

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Kiefernkernelzentstehung und -morphologie	1
1.2 Inhaltsstoffe des Kiefernkernelholzes	5
1.2.1 Sterole	6
1.2.2 Stilbene.....	7
1.2.3 Freie Fettsäuren	9
1.2.4 Terpene	11
1.2.4.1 Harzsäuren	13
1.2.4.2 Abbaureaktionen von Harzsäuren	15
1.2.4.3 Funktionen von Harzsäuren.....	16
1.3 Zytotoxische Effekte wässriger Kiefernkernelholzextrakte von <i>Pinus sylvestris</i>	18
1.4 Inositolphosphate.....	20
1.4.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion	20
1.4.2 Phosphatidylinositol und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion	21
1.4.3 Inositolphosphatkinasen und -phosphatasen als zentrale Enzyme des Inositolphosphat-Stoffwechsels.....	23
1.4.4 Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase A	24
1.4.5 Aufbau und physiologische Funktion der ITPKs	28
1.4.6 Rolle der ITPKA in Tumoren bei invasiver Migration und Metastasierung	32
1.4.7 Hemmstoffe gegen die IP3Kinase Aktivität	35
1.4.8 Enzymatische Eigenschaften der rekombinanten Ins(1,4,5)P ₃ 3- Kinase A aus Vogelerithrozyten.....	37
1.5 Zielsetzung	37
2 Material und Methoden	39
2.1 Materialien	39
2.1.1 Chemikalien	39
2.1.2 Geräte.....	39
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	41
2.1.4 Kits, Reagenzien und Marker.....	43
2.1.5 Antibiotika	43

2.1.6	Enzyme.....	43
2.1.7	Agar und Medien.....	44
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	45
2.1.9	Computerprogramme.....	47
2.1.10	Zelllinien.....	48
2.1.11	Bakterienstämme.....	48
2.2	Methoden.....	49
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	49
2.2.1.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	49
2.2.1.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> (nach Hanahan 1983 [70]).....	49
2.2.1.3	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> (nach Hanahan 1983 [70]).....	50
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	51
2.2.2.1	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	51
2.2.2.2	Lyse von <i>E. coli</i> -Bakterien und Separation der löslichen Fraktion.....	53
2.2.2.3	Chromatographische Reinigung von ITPKA durch P11-Phosphocellulose.....	53
2.2.2.4	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	55
2.2.2.5	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue.....	56
2.2.2.6	Enzymaktivitätsbestimmungen.....	57
2.2.2.7	Inhibierung der Aktivität der Ins(1,4,5)P ₃ 3-Kinase A.....	58
2.2.2.8	HPLC-Analyse von Inositolphosphatisomeren mittels Metal-Dye-Detection-Methode (MDD).....	59
2.2.2.9	Umsatz von Inositolphosphaten in <i>in vitro</i> -Enzymreaktionen und deren Aufarbeitung für die Analyse mit MDD-HPLC.....	60
2.2.2.10	HPLC-Trennung des ethanolischen Kiefernholzextrakts über Umkehr- und Normalphasensäule.....	61
2.2.2.11	Probenvorbereitung für die Strukturaufklärung mittels Kernresonanzspektroskopie.....	64
2.2.2.12	Probenvermessung mittels GC-MS sowie ESI-MS.....	64
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	65

2.2.3.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	66
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	66
2.2.3.3	Bestimmung der Tumorzellvitalität mittels MTT-Assay	67
2.2.4	Immunzytochemische Methoden	68
2.2.4.1	Durchflusszytometrie	68
2.2.4.2	BrdU-Proliferationsassay	69
2.2.4.3	Auswertung der FACS-Daten	71
3	Ergebnisse.....	73
3.1	Expression und Reinigung der GgITPKA.....	74
3.2	HPLC-Trennung des ethanolischen Kiefernkernholzextrakts über Umkehrphasensäule (UP).....	75
3.2.1	Bestimmung der Hemmwirkung von RP-HPLC-Fractionen mittels enzymatischer Assays unter Verwendung der GgIP3KA als Referenzenzym.....	75
3.2.2	Bestimmung der wachstumshemmenden Hemmwirkung von RP- HPLC-Fractionen auf H1299 Tumorzellen	78
3.3	HPLC-Trennung des ethanolischen Kiefernkernholzextrakts über Normalphasensäule (NP).....	79
3.3.1	Bestimmung der Hemmwirkung von NP-HPLC-Fractionen mittels enzymatischer Assays unter Verwendung der GgIP3KA als Referenzenzym.....	80
3.3.2	Bestimmung der Hemmwirkung von NP-HPLC-Fractionen mittels tumorzellkulturbasiertem Assay unter Verwendung von H1299 Zellen	81
3.4	Strukturanalysen hemmaktiver Fractionen aus der HPLC-Trennung mit RP-Säule.....	83
3.4.1	Strukturaufklärung von Fraktion 59.....	83
3.4.1.1	GC-MS-Analysen der Fraktion 59.....	83
3.4.1.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fraktion 59	86
3.4.2	Strukturaufklärung von Fraktion 55 und 53	91
3.4.2.1	Massenspektroskopische Analysen der Fractionen 55 und 53	91
3.4.2.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fractionen 55 und 53.....	97
3.4.3	Strukturaufklärung von Fraktion 35 und 36	102

