarbitursäure als Thiobarbitursäure - MDA - Komplex mittels HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion nachgewiesen (modifiziert nach Draper *et al.*, 1993).

Für den Versuch wurden 2,5 x 10⁵ H4IIE Zellen / Well in Sixwells ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in Williams E-Medium (ohne PhenoIrot) inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden adhärente und schwimmende Zellen im Medium suspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (4 °C, 30 min, 15000 rpm) und der erhaltende ÜS zur Quantifizierung in der HPLC verwendet. Bis zur Durchführung der MDA-Bestimmung wurde der ÜS bei -80 °C gelagert.

Zur Bildung des TBS-MDA-Komplexes wurden jeweils 0,5 ml Zellkulturüberstand mit 1,05 ml einer 25 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Lösung (pH 2,7), 0,5 ml einer gesättigten Thiobarbitursäure und 20 μ l einer 0,2 % Butylhydroxytoluol-Lösung (in Methanol) gemischt und für 30 Minuten bei 93 °C inkubiert. Die Proben wurden dann 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. 20 μ l dieser Probe wurden mittels HPLC bei einer Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (20 % [v/v] Acetonitril, 0,6 % [v/v] Tetrahydrofuran in 5 mM Na₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH_{Fließmittel} 6,7) von 0,5 ml / min aufgetrennt. Der TBS-MDA-Komplex hatte eine Retentionszeit von ca. 3,2 min und wurde durch einen Fluoreszenzdetektor (Exzitation 532 nm, Emission 553 nm) identifiziert und quantifiziert. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve von Tetraethoxypropan (0,05 – 1 pmol, in 50 % [v/v] Methanol), welches zu MDA zerfällt.

Die Aufarbeitung der Proben und der Nachweis von MDA wurden von Frau Dr. Q.-H. Tran-Thi durchgeführt.

4.2.15. DNA-Leiter als Apoptosenachweis

Im Verlauf der Apoptose schneiden Ca²⁺/Mg²⁺-abhängige Endonukleasen die DNA in den Linkerregionen, was zu einem charakteristischen Bandenmuster im Agarosegel führt. Das Vorhandensein der "DNA-Leiter" ist ein Nachweis für einen apoptotischen Zelltod. Eine apoptotische DNA-Leiter besteht aus oligonukleosomalen DNA-Fragmenten, deren Grösse jeweils ein Vielfaches von etwa 180 bp beträgt.

Es wurden 1,5 x 10⁶ Zellen (H4IIE) auf 10 cm Zellkulturschalen bzw. 8 x 10⁵ Zellen (C6) / Well auf Sixwells ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte bei C6 (serumfrei) ein Mediumwechsel für 48 Stunden. Die übrigen Zellen wurden nach 24 Stunden Anwachszeit (C6) bzw. 48 Stunden (H4IIE) mit der zu testenden Substanz inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden adhärente und bereits vom Boden der Zellkulturschalen abgelöste Zellen im Medium vereint und zentrifugiert (1700 rpm, 2 min). Das Pellet wurde mit PBS Puffer gewaschen (12000 rpm, 5 min) und anschliessend bei -20 °C eingefroren.

Zur Isolierung der DNA aus den Zellen wurde das Zellpellet mit 500 μ l Lysispuffer und 5 μ l RNase A (10 mg / ml) versetzt. Es wurde vorsichtig suspendiert. Die Suspension wurde 40 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zur Proteinfällung wurden 125 µl 5 M NaCl (60 min, 4 °C) zugeben.

Der Überstand (15 min, 12000 rpm, 4 ℃) wurde zur weiteren Abtrennung von Proteinen mit 250 µl Chloroform und 500 µl gepuffertem Phenol (pH 7,5 - 8) versetzt und für 2 Minuten geschüttelt. Danach wurde erneut zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 ℃), 650 µl Chloroform zum ÜS gegeben und wiederum 2 Minuten geschüttelt. Es wurde erneut zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 ℃).

Die DNA wurde nach Zugabe von 1000 µl Isopropanol (-20 ℃) zum Überstand üN bei -20 ℃ gefällt. Das Pellet (15 min, 12000 rpm, 4 ℃) wurde an der Luft getrocknet und in 30 µl TE Puffer pH 8,0 aufgenommen.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,75 % Agarosegel in TBE-Puffer unter Zusatz von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 μ g / ml verwendet. Nach dem Aufkochen der Agarose-Lösung wurde sie nach kurzem Abkühlen (ca. 60 °C) in einen Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Gelkammer gelegt und mit TBE-Puffer überschichtet.

Die Proben (4 µg DNA / *lane*, 20 µl Gesamtvolumen) wurden mit 5 µl *loading dye solution* versetzt, 5 Minuten bei 65 °C erhitzt und danach sofort im Eisbad gekühlt. Danach wurde die Probe in die Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V über 3 Stunden. Die Visualisierung der aufgetrennten Fragmente erfolgte mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (BioRad).

4.2.16. Bestimmung der Aktivität von Caspasen

Im Verlauf der Apoptoseinduktion werden Caspasen aktiviert. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz C-terminal nach einem Aspartat-Rest schneiden. Caspasen sind zentrale Enzyme für den Ablauf der Apoptose, zu ihren Substraten zählen Procaspasen, Strukturproteine, Inhibitoren und Enzyme.

Zur Bestimmung der Caspaseaktivität nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen wurden zunächst 1,5 x 10⁶ Zellen auf Zellkulturschalen (10 cm, H4IIE) oder 8 x 10⁵ Zellen / Well auf Sixwells (C6) ausgesät. Bei den C6 Zellen wurde ggf. nach 24 Stunden ein Mediumwechsel (serumfrei) vorgenommen. Die Inkubation erfolgte dann nach 48 Stunden Kultivierung mit serumfreiem Medium.

Nach 48 Stunden Anwachszeit (H4IIE) bzw. 24 Stunden (C6 serumhaltig) wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden adhärente und bereits vom Boden der Zellkulturschale abgelöste Zellen im Medium aufgenommen, zentrifugiert (3 min, 2000 rpm) und das Zellpellet mit PBS-Puffer gewaschen (2 min, 5000 rpm), in 70 µl Lyse-Gebrauchslösung aufgenommen und zur vollständigen Lyse mit einem Metallrührer suspendiert (4 ℃, 15 min, 500 rpm, Heidolph MR 2002). Die lysierte Zellsuspension wurde bei – 80 ℃ üN eingefroren.

Der durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 15300 rpm) erhaltene Überstand wurde für den Assay sowie für die Proteinbestimmung verwendet.

	Blank [µl]	Probe [µl]
Assay-Gebrauchslösung	90	80
Caspasesubstrat [2 mM]	10	10
Probe	-	10
Gesamtvolumen	100	100

In Wells einer 96-Wellplatte wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Durch die von Caspasen katalysierte Hydrolyse des Substrates wurde Nitrophenol freigesetzt, das photometrisch (405 nm, 37 ℃) detektiert werden konnte. Die Caspaseaktivität ergibt sich aus der Steigung der Absorption über 3 Stunden (Δ 405 nm, 3 h). Gezeigt werden Daten als Prozent der Kontrolle, normiert auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe.

Die Caspasesubstrate sind mit Nitrophenol gekoppelte Tetrapeptide mit der spezifischen Schnittsequenz für Caspasen. Verwendet wurde z.B. für die Messung der Aktivität der Caspase-3 das Substrat Ac-DEVD-PNA. Dies ist an *para*-Nitrophenol gekoppeltes acetyliertes Tetrapeptid aus folgenden Aminosäuren: Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Valin (V), Asparaginsäure (D).

Gemessen wurden die Aktivität der Caspase-2 (Ac-VDVAD-PNA; Alanin (A)), Caspase-3 (Ac-DEVD-PNA), Caspase-9 (Ac-LEHD-PNA; Leucin (L), Histidin (H)) sowie Caspase-10 (Ac-IEDT-PNA; Isoleucin (I)). Die Verwendung des Substrates Ac-IEDT-PNA ist nicht der Messung der Caspase-10 alleine gleichzusetzen, da z.B. auch Caspase-8 wegen der Unspezifität des Substrats gemessen wird. Die Reduzierung des gemessenen Effektes auf die Caspase-10 dient der Vereinfachung, oft wird daher auch die Aktivität von "IEDTase" statt der Aktivität von Caspase-10 angegeben.

4.2.17. Nachweis der apoptotischen Kernfragmentation

Zur Bestimmung der apoptotischen Kernfragmentation wurde die zelluläre DNA durch einen Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33342, DMSO), der in der DNA interkaliert, tiefblau gefärbt. War das Chromatin kondensiert oder ein Zellkern aufgrund apoptotischer Prozesse in einzelne Fragmente zerfallen (*apoptotic bodies*), konnte dies im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden die Zellen jeweils noch einmal im Durchlichtmikroskop auf ihre Morphologie überprüft.

 1×10^5 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (33 mm) ausgesät und nach 48 Stunden bzw. nach 48 Stunden Serumentzug mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde 15 Minuten mit Hoechst 33342 (50 µM) inkubiert (37 °C). Die Zellen wurden nach vorsichtigem Entfernen des Mediums mit einem Deckgläschen (10 x 10 mm) abgedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Filter, 365 nm Excitation) analysiert.

Der apoptotische Index ergibt sich aus der Zahl der apoptotischen Zellen zur Gesamtzellzahl in mindestens drei zufällig ausgesuchten Gesichtsfeldern.

4.2.18. Nachweis der Induktion von Nekrose durch Polyphenole

1 x 10⁵ Zellen wurden auf Zellkulturschalen (33 mm) ausgesät und nach 48 Stunden mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit 50 μ l Acridinorange (1 mg / ml) und 50 μ l Propidiumiodid (1 mg / ml) für 5 Minuten inkubiert (37 °C). Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums mit einem Deckgläschen (10 x 10 mm) abgedeckt und mit dem Fluoreszmirkoskop analysiert.

Der nekrotische Index ergibt sich aus der Zahl der nekrotischen Zellen zur Gesamtzellzahl in vier zufällig ausgesuchten Gesichtsfeldern.

4.2.19. Reaktivität von Flavonoiden mit Thiolen

Flavonoide können unter oxidativen Bedingungen Chinone bilden (Galati *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 2001), die in der Zelle mit Thiolen reagieren können. Um diese Thiolreaktivität verschiedener Flavonoide zu untersuchen, wurde GSH verwendet und die gebildeten GSH - Addukte spektrophometrisch sowie in der HPLC analysiert (Awad *et al.*, 2000; Boersma *et al.*, 2000).

A) Spektroskopischer Nachweis von Flavonoidthiolen

Es wurden 2,5 μ M Flavonoid, 1 mM GSH, 200 μ M H₂O₂ und 20 nM HRP in Natriumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) gegeben. Die Spektren (240 - 500 nm) wurden 5 Minuten nach Mischen der Substanzen bei pH 7,4 und pH 2,2 (mit HCI) aufgenommen.

B) Nachweis von Flavonoidthiolen mittels HPLC

Es wurden 50 μ M Flavonoid, 1 mM GSH, 200 μ M H₂O₂, 0,1 μ M HRP in Natriumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,4) gelöst. Von dieser Mischung wurden 10 μ l in der HPLC vermessen.

Hierfür wurde eine HP 1100 Anlage mit einer C-18 Säule verwendet. Das Elutionsschema beinhaltete lineare Gradientenelution und isokratische Elutionsschritte (Eluent A: 0,1 % [v/v] Trifluoressigsäure, Eluent B: Acetonitril):

Zeit (min)	% Eluent A [v/v]	% Eluent B [v/v]
0 - 10	95 - 85	5 - 15
10 - 20	85	15
20 - 25	85 - 65	15 - 35
25 - 28	65 - 40	35 - 60
28 - 30	40	60
30 - 32	40 - 60	60 - 40
32 - 37	60 - 95	40 - 5

Die Flussrate war 0,7 ml / min, der maximale Druck betrug 400 bar. Die Säulentemperatur war konstant 22 °C, der pH betrug 2,2.

Zur Detektion wurde ein Diodenarray-Detektor verwendet, der die Spektren zwischen 200 und 450 nm aufzeichnete.

Die gezeigten HPLC - Chromatogramme wurden bei 290 nm gemessen.

4.2.20. GST-Aktivitätsbestimmung

Die Superfamilie der Glutathion-S-Transferasen (GST) umfasst cytosolische, mitochondriale und microsomale Isoenzyme. Die hier verwendete GST P1-1 ist eine cytosolische Transferase. Die Hauptfunktion der GST stellt die Konjugation elektrophiler Substrate mit GSH im Phase-II-Metabolismus dar.

GSH + RX _____ GST → GSR + HX

Die Bestimmung der Aktivität der GST erfolgte mit Hilfe einer *in vitro* Messung. Die GST katalysiert dabei die Reaktion von CDNB mit GSH unter Bildung von GS-Dinitrobenzol und Salzsäure. Das Produkt dieser Reaktion wurde bei 340 nm im UV-Spektophotometer gemessen.



Die zu testende Substanz wurde in Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5) zu einem Endvolumen von 1 ml gelöst und mit 100 μ l Enzymlösung (0,5 μ g / ml, 1 μ g = 0,0146 U, in Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) versetzt. Nach kurzem (!) Suspendieren wurde 2 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50 μ l CDNB (20 mM) sowie 50 μ l GSH (20 mM) hinzugegeben. Nach erneutem kurzem Suspendieren, wurde die Absorption der Lösung im UV-Spektrophotometer bei 340 nm über 2 Minuten gemessen. Die Steigung ist ein Maß für die Menge des entstehenden Endprodukts und somit ein Maß für die Aktivität der GST.

Das nur kurze Suspendieren ist hier sehr wichtig, da das Enzym durch zu langes Suspendieren zerstört werden kann.

4.2.21. Apo-ONE[®] Assay

Die Aktivität der Caspase-3/7 wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Apo-ONE[®] Assays (Promega) bestimmt. Es wurden 50.000 Zellen (H4IIE) auf 96-Wellplatten aufgesät. Nach 24 Stunden Anwachszeit wurden die Zellen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, 50 µl frisches Medium hinzugegeben und 50 µl des Apo-ONE[®] Reagenzes zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte bei 37 °C im Plattenlesegerät bei 405 nm.

