

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Berend Isermann  
Bereich Pathobiochemie  
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann

**Untersuchungen zum Einfluss eines  
*Gynostemma pentaphyllum*-Extraktes auf das Wachstum von  
Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie.**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: Kerstin Heinitz  
aus: Bad Belzig  
Magdeburg 2012

*Für meine Familie*

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Heinitz, Kerstin:

Untersuchungen zum Einfluss eines *Gynostemma pentaphyllum*-Extraktes auf das Wachstum von Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie. – 2012, 75 Bl., 15 Abb., 8 Tab., 1 Anl.

## Kurzreferat

Gliome stellen die am häufigsten vorkommenden Hirntumore des Menschen dar. Besonders die Grad IV-Gliome weisen aufgrund ihres malignen Wachstumsverhaltens eine dramatische Prognose mit einer mittleren Überlebenserwartung von rund 14 Monaten nach Diagnosestellung auf. *Gynostemma pentaphyllum* (*G. pentaphyllum*), eine asiatische Pflanze, besitzt zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein ethanolischer Extrakt von *G. pentaphyllum* auf seine antikanzerogene Wirkung am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie der Ratte untersucht. Es wurde gezeigt, dass *G. pentaphyllum* die Proliferation der Tumorzellen hemmt. Ein gesteigertes Vorkommen toter, in Apoptose gegangener Zellen wurde nachgewiesen. Als Ursache wurde die Beeinflussung des ROS-Haushaltes der C6-Gliomazellen identifiziert. Die Untersuchungen zeigten ein durch *G. pentaphyllum* erhöhten zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt, der von einem gesteigerten Mn-SOD-Proteingehalt und einer gesteigerten SOD-Gesamtaktivität begleitet war. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *G. pentaphyllum* eine antikanzerogene Wirkung auf die C6-Gliomazellen ausübt. Sie leistet somit einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung des hochmalignen Grad IV-Glioms.

## Schlüsselwörter

*Gynostemma pentaphyllum*, C6-Gliomazellen, Reaktive Sauerstoffspezies, Wasserstoffperoxid, Superoxiddismutase, Apoptose

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Gliome</b>	<b>1</b>
1.1.1	WHO-Klassifikation .....	1
1.1.2	Therapiestrategien und Prognose.....	2
<b>1.2</b>	<b>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</b>	<b>3</b>
1.2.1	Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	4
1.2.2	ROS und Krebszellen .....	4
1.2.3	Antioxidantien – Superoxiddismutase (SOD) .....	5
1.2.4	ROS und Gliomazellen.....	6
<b>1.3</b>	<b>Apoptose</b>	<b>7</b>
1.3.1	Intrinsischer Weg .....	7
1.3.2	Caspasen .....	7
<b>1.4</b>	<b>Gynostemma pentaphyllum (Jiaogulan)</b>	<b>8</b>
1.4.1	Botanik .....	8
1.4.2	Wirkkomponenten .....	9
1.4.3	Wirkungen.....	11
1.4.3.1	Antioxidative Wirkung .....	11
1.4.3.2	Antikarzinogene Wirkung .....	12
<b>1.5</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>15</b>
2.2.1	Zellkultivierung.....	15
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	16
2.2.3	Mikroskopische Analyse.....	16
2.2.4	Färbung der C6-Gliomazellen.....	17
2.2.4.1	Fluoreszeindiacetat (FDA)-Assay .....	17
2.2.4.2	Immunhistochemie.....	17
2.2.5	Bestimmung von zellulärem Wasserstoffperoxid .....	18
2.2.6	Photometrische Untersuchung der SOD-Gesamtaktivität .....	19
2.2.7	Proteinanalytik – SOD .....	21
2.2.7.1	Quantifizierung der Proteine nach Lowry.....	21
2.2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.2.7.3	Western Blot.....	23

2.2.7.4	Detektion und Visualisierung .....	24
<b>2.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Vitalitätsbestimmungen</b>	<b>26</b>
3.1.1	Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Zellzahl.....	26
3.1.2	Phasenkontrastmikroskopie .....	28
3.1.3	Quantitative Vitalitätsbestimmung.....	30
3.1.3.1	Fluoreszein-Diacetat-Assay (FDA-Assay) .....	32
3.1.3.2	Immunhistochemische Untersuchung der Caspase 3-Aktivität.....	33
<b>3.2</b>	<b>Prozesse in der Zelle</b>	<b>33</b>
3.2.1	Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf den zellulären Wasserstoffperoxidgehalt .....	33
3.2.2	Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Superoxiddismutase .....	35
3.2.2.1	Aktivitätsbestimmung mittels UV/VIS-Photometrie .....	35
3.2.2.2	Western Blot zur Bestimmung des Mn-SOD-Gehaltes .....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellvitalität</b>	<b>39</b>
4.1.1	Qualitative Bestimmung – Zellzählung.....	39
4.1.2	Vitalitätsbestimmung.....	40
4.1.3	Untersuchungen zur Apoptose .....	42
<b>4.2</b>	<b>Prozesse in der Zelle</b>	<b>45</b>
4.2.1	Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf den zellulären Wasserstoffperoxidgehalt .....	46
4.2.2	Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Superoxiddismutase .....	47
<b>4.3</b>	<b><i>In vivo</i>-Experimente mit Gypenosiden an Tumorzellen</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
	<b>Anhang: Material .....</b>	<b>61</b>
	Verwendete Chemikalien	61
	Verwendete Geräte	62
	Verwendete Verbrauchsmaterialien	62
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>63</b>