3.4.3.1	GC-MS-Analysen der Fraktionen 35 und 36	102
3.4.3.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fraktionen 35 und 36	104
3.5	Strukturanalysen hemmaktiver Fraktionen aus der HPLC-Trennung mit NP-Säule	111
3.5.1	Strukturaufklärung von Fraktion 24	111
3.5.1.1	GC-MS-Analysen der Fraktion 24	111
3.5.1.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fraktion 24	114
3.5.2	Strukturaufklärung von Fraktion 23	119
3.5.2.1	GC-MS-Analysen der Fraktion 23	119
3.5.2.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fraktion 23	122
3.6	Strukturanalysen hemmaktiver Fraktionen aus der HPLC-Trennung mit beiden Säulen	128
3.6.1	Strukturaufklärung von Fraktion 31NP2, 32NP2, 23RP2 und 24RP2	128
3.6.1.1	GC-MS-Analysen	128
3.6.1.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen	133
3.7	Strukturaufklärung mittels UV-Spektroskopie	139
3.8	Erhebung von weiteren Strukturhinweisen mittels HPLC-Trennung der jeweiligen Reinsubstanzen	140
3.9	Zusammenfassung der Strukturanalysen	142
3.10	Hemmung von GgIP3KA durch Reinsubstanzen aus Kiefernkernholzextrakt	144
3.11	Hemmung des Wachstums von NCI-H1299-Zellen durch Reinsubstanzen aus Kiefernkernholzextrakt	145
3.12	BrdU Proliferationsassays zur Verifizierung einer antiproliferativen Wirkung von Reinsubstanzen aus Kiefernkernholzextrakt	148
3.13	Zellzahlbestimmung mittels Casy-Counter	149
3.14	Verdünnungsreihen im MTT-Assay mit H1299 Zellen von drei identifizierten Kiefernkernholzsubstanzen	151
4	Diskussion	153
4.1	Detektierte Substanzen im Kiefernkernholz	153
4.2	HPLC und GC von ethanolischem Kiefernkernholzextrakt	154
4.3	Antiproliferative Wirkung von Kiefernkernholzverbindungen	156

4.3.1	Sichtung der PubChem Bioassay Datenbank	156
4.3.2	Publizierte Studien über antiproliferative Kiefernsubstanzen	160
4.3.3	Hinweise zum antiproliferativen Wirkungsmechanismus der Kiefernkernholzkomponenten	161
4.3.4	Wirkungsspektrum von Kiefernkernholzsubstanzen	163
4.4	Rolle einer Hemmung der ITPKA.....	164
4.5	Ausblick	166
5	Zusammenfassung	169
6	Summary.....	171
7	Literaturverzeichnis	173
8	Abkürzungsverzeichnis	187
9	Anhang.....	191
9.1	Strukturanalysen hemmaktiver Fraktionen aus der HPLC-Trennung mit RP-Säule.....	191
9.1.1	Spektroskopische Datensätze der Fraktion 57RP1	191
9.1.2	Ergänzende NMR-Datensätze zur Fraktion 53RP1	193
9.1.3	Spektroskopische Datensätze der Fraktionen 43RP1 und 42RP1....	195
9.2	Strukturanalysen hemmaktiver Fraktionen aus der HPLC-Trennung mit NP-Säule.....	200
9.2.1	NMR-Spektren der Fraktion 24NP1	200
9.2.2	Ergänzende GC-MS Analysen zu den Fraktionen F23RP2, F24RP2, F31NP2 und F32NP2	202
9.2.3	Ergänzende NMR-Datensätze zu den Fraktionen F23RP2, F24RP2, F31NP2 und F32NP2	203
9.2.4	GC-MS-Analysen der Fraktionen F30NP1 und F33NP1.....	208
9.2.5	Spektroskopische Datensätze der Fraktionen F9NP1, F10NP1 und F11NP1.....	210
	Danksagung.....	213
	Publikationen.....	215