4.2.22. Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Mittelwerte aus Einzelversuchen untereinander wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) durchgeführt, als posthoc Test wurde der LSD Test (*least significance difference*, Analyse-it) verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus mindestens drei durchgeführten Einzelversuchen.

5. Literaturverzeichnis

- Anderson, G.L., Judd H.L., Kaunitz A.M., Barad D.H., Beresford S.A., Pettinger M., Liu J., McNeeley S.G., Lopez A.M., WHI steering committee (2004 a) Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the women's health initiative randomized trial. *JAMA* 290, 1739-48.
- Anderson G.L., Limacher M., WHI steering committee (2004 b) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA* 291, 1701-1712.
- Andlauer W., Kolb J., Siebert K., Furst P. (2000) Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.* 26, 47-55.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A.M., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.-J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R., Marinou J.-C. (1997) Inhibition of bax channel-forming activity by bcl-2. Science 277, 370-372.
- Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M. (1998) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 1355-1363.
- Arts I.C.W. und Hollmann P.C.H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. clin. Nutr.* 81, 317S-25S.
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2002 b) The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 343-351.
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van der Woude H., van Zanden J., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2002 a) Identification of *o*quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.* 520, 30-34.
- Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M. (2000) Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide glutathione adducts. *Arch. Biochem. Biophy.* 378, 224-233.
- Bailey D.G., Malcom J., Arnold O., Spencer J.D. (1998) Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46, 101-110.
- Barinaga M. (1998) Alzheimer's treatments that work now. Science 282, 1030-1032.
- Bast A., Haenen G.R.M.M. (2002) The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Tox. Pharm.* 11, 251-258.
- Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L., Sweet W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-371.
- Birt D.F., Hendrich S., Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: falvonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 90,157-177.

- Boersma M.G., van der Woude H., Bogaards J., Boeren S., Vervoort J., Cnubben N.H.P., van Iersel M.L.P.S., van Bladeren P.J., Rietjens I.M.C.M. (2002) Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 662-670.
- Boersma M.G., Vervoort J., Szymusiak H., Lemanska K., Tyrakowska B., Cenas N., Segura-Aguilar J., Rietjens I.M.C.M. (2000) Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 185-191.
- Borello S. und Demple B. (1997) NF-κB-independent transcriptional induction of the human manganous superoxide dismutase gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 348, 289-294.
- Borenfreund E. und Puerner J.A. (1986) Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology* 39, 121-134.
- Bortner C.D. und Cidlowski J.A. (2002) Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 259-81.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical. Biochem.* 72, 248-254.
- Bras M., Queenan B., Susin S.A. (2005) Programmed cell death via mitochondria : different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)* 70, 231-239.
- Briviba K., Pan L., Rechkemmer G. (2002) Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132, 2814-2818.
- Bröker L.E., Kruyt F.A.E., Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155-3162.
- Brownson D.M., Azios N.G., Fuqua B.K., Dharmawardhane S.F., Mabry T.J. (2002) Flavonoid effects relevant to cancer. *J. Nutr.* 132, 3482S-3489S.
- Burke R.E., Kholodilov N.G. (1998) Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease?. *Ann. Neurol.* 44, 126-33.
- Cai J., Yang J., Jones D.P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366, 139-149.
- Cain K., Bratton S.B., Langlais C., Walker G., Brown D.G., Sun X.-M., Cohen G.M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active ~700 kDa and inactive ~1.4 MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6067-6070.
- Cain K., Brown D.G., Langlais C., Cohen G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (~700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* 274, 22686-22692.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 749-760.

- Chao Y., Shiozaki E.N., Srinivasula S.M., Rigotti D.J., Fairman R., Shi Y. (2005) Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol.* 3, 1079-108.
- Cheng A.-C., Huang T.-C., Lai C.-S., Pan M.-H. (2005) Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *Europ. J. Pharmacol.* 509, 1-10.
- Choi Y.-J., Jeong Y.-J., Lee Y.-J., Kwon H.-M., Kang Y.-H. (2005) (-)Epigallocatechin gallate and quercetin enhance survival signaling in response to oxidant-induced human endothelial apoptosis. *J. Nutr.* 135, 707-713.
- Choi Y.-J., Kang J.-S., Park J.H.Y., Lee Y.-J., Choi J.-S., Kang Y.-H. (2003) Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxidetreated human vascular endothelial cells. *J. Nutr.* 133, 985-991.
- Cipak L., Rauko P., Miadokova E., Cipakova I., Novotny L. (2003) Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leukemia Research* 27, 65-72.
- Cogswell P.C., Guttridge D.C., Funkhouser W.K., Baldwin A.S. (2000) Selective activation of NF-κB subunits in human breast cancer: potential roles for NF-κB/p52 and for Bcl-2. *Oncogene* 19, 1123-1131.
- Conquer J.A., Maiani G., Azzini E., Raguzzini A., Holub B.J. (1998) Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart diseases in healthy subjects. *J. Nutr.* 128, 593-597.
- Cottrell D.A., Blakely E.L., Borthwick G.M., Johnson M.A., Taylor G.A., Brierley E.J., Ince P.G., Turnbull D.M. (2000) Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 908, 199-207.
- Cross T.G., Scheel-Toellner D., Henriquez N.V., Deacon E., Salmon M., Lord J.M. (2000) Serine/Threonin Protein Kinases and apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 256, 34-41.
- Croteau D.L. und Bohr V.A. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 25409-25412.
- Dajas F., Rivera-Megret F., Blasina F., Arredondo F., Abin-Carriquiry J.A., Costa G., Echeverry C., Lafon L., Heizen H., Ferreira M., Morquio A. (2003) Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 36, 1613-1620.
- Delhalle S., Blasius R., Dicato M., Diederich M. (2004) A beginner's guide to NF-κB signaling pathways. *Ann. NY Acad. Sci.* 1030, 1-13.
- Della Ragione F., Cucciolla V., Borriello A., Della Pietra V., Racioppi L., Soldati G., Manna C., Galletti P., Zappia V. (1998) Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 53-58.
- De Vries J.H., Hollmann P.C., van Amersfoort I., Olthof M.R., Katan M.B. (2001) Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *J. Nutr.* 131, 745-748.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65, 337-353.

- Ding X.-Z. und Adrian T.E. (2002) Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 25, e71-e76.
- Draper H.H., Squires E.J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Hadley M. (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad. Biol. Med.* 15, 353-363.
- Dulak, J. (2005) Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *J. Physiol. Pharmacol.* 56, 51-69.
- El-Mowafy A.M., White R.E. (1999) Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Letters* 451, 63-67.
- Erhardt P., Schremser E.J., Cooper G.M. (1999) B-raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/ERK pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5308-5315.
- Evans M.J., Kovacs C.J. (1977) Properties of the H-4-II-E tumor cell system. I. Growth and cell proliferation kinetics of an experimental hepatoma. *Cell Tissue Kinet.* 10, 233-43.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Henson P.M. (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* 108, 957-962.
- Ferry-Dumazet H., Garnier O., Mamani-Matsuda M., Vercauteren J., Belloc F., Billiard C., Dupouy M., Thiolat D., Kolb J.P., Marit G., Reiffers J., Mossalayi M.D. (2002) Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis* 23, 1327-1333.
- Fiala E.S., Sohn O.S., Wang C.-X., Seibert E., Tsurutani J., Dennis P.A., El-Bayoumy K., Sodum R.S., Desai D., Reinhardt J., Aliaga C. (2005) Induction of preneoplastic lung lesions in guinea pigs by cigarette smoke inhalation and their exacerbation by high dietary levels of vitamins C and E. *Carcinogenesis* 26, 605-612.
- Finkel T. und Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Floyd R.A. (1999) Antioxidants, Oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc Biol. Med.* 222, 236-245.
- Fridovich I. (1989) Superoxide dismutases. J. Biol. Chem. 264, 7761-7764.
- Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P.J. (1999) Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 521-525.
- Galati G., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J. (2001) Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 370-382.
- Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O'Brien P.J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177, 91-104.

- Gambuti A., Strollo D., Ugliano M., Lecce L., Moio L. (2004) trans-Resveratrol, Quercetin, (+)-Catechin, and (-)-Epicatechin content in south italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food chem.* 52, 5747-5751.
- Gescher A.J. und Steward W.P. (2003) Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Canc. Epidem. Biomarkers Prev.* 12, 953-957.
- Gille G., Sigler K. (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* 40 131-52
- Goldberg D.M., Soleas G.J., Levesque M. (1999) Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clin. Biochem.* 32, 505-18.
- Goldberg D.M., Soleas G.J., Yan J. (2003) Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* 36, 79-87.
- Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D. (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121, 29-65.
- Goodman G.E., Thornquist M., Kestin M., Metch B., Anderson G., Omenn G.S. (1996) The association between participant characteristics and serum concentrations of beta-carotene, retinol, retinyl palmitate, and alpha-tocopherol among participants in the carotene and retinol efficacy trial (CARET) for prevention of lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 815-21.
- Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Meyskens F.L., Omenn G.S., Valanis B., Williams J.H. (2004) The beta-carotene and retinol efficacy trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J. Nat. Cancer Inst.* 96, 1743-50.
- Gosslau A. (1998) Vergleichende Untersuchungen zur Induktion von Streßproteinen durch oxidativen Streß und Hitzeschock in C6 Rattengliomazellen. *Dissertation Universität Bremen.*
- Gougeon M.-L. und Montagnier L. (1999) Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. *Ann. NY Acad. Sci*, 887, 199-212.
- Graefe E.U., Wittig J., Mueller S., Riethling A.-K., Uehleke B., Drewelow B., Pforte H., Jacobasch G., Derendorf H., Veit M. (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 41, 492-499.
- Groenendyk J. und Michalak M. (2005) Endoplasmatic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 381-395.
- Guerrero M.F., Puebla P., Carron R., Martin M.L., San Roman L. (2002) Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from Croton schiedeanus Schlecht. *JPP* 54, 1373-1378.
- Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253-65.

- Halliwell B., Rafter J., Jenner A. (2005) Health promotion by flavonoids, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 268S-76S.
- Harris D.M., Besselink E., Henning S.M., Go V.L., Heber D. (2005) Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp. Biol. Med.* 230, 558-68.
- Hayashibara T., Yamada Y., Nakayama S., Harasawa H., Tsuruda K., Sugahara K., Miyanishi T., Kamihira S., Tomonaga M., Maita T. (2002) Resveratrol induces downregulation in survivin expression and apoptosis in HTLV-1-infected cell lines: a prospective agent for adult T cell leukemia chemotherapy. *Nutr. Cancer* 44, 193-201.
- Heijnen C.G.M., Haenen G.R.M.M., Oostveen M.R., Stalpers E.M., Bast, A. (2002) Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Rad. Res.* 36, 575-581.
- Heijnen C.G.M., Haenen G.R.M.M., Vekemans J.A.J.M., Bast A. (2001) Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10, 199-206.
- Hengartner M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-776.
- Henson P.M., Bratton D.L., Fadok V.A. (2001) Apoptotic cell removal. *Current biology* 11, R795-R805.
- Heo M.Y., Sohn S.J., Au W.W. (2001) Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research* 488, 135-150.
- Hertog M.G., Hollmann P.C., Katan M.B., Kromhout D. (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-9.
- Hollmann P.C.H. und Arts I.C.W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols nature, occurence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081-1093.
- Hollmann P.C.H. und Katan M.B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chemic. Tox.* 37, 937-942.
- Holmes-McNary M. und Baldwin A.S. (2000) Chemopreventive properties of *trans*resveratrol are associated with inhibition of activation of the I-κB kinase. Cancer Res. 60, 34877-83.
- Horbinski C., Chu C.T. (2005) Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 2-11.
- Huang Y.T., Hwang J.J., Lee P.P., Ke F.C., Huang J.H., Huang C.J., Kandaswami C., Middleton E., Lee M.T. (1999) Effect of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* 128, 999-1010.
- Ichijo H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18, 6087-6093.

- Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K., Gotoh Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Ishikawa Y. und Kitamura M. (2000) Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK and ERK-mediated apoptotic pathway. *Kidney Intern* 58, 1078-1087.
- Isoherranen K., Peltola V., Laurikainen L., Punnonen J., Laihia J., Ahotupa M., Punnonen K. (1997) Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 40, 288-293.
- Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Piersiak T., Glowniak K., Glawron A., Kandefer-Szerszen M. (2005) The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem. J.* 69, 1343-1350.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220.
- Ji L.L., Leeuwenburgh C., Leichtweis S., Gore M., Fiebig R., Hollander J., Bejma J. (1998) Oxidative stress and aging. *Ann. NY Acad. Sci* 854, 102-17.
- Jiang H., Zhang L., Kuo J., Kuo K., Gautam S.C., Groc L, Rodriguez A.I., Koubi D., Hunter T.J., Corcoran G.B., Seiman M.D., Levine R.A. (2005) Resveratrolinduced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol. Cancer Ther.* 4, 554-561.
- Joe A.K., Liu H., Suzui M., Vural M.E., Xiao D., Weinstein I.B. (2002) Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 8, 893-903.
- Kajiya K., Ichiba M., Kuwabara M., Kumazawa S., Nakayama T. (2001) Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in the cytotoxicity of flavonols. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 65, 1227-1229.
- Kamata H. und Hirata H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* 11, 1-14.
- Keller A., Mohamed A., Dröse S., Brandt U., Fleming I., Brandes R.P. (2004) Analysis of Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Rad. Res.* 38, 1257-1267.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-57.
- Kim S.-H., Shin K.-J., Kim D., Kim Y.-H., Han M.S., Lee T.G., Kim E., Rhy S.H., Suh P.-G. (2003) Luteolin inhibits the nuclear factor-κB transcriptional activity in Rat-1 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 66, 955-963.
- King R.E., Kent K.D., Bomser J.A. (2005) Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 15, 143-9.
- Kishida T., Nagamoto M., Ohtsu Y., Watakabe M., Ohshima D., Nashiki K., Mizushige T., Izumi T., Obata A., Ebihara K. (2004) Lack of an inducible effect of dietary soy isoflavones on the mRNA abundance of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 508-515.
- Knecht H., Berger C., Rothenberger S., Odermatt B.F., Brousset P. (2001) The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* 60, 289-302.
- Knight J.A. (1998) Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 28, 331-46.
- Ko W.G., Kang T.H., Lee S.J., Kim Y.C., Lee B.H. (2002) Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Phytother. Res.* 16, 295-298.
- Korsmeyer S.J. (1999) Bcl-2 gene familiy and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 59, 1693S-1700S.
- Kovacs C.J., Evans M.J., Hopkins H.A. (1977) Properties of the H-4-II-E tumor cell system. II. In vitro characteristics of an experimental tumor cell line. *Cell Tissue Kinet.* 10, 245-54.
- Kowalik T.F., Wing B., Haskill J.S., Azizkhan J.C., Baldwin A.S., Huang E.-S. (1993) Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-κB activity during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1107-1111.
- Krammer P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619-42.
- Kühnau J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components : their role in human nutrition. *World review Nutr. Diet.* 24, 117-191.
- Kumazawa S., Shimoi K., Hayashi K., Ishii T., Hamasaka T., Nakayama T. (2004) Identification of metabolites in plasma and urine of uruguayan propolis-treated rats. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3083-3088.
- Kuwajerwala N., Cifuentes E., Gautam S., Menon M., Barrack E.R., Reddy G.P.V. (2002) Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res.* 62, 2488-2492.
- Lambert J.D., Hong J., Yang G., Liao J., Yang C.S. (2005) Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 284S-91S.
- Le Marchand L. (2002) Cancer preventive effects of flavonoids a review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 296-301.