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>65</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>66</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges.....</b>	<b>67</b>

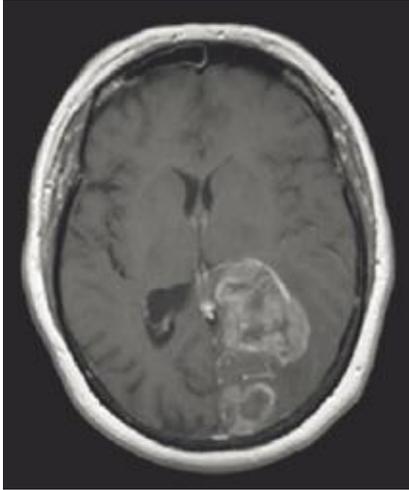
## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser ( <i>aqua destillata</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase
CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)	Kupfersulfat –Pentahydrat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCF	Dichlorhydrofluoreszein
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EC-SOD	Extrazelluläre Superoxiddismutase
ELSD	Lichtstredetektor ( <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> )
FDA	Fluoreszeindiacetat-Assay
FKS	fetales Kälberserum
<i>G. pentaphyllum</i>	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>
GPx	Glutathion-Peroxidase
H <sub>2</sub> -DCF	2',7'-Dichlordihydrofluoreszein
H <sub>2</sub> -DCF-DA	2',7'-Dichlordihydrofluoreszein-diacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

KM	Kontrastmittel
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NAD(P)H-Oxidase	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)-Oxidase
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidanion-Radikal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TBST	TBS-Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )

# 1 Einleitung

## 1.1 Gliome



**Abbildung 1: Glioblastom, WHO Grad IV, MRT T1-Wichtung mit KM (Schlegel 2011)**

Gliome stellen mit einem Anteil von 49 % an allen primären Hirntumoren die häufigste primäre Tumorform des zentralen Nervensystems dar. Mit einem Anteil von 2 % an allen Tumorerkrankungen des Menschen ist das Vorkommen zwar relativ selten, jedoch besitzen mehr als 60 % der Gliome ein ausgesprochen aggressives Wachstumsverhalten (Hayat 2011).

Die Tumorzellen haben ihren Ursprung in den Zellen des neuroepithelialen Gewebes, der Glia. Sie übernimmt eine Stütz- und Nährfunktion für die Nervenzellen. Entsprechend der verschiedenen glialen Subtypen lassen sich verschiedene histologische Tumorentitäten beschreiben.

Zu den Gliomen gehören die Astrozytome, die Oligodendrogliome und die Ependyome, sowie Mischformen. Glioblastome stellen die bösartigste Variante astrozytärer Gliome dar (Schlegel 2011). Betroffene dieser hochmalignen Grad IV-Glioblastome weisen eine durchschnittliche Überlebenserwartung von rund 14 Monaten auf (Ohka et al. 2012).

### 1.1.1 WHO-Klassifikation

Zur Einordnung der verschiedenen Subtypen der Gliome dient die aktualisierte Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) der Tumoren des Zentralen Nervensystems. Die WHO-Klassifikation beruht auf einer morphologischen Einteilung der Malignome unter Beachtung histologischer und zytologischer Kriterien (Zellursprung, Mitoseaktivität, Kernatypien), immunhistochemischer Marker zellspezifischer Antigene sowie des biologischen Verhaltens (Vaskularisation, Nekrosen). Entsprechend ihrer Dignität werden die Tumoren in vier Grade eingeteilt. Dabei entspricht Grad I einem differenzierten Tumor niedriger Wachstumstendenz, während dem Grad IV hochmaligne, entdifferenzierte

Tumoren zugeordnet werden (Schlegel 2011). Beispiele verschiedener Gliome, ihrer Gradeinteilung und Dignität finden sich in Tabelle 1.

