

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Kiefernholzentstehung und -morphologie	1
1.2 Inhaltsstoffe des Kiefernholzes	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 Kiefernholzextrakte von <i>Pinus sylvestris</i>	18
1.4 Inositolphosphate	20
1.4.1 Prinzipien der zellulären Signaltransduktion	20
1.4.2 Phosphatidylinositole 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 Vogelerythrozyten	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 Kiefernkernholzextrakts 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 Kiefern kernholzextrakts über Umkehrphasensäule (UP).....	75
3.2.1	Bestimmung der Hemmwirkung von RP-HPLC-Fraktionen mittels enzymatischer Assays unter Verwendung der GgIP3KA als Referenzenzym.....	75
3.2.2	Bestimmung der wachstums hemmenden Hemmwirkung von RP-HPLC-Fraktionen auf H1299 Tumorzellen	78
3.3	HPLC-Trennung des ethanolischen Kiefern kernholzextrakts über Normalphasensäule (NP).....	79
3.3.1	Bestimmung der Hemmwirkung von NP-HPLC-Fraktionen mittels enzymatischer Assays unter Verwendung der GgIP3KA als Referenzenzym.....	80
3.3.2	Bestimmung der Hemmwirkung von NP-HPLC-Fraktionen mittels tumorzellkulturbasiertem Assay unter Verwendung von H1299 Zellen	81
3.4	Strukturanalysen hemmaktiver Fraktionen 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 Fraktionen 55 und 53	91
3.4.2.2	Kernresonanzspektroskopische Analysen der Fraktionen 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 Kiefern kernholzextrakt	144
3.11	Hemmung des Wachstums von NCI-H1299-Zellen durch Reinsubstanzen aus Kiefern kernholzextrakt	145
3.12	BrdU Proliferationsassays zur Verifizierung einer antiproliferativen Wirkung von Reinsubstanzen aus Kiefern kernholzextrakt	148
3.13	Zellzahlbestimmung mittels Casy-Counter.....	149
3.14	Verdünnungsreihen im MTT-Assay mit H1299 Zellen von drei identifizierten Kiefern kernholzsubstanzen	151
4	Diskussion	153
4.1	Detektierte Substanzen im Kiefern kernholz	153
4.2	HPLC und GC von ethanolischem Kiefern kernholzextrakt	154
4.3	Antiproliferative Wirkung von Kiefern kernholzverbindungen	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	