- Lee L.T., Huang Y.T., Lee P.P., Ke F.C., Nair M.P., Kanadaswam C., Lee M.T. (2002) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.* 22, 1615-1627.
- Lee S.-R., Kwon K.-S., Kim S.-R., Rhee S.G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366-15372.
- Lemanska K., van der Woude H., Szymusiak H., Boersma M.G., Gliszczynska-Swiglo A., Rietjens I.M.C.M., Tyrakowska B. (2004) The effects of catechol Omethylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin – a mechanistic insight. *Free Rad. Res.* 38, 639-647.
- Leppälä J.M., Virtamo J., Fogelholm R., Huttunen J.K., Albanes D., Taylor P.R., Heinonen O.P. (2000) Controlled trial of α-tocopherol and β-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 230-235.
- Lien E.J., Ren S., Bui H.-H., Wang, R. (1999) Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 285-294.
- Liu J., Lin A. (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell. research* 15, 36-42.
- Lundberg A.S. und Weinberg R.A. (1999) Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer* 35, 531-539.
- Manach C. und Donovan J.L. (2004) Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Rad. Res.* 38, 771-785.
- Manach C., Morand C., Crespy V., Demigne C., Texier O., Regerat F., Remesy C. (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters* 426, 331-6.
- Manach C., Regerat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Remesy C. (1996) Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* 16, 517-544.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S-42S.
- Mangoura D., Sakellaridis N., Jones J.J., Vernadakis A. (1989) Early and late passage C6 glial cell growth : similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem. Res.* 14, 941-947.
- Manna S.K., Mukhopadhyay A., Aggarwal B.B. (2000) Resveratrol suppresses TNFinduced activation of nuclear transcription factors NF-κB, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.* 164, 6509-6519.
- Marangolo M., McGee M.M., Tipton K.F., Williams C., Zisterer D.M. (2001) Oxidative stress induces apoptosis in C6 glioma cells: involvement of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B. *Neurotox. Res.* 3, 397-409.

- Marcucci M.C., Ferreres F., Custodio A.R., Ferreira M:M., Bankova V.S., Garcia-Viguera C., Bretz W.A. (2000) Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z. Naturforsch.* 55, 76-81.
- Marier J.-F., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J.-P., Ducharme M.P. (2002) Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *JPET* 302, 369-373.
- Marnett L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 21, 361-370.
- Mashima T., Oh-hara T., Sato S., Mochizuki M., Sugimoto Y., Yamazaki K., Hamada J., Tada M., Moriuchi T., Ishikawa Y., Kato Y., Tomoda H., Yamori T., Tsuruo T. (2005) p53-defective tumors with a functional apoptosome-mediated pathway: a new therapeutic target. *J. Nat. Cancer Institute* 97, 765-777.
- Matsukawa J., Matsuzawa A., Takeda K., Ichijo H. (2004) The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J. Biochem.* 136, 261-265.
- Matsuo M., Sasaki N., Saga K., Kaneko T. (2005) Cytotoxicity of flavonoids towards cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 253-259.
- Mattson M.P., Duan W., Pedersen W.A., Culmsee C. (2001) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6, 69-81.
- McPhail D.B., Hartley R.C., Gardner P.T., Duthie G.G. (2003) Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity by Electron Spin Resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1684-1690.
- Mennen L.I., Walker R., Bennetau-Pelissero C., Scalbert A. (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 326S-9S.
- Michels G., Haenen G.R.M.M., Wätjen W., Rietjens S., Bast A. (2004) The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one containing flavonoids. *Toxicol. Lett.* 151, 105-111.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751.
- Mikhailov V., Mikhailova M., Pulkrabek D.J., Dong Z., Venkatachalam M.A., Saikumar P. (2001) Bcl-2 prevents bax oligomerisation in the mitochondrial outer membrane. J. Biol. Chem. 276, 18361-18374.
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status of premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-411.
- Monasterio A., Urdaci M.C., Pinchuk I.V., Lopez-Moratalla N., Martinez-Irujo J.J. (2004) Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr. Cancer* 50, 90-100.
- Moon J.H, Nakata R., Oshima S., Inakuma T., Terao J. (2000) Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am. J. Physiol.* 279, R461-R467.

- Moon J.H., Tsushida T., Nakahara K., Terao J. (2001) Identification of quercetin 3-Obeta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 1274-85.
- Mouria M., Gukovskaya A.S., Jung Y., Buechler P., Hines O.J., Reber H.A., Pandol S.J. (2002) Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *Int. J. Cancer* 98, 761-769.
- Mu M.M., Chakravortty D., Sugiyama T., Koide N., Takahashi K., Mori I., Yoshida T., Yokochi T. (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharideinduced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res.* 7, 431-8.
- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1992) Synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Enzymology* 155, F335-F350.
- Musonda C.A. und Chipman J.K. (1998) Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 19, 1583-9.
- Nagata S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. Exp. Cell. Res. 256, 12-18.
- Nakagawa T. und Yuan J. (2005) Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell. Biol.* 150, 887-894.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Yu J., Yankner B.A., Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-β. *Nature* 403, 98-103
- Nakshatri H., Bhat-Nakshatri P., Martin D.A., Goulet R.J., Sledge G.W. (1997) Constitutive activation of NF-κB during progression of breast cancer to hormoneindependent growth. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 3629-3639.
- Nguyen T.T.T., Tran E., Nguyen T.H., Do P.T., Huynh T.H., Huynh H. (2004) The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 647-659.
- Nicholson D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6, 1028-1042.
- Noroozi M., Angerson W.J., Lean M.E.J. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1210-8.
- Olthof M.R., Hollmann P.C., Vree T.B., Katan M.B. (2000) Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4´-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.* 130, 1200-1203.
- Otake Y., Hsieh F., Walle T. (2002 a) Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug metabolism and disposition* 30, 576-581.
- Otake Y., Walle T. (2002 b) Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and cyp1A1, cyp1A2, and cyp2C9. *Drug metabolism and disposition* 30, 103-105.

- Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. (1994) Characterization of 2',7'dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* 635, 113-117.
- Paganga G. und Rice-Evans C.A. (1997) The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters* 401, 78-82.
- Palamara A.T., Nencioni L, Aquilano K., Chiara G.D., Hernandez L, Cozzolino F., Ciriolo M.R., Garaci E. (2005) Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *JID* 191, 1719-1729.
- Park J.-W., Choi Y.-J., Suh S.-I., Baek W.-K., Suh M.-H., Jin I.-N., Min D.S., Woo J.-H., Chang J.-S., Passaniti A., Lee Y.H., Kwon T.K. (2001) Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis* 22, 1633-1639.
- Parker K.K., Norenberg M.D., Vernadakis A. (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* 208, 179-181.
- Pervaiz S. (2003) Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB* 17, 1975-1985.
- Pietta P.-G. (2000) Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042.
- Pitot H.C., Peraino C., Morse P.A., Potter V.A. (1964) Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 13, 229-242.
- Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M., Munks R.J.L., Kaptein A., Farrow S., Howells L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-κB activation via the NIK/IKK signaling complex. *Oncogene* 18, 6013-6020.
- Prior R.L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 570S-8S.
- Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S., Ishizaki Y., Jacobson M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Rangan G.K., Wang Y., Tay Y.-C., Harris D.C.H. (1999) Inhibition of NFκB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *AJP-Renal physiology* 277, F779-F789.
- Rautalahti M., Virtamo J.R.K., Taylor P.R., Heinonen O.P., Albanes D., Haukka J.K., Edwards B.K., Kärkkäinen P.A., Stolzenberg-Solomon R.Z., Huttunen J. (1999) The effects of supplementation with α-tocopherol and β-carotene on the incidence and mortality of carcinoma of the pankreas in a randomized, controlled trial. *Cancer* 86, 37-42.
- Rayet B. und Gélinas C. (1999) Abberrant *rel / nf-kb* genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.
- Rechner A.R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G.P., Moore K.P., Rice-Evans C.A. (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 220-235.

- Rice-Evans C.A. (2000) Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Rad. Res.* 33, S59-66.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., de Haan L., Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N.H.P., van Zanden J.J., van der Woude H., Alink G.M., Koeman J.H. (2002) The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Tox. Pharmacol.* 11, 321-333.
- Ronis M.J., Chen Y., Jo C.-H., Simpson P., Badger T.M. (2004) Diets containing soy protein isolate increase hepatic CYP3A expression and inducibility in weanling male rats exposed during early development. *J. Nutr.* 134, 3270-3276.
- Roshal M., Zhu Y., Planelles V. (2001) Apoptosis in AIDS. Apoptosis 6, 103-116.
- Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I-κB kinase. *Nature* 403, 103-108.
- Rust C., Gores G.J. (2000) Apoptosis and liver disease. Am. J. Med. 108, 567-574.
- Sale S., Verschoyle R.D., Boocock D., Jones D.J.L., Wilsher N., Ruparelia K.C., Potter G.A., Farmer P.B., Steward W.P., Gescher A.J. (2004) Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue *trans*-3,4,5,4⁻-tetramethoxystilbene. *Brit. J. Canc.* 90, 736-744.
- Sandstrom P.A. und Buttke T.M. (1993) Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4708-4712.
- Sato M., Suzuki Y., Okuda T., Yokotsuka K. (1997) Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1800-5.
- Schendel S.L., Azimov R., Pawlowski K., Godzik A., Kagan B.L., Reed J.C. (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, Bid. *J. Biol. Chem.* 274, 21932-21936.
- Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.-M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G., Korsmeyer S.J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic bax and antiapoptotic bcl-2. *Cell Biology* 94, 11357-11362.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Riehemann K., Wesselborg S. (1997) Regulation of NF-κB activation by MAP kinase cascades. *Immunobiol.* 198, 35-49.
- Scorrano L. (2003) Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell death and differentiation* 10, 1287-1289.
- Seitz, R. (2005) Propolis: "Bioantibiotikum" mit vielen Anwendungsmöglichkeiten. *Deutsche Apotheker Zeitung* 145, 4192-4194.

- Seth R., Yang C., Kausal V., Shah S.V., Kaushal G.P. (2005) p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *JBC* 280, 1230-9.
- Sgambato A., Ardito R., Faraglia B., Boninsegna A., Wolf F.I., Cittadini A. (2001) Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 496 171-80.
- She Q.-B., Bode A.M., Ma W.-Y., Chen N.-Y., Dong Z. (2001) Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Research* 61, 1604-1610.
- Shih A., Davis F.B., Lin H.-Y., Davis P.J. (2002) Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1223-1232.
- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinae N. (1998) Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-Obeta-glucoside in rats and humans. *FEBS Letters* 438, 220-4.
- Sies H. (1993) Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem. 215, 213-9.
- Silva I.D., Rodrigues A.S., Gaspar J., Laires A., Rueff J. (1997) Metabolism of galangin by rat cytochromes P450 : relevance to the genotoxicity of galangin. *Mut. Res.* 393, 247-257.
- Silva M.M., Santos M.R., Caroco G., Rocha R., Justino G., Mira L. (2002) Structureantioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Rad. Res.* 36, 1219-1227.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Siwak D.R., Shishodia S., Aggarwal B.B., Kurzrock R. (2005) Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkB kinase and nuclear factor kB activity and are independent of the B-Raf / Mitogen activated / extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. *Cancer* 104, 879-80.
- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell death and differentiation* 6, 1067-1074.
- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. (2001) Executioner Caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320-7326.
- Soleas G.J., Angelini M., Grass L., Diamandis E.P., Goldberg D.M. (2001) Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol.* 335, 145-54.
- Spencer J.P.E., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans, C. (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminol flavonoids. *FEBS Letters* 458, 224-230.

- Spencer J.P.E., Kuhnle G.G.C., Williams R.J., Rice-Evans C. (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.* 372, 173-181.
- Stadtmann E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797-821.
- Stanley L.L., Mazier B.Sc., Mazier M.J.P. (1999) Potential explanations for the french paradox. *Nutr. Res.* 19, 3-15.
- Stennicke H.R. und Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell death and differentiation* 6, 1054-1059.
- Stennicke H.R., Ryan C.A., Salvesen G.S. (2002) Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 27, 94-101.
- Steward J.R., Artime M.C., O'Brian C.A. (2003) Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J. Nutr.* 133, 2440S-2443S.
- Strasser A., Newton K. (1999) FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 533-7.
- Straszewski-Chavez S.L., Abrahams V.M., Mor G. (2005) The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Rev.* 18, in press.
- Su J.-L., Lin M.-T., Hong C.-C., Chang C.-C., Shiah S.-G., Wu C.-W., Chen S.-T., Chau Y.-P., Kuo M.-L. (2005) Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis* 26, 1-10.
- Sumbayev V.V., Yasinska I.M (2005) Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen species and nitrogen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 406-412.
- Szende B., Tyihak E., Kiraly-Veghely Z. (2000) Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp. Mol. Med.* 32, 88-92.
- Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H., Ichijo H. (2003) Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell. Struct. Funct.* 28, 23-29.
- Thornberry N.A. (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell death and differentiation* 6, 1023-1027.
- Thornberry N.A. und Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tomita N., Morishita R., Tomita S., Gibbons G.H., Zhang L., Horiuchi M., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., Dzau V.J. (2000 a) Transcription factor decoy for NF-κB inhibits TNFα -induced cytokine and adhesion molecule expression in vivo. *Gene Therapy* 7, 1326-1332.