Grad nach WHO	Tumoren (Auswahl)	Dignität
Grad I	Pilozytisches Astrozytom (Astrozytom I)	Niedriggradig maligne, langsam wachsend
Grad II	Differenzierte Astrozytome, Oligodendrogliom, Oligoastrozytom	
Grad III	Anaplastische Astrozytome, anaplastisches Oligodendrogliom	Hochgradig maligne, schnell wachsend
Grad IV	Glioblastoma multiforme (GBM)	

**Tabelle 1: Gradeinteilung der Hirntumoren**

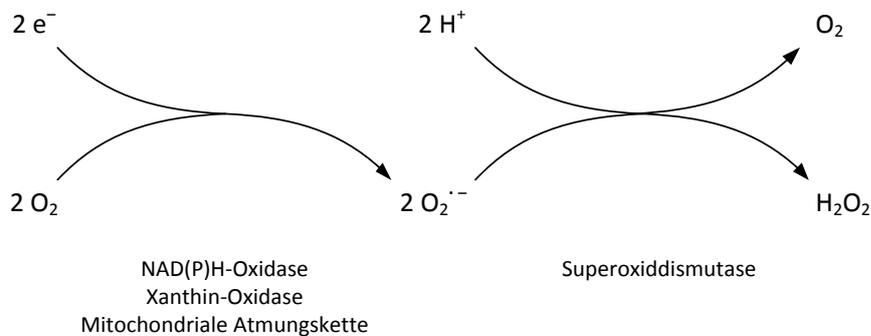
### 1.1.2 Therapiestrategien und Prognose

Zu den etablierten Standardverfahren der Gliomtherapie gehören die chirurgische Tumorentfernung, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Je nach Gliomentität profitieren die Patienten in unterschiedlichem Ausmaß von den verschiedenen Verfahren.

Faktoren wie ein junges Alter, ein hoher Karnofsky-Index, die Histologie, ein Fehlen von Nekrosen und eine ausgeprägte operative Tumormassenreduktion sind als prognostisch günstiger zu erachten (Reardon & Wen 2006). So ist die Prognose der Grad I- und Grad II-Tumoren, abhängig von ihrer Lokalisation und Operabilität, günstiger als die der Grad III- und Grad IV-Tumoren. Gerade bei dem hochmalignen Glioblastoma multiforme (GBM – Grad IV) sind dauerhafte Tumorwachstumskontrollen oder gar kurative Erfolge nur selten zu verzeichnen (Hayat 2011). Daher wird fortlaufend an einer Verbesserung der Tumorkontrolle geforscht. Dank fortschreitender Kenntnisse molekulargenetischer Zusammenhänge finden gezielte Therapieansätze, sogenannte *Target-Therapien*, immer häufiger in experimentellen Untersuchungen Anwendung (Mason & Cairncross 2008). Therapiestrategien, die die Prognose der aggressiv wachsenden Grad IV-Gliome dauerhaft verbessern, fehlen jedoch derzeit. Daher ist es erstrebenswert, eine Vielfalt von potentiellen Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und zu erproben. Eine mögliche Option besteht in der Beeinflussung zellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Da neuere Forschungen einen beträchtlichen Einfluss von ROS auf die Tumorphathologie belegt haben, wird dieser Ansatz in dieser Arbeit näher beleuchtet.

## 1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) werden unter physiologischen Bedingungen in aeroben Organismen gebildet. Zu ihnen gehören unter anderem das Superoxidanion-Radikal ( $O_2^{\bullet -}$ ) und das daraus durch die Superoxiddismutase (SOD) entstehende Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), siehe Abbildung 2. In Zellen des angeborenen Immunsystems werden ROS zur Abwehr synthetisiert (*oxidative burst*). Dazu dienen sowohl die Xanthin-Oxidase (Vorbach et al. 2003), als auch Isoformen der NAD(P)H-Oxidase (Katsuyama et al. 2012). Zudem entstehen ROS auch als Nebenprodukte der Atmungskette in den Mitochondrien (Giorgio et al. 2005).



**Abbildung 2: Entstehungswege reaktiver Sauerstoffspezies**

Studien zeigen, dass ROS auch in nicht-phagozytären Zellen, wie Fibroblasten und Gefäßendothelzellen durch Isoformen der NAD(P)H-Oxidase gebildet werden (Jones et al. 1996, Thannickal & Fanburg 1995). Dort sind sie Bestandteil intrazellulärer Signalkaskaden (Dröge 2002, Finkel, 2011) und fungieren als *second messenger* (Valko et al. 2006). Auf diese Weise nehmen sie Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Durch Einwirken auf intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen sie auch die Hemmung der Proliferation geschädigter Zellen und die Einleitung von Apoptosemechanismen – Mechanismen, die zum selbstinduzierten Zelltod führen (Valko et al. 2007).

Andere Studien weisen darauf hin, dass Zellen einen bestimmten *Redox-Zustand* besitzen, vergleichbar mit einem bestimmten pH-Wert, der in den Zellen herrscht (Schaffer & Buettner 2001). Der *Redox-Zustand* einer Zelle entsteht durch zelluläre Oxidations- und

Reduktionsreaktionen. Er nimmt Einfluss auf zelluläre Stoffwechselfvorgänge und auf die Genexpression. Veränderungen des *Redox-Zustandes*, ausgelöst durch ROS, wirken auf diese Weise auf Signaltransduktionsvorgänge. Das Vorhandensein geringer Mengen ROS wirkt so proliferationsfördernd, während hohe Mengen ROS zum Zelltod führen (Valko et al. 2006).

Eine übermäßige ROS-Produktion bei nicht ausreichender antioxidativer Metabolisierung führt zu einem erhöhten zellulären ROS-Vorkommen (siehe 1.2.3). Dies wird als *oxidativer Stress* bezeichnet (Finkel & Holbrook 2000). Wirkt dauerhaft *oxidativer Stress* auf die Zelle ein, so führt dies zu einer Schädigung der Zelle in Form von strukturellen Veränderungen an Biomembranen, Proteinen und DNA (Gil 2011, Valko et al. 2007). Eine wiederholte DNA-Schädigung stellt eine Ursache der Mutagenese, Karzinogenese und Zellalterung dar.

### **1.2.1 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entsteht aus der katalytischen Umwandlung des Superoxidation-Radikals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) durch die Superoxiddismutase (SOD). Es ist ein stabileres Molekül als sein radikaler Verwandter, das O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und zudem nur mäßig reaktiv gegenüber biologischen Molekülen. Anders als das O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gelangt das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Diffusion (Reth 2002) und durch Membranproteine, Aquaporine, (Bienert et al. 2007) durch die Zellmembran.

In Zellen übernimmt das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgrund seiner oben genannten Eigenschaften besondere Funktionen an den durch ROS verursachten Signalkaskaden (Rhee 2006, Veal et al. 2007, Cai 2005) und an der Initialisierung des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes. Studien zeigen, dass ein über einen bestimmten Grenzwert gesteigerter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt in der Zelle zur Apoptose führt (Gao et al. 2012, Mao et al. 2006, Hampton & Orrenius 1997). Ein über dieses Maß hinaus gesteigerter zellulärer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt führt zum nekrotischen Niedergang der Zelle (Hampton & Orrenius 1997).

### **1.2.2 ROS und Krebszellen**

ROS haben bei übermäßigem Vorhandensein zellschädigende Eigenschaften (*oxidativer Stress*). Dies führt zu Schädigungen an der DNA und genetischer Instabilität, was im Weiteren eine Ursache für die Karzinomentstehung von Zellen darstellt (Marnett 2000). Jede gesunde Zelle besitzt dagegen Schutzmechanismen, wie die Möglichkeit der Reparatur veränderter DNA-Abschnitte oder, bei Irreparabilität, die Einleitung der Apoptose. Krebszellen besitzen

hingegen eine hohe Toleranz gegenüber ROS. Diese Eigenschaft trägt dazu bei, dass sie sich unkontrolliert vermehren. Darüber hinaus ist in Krebszellen der oben beschriebene *Redox-Zustand* zugunsten eines Proliferationsoptimums verändert (McEligot et al. 2005, Valko et al. 2006). Das Vorhandensein eines für die Krebszelle optimalen ROS-Gehaltes verbessert zudem die Invasions- und Metastasierungsbedingungen (López-Lázaro 2007). Das bedeutet, dass sich durch Veränderungen im zellulären ROS-Vorkommen potenzielle Therapiestrategien ergeben. Eine übermäßige Erhöhung des zellulären ROS-Gehaltes kann in Form von *oxidativem Stress* den Krebszelltod induzieren. Eine Schlüsselrolle in dem durch *oxidativen Stress* induzierten Krebszelltod übernimmt das  $H_2O_2$  (López-Lázaro 2010, Liou & Storz 2010). Untersuchungen an Krebszellen zeigen, dass eine signifikante Steigerung der intrazellulären  $H_2O_2$ -Produktion die Apoptose in den Zellen einleitet (López-Lázaro 2007).

### **1.2.3 Antioxidantien – Superoxiddismutase (SOD)**

Aufgrund der schädigenden Wirkung der ROS entwickelte der Organismus Abwehrmechanismen. Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), Katalase und die Glutathion-Peroxidase (GPx) wandeln ROS in für die Zelle nicht-toxische Moleküle um. Außerdem stehen nicht-enzymatische Stoffe zur Verfügung, die antioxidativ wirken. Dazu gehören  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E),  $\beta$ -Carotin, Ascorbinsäure (Vitamin C) und Glutathion (Dröge 2002).

Wie in Abbildung 2 (siehe 1.2, S. 3) veranschaulicht wird, erfolgt die Umwandlung des  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  unter katalytischer Wirkung der SOD (McCord & Fridovich 1969). Im Menschen existieren drei Isoformen der SOD: Im Zytosol befindet sich die Cu/Zn-SOD, in den Mitochondrien die Mn-SOD und im Extrazellularraum die EC-SOD (Robbins & Zhao 2012). Von den drei Genannten besitzt die Mn-SOD die größte Bedeutung in der zellulären ROS-Entgiftung (Holley et al. 2011).