- Tomita T., Takano H., Tomita N., Morishita R., Kaneko M., Shi K., Takahi K., Nakase T., Kaneda Y., Yoshikawa H., Ochi T. (2000 b) Transcription factor decoy the NF-κB inhibits cytokine and adhesion molecule expressions in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39, 749-757.
- Törnwall M.E., Virtamo J., Korhonen P.A., Virtanen M.J., Taylor P.R., Albanes D., Huttunen J.K. (2004) Effect of α-tocopherol and β-carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *European Heart J.* 25, 1171-1178.
- Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.-J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 331-342.
- Van de Craen M., Declercq W., Van den Brande I., Fiers W., Vandenabeele P. (1999) The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell death and differentiation* 6, 1117-1124.
- Van den Berg R., Haenen G.R.M.M., van den Berg H., Bast A. (1999) Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food. Chem.* 66, 511-517.
- Van Zanden J.J., Geraets L., Wortelboer H.M., van Bladeren P.J., Rietjens I.M.C.M., Cnubben N.H.P. (2004) Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1607-1617.
- Varfolomeev E.E. und Ashkenazi A. (2004) Tumor Necrosis Factor: An apoptosis JuNKie?. *Cell* 116, 491-497.
- Virtamo J., Edwards B.K., Virtanen M., Taylor P.R., Malila N., Albanes D., Huttunen J.K., Hartman A.M., Hietanen P., Mäenpää H., Koss L., Nordling S., Heinonen O.P. (2000) Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on urinary tract cancer: incidence and mortality in a controlled trial (Finland). *Cancer causes and control* 11, 933-939.
- Wahl C., Liptay S., Adler G., Schmid R.M. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of NF-κB. *J. Clin. Invest.* 101, 1163-1174.
- Wallace D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- Walle T., Vincent T.S., Walle U.K. (2003) Evidence for covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1603-10.
- Walle T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 36, 829-837.
- Walle T., Walle U.K., Halushka P.V. (2001) Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.* 13, 2648-52.
- Wang X., McCullough K.D., Franke T.F., Holbrook N.J. (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* 275, 14624-14631.

- Wätjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkötter A., Tran-Thi Q.-H., Proksch P., Kahl R. (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause damage and apoptosis. *J. Nutr.* 135, 525-531.
- Warner B.B., Stuart L., Gebb S., Wispé J.R. (1996) Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.* 271, L150-L158.
- Wenzel E., Soldo T., Erbersdobler H., Somoza V. (2005) Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 482-494.
- Whittaker J.W. (2003) The irony of manganese superoxide dismutase. *Biochem. Soc. Transactions* 31, 1318-1321.
- Williams L.R. (1995) Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 7, 55-73.
- Williamson G. und Manach C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 243S-55S.
- Wrona M., Patel K., Wardman P. (2005) Reactivity of 2´,7´-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 262-270.
- Wylie-Rosett, J. (2005) Menopause, micronutrients, and hormone therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1233S-31S.
- Xagorari A., Roussos C., Papapetropoulos A. (2002) Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Brit. J. Pharmacol.* 136, 1058-1064.
- Xia S., Rosen E.M., Laterra J. (2005) Sensitization of glioma cells to Fas-dependent apoptosis by chemotherapy-induced oxidative stress. *Cancer Res.* 65, 5248-5255.
- Yamashita N. und Kawanishi S. (2000) Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin. *Free Rad. Res.* 33, 623-633.
- Yen G.-C., Duh P.-D., Lin C.-W. (2003) Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Rad. Res.* 37, 509-514.
- Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. (2004) Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Rad. Biol. Med.* 36, 592-604.
- Youdim K.A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 1683-1693.
- Yu C., Shin Y.G., Chow A., Li Y., Kosmeder J.W., Lee Y.S., Hirschelman W.H., Pezzuto J.M., Mehta R.G., van Breemen R.B. (2002) Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* 19, 1907-14.

- Yu R., Hebbar V., Kim D.W., Mandlekar S., Pezzuto J.M., Kong A.-N. T. (2001) Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol. Pharmacol.* 60, 217-224.
- Yuan J. und Yankner B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.
- Zarubin T., Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell. research* 15, 11-18.
- Zhivotovsky B., Orrenius S. (2005) Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331, 859-867.
- Zhou H.-B., Yan Y., Sun Y.-N., Zhu J.-R. (2003) Resveratrol induces apoptosis in human esophagal carcinoma cells. *WJG* 9, 408-411.
- Zhu H., Bannenberg G.L., Moldeus P., Shertzer H.G. (1994) Oxidation pathways for the intracellular probe 2´,7´-dichlorofluorescein. *Arch. Toxicol.* 68, 582-587.

6. Anhang

6.1. Rohdaten

Tab. 1: Aufnahme, H4IIE, angegeben sind die Werte in [nmol / 10⁶ Zellen], Abb. 2.1.A

Quercetin	0,5 h	1 h	4 h	24 h
1	2,138	1,842	0	0
2	2,877	4,415	0	0
3	5,087	2,805	0	0
Luteolin	0,5 h	1 h	4 h	24 h
1	0,886	0,614	0,000	0,007
2	0,303	0,154	0,000	0,276
3	0,402	0,276	0,054	0,004
Oslausia	0.5.1	4 1-	4 1-	04.1
Galangin	0,5 n	1 n	4 n	24 n
1	4,079	6,469	1,493	0
2	10,935	9,510	4,107	0
3	10,267	4,588	0,000	0
Resveratrol	0,5 h	1 h	4 h	24 h
1	3,114	0,612	1,289	0,156
2	2,832	1,871	0,064	0,080
3	3,229	1,229	0,095	0,000
4	n.g.	n.g.	0,105	n.g.

Tab. 2: Aufnahme, angegeben sind die Werte in [nmol / 10⁶ Zellen], C6, Abb. 2.1.B

Quercetin	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	4,641	9,042	4,641	7,1997
2	6,702	5,715	5,778	4,221
3	7,149	8,367	9,15	3,4314
Luteolin	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	5,180	4,724	5,693	10,810
2	6,189	7,772	11,307	5,294
3	13,588	10,632	9,417	8,761
4	6,268	9,127	10,605	n.g.
Galangin	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	31,637	39,925	54,841	283,652
2	41,911	22,969	34,017	60,974
3	41,754	42,204	48,898	113,930
Resveratrol	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	15,540	14,219	15,184	21,334
2	11,830	12,958	12,031	11,566
3	14,306	12,009	13,464	9,920

Tab. 3: Aufnahme, angegeben sind die Werte in [nmol / 10^6 Zellen], C6 mit Serumentzug, Abb. 2.1.C

Quercetin	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	2,793	6,864	6,924	28,505
2	4,881	3,588	2,694	11,553
3	0	5,826	4,692	4,137
Lutealin	0.5.6	4 6	4 6	0.6
Luteolin	0,5 N	IN	4 N	8 N
1	21,057	12,904	29,877	57,926
2	5,039	15,588	17,588	56,073
3	14,596	5,368	16,035	12,586
4	n.g.	n.g.	19,680	n.g.
Galangin	0,5 h	1 h	4 h	8 h
1	86,910	67,314	68,719	117,915
2	174,806	143,544	175,372	183,726
3	62,348	84,648	69,774	72,884

Fortsetzung Tab. 3:							
Resveratrol	0,5 h	1 h	4 h	8 h			
1	24,313	18,365	17,872	22,686			
2	22,464	18,739	16,576	15,499			
3	12,054	9,495	10,099	8,841			

Tab. 4: TEAC Assay, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.4.

Trolox	0 μΜ	2,5 µM	5 µM	10 µM	15 μM	25 µM
1	0,752	0,7575	0,6819	0,4362	0,3282	0,0391
2	0,7169	0,6623	0,6325	0,4949	0,3702	0,1217
3	0,6902	0,6413	0,5455	0,3449	0,3223	0,0046
4	0,7243	0,6956	0,6123	0,4041	0,1971	0,0882
5	0,735	0,6789	0,5738	0,4244	0,2897	0,0214
6	0,7909	0,7355	0,6379	0,4421	0,289	0,0866
7	0,6946	0,6205	0,5257	0,3327	0,2221	0,0836
0	0	0.5	5	10.5	05	
Quercetin	υμινι	2,5 µM	5 µM	12,5 µм	25 µM	
1	0,8024	0,6274	0,3593	0,1199	0,0423	
2	0,7875	0,4747	0,3363	0,1559	0,0849	
3	0,7262	0,3604	0,3171	0,1065	0,001	
4	0,8043	0,4356	0,378	0,2139	0,1067	
Luteolin	Ο μΜ	2,5 μM	5 µM	12,5 μM	25 µM	
1	0,8024	0,7114	0,5873	0,4768	0,0928	
2	0,7262	0,6752	0,5962	0,3186	0,1891	
3	0,8238	0,7123	0,6244	0,3707	0,2121	
O al a unite	0	0.5	5	10.5	05	
Galangin	υμινι	2,5 μινι	5 μινι	12,5 μiνi	25 μινι	
1	0,7506	0,6319	0,5525	0,3373	0,2662	
2	0,8042	0,6859	0,5739	0,4037	0,3582	
3	0,7432	0,608	0,5293	0,1972	0,1818	
Deeveratral	0	0.5	E	10 5M	05M	
nesveratrol	υμινί	2,5 μινι	ο μινι	ı∠,5 μivi	∠ο μινι	
1	0,8024	0,6417	0,5261	0,2522	0,0921	
2	0,7875	0,546	0,4426	0,261	0,2175	
3	0,7262	0,5475	0,419	0,2686	0,2173	

Tab. 5: H₂DCF-DA Assay, H4IIE, Werte sind angegeben in [rfu], Abb. 2.5.A

DMSO	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	669258	725345	1084226	1097588	1398321,5
2	859037	1032517,5	1251144,5	1293077,5	1618501
3	741763,5	918618	1102800,5	1331174,5	1656376,5
4	809442	1162086	1866568	2219720	3228975,5
5	1155397	1356883	1726729,5	3761309,5	4597433
6	917492	1495175	2401619,5	3054077,5	4729971,5
Resveratrol	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	510166	570686,5	591244	867086,5	1074993,5
2	594816,5	608667	748908	832712	890628
3	573569,5	628303	810083,5	796430	1134311,5
Luteolin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	429660	402345	421108,5	530002	638293,5
2	421252	459660	516140,5	540204	679195
3	397179	414142	493903,5	525462,5	677526
Galangin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	945019,5	1014962,5	1338727,5	1845656	2005029
2	1088189	1129503	1263053	2350816	2786069,5
3	834862,5	1149413	1585441	1955515	2616410
Quercetin	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	467580,5	537019,5	707642	827049	991941,5
2	595205	658850	716436	1323490,5	1472613,5
3	470881	560884,5	700323,5	697520	1217189,5

Tab. 6: H ₂ DC	F-DA Assay	, C6, Werte	sind angeg	geben in [rf	u], Abb. 2.5.
DMSO	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	1000062	1492007,5	2387862,5	3219791,5	4760369,5
2	643177,5	769931	1104148,5	1926046	3110346
3	418664,5	1243929,5	1893197,5	2216021,5	3335172
4	1163924	1643032,5	2956375,5	3757917,5	4811533,5
5	1134330	1809975,5	2411168	3078682	3848554
6	1171323	1557807	2083919,5	2728483	3532430
Quercetin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	647984,5	752627,5	1066917	1322081	2137990,5
2	368466,5	398234	576027,5	875333	1309646,5
3	541648	590369,5	822567	926699	1397615
Luteolin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	614117	688448	971160,5	977508,5	1680303
2	405431	458691,5	570791,5	1038979,5	1369529,5
3	518104,5	539045,5	696666	787201,5	1009908
Galangin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	978275,5	1433372,5	2050907	2737817	3106073,5
2	1049126	1425736,5	1875705	2305352	2816355,5
3	1024437,5	1243051	1588104,5	1887178,5	2313202
Resveratrol	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	974421	1298529,5	1964326	2525043	3272111,5
2	1037997,5	1269987,5	1509756,5	2397870	2912231,5
3	1009054,5	1126590	1506370,5	2215104	2574308

Tab. 7: H₂DCF-DA Assay, C6 mit Serumenzug, Werte sind angegeben in [rfu], Abb. 2.5.C