Unter Betrachtung des Aspektes „Tumorgenese“ weisen neue Untersuchungen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Mn-SOD-Aktivität/-Gehalt und Tumorprogression besteht. Es konnte je nach Tumorentität gezeigt werden, dass der Mn-SOD-Erhöhung in Tumorzellen eine progressionsbegünstigende oder eine erschwerende Rolle zukommt (Holley et al. 2011). Wiesen Tumorentitäten eine Verringerung der Mn-SOD unterhalb des physiologischen

Wertes auf, so führte eine künstliche Erhöhung des Mn-SOD-Gehaltes und ihrer Aktivität zu einer Verlangsamung oder Hemmung der Tumorpheriferation (Venkataraman et al. 2005, Ough et al. 2004). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die durch die Mn-SOD veränderte intrazelluläre ROS-/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Situation sein (Valko et al. 2007, Oberley 2005). Diese beeinflusst im Folgenden intrazelluläre Signalwege, die bestimmend für zelluläre Wachstums- und Differenzierungsprozesse (Valko et al. 2006) sowie für die Apoptoseeinleitung sind (López-Lázaro 2010).

#### **1.2.4 ROS und Gliomazellen**

Ein durch die Veränderung von Mn-SOD-Aktivität und -Gehalt beeinflusstes Wachstum von humanen Gliomazellen zeigten *in vivo*- und *in vitro*-Experimente. Eine Erhöhung der Mn-SOD-Aktivität und des SOD-Gehaltes bei gleichzeitig ansteigendem zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkten sich wachstumshemmend auf die Tumorzellen aus (Zhong et al. 1997, Li et al. 2000, Liou & Storz 2010). Es liegen somit Hinweise vor, die auf einen Zusammenhang der zellulären ROS-Situation und der Gliomprogression schließen lassen. Dies könnten sich zukünftige Therapiemodelle zunutze machen.

## 1.3 Apoptose

Als Apoptose wird eine Form des programmierten Zelltodes bezeichnet. Dabei sorgt die Zelle selbst durch Induktion proteolytischer Enzyme, sogenannte Caspasen, für ihren Niedergang. Zwei verschiedene Wege der Apoptoseeinleitung werden beschrieben: der intrinsische oder mitochondriale Weg und der extrinsische oder Todesrezeptor-vermittelte Weg (Rezeptor der TNF-Familie). Alle Wege führen am Ende zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (Adams 2003).

### 1.3.1 Intrinsischer Weg

Beim intrinsischen Weg handelt es sich um ein an der Zelle ausgelösten Stress, der zur Zellschädigung führt. Als Beispiel kann der durch die ROS verursachte Zellstress genannt werden. Dieser führt zu Permeabilitätsveränderungen der Mitochondrienmembran, die durchlässig für Cytochrom c und andere proapoptotische Proteine wird. Produkte der Bcl-2-Genfamilie fungieren als Apoptoseregulatoren (Adams 2003, Plati et al. 2011). Bcl-2 wirkt dabei antiapoptotisch, Bax hingegen proapoptotisch.

### 1.3.2 Caspasen

Caspasen, abgeleitet von engl. *cysteiny* *aspartate-specific proteinases*, sind Cystein-Proteasen. Sie liegen in jeder Zelle als inaktives Vorprodukt, sogenannte Zymogene, vor und sind maßgeblich an der Umsetzung des von der Zelle gesteuerten Zelltodes beteiligt. Die Caspasen 8 und 9 übernehmen die Initiatorrolle (Caspase 8 im extrinsischen Weg, Caspase 9 im intrinsischen Weg) und aktivieren die Effektorcaspasen. Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7. Diese sind als Proteasen direkt am Abbau der Zelle beteiligt. Zudem aktivieren sie weitere Enzyme, die die Zelle ohne Zerstörung der Membranintegrität „auflösen“. Optisch wird ein Schrumpfen der Zelle sichtbar. Sie löst sich aus ihrem Zellverband, ohne eine Begleitreaktion (Entzündung) in der Umgebung hervorzurufen (Turner & Cidlowski 2007).

## 1.4 Gynostemma pentaphyllum (Jiaogulan)

### 1.4.1 Botanik

*Gynostemma pentaphyllum* (*G. pentaphyllum*) ist eine wildwachsende Rankpflanze, die Schatten und Feuchtigkeit bevorzugt. Sie gehört der Familie der Kürbisgewächse (Cucurbitaceae) an. Die Pflanze ist in den bergigen Regionen im Süden Chinas, in Japan und weiteren Regionen Südasiens beheimatet (Blumert & Lui 2003, Huang et al. 2007).

Aufgrund ihrer vielfältigen gesundheitsförderlichen Eigenschaften fand sie Anwendung in der südostasiatischen Volksmedizin. Im Volksmund wird sie auch „Jiaogulan“ oder „Pflanze der Unsterblichkeit“ genannt.

Charakteristisch ist der fünfblättrige Aufbau der Laubblätter, wie auf der Abbildung 3 zu erkennen ist. Dieser ist namensgebend für die Pflanze. In den Laubblättern befindet sich der größte Anteil der Wirkstoffe (Liu et al. 2005).