DMSO	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	1101444,5	1306526,5	1759677	2164780,5	3304263
2	1192858	1294569	1487353	1887121,5	2268505,5
3	1389465	1539569	1604364,5	1759572	2111475
4	1575404,5	1671669	1810502	2071332	2440435
5	1600617,5	1574567	1588435	1679640	2371240
6	1446329	1444129,5	1507891	1669701	2069352
7	1381759,5	1501129	1712264,5	1990493	2478423,5
8	1362847	1411304,5	1509494,5	1658026,5	2153705
Quercetin	0 uM	100 µM	250 uM	500 uM	1000 µM
1	772810,5	1113246,5	1135294,5	1122635,5	2025078
2	948697,5	931021,5	1034534,5	1285500	1575410,5
3	1034793,5	1010172	1149845,5	1269186	1497893
4	1180208	1085490	1248408,5	1399883,5	1771827,5
5	1198483	1047867	1244711,5	1394242,5	1597548
Lutaolin	0.01	100.01	250 uM	500 uM	1000
Luteolin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
Luteolin 1	0 μΜ 1605340	100 μΜ 1005036,5	250 μΜ 1061488	500 μΜ 1790802,5	1000 μΜ 1564059
Luteolin 1 2	0 μΜ 1605340 925410,5	100 μΜ 1005036,5 900469	250 μΜ 1061488 1004931,5	500 μΜ 1790802,5 1141166	1000 μΜ 1564059 1396290,5
Luteolin 1 2 3	0 μΜ 1605340 925410,5 929694	100 μΜ 1005036,5 900469 943011	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5	500 μΜ 1790802,5 1141166 1217542,5	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783
Luteolin 1 2 3 4	0 μΜ 1605340 925410,5 929694 1126113	100 μΜ 1005036,5 900469 943011 1106410	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658	500 μΜ 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860	1000 μΜ 1564059 1396290,5 1471783 1561398
Luteolin 1 2 3 4 5	0 μΜ 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5	500 μΜ 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5	1000 μΜ 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440
Luteolin 1 2 3 4 5 Galancin	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5	250 μM 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μM	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1228200	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 μM	250 μM 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μM 1259729,5	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μM
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 0	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 μM 1225964,5	250 μM 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μM 1358729,5	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μM 1638370
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 2	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300 1311173	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 μM 1225964,5 1293239,5	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μΜ 1358729,5 1382910	500 μM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 μM 1457722 1552236,5	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 2 3 3 4 5 3 3 4 3 3 4 3 4 3 3 4 5 3 4 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300 1311173 1146454	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 μM 1225964,5 1293239,5 1156043	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μΜ 1358729,5 1382910 1242755	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722 1552236,5 1396456	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μM 1638370 1910380,5 1660922
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 2 3 Resveratrol	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300 1311173 1146454 0 μM	100 μM 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 μM 1225964,5 1293239,5 1156043 100 μM	250 μM 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μM 1358729,5 1382910 1242755 250 μM	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722 1552236,5 1396456 500 µM	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μM 1638370 1910380,5 1660922 1000 μM
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 2 3 Resveratrol 1	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300 1311173 1146454 0 μM 1458370,5	100 µМ 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 µМ 1225964,5 1293239,5 1156043 100 µМ 1423718	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μΜ 1358729,5 1382910 1242755 250 μΜ 1458892,5	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722 1552236,5 1396456 500 µM 1616687	1000 μM 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μM 1638370 1910380,5 1660922 1000 μM 1817122,5
Luteolin 1 2 3 4 5 Galangin 1 2 3 Resveratrol 1 2	0 μM 1605340 925410,5 929694 1126113 1005421 0 μM 1328300 1311173 1146454 0 μM 1458370,5 1356638	100 µМ 1005036,5 900469 943011 1106410 1104010,5 100 µМ 1225964,5 1293239,5 1156043 100 µМ 1423718 1391256,5	250 μΜ 1061488 1004931,5 1113709,5 1185658 1083712,5 250 μΜ 1358729,5 1382910 1242755 250 μΜ 1458892,5 1503237,5	500 µM 1790802,5 1141166 1217542,5 1384860 1132842,5 500 µM 1457722 1552236,5 1396456 500 µM 1616687 1794324,5	1000 μΜ 1564059 1396290,5 1471783 1561398 1458440 1000 μΜ 1638370 1910380,5 1660922 1000 μΜ 1817122,5 2126149,5

DMSO	0 μΜ	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	227638	628741	1000702,5	1308564	1633176,5
2	264382,5	595780,5	1014306	1204504,5	1555493,5
3	348900,5	692188,5	1033654	1544885,5	1920116,5
Galangin	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	218308	538017,5	932947,5	1188722,5	1606245,5
2	267295,5	610746	1024550	1306923	1410670,5
3	375391,5	591279,5	892718	1378015	1508691,5
Resveratrol	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	195666	404959	641849,5	927068,5	1328452
2	230312,5	455471	727186,5	861999	1049749
3	272075,5	361139	484549	493348,5	790681
Luteolin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	158625,5	394840,5	563031,5	809345	1075249
2	169524	348554,5	480612	545214,5	764203,5
3	260574,5	353772	399843	637923,5	696843
Quercetin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	131210	280626	492376	702263,5	975879,5
2	151152	308230,5	434360	548930,5	674961,5
3	205452	281932,5	408064,5	422983,5	601452

Tab. 8: H₂Rh123 Assay, H4IIE, Werte sind angegeben in [rfu], Abb. 2.6.A

Tab. 9: H₂Rh123 Assay, C6, Werte sind angegeben in [rfu], Abb. 2.6.B

DMSO	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	460849,5	775361,5	1097787	1511447	1997263,5
2	453230	548743,5	777721	974041	1304934,5
3	539117	733908	1115492,5	1271629,5	1778589
4	454845,5	821193,5	1274086	1760120,5	1959891
5	387971	595563	822681	1176523	1566864
6	427509	578652	793108,5	1344238,5	1513921,5
Quercetin	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 μM	1000 µM
1	363730,5	441326	550626,5	716698,5	932649
2	355631,5	384715	491185	584939,5	671629
3	417105	477186	626094,5	625833,5	802185,5
Luteolin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	388869,5	443534,5	563585	613445,5	777041,5
2	388808,5	395077,5	569242,5	649375,5	617273,5
3	414179	489101,5	614484	634093,5	748530
Galangin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	482004	723555	1179276	1452621	1589361
2	416775	616275	780211	1321228,5	1500742
3	442791	535045	785041,5	1189117	1322428,5
Resveratrol	0 μΜ	100 µM	250 µM	500 µM	1000 µM
1	351681,5	511722,5	784957	1052361,5	1265135,5
2	328547	421807,5	550723,5	830043,5	1130815
3	343930	408193	505754	755143,5	1035533

Tab. 10: H₂Rh123 Assay, C6 mit Serumentzug, Werte sind angegeben in [rfu], Abb. 2.6.C

DMSO	0 μΜ	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	218339	362218	459691,5	576277,5	1072986,5
2	314459	378248,5	493698	752051,5	840642,5
3	447306,5	503452	583740,5	835988,5	894015
4	379144	461935,5	559764	835928	919866
5	417275	438322,5	598813	890527	1003071,5
6	260117,5	257722	325118,5	459461,5	791636
7	297285	422032	547603,5	775439	809370
8	211816	244889	285075	392725,5	713807,5

Fortsetzung	Tab. 10:				
Quercetin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 μM
1	175792	194675	239598	279624,5	359328,5
2	255126,5	273284	293330	294999,5	335315
3	389448	392068,5	449221,5	467057,5	624467
4	314014	332029	331462	420506,5	563851,5
5	387212	364133	400560,5	398533	563259
		100 14	050 14		4000 11
Luteolin	0 μΜ	100 μM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	184250,5	193325	337430,5	269838	358938
2	241463,5	260514	260917,5	268756	
3	383564	401533	451142,5	460772,5	531356
4	310734	299378,5	304526	359144	417985
5	365596	341477,5	370240,5	380791	530060,5
Galangin	0 μΜ	100 µM	250 μM	500 μM	1000 µM
1	345180	331460,5	347789	399367,5	625994,5
2	515663,5	516114,5	682110	811997,5	869670,5
3	306255	340647,5	358494,5	527227,5	827902,5
Resveratrol	0 μΜ	100 μM	250 µM	500 μM	1000 µM
1	185973,5	188347,5	205531,5	290124,5	435947,5
2	235337,5	321220	386292,5	541896,5	589209,5
3	169646	177079	197917	317228,5	428909

Tab. 11: *Comet* Assay, H4IIE, angegeben sind die Werte in [µm], Abb. 2.7.

Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	50 µM Luteolin Vorink.
12,38	36,78	17,28
11,58	46,4	19,96
16,28	39,3	18,42
11,52		
11,7		
11,9		
	Kontrolle 12,38 11,58 16,28 11,52 11,7 11,9	Kontrolle 500 μM H ₂ O ₂ 12,38 36,78 11,58 46,4 16,28 39,3 11,52 11,7 11,9 11,9

Tab. 12: RT-PCR MnSOD, H4IIE, 24 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung als Quotient aus MnSOD und GAPDH Intensität, Abb. 2.8.A

	Kontrolle	%	250 μM H ₂ O ₂	%	500 μM H ₂ O ₂	%	1000 µM H ₂ O ₂	%	2500 µM H ₂ O ₂	%
1	0,666	100	1,0143	152,30	n.g.	n.g.	1,189	178,49	0,849	127,46
2	0,653	100	1,0626	162,72	1,1032	168,94	1,509	231,09	0,958	146,77
3	0,985	100	0,9967	101,93	0,9952	101,78	1,029	105,26	0,961	98,33
4	0,9855	100	1,0131	102,79	0,7020	71,23	0,967	98,12	1,137	115,37
5	0,8825	100	0,9406	106,58	0,7798	88,36	0,866	98,10	n.g.	n.g.

Tab. 13: RT-PCR MnSOD, H4IIE, 8 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung als Quotient aus MnSOD und GAPDH Intensität, Abb. 2.8.B

	Kontrolle	%	100 μM H ₂ O ₂	%	300 µM H ₂ O ₂	%	500 μM H ₂ O ₂	%	10 µg/ml LPS	%
1	0,9495	100	1,1803	124,37	0,91314	96,22	1,1010	116,01	0,6988	73,64
2	0,527	100	0,5075	96,29	0,19315	36,65	0,4855	92,12	0,1939	36,80
3	0,712	100	0,7804	109,61	0,56925	79,95	0,6224	87,42	0,4928	69,21

Tab. 14: RT-PCR MnSOD, C6, 24 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung als Quotient aus MnSOD und GAPDH Intensität, Abb. 2.9.A

									10 µg/ml	
	Kontrolle	%	250 μM H ₂ O ₂	%	500 μM H ₂ O ₂	%	1000 μM H ₂ O ₂	%	LPS	%
1	0,9072	100	1,1971	131,95	1,1812	130,20	1,3808	152,21	n.g.	n.g.
2	0,1990	100	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	0,3122	156,90
3	0,4940	100	0,345	69,84	0,499	101,01	0,334	67,61	0,3590	72,67
4	0,4584	100	0,7598	165,78	0,8086	176,43	1,1316	246,92	0,3159	68,92

Tab. 15: RT-PCR MnSOD, C6 mit Serumentzug, 24 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung als Quotient aus MnSOD und GAPDH Intensität, Abb. 2.9.B

	Kontrolle	%	250 μM H ₂ O ₂	%	500 μM H ₂ O ₂	%	1000 μM H ₂ O ₂	%
1	0,5575	100	0,5417	97,16	0,8432	151,25	0,6856	122,98
2	0,371	100	0,3300	88,95	0,2240	60,38	0,3250	87,60
3	0,5396	100	0,5638	104,48	0,5974	110,70	0,6102	113,07

					100 µg/ml		50 µM Quer-		25 µM Luteo-	
	Kontrolle	%	1000 µM H ₂ O ₂	%	LPS	%	cetin	%	lin	%
1	10,893	100	16,595	152,39	24,414	224,19	11,433	104,96	24,879	228,39
2	20,45445	100	21,035	102,86	36,459	178,28	36,619	179,03	23,17	113,28
3	19,5235	100	17,353	88,90	24,945	127,79	n.g.	n.g.	19,872	101,79
4	27,0375	100	27,699	102,48	31,614	116,96	23,028	85,17	n.g.	n.g.
5	17,2753	100	20,835	120,64	27,444	158,91	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
6	20,9775	100	21,659	103,29	33,771	161,04	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
7	57,25	100	62,46	109,10	n.g.	n.g.	53,05	92,66	50,1	87,51

Tab. 16: Westernblot MnSOD, C6 mit Serumentzug, 24 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung, Abb. 2.10.A

Tab. 17: Westernblot MnSOD, C6 mit Serumentzug, 8 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung, Abb. 2.10.B

			LPS 1		LPS 10		100 µM		300 µM		500 µM		100 nM	
	Kontrolle	%	µg/ml	%	µg/ml	%	H_2O_2	%	H_2O_2	%	H_2O_2	%	PMA	%
1	15,035	100	18,93	125,91	13,46	89,52	8,37	55,67	13,66	90,85	15,58	103,62	11,82	78,62
2	26,65	100	24,03	90,17	n.g.	n.g.	27,39	102,78	31,94	119,85	24,91	93,47	20,66	77,52
3	12,975	100	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	10,02	77,23	17,07	131,56	19,9	153,37	n.g.	n.g.
4	13,41	100	18,39	137,14	20,25	151,01	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	21,77	162,34

Tab. 18: Westernblot MnSOD, C6 mit Serumentzug, 6 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

			1 µg/ml		10 μg/ml		100 μM		300 μM		500 µM	
	Kontrolle	%	LPS	%	LPS	%	H_2O_2	%	H_2O_2	%	H_2O_2	%
1	20,399	100	17,24	84,51	16,73	82,014	18,45	90,45	24,68	120,99	14,84	72,75
2	16,462	100	26,876	163,26	18,486	112,295	11,731	71,26	18,447	112,06	21,944	133,30
3	32,45	100	33,09	101,97	43,21	133,159	49,78	153,41	54,02	166,47	55,37	170,63

Tab. 19: Westernblot MnSOD, C6 mit Serumentzug, 10 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

	Kontrolle	%	10 µg/ml LPS	%	100 μM H ₂ O ₂	%	300 µM H ₂ O ₂	%	500 µM H ₂ O ₂	%
1	34,08	100	42,57	124,91	32,69	95,92	26,72	78,40	29,75	87,29
2	27,15	100	30,79	113,41	25,01	92,12	30	110,50	23,63	87,03
3	32,25	100	46,71	144,84	42,55	131,94	42,24	130,98	42,44	131,60

Tab. 20: Westernblot MnSOD, C6 mit Serumentzug, 14 h, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

	Kontrolle	%	10 µg/ml LPS	%	100 μM H ₂ O ₂	%	300 µM H ₂ O ₂	%	500 μM H ₂ O ₂	%
1	40,63	100	50,43	124,12	31,28	76,99	41,39	101,87	40,29	99,16
2	21,485	100	22,68	105,56	18,55	86,34	24,32	113,20	24,76	115,24
3	46,97	100	65,97	140,45	56,46	120,20	42,19	89,82	32,31	68,79

Tab. 21: ELISA, C6 mit Serumentzug, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.12.

	Cytosol Kontrolle	Cytosol LPS 10 µg/ml	Cytosol 100 µM H ₂ O ₂	Cytosol 300 μM H₂O₂	Cytosol 500 μM H ₂ O ₂	Kern Kontrolle	Kern LPS 10 μg/ml	Kern 100 μΜ Η₂Ο₂	Kern 300 μΜ H ₂ O ₂	Kern 500 μΜ Η₂Ο₂
1	0,411	0,291	0,381	0,421	0,341	0,204	1,422	0,25	0,235	0,274
2	0,268	0,289	0,293	0,2	0,271	0,17	1,344	0,235	0,297	0,321
3	0,291	0,292	0,33	0,325	0,29	0,24	1,459	0,235	0,283	0,406

Tab. 22: Westernblot pp38, C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung, Abb. 2.13.