**Abbildung 3:** *Gynostemma pentaphyllum*

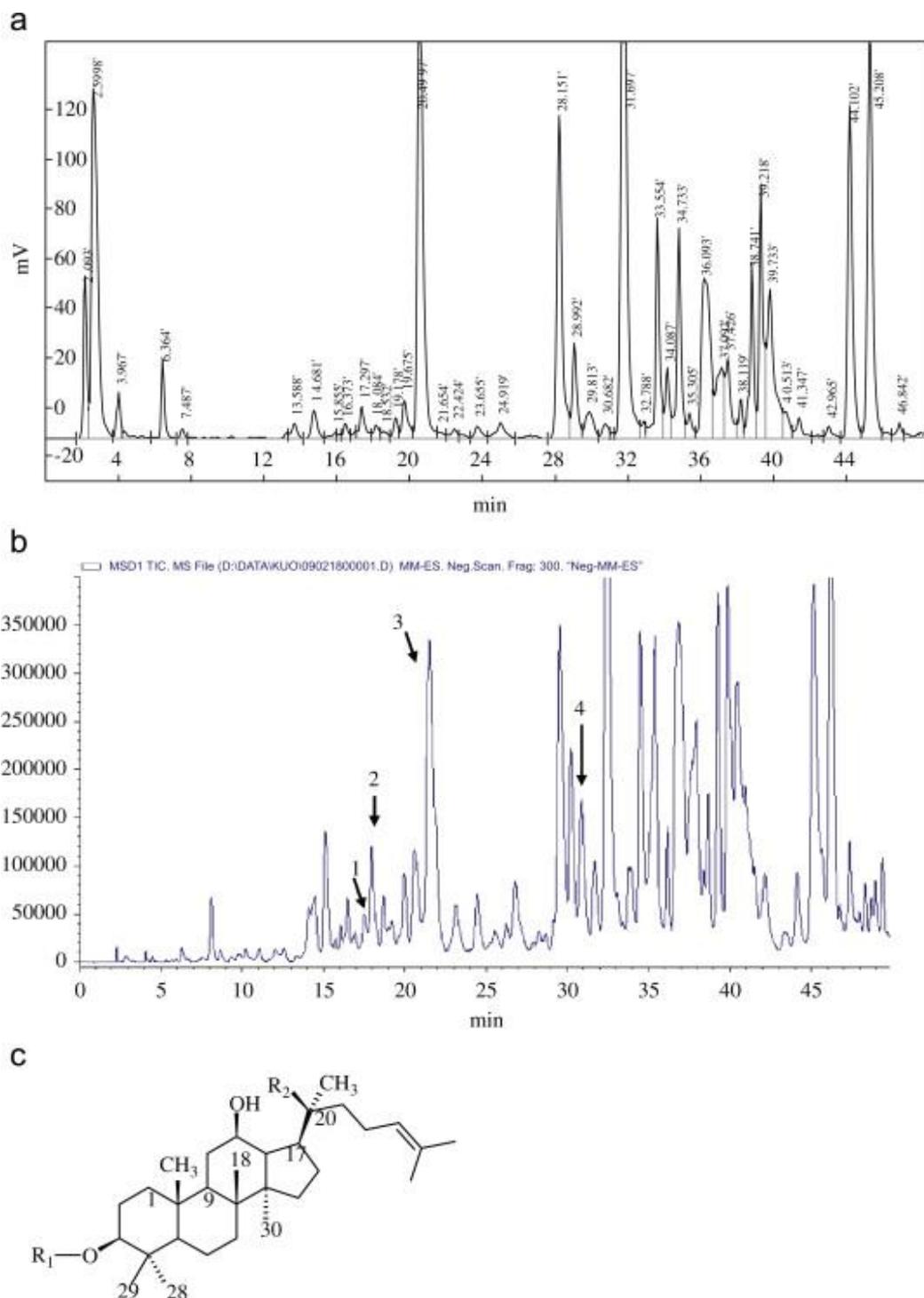
Quelle: <http://www.siamherba.net/images/03gynostemmapentaphyllum.jpg> (Zugriff am 12.09.2012)

## 1.4.2 Wirkkomponenten

Bei phytochemischen Untersuchungen dieser Pflanze wurden ca. 90 steroidale Glykoalkaloide, auch *Saponine* genannt, identifiziert. Die im *G. pentaphyllum* vorkommenden *Saponine* werden als *Gypenoside* bezeichnet. Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu den im *Panax Ginseng* enthaltenen *Ginsenoiden* auf (Cui et al. 1999). Besonders herausgestellt werden können die *Gypenoside* III, IV, VIII, XII, welche identisch mit den *Ginsenoiden* Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rd und F2 sind (Cui et al. 1999).

Der im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung verwendete ethanolische Extrakt wurde zuvor einer Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) zugeführt. Diese Untersuchung wurde von B.H. Chen vom Department of Food Science and Graduate Institute of Medicine, Fu Jen University, Taipei, Taiwan nach einer modifizierten Methode von Kao et al. 2008 durchgeführt. Auf den Abbildungen 4a und 4b ist das HPLC-Chromatogramm dargestellt, welches zum einen mittels Lichtstreuendetektor (ELSD) ausgewertet wurde (Abbildung 4a) und zum anderen mittels Massenspektrometrie (MS) (Abbildung 4b). Durch Vergleiche der Spitzen (*Peaks*) mit Standards (bekannte Substanzen, die einem *Peak* zugeordnet sind) konnten 4 *Peaks* identifizieren werden: Peak 1 – Gypenoside LXIII, Peak 2 - Gypenoside LXIII, Peak 3 – Gypenoside IV, Peak 4 – Gypenoside VIII.