	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	50 µM Quercetin	50 µM Luteolin	50 µM Galangin	50 µM Resveratrol
1	0,0397	0,6511	0,8667	0,0005	0,7203	0,7798
2	0,1922	0,8317	0,8020	0,1414	0,7765	0,7308
3	0,0158	0,5963	0,5353	0,2918	0,6941	0,5044

Westernblot p38, C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	50 µM Quercetin	50 µM Luteolin	50 µM Galangin	50 µM Resveratrol
1	28,28	37,41	21,23	25,65	39,9	55,74
2	36,18	34,99	43,16	43,03	24,76	37,56
3	17,75	8,88	12,24	15,28	16,62	16,25

Tab. 23: Westernblot pERK1 und ERK1, sowie pERK1/ERK1 [% Kontrolle], C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung, Abb. 2.14.

pERK 1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 µM Quercetin Vorink	50 µM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 μM Luteolin Vorink
1	24,8	105,93	74,85	55,14	83,63	63,9
2	30,76	83,98	64,69	78,63	89,24	79,88
3	38,98	60,93	94,4	101	82,4	90,35
4	46,05	97,92	108,83	96,55	95,75	88,16
ERK1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Quercetin Vorink	50 µM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 μM Luteolin Vorink
1	50,88	66,78	76,19	86,83	70,5	76,79
2	83,76	101,49	90,59	71,3	71,86	71,25
3	129,87	135,43	123,48	121,54	130,77	127,88
4	42,33	45,38	45,12	42,39	42,28	42,68
pERK1/ERK1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Quercetin Vorink	50 μM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 μM Luteolin Vorink
1	100	325,43	201,55	130,28	243,37	170,72
2	100	225,32	194,44	300,29	338,16	305,28
3	100	149,89	254,7	276,86	209,93	235,39
4	100	198,34	221,716	209,36	208,17	189,87

Westernblot pERK2 und ERK2, sowie pERK2/ERK2 [% Kontrolle], C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

pERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 µM Quercetin Vorink	50 µM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 µM Luteolin Vorink
1	4,51	60,28	32,68	12,93	34,36	30,25
2	9,15	27,29	59,87	62,68	45,97	49,69
3	12,73	58,03	70,98	53,85	58,97	52,72
ERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Quercetin Vorink	50 µM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 µM Luteolin Vorink
1	62,94	65,92	59,51	63,37	54,88	49,15
2	93,43	109,13	94,08	93,28	101,61	104,25
3	40,46	27,03	29,31	29,09	34,95	32,52
pERK2/ERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Quercetin Vorink	50 μM Quercetin Vorink	25 μM Luteolin Vorink	50 μM Luteolin Vorink
1	100	1276,16	766,37	284,75	873,75	858,91
2	100	255,34	649,79	686,12	461,95	486,69
3	100	682,34	769,69	588,35	536,26	515,25

Westernblot pERK1 und ERK1, sowie pERK1/ERK1 [% Kontrolle], C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

pERK1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 µM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	18,08	91,31	60,92	63,17	72,06	88,78
2	32,65	79,57	85,1	59,47	74,62	65,32
3	14,581	87,44	59,98	47,22	65,27	72,75
ERK1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 μM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	63,47	85,32	79,95	88,96	94,84	82,96
2	53,1	58,6	57,64	53,53	40,58	37,87
3	59,17	55,96	58,29	59,067	59,11	59,44
pERK/ERK1	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 μM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	100	375,69	267,49	249,27	266,73	375,67
2	100	220,83	240,11	180,68	299,05	280,51
3	100	634,08	417,56	324,41	448,09	496,67

Westernblot pERK2 und ERK2, sowie pERK2/ERK2 [% Kontrolle], C6 mit Serumentzug, angegeben sind die Werte der densitometrischen Auswertung

pERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 μM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	22,89	55,5	55,59	34,29	48,45	41,13
2	30,95	63,12	33,31	14,98	38,09	21,23
3	1,501	52,67	31,01	17,79	37,1	51,81
ERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 μM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	29,39	36,96	38,12	37,57	29	28,52
2	29,23	43,33	50,88	57,7	65,54	61,71
3	13,81	16,97	26,76	30,057	33,49	32,93
pERK2/ERK2	Kontrolle	500 μM H ₂ O ₂	25 μM Resv. Vorink	50 μM Resv. Vorink	25 μM Galangin Vorink	50 μM Galangin Vorink
1	100	192,8	187,23	117,18	214,51	185,16
2	100	137,57	61,82	24,51	54,88	32,49
3	100	243,41	87,39	43,73	33,71	14,61

Tab. 24: Neutralrot Assay, H4IIE, 24 h, Konzentrationsverlauf, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.16.

Quercetin	0 μΜ	10 µM	25 μM	50 μM	75 μM	100 µM	150 μM	200 µM	300 µM
1	0,5978	0,4927	0,6013	0,5420	0,4553	0,3567	0,2230	0,1107	0,0483
2	0,5917	0,6053	0,6267	0,4887	0,4333	0,3590	0,2330	0,0927	0,0613
3	0,5166	0,4925	0,5573	0,4745	0,3863	0,2993	0,2993	0,0748	0,1353
Luteolin	0 μΜ	25 µM	50 μM	75 μM	100 µM	150 uM	200 µM		
1	0,3730	0,3563	0,2215	0,1693	0,1312	0,1435	0,1908		
2	0,2904	0,3870	0,5647	0,3019	0,2205	0,1643	0,1769		
3	0,4722	0,5443	0,4061	0,3443	0,2353	0,2073	0,2197		
4	0,5317	0,5739	0,4388	0,3267	0,2399	0,3005	0,3350		
Galangin	0 μΜ	50 µM	100 µM	250 µM					
1	0,4065	0,3915	0,2615	0,042					
2	0,636	0,4495	0,339	0,0625					
3	0,6235	0,6005	0,504	0,069					
Description	0	05	50	75	100	000	050		
Resveratrol	υμм	25 µM	50 µM	75 μM	100 µM	200 µM	350 µM		
1	0,4063	0,4691	0,4000	0,2722	0,1852	0,0840	0,0969		
2	0,3798	0,4271	0,2661	0,1969	0,1625	0,1324	0,1354		
3	0,6229	0,6268	0,4980	0,2584	0,1930	0,1147	0,1186		
4	0,5267	0,5575	0,4667	0,3096	0,2483	0,1323	0,1294		
			100 11	450.00				400 11	
H ₂ O ₂	υμм	50 µM	100 µM	150 µM	200 µM	250 µM	300 µM	400 µM	500 µM
1	0,593	0,582	0,4895	0,4525	0,3735	0,317	0,259	0,199	0,1735
2	0,6598	0,634	0,528	0,4743	0,409	0,1877	0,1587	0,0953	0,0557
3	0,6447	0,5743	0,555	0,469	0,3473	0,2103	0,093	0,0607	0,0733
4	0,5735	0,4965	0,3205	0,247	0,314	0,1	0,0745	0,067	0,101

Tab. 25: Neutralrot	Assay, H4	IIE, Zeitverlauf	, angegeben	sind die	gemessenen	Absorptionen,
Abb. 2.17.						

100 µM Quercetin	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h
1	0,85825	0,4385	0,4285	0,3055	0,4905
2	0,52125	0,3495	0,438	0,376	0,247
3	0,6425	0,5405	0,545	0,437	0,4745
4	0,896	0,6405	0,585	0,6965	0,674
5	0,4885	n.g.	0,377	0,341	0,2415
6	0,613	0,377	0,427	n.g.	0,41
100 uM Luteolin	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h
	• • • •		011	011	
1	0,85825	0,4385	0,4285	0,3055	0,4905
1 2	0,85825 0,53925	0,4385 0,3775	0,4285 0,4425	0,3055 0,4155	0,4905 0,308
1 2 3	0,85825 0,53925 0,619	0,4385 0,3775 0,4645	0,4285 0,4425 0,493	0,3055 0,4155 0,373	0,4905 0,308 0,3465
1 2 3 4	0,85825 0,53925 0,619 0,828	0,4385 0,3775 0,4645 0,619	0,4285 0,4425 0,493 0,5765	0,3055 0,4155 0,373 0,6435	0,4905 0,308 0,3465 0,609
1 2 3 4 5	0,85825 0,53925 0,619 0,828 0,4745	0,4385 0,3775 0,4645 0,619 n.g.	0,4285 0,4425 0,493 0,5765 0,296	0,3055 0,4155 0,373 0,6435 0,329	0,4905 0,308 0,3465 0,609 0,1685
1 2 3 4 5 6	0,85825 0,53925 0,619 0,828 0,4745 0,447	0,4385 0,3775 0,4645 0,619 n.g. 0,4165	0,4285 0,4425 0,493 0,5765 0,296 0,558	0,3055 0,4155 0,373 0,6435 0,329 n.g.	0,4905 0,308 0,3465 0,609 0,1685 0,2315
1 2 3 4 5 6 7	0,85825 0,53925 0,619 0,828 0,4745 0,447 0,5455	0,4385 0,3775 0,4645 0,619 n.g. 0,4165 0,426	0,4285 0,4425 0,493 0,5765 0,296 0,558 0,4645	0,3055 0,4155 0,373 0,6435 0,329 n.g. 0,3825	0,4905 0,308 0,3465 0,609 0,1685 0,2315 0,1885

Fortsetzung Tab. 25:									
100 µM Resveratrol	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h				
1	0,85825	0,4385	0,4285	0,3055	0,4905				
2	0,48725	n.g.	0,38125	0,384	0,13225				
3	0,567	0,553	0,537	0,416	0,317				
4	0,689	0,62	n.g.	n.g.	n.g.				
250 μM H ₂ O ₂	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h				
1	0,85825	0,4385	0,4285	0,3055	0,4905				
2	0,49225	0,352	0,1595	0,1235	0,029				
3	0,62325	0,3955	0,165	0,111	0,0355				
4	0,84225	0,3375	0,1915	0,147	0,1235				

Tab. 26: Neutralrot Assay, C6, 96er Well, 24 h, Konzentrationsverlauf, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.18.

Quercetin	0 µM	10 µM	25 µM	50 µM	75 uM	100 uM	150 µM	200 uM	250 uM	
1	0.843	0 7005	0.5245	0.699	0.5675	0.5675	0 407	0.35	0 1885	
2	0.8095	0.728	0.4425	0.5915	0.5795	0.4855	0.3945	0,269	0.1765	
3	0.7515	0.766	0.562	0.657	0.6135	0 552	0.4185	0.3525	0.383	
4	0,7010	0,700	0,002	0.424	0,0100	0.2075	0,4100	0,0020	0,000	
5	0.7755			0,427		0.3665				
6	0,7700			0,477		0,0000				
0	0,940			0,095		0,455				
Luteolin	0 μΜ	10 µM	25 µM	50 μM	75 μM	100 μM	150 μM	200 µM	250 μM	
1	0,8255	0,625	0,447	0,466	0,3495	0,3625	0,3145	0,2145	0,126	
2	0,757	0,636	0,4685	0,467	0,3875	0,3475	0,297	0,144	0,134	
3	0,7585	0,6795	0,5735	0,5105	0,362	0,323	0,344	0,385	0,3055	
4	0,729			0,4415		0,2685				
5	0,7325			0,4205		0.33				
6	0,88925			0,5405		0,383				
Resveratrol	0 μΜ	10 µM	25 µM	50 µM	75 μM	100 µM	150 µM	200 µM	250 µM	
1	0,768	0,707	0,516	0,589	0,5895	0,5545	0,4685	0,206	0,1455	
2	0,7345	0,6375	0,5885	0,582	0,4415	0,39	0,3235	0,19	0,136	
3	0,731	0,707	0,4225	0,4785	0,4655	0,4045	0,342	0,232	0,139	
4	0,87825			0,6395		0,5895				
5	0,891			0,702		0,531				
6	1,055			0,85		0,632				
	0	40	00	00	40	50	75	100	450	000
Galangin	0 µм	10 µM	20 µM	30 µм	40 µM	50 µM	75 μM	100 μΜ	150 µM	200 µM
1	0,886	0,8115	n.g.	n.g.	n.g.	0,1145	0,1235	0,084833	0,0965	0,109
2	0,654	0,504	0,257	0,083	0,0695	0,065	0,0635	0,0595	0,0695	0,082
3	0,9065	0,93	0,452	0,145	0,133	0,12	0,1015	0,0885	0,089	0,1065
4	1,008	0,959	0,5445	0,1935	0,1205	0,1235	0,133	0,099	0,112	0,115

Tab. 27: Neutralrot Assay, C6, 96er Well, Zeitverlauf, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.19.

100 µM Luteolin	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h
1	0,729	n.g.	0,593	0,4995	0,2685
2	0,7325	0,5905	0,5885	0,4035	0,33
3	0,88925	0,6735	0,5655	0,576	0,383
4	0,8255				0,3625
5	0,757				0,3475
6	0,7585				0,323
7	1,0085	0,7145	n.g.	n.g.	n.g.
100 µM Quercetin	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h
1	0,8007	n.g.	0,5215	0,5215	0,2075
2	0,8105	0,549	0,556	0,589	0,3355
3	0,8355	0,469	0,3975	0,6625	0,57
4	0,7755	0,5375	0,537	0,5195	0,3665
5	0,946	0,636	0,4745	0,613	0,453
250 μM H ₂ O ₂	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h
1	0,792	n.g.	0,1215	0,0445	0,0475
2	0,712	0,358	0,145	0,0525	0,0495
3	0,921	0,413	0,0785	0,048	0,049
4	1,053	0,9755	n.g.	n.g.	n.g.

Fortsetzung Tab. 27:									
100 µM Resveratrol	0 h	1 h	3 h	8 h	24 h				
1	0,87825	0,687	0,7175	0,6745	0,5895				
2	0,891	0,6285	0,509	0,4535	0,531				
3	1,055	0,78266667	0,716666667	0,636333333	0,632				
4	0,7345				0,39				
5	0,768				0,5545				
6	0,731				0,4045				

Tab. 28: Neutralrot Assay, C6, 24er Well, 24 h, Konzentrationsverlauf, angegeben sind die gemessenen Absorptionen

Quercetin	0 μΜ	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM
1	0,814	0,58	0,472	0,472	0,409	0,324
2	0,634	0,526	0,466	0,413	0,355	0,217
3	0,467	0,408	0,345	0,258	0,095	0,086
4	0,507	0,4	0,356	0,27	0,22	0,186
5	0,811	n.g.	0,613	0,484	0,359	n.g.
Luteolin	0 μΜ	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM
1	0,519	0,3995	0,256	0,199	0,264	0,331
2	0,454	0,307	0,194	0,142	0,152	0,235
3	0,625	0,443	0,365	0,294	0,279	0,286
4	0,937	0,555	0,385	0,515	0,439	0,566
5	0,844	n.g.	0,484	0,417	0,404	n.g.
Galangin	0 μΜ	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM
1	0,947	0,777	0,556	0,487	0,208	0,229
2	0,588	0,51	0,449	0,213	0,153	0,148
3	0,5	0,375	0,248	0,21	0,124	0,144
4	0,496	0,345	0,204	0,123	0,095	0,133
Resveratrol	0 μΜ	25 uM	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM
1	0.428	0.364	0.221	0.158	0.116	0.05
2	0,484	0,394	0,247	0,229	0,172	0.061
3	0.654	0,473	0.376	0,371	0,253	0,124
4	0,807	0,571	0,529	0,48	0,14	0,088
5	0,794	n.g.	0,565	0,529	0,342	n.g.
H ₂ O ₂	0 µM	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM	500 μM
1	0,638	0,563	0,455	0,24	0,078	0,061
2	1,009	0,906	0,761	0,528	0,254	0,069
3	0,862	0,777	0,69	0,258	0,075	0,058

Tab. 29: Neutralrot Assay, C6 mit Serumentzug, 24er Well, 24 h, Konzentrationsverlauf, angegeben sind die gemessenen Absorptionen

~						
Luteolin	0 μΜ	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	300 μM
1	0,453	0,348	0,284	0,395	0,463	0,557
2	0,607	0,391	0,296	0,393	0,497	0,617
3	0,595	0,331	0,331	0,402	0,462	0,608
Galangin	0 μΜ	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM	300 μM
1	0,506	0,368	0,172	0,322	0,505	0,252
2	0,562	0,404	0,18	0,279	0,267	0,236
3	0,512	0,292	0,223	0,261	0,244	0,118
Resveratrol	0 μΜ	25 µM	50 μM	100 µM	200 µM	300 µM
1	0,55	0,523	0,452	0,322	0,221	0,101
2	0,618	0,53	0,349	0,256	0,218	0,145
3	0,592	0,515	0,405	0,275	0,225	0,127
H ₂ O ₂	0 μΜ	50 µM	100 µM	200 µM	300 µM	500 μM
1	0,545	0,435	0,341	0,302	0,153	0,099
2	0.601	0.519	0 406	0.281	0 104	0.07
	0,001	0,515	0,400	0,201	0,104	0,07

Tab. 30: *Comet* Assay H4IIE, angegeben sind die Werte in [µm], Abb. 2.20.

Luteolin	0 μΜ	10 µM	50 μM	100 μM	250 µM
1	15,44	11,04	14,1	23,54	24,76
2	11,64	10,54	14	17,14	21,68
3	12,6	14,1	15	19,02	17,6
Resveratrol	0 μΜ	10 µM	50 μM	100 µM	250 µM
1	14,24	14,02	18,3	24	22,94
2	14,8	17,82	21,94	19,6	23,6
3	10.88	12.68	14.66	17.82	21.08

Tab. 31: MDA Messung, H4IIE, angegeben sind die Werte in [pmol / 10⁶ Zellen], Abb. 2.21.

Luteolin	0 μΜ	50 µM	100 µM	200 µM	350 μM	500 μM
1	0,4838	0,4963	0,5248	0,5584	0,5872	0,6052
2	0,4479	0,538	0,5423	0,5631	0,5865	0,6094
3	0,4377	0,4466	0,5063	0,5263	0,5413	0,588
Resveratrol	0 μΜ	50 μM	100 µM	200 µM	350 μM	500 μM
1	0,4067	0,4094	0,4168	0,4576	0,508	0,5815
2	0.447	0.4628	0.4928	0.5673	0.6073	0.6615

Tab. 32: Caspaseassay, H4IIE, Konzentrationsverlauf, angegeben ist die [Enzymaktivität / mg Protein], Abb. 2.23.

Quercetin 24 h				
Caspase 3	Kontrolle	250 μM		
1	0,408	0,9457		
2	0,256	1,5280		
3	0	0,5877		
4	0,274	1,0205		
5	0,189	0,3874		
6	0,172	0,785		
7	0,1931	0,9585		
Caspase-9	Kontrolle	250 μM		
1	0	0,0445		
2	0	0,0784		
3	0	0,0135		
4	0	0,3464		
5	0,024	0,1207		
6	0,026	0,1527		
7	0,0211	0,0736		
8	0	0,0537		
Luteolin 24h				
Caspase 3	Kontrolle	50 μM	100 µM	250 μM
1	0,94	1,42	2,16	4,635
2	1,515	2,3035	2,315	6,63
3	0,66	1,015	0,83	2,54
4	1,135	1,22	1,125	3,695
Caspase 9	Kontrolle	50 µM	100 µM	250 µM
1	0,1315	0,315	0,36	1,34
2	0,22	0,29	0,28	1,105
3	0,19	0,3	0,295	0,835
4	0,103	0,155	0,185	1,565
Resveratrol 24h	1			
Caspase 3	Kontrolle	50 μM	100 µM	250 µM
1	0,725	0,92	0,71	4,83
2	1,02	1,095	1,115	2,31
3	1,45	0,37	0,795	3,855
4	1,15			n.g.
5	2,716			6,0415
6	0,906			1,2825
7	0,73			1,6005
	1			

Fortsetzung Tab.32:							
Caspase 9	Kontrolle	50 µM	100 µM	250 µM			
1	0,09	0,085	0,09	0,145			
2	0,125	0,15	0,1515	0,21			
3	0	0,685	0,137	0,075			
4	1,7905			2,396			
5	0,06			0,072			
6	0,129			0,231			
Galangin 24 h							
Caspase 3	Kontrolle	50 µM	100 µM	250 µM			
1	0,36	0,335	0,38	1,065			
2	0,155	0,22	0,22	8,01			
3	0,89	0,825	0,7125	1,425			
4	1,71	1,9	1,576	4,45			
Caspase 9	Kontrolle	50 µM	100 µM	250 µM			
1	0	0,045	0	0,115			
2	0	0	0	0,715			
3	0,075	0,065	0,07	0,155			
4	0,09	0,08	0,06	0,42			
Galangin 24 h							
Caspase 2	Kontrolle	50 µM	100 µM	250 µM			
1	0,169	0,2375	0,252	3,1085			
2	0,148	0,1625	0,196	0,543			
3	0,543	0,6105	0,4395	0,7255			
4	0,795	0,809	0,711	2,1085			
Cooperation 10	Kontrollo	50M	100	250			
	0.0525	0 1 2 P	0.046	230 μM			
	0,0000	0,120	0,040	0,1740			
2	0.0845	0,1115	0.214	2,0305			
3	0,249	0,242	0.279	1 012			
4	0,3055	0,243	0,210	1,012			

Tab. 33: Caspaseassay, H4IIE, Zeitverlauf, angegeben ist [Enzymaktivität / mg Protein], Abb. 2.24.

Luteolin					
Caspase 2	Kontrolle	3 h	6 h	12 h	24 h
1	0,2695	0	0,057	0,377	1,696
2	0,6	0,2005	0,39	0,8405	n.g.
3	0,689	0,476	1,549	1,9875	2,79
4	0,511	0,528	1,5295	2,115	1,512
5	0,3035	0,6065	0,212	0,1285	n.g.
6	0,1515	0,3395	0,073	0,0805	n.g.
Caspase 3	Kontrolle	3 h	6 h	12 h	24 h
1	1.02	0.329	0.797	1.4985	3.6195
2	1.15	0.2435	0.6305	1.2055	n.a.
3	0.906	0.569	2.342	3.0325	3.5875
4	0.73	0.989	1,969	3.03	2,135
5	0,289	0,7035	0.2125	0,152	n.g.
6	0,123	0,4445	0,123	0,074	n.g.
7	0,94				4,635
8	1,5185				6,6305
9	0,66				2,54
10	1,135				3,695
Caspase 9	Kontrolle	3 h	6 h	12 h	24 h
1	0.3075	0 4385	0.3985	0.642	0.77
2	0.093	0	0.1795	0.1625	n.a.
3	0.06	0	0.435	0.259	0.375
4	0.129	0.201	0.261	0.3875	0.277
5	0.121	0.0865	0.0265	0.024	n.a.
6	0.042	0.011	0	0	n.a.
7	0,1315	-,			1,3425
8	0,22				1,105
9	0,19				0,835
10	0,103				1,5685

Fortsetzun	ıg -	Гаb. З	3:						
Caspase 10	Ko	ntrolle	3 ł	ı	6 h	12 h	24 h		
1	0	,0835	0		0	0,0095	0,4785		
2	0	,4555	0,16	55	0,34	0,5695	n.g.		
3	0	,4605	0,26	64	0,93	1,21	1,7255		
4		0,35	1,14	75	1,35	1,2565	0,8525		
5	C),243	0,26	61	0,119	0,1115	n.g.		
6		0,14	0,17	78	0,0965	0,016	n.g.		
Resveratro	Ы								
Caspase 2	2	Kontr	olle		3 h	6 h	12 h		24 h
1		0,27	75	(),575	0,6605	4,705	;	2,822
2		0,68	39	(),757	2,4125	3,008	5	0,8845
3		0,5	11	0	,9465	3,239	3,324	5	1,395
Casnase	2	Konti	ماله	<u> </u>	3 h	6 h	12 h		24 h
1	, 	1 1	5		5 35	0.985	28		<u>2</u> 411
2		27	16	8	6615	4 4935	6 784	5	6.0415
3		0.90	16	0	9815	3 5885	4 188	1	1 2825
		0,50	20	- 1	0005	4,4015	F 000		1,2025

3	0,906	0,9815	3,5885	4,188	1,2825
4	0,73	1,3685	4,4915	5,086	1,6005
5	0,725				4,83
6	1,02				2,31
7	1,45				3,855
Caspase 9	Kontrolle	3 h	6 h	12 h	24 h
1	1,7905	6,423	2,344	3,3115	2,396
2	0,06	0,0485	0,3575	0,532	0,072
3	0,129	0,175	0,5	0,5895	0,231
4	0,09				0,145
5	0,128				0,21
6	0				0,0775
0	Kantualla	0.6	C h	10 h	04 h
Caspase 10	Kontrolle	3 N	6 N	12 n	24 N
1	0,0705	0,167	0,238	2,3825	1,202
2	0,4605	0,429	1,4075	1,8425	0,48
3	0,35	0,525	1,821	1,814	0,6035

Tab. 34: Caspaseassay (C6), angegeben sind die Werte als [Enzymaktivität / mg Protein]

50 µM Quercetin
0,2005
0,0805
0,179
0,3055
0
0,025
50 µM Quercetin
0,234
0,3485
0,3575
0,3055
0
0 0,0745
0 0,0745 50 μM Quercetin
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0 0 0,0745
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0,0805 0 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0 0
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0 0 0 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0 0 0 0,051
0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0 0 0 0 0,0745 50 µM Quercetin 0,067 0 0 0 0,051 0
5

Fortsetzung	Tab. 34 :			
Caspase 2	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin
1	0,0785	0,254	0,1415	0,0925
2	0,046	0,129	0,0235	0
3	0,1165	0	0	0,0425
Caspase 3	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin
1	0,0725	0,2905	0	0,0925
2	0,0945	0,35	0,1185	0,1525
3	0,1705	0	0	0
Caspase 9	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin
1	0,0075	0	0,047	0
2	0,0735	0,0735	0,1425	0,122
3	0	0	0	0
Caspase 10	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin
1	0,0355	0	0,1415	0,3695
2	0	0	0,0305	0
3	0	0	0	0

Caspase 2	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 µM Galangin
1	0,0785	0,061	0,0615	0,2305
2	0,046	0	0,043	0
3	0,1165	0,0435	0	0,0805
4	0,03	0	0	0
0	DUGO	50 ··· N O · l · ·· ···		
Caspase 3	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 µM Galangin
1	0,0725	0	0	0,0576
2	0,0945	0,065	0,129	0,263
3	0,17065	0	0	0
4	0	0	0,05915	0,10945
Caspase 9	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 μM Galangin
1	0,00765	0	0,031	0,0575
2	0,07335	0,0972	0,172	0,1315
3	0	0	0,0315	0,04
4	0	0	0	0,1095
Caspase 10	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 μM Galangin
1	0,0355	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

Caspase 2	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0,03	0	0 0,10475		
2	0	0	0	0	
3	0,0785	0,0545977	0,0725	0	
Caspase 3	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0	0,096	0,1395	0,093	
2	0	0,0205	0	0 0	
3	0,0872	0,073	0,0905		
Caspase 9	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0,018	0,018	0	
Caspase 10	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 μM Resveratrol	
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0,119	0,109	0,1265	0	

Tab. 35: Caspaseassay (C6 mit Serumentzug	g), angegeben sind die	Werte als [Enzymaktivität /
mg Protein]		

Caspase 2	Caspase 2 DMSO		100 µM Luteolin	250 µM Luteolin	
1	0,17	0,1895	0,1715	0,4185	
2	0,1219	0,08105	0,05475	0,06645	
3	0	0	0	0	
Caspase 3	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin	
1	0,1125	0,2275	0,2055	0,4185	
2	0,112	0,081	0,1095	0,155	
3	0	0	0	0	
Caspase 9	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin	
1	0,09	0,1135	0,2055	0,3765	
2	0,126	0,0205	0,0545	0,155	
3	0	0	0	0	
Caspase 10	DMSO	50 µM Luteolin	100 µM Luteolin	250 µM Luteolin	
1	0,113	0,1515	0,2055	0,3765	
2	0,16	0,0405	0,164	0,133	
3	0	0	0	0	

Caspase 2	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 μM Galangin	
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0,17	0,4225	1,538	0,444	
Caspase 3	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 µM Galangin	
1	0,017	0,06	0,2393	0	
2	0	0,1105	0	0 1,333	
3	0,1125	0,4225	1,3845		
Caspase 9	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 μM Galangin	
1	0,011	0,09385	0,615	0	
2	0	0	0	0	
3	0,09	0,2345	0,9273	0,8885	
Caspase 10	DMSO	50 µM Galangin	100 µM Galangin	250 μM Galangin	
1	0	0,094	0,615	0	
2	0	0	0	0	
3	0,113	0,3285	0,769	0,444	

Caspase 2	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0	0	0 0		
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
Caspase 3	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0,017	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
Caspase 9	DMSO	50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0,011	0	0	0,042	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
Caspase 10 DMSO 50 µM Resve		50 µM Resveratrol	100 µM Resveratrol	250 µM Resveratrol	
1	0	0	0	0,04	
2	0	0	0	0	
	1				

Tab. 36: Apoptotischer Index, H4IIE, angegeben ist die Anzahl apoptotischer Zellen / Gesamtzellzahl, Abb. 2.25.