Die Abbildung 4c zeigt die chemische Struktur der Gypenoside (Dammaran Typ - Triterpenglykosid), die eine partielle Ähnlichkeit mit den im Ginseng enthaltenen *Saponinen* aufweisen (Schild et al. 2010).



**Abbildung 4: Charakterisierung des ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum***

1a: HPLC Chromatogramm der Saponine des *G. pentaphyllum*-Extraktes mit ELSD Detektion. Peak 1: Gypenoside LXIII; Peak 2: Gypenoside LXIII; Peak 3: Gypenoside IV (Ginsenoide Rb3); Peak 4: Gypenoside VIII (Ginsenoide Rd). 1b: HPLC Chromatogramm der Saponine des *G. pentaphyllum* Extraktes mit MS. Peak 1: Gypenoside LXIII; Peak 2: Gypenoside LXIII; Peak 3: Gypenoside IV (Ginsenoide Rb3); Peak 4: Gypenoside VIII (Ginsenoide Rd). 1c: Darstellung der chemischen Struktur der Gypenoside (Dammaran Typ – Triterpenglykosid) mit Ähnlichkeit zu den im Ginseng enthaltenen Saponinen (Schild et al. 2010)

### 1.4.3 Wirkungen

Diverse Untersuchungen und Studien beschäftigten sich in den vergangenen Jahren mit den Wirkungen von *G. pentaphyllum* und einer in ihr vorkommenden Wirkstoffgruppe, den *Gypenosiden*. Zahlreiche positive Eigenschaften werden darin belegt: **Antidiabetische** Effekte wurden in klinischen Studien an zwei Patientengruppen gezeigt, die über 12 Wochen hinweg täglich *G. pentaphyllum*-Tee zu sich nahmen (Huyen et al. 2010). Vergleichbare Effekte boten sich auch in tierexperimentellen Studien (Norberg et al. 2004, Megalli et al. 2006). Weiterhin wurden über **gastro- und hepatoprotektive** Eigenschaften (Rujjanawate et al. 2004, Chou et al. 2006, Müller et al. 2012) sowie über **fettsenkende** und **immunmodulatorische** Wirkungen (La Cour et al. 1995, Huang et al. 2007) berichtet. Auch eine **kardiovaskuläre Protektion** konnte in Experimenten (Tanner et al. 1999) nachgewiesen werden.

#### 1.4.3.1 Antioxidative Wirkung

1993 wurden von Li et al. berichtet, dass die im *G. pentaphyllum* vorkommenden *Gypenoside* in der Lage sind, den Gehalt an Superoxidanion-Radikalen und Wasserstoffperoxid in Neutrophilen zu senken. Auch zeigten sie, dass Lipidperoxidationen in Lebermikrosomen und Gefäßendothelzellen durch die *Gypenoside* gehemmt wurden. *Gypenoside* schützten Biomembranen vor oxidativer Schädigung (Li et al. 1993).

Schild et al. führten 2009 Untersuchungen an Hirnzellen des Hippocampus von Ratten durch. Dabei stellten sie fest, dass Zellschädigungen, ausgelöst durch hypoxische und hypoglykämische Reize, mithilfe sofortiger *G. pentaphyllum*-Applikation verhindert wurden (Schild et al. 2009). Dies stellte einen Hinweis auf eine direkte antioxidative Wirkung von *G. pentaphyllum* dar. Sich daran anschließende Untersuchungen ließen 2012 auf einen weiteren durch *G. pentaphyllum* ausgelösten antioxidativen Mechanismus folgern. In ihren Untersuchungen konnten Schild et al. gesteigerte Enzymaktivitäten und Mengen der antioxidativen Enzyme Mn-SOD und GPx, ausgelöst durch 48-stündige Kultivierung der hippocampalen Astrozyten mit *G. pentaphyllum*, zeigen. Der Gehalt zellulärer ROS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blieb so unverändert. Einer oxidativen Schädigung wurde vorgebeugt (Schild et al. 2012).

Wang et al. untersuchten 2010 die antioxidativen Eigenschaften von *Gypenosiden* im Zusammenhang mit der Parkinsonerkrankung. In Theorien wird davon ausgegangen, dass es durch oxidativen Stress zu einem Untergang dopaminerger Zellen in der für diese Erkrankung entscheidenden Hirnregion, der *Substantia nigra*, kommt (Fahn & Cohen 1992). Wang et al. führten daher Untersuchungen an Mäusen durch, die oxidativem Stress ausgesetzt waren. Der oxidative Stress löste in den Nervenzellen die Apoptose aus. Sie gingen zugrunde. Wurden den Mäusen jedoch *Gypenoside* injiziert, so schützten diese die Nervenzellen vor dem oxidativen Stress und dem dadurch verursachten Zelluntergang. In diesem Zusammenhang zeigten sie eine dosisabhängige Erhöhung der SOD-Aktivität und eine Vermehrung des Glutathions, ausgelöst durch die im *G. pentaphyllum* vorkommenden *Gypenoside* (Wang et al. 2010).