Quercetin	Kontrolle	100 µM	250 µM	
1	0,00787	0,05185	0,08019	
2	0,01266	0,04819	0,08451	
3	0,00476	0,136	0,15854	

Fortsetzung				
Luteolin	Kontrolle	100 µM	250 μM	
1	0,01265	0,06386	0,45662	
2	0,01534	0,1243	0,5493	
3	0,0539	0,0275	0,2421	
Galangin	Kontrolle	100 μM	250 µM	
1	0,00787	0,01840	0,09286	
2	0,00787 0,01266	0,01840 0,03704	0,09286 0,07296	
1 2 3	0,00787 0,01266 0,00476	0,01840 0,03704 0,06612	0,09286 0,07296 0,03784	
1 2 3	0,00787 0,01266 0,00476	0,01840 0,03704 0,06612	0,09286 0,07296 0,03784	
1 2 3 Resveratrol	0,00787 0,01266 0,00476 Kontrolle	0,01840 0,03704 0,06612 100 μΜ	0,09286 0,07296 0,03784 250 μΜ	

0,01266

0,00476

0,04608

0,03306

0,07143

0,07955

2

3

Tab. 37: Apoptotischer Index, C6, angegeben ist die Anzahl apoptotischer Zellen / Gesamtzellzahl, Abb. 2.26.A

	100 μM Quercetin	250 μM Quercetin	100 μM Galangin	250 μM Galangin	100 µM Res- veratrol	250 µM Res- veratrol	100 μM Luteolin	250 μM Luteolin	DMSO
1	0,01471	0,05882	0,02392	0,08209	0,01667	0,03774	0,03150	0,03636	0,01163
2	0,04274	0,05556	0,01504	0,05932	0,03597	0,10843	0,03279	0,07194	0,01942
3	0,011976	0,06	0,03030	0,04286	0,01342	0,032	0,03125	0,04673	0,00769

Tab. 38: Apoptotischer Index, C6 mit Serumentzug, angegeben ist die Anzahl apoptotischer Zellen / Gesamtzellzahl, Abb. 2.26.B

	100 μM Galangin	250 μM Galangin	100 µM Res- veratrol	250 µM Res- veratrol	100 μM Luteolin	250 μM Luteolin	DMSO
1	0,01515	0,03472	0,06977	0,05660	0,02128	0,07792	0,01242
2	0,09483	0,08333	0,02210	0,05769	0,05051	0,03731	0,00575
3	0,04217	0,09735	0,03636	0,04211	0,02439	0,06140	0,00654

Tab. 39: Nekrotischer Index, H4IIE und C6, angegeben ist die Anzahl nekrotischer Zellen / Gesamtzellzahl, Abb. 2.27

C6 Zellen	DMSO	Resveratrol
1	2,01	17,57
2	0,46	5,84
3	1,54	23,89
H4IIE Zellen	DMSO	Resveratrol
H4IIE Zellen 1	DMSO 0,73	Resveratrol 3,3
H4IIE Zellen 1 2	DMSO 0,73 1,47	Resveratrol 3,3 0,8

Tab. 40: GST-Aktivitätsmessung, angegeben ist die gemessene Absorptionsänderung, Abb. 2.30.

Quercetin	0 μM	1 μM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,10395	0,0997	0,05315	0,03645	0,01775
2	0,0565	0,05255	0,03805	0,0394	0,02055
3	0,0823	0,08095	0,04345	0,02255	0,01305
Luteolin	0 μΜ	1 μM	10 µM	25 μΜ	50 µM
1	0,11494	0,08705	0,06243	0,04599	0,02440
2	0,07913	0,08208	0,06276	0,04673	0,01599
3	0,09518	0,09153	0,04701	0,04487	0,00586
Galangin	0 μΜ	1 μM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,04433	0,04690	0,03890	0,03413	0,01393
2	0,05404	0,04569	0,03468	0,04488	0,01536
3	0,08575	0,09025	0,09435	0,09085	0,02615
4	0,05785	0,12015	0,0893	0,0312	0,0274
Resveratrol	0 μΜ	1 μM	10 µM	25 µM	50 µM
1	0,08518	0,05192	0,08999	0,08841	0,04536
2	0,08424	0,08734	0,07147	0,08351	0,07885
3	0,10049	0,08259	0,08787	0,07699	0,07929

 Tab. 41: TEAC Luteolinderivate, angegeben sind die gemessenen Absorptionen, Abb. 2.32.

 Trolox
 Luteolin

 Luteolin
 Luteolin

	Kontrolle	10 μM	10 µM	10 μM	10 µM
1	0,828	0,48	0,336	0,777	0,85
2	0,952	0,618	0,467	0,872	0,944
3	0,781	0,345	0,299	0,708	0,78

Tab. 42: Neutralrot Assay Luteolinderivate, H4IIE, angegeben sind die gemessenen Absorptionen bzw. % Kontrolle, Abb. 2.33.

			Luteolin		Luteolindimethylether		Luteolintetramethylether	
	Kontrolle	%	250 µM	%	250 μM	%	250 μM	%
1	0,597	100	0,234	39,23	0,213	35,62	0,582	97,57
2	0,587	100	0,203	34,53	0,239	40,66	0,583	99,32
3	0,720	100	0,193	26,82	0,177	24,60	0,591	82,14
4	0,694	100	0,171	24,57	0,252	36,31	0,683	98,41

Tab. 43: Apo-ONE[®] Assay, angegeben sind die Werte in [rfu], Abb. 2.34.

	Kontrolle	Luteolin 250 µM	Luteolindimethylether 250 µM	Luteolintetramethylether 250 µM
1	147230	519755	96042	159097
2	143348	336989	43228	113118
3	80147	326987	29659	171502

6.2. Veröffentlichungen

Publikationen:

G. Michels, G.R.M.M. Haenen, W. Wätjen, S. Rietjens, A. Bast* (2004)

The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one containing flavonoids.

Toxicology letters 151, 105-111

G. Michels, W. Wätjen*, P. Niering, B. Steffan, Q.-H. Tran Thi, Y. Chovolou, A. Kampkötter, A. Bast, P. Proksch, R. Kahl (2005)

Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology* 206, 337-348

W. Wätjen*, G. Michels, B. Steffan, P. Niering, Y. Chovolou, A. Kampkötter, Q.-H. Tran-Thi, P. Proksch and R. Kahl (2005)

Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause damage and apoptosis. *Journal of Nutrition* 135, 525-531

B. Steffan, W. Wätjen^{*}, G. Michels, P. Niering, V. Wray, R. Ebel, R. Edrada-Ebel, R. Kahl and P. Proksch (2005)

Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu) – uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 233-240

P. Niering, G. Michels, W. Wätjen*, S. Ohler, B. Steffan, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch and R. Kahl

Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implications of oxidative stress and apoptosis.

Accepted by: Toxicology and Applied Pharmacology

G. Michels, W. Wätjen*, N. Weber, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch, R. Kahl

Effects of methylated derivates of luteolin isolated from Cyperus alopecuroides in rat H4IIE hepatoma cells

Accepted by: Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology

Veröffentlichte Abstracts / Posterpräsentationen:

W. Wätjen, Y. Chovolou, P. Niering, A. Kampkötter, G. Aussel, Q.-H. Tran-Thi, R. Kahl (2002).

Pro- and antiapoptotic effects of quercetin and fisetin in H4IIE cells: Implication of oxidative stress.

http://www.wissenschaft-online.de/gbm/homepage/abstract_detail.php? article_id=169

G. Michels, W. Waetjen, G.R.M.M. Haenen, A. Bast and R. Kahl (2002)

Role of dietary flavonoids in the adaptation of antioxidant enzymes to prooxidants and proinflammatory mediators.

Abstracts of the 1st Workshop of the European Graduate School "Molecular Mechanisms in Food Toxicology", 2002, Maastricht, Netherlands

G. Michels, G.R.M.M. Haenen, W. Wätjen and A. Bast (2003)

The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one containing flavonoids

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 367, 531

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

G. Michels, W. Wätjen, P. Niering, Q.-H. Tran-Thi and R. Kahl (2003)

Auswirkungen von Luteolin und Resveratrol auf Rattenhepatomzellen. Abstractband, DPhG-Doktorandentagung, Düsseldorf

G. Michels, G.R.M.M. Haenen, A. Bast, P. Niering, and W. Wätjen (2003)

Polyphenols induce apoptotic cell death in rat H4IIE cells Abstracts of the 2nd Workshop of the European Graduate School "Molecular Mechanisms in Food Toxicology", 28.October 2003, Maastricht, Netherlands

G. Michels, W. Wätjen, P. Niering, R. Kahl (2003)

Induction of apoptosis by luteolin and resveratrol in H4IIE cells 1st international Conference on Polyphenols and Health, Vichy (France)

W. Wätjen, B. Steffan, G. Michels, P. Niering, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch, R. Kahl (2003)

Protective and adverse effects of flavonoids in hepatoma cells: implication of oxidative stress and apoptosis.

1st international Conference on Polyphenols and Health, Vichy (France)

P. Niering, W. Wätjen, G. Michels, Q.-H. Tran-Thi, R. Kahl (2003)

Influence of kaempferol on oxidative stress, DNA strand breaks and apoptosis in H4IIE cells.

1st international Conference on Polyphenols and Health, Vichy (France)

G. Michels, W. Wätjen, P. Niering and R. Kahl (2004)

Apoptotic effects of the flavonoid luteolin in H4IIE rat hepatoma cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol 369, 466

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

W. Wätjen, I. Leinz, B. Steffan, G. Michels, P. Niering, A. Kampkötter, Y. Chovolou, P. Proksch, R. Kahl (2004)

Induction of apoptosis by the flavonoids quercetin and fisetin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 369, 467

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

W. Wätjen, I. Leinz, B. Steffan, G. Michels, P. Niering, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch, R. Kahl (2004)

Pro- and antiapoptotic effects of flavonoids.

1st International Conference "Molecular Research in Environmental Medicine" IUF Düsseldorf, 18-20th March 2004

G. Michels, W. Wätjen, R. Kahl (2004)

Apoptotic effects of the flavonoid luteolin in H4IIE rat hepatoma cells. 1st International Conference "Molecular Research in Environmental Medicine" IUF Düsseldorf, 18-20th March 2004

W. Wätjen, N. Weber, G. Michels, P. Niering, Y. Chovolou, A. Kampkötter, P. Proksch, R. Kahl (2005)

Comparison of uptake, antioxidative effects and cytotoxicity of structurally related flavonoids.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 371, 449

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

P. Niering, W. Wätjen, B. Steffan, S. Ohler, G. Michels, Y. Chovolou, A. Kampkötter, Q.-H. Tran-Thi, P. Proksch, R. Kahl (2005)

Ambivalence of kaempferol: protective and detrimental effects in H4IIE cells implicating oxidative stress and apoptosis

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 3719, 450

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

G. Michels, W. Wätjen, P. Niering and R. Kahl (2005)

Effects of resveratrol in H4IIE and C6 cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 371, 466

Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

6.3. Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl bedanken, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in ihrem Institut anzufertigen. Ich danke für das Vertrauen, das sie mir bei der Bearbeitung des Themas entgegen gebracht hat, für hilfreiche Diskussionen, sowie für die vielen Möglichkeiten der Weiterbildung, die sie mir eingeräumt hat.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch (Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, HHU Düsseldorf) danke ich für die Betreuung meiner Promotion und für die sehr gute Kooperation. Für die Durchführung von HPLC-Messungen bedanke ich mich bei Frau Dr. Bärbel Steffan und Frau Nadine Weber.

Herrn Prof. Dr. Aalt Bast (Institute of Pharmacology and Toxicology, Maastricht University) gilt mein Dank für seine Betreuung meiner Tätigkeit, ferner den Mitgliedern seines Arbeitskreises, besonders Frau Saskia Rietjens, für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Herrn Dr. Wim Wätjen, der meine Arbeit stets mit guten Ratschlägen, "lustigen Substanzen" und seiner bekannt liebenswerten Art, die Dinge kurz und prägnant auf den Punkt zu bringen, begleitet hat.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Frau Sandra Ohler und Frau Kerstin Wolters, die mit vielen kleinen Tipps & Tricks den Laboralltag erleichtert und vor allem erheitert haben, sowie Frau Dr. Yvonni Chovolou und Herrn Dr. Andreas Kampkötter, die durch ihre Diskussionsbereitschaft zu dieser Arbeit beigetragen haben. Den "Insassen" des Doktorandenzimmers danke ich für die gute Atmosphäre, die stets in unserem Räumchen herrschte.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern des Internationalen Graduiertenkollegs und "meinen" Holländern für die Begleitung während der Tox-Kurse. Besonders Frau Dr. Nadine Tillmanns möchte ich danken, die immer ein offenes Ohr für die Probleme und Problemchen des (Labor)-Alltags hatte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und vor allem meinem Mann Stephan für die uneingeschränkte Unterstützung - auch wenn es manchmal vielleicht schwer gefallen ist ;-))

6.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwandt. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den