#### **1.4.3.2 Antikanzerogene Wirkung**

Die in 1.4.3.1 beschriebenen antioxidativen Eigenschaften spiegeln den Effekt von *G. pentaphyllum/Gypenosiden* in gesunden Zellen wider. In Tumorzellen besitzen diese Wirkstoffe hingegen gegenläufige Effekte. So ließ sich ebenfalls eine Beeinflussung der zellulären ROS-Situation durch die *Gypenoside* in diversen Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten an der China Medical University, Taichung, Taiwan, Volksrepublik China finden. Die Beeinflussung der zellulären ROS-Situation in Tumorzellen war mit dem Tod der malignen Zellen verbunden. Die Untersuchungen wurden an Zellen des Kolonkarzinoms (Chen et al. 2006), Leberkarzinoms (Wang et al. 2007), Zungentumoren (Chen et al. 2009) und Leukämiezellen (Hsu et al. 2011) durchgeführt. Experimente zum Einfluss des Wirkstoffes auf Gliomazellen fanden hingegen nicht statt.

Neben einer gesteigerten ROS-Produktion wiesen die *Gypenoside* in den genannten Untersuchungen weitere Effekte auf, die das Wachstum und den Stoffwechsel in Richtung Apoptose beeinflussten. So zeigten sich ein erhöhter Calciumionen-Gehalt, Cytochrom-c-Freisetzung und veränderte Membranpotentiale der Mitochondrienmembran (Hsu et al. 2011, Lin et al. 2011, Chen et al. 2006). Zudem ließ sich ein Eingreifen in die für die Apoptoseregulation verantwortlichen Bcl-2 Genfamilie erkennen. So kam es zur up-Regulation des pro-apoptotischen Proteins Bax und zur down-Regulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Hsu et al. 2011, Lin et al. 2011, Wang et al. 2007). Weiterhin

konnte eine Aktivierung der zur Apoptose führenden Caspase-3 dargestellt werden (Chen et al. 2006, Chen et al. 2009). *In vivo*-Untersuchungen an Mäusen zeigten die antikanzerogenen Eigenschaften der Gypenoside in Form einer Tumormassenreduktion (Lin et al. 2011) bzw. einer verbesserten Überlebensrate der mit Tumorzellen injizierten Tiere (Hsu et al. 2011).

Unabhängig von den oben beschriebenen Untersuchungen konnten Guohua et al. 2006 und Cheng et al. 2011 in ihren Experimenten mit einem *G. pentaphyllum*-Extrakt vergleichbare Effekte erzielen. Beide zeigten ein Eingreifen des Wirkstoffes in den Zellzyklus über eine Expressionsabnahme von Bcl-2 und eine Expressionszunahme von Bax in Lebertumorzellen der Zelllinie Huh-7 (Guohua et al. 2006) und an PC-3-Zellen des Prostatakarzinoms (Cheng et al. 2011).

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Derzeit steht die Medizin vor enormen Herausforderungen bei der Behandlung von Patienten mit Grad III- und IV-Gliomen. Denn trotz intensiver Forschung und radikaler Therapiekonzepte sind diese am häufigsten vorkommenden Hirntumore von einer dramatischen Prognose mit einer mittleren Überlebenserwartung von rund 14 Monaten nach Diagnosestellung begleitet. Gegenwärtig ist unbekannt, ob *G. pentaphyllum* das Wachstum der aggressiven Gliomazellen beeinflussen kann.

Daher untersucht diese Arbeit

- den Einfluss eines ethanolschen Extraktes von *G. pentaphyllum* auf das **Wachstum von C6-Gliomazellen der Ratte**,
- deren **Vitalität** und **Caspase 3-Aktivität** und
- die durch *G. pentaphyllum* ausgelöste Veränderung des ROS-Haushaltes in C6-Gliomazellen unter Betrachtung des **Wasserstoffperoxid-Gehaltes** sowie des **Superoxiddismutase-Vorkommens** und **-Gesamtaktivität** in den Tumorzellen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Der in diesen Untersuchungen verwendete *G. pentaphyllum*-Extrakt wurde aus luftgetrockneten Bestandteilen der Pflanze gewonnen. Die Extraktion erfolgte mithilfe eines 75 % Ethanol/25 % Wasser- Gemisches. Erworben wurde er von Herbasin (Shenyang) Co., Ltd. (China).

Die Untersuchungen der Wirkungen des ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum* erfolgten an der C6-Glioma-Zelllinie der Ratte. Diese wurde von der European Collection of cell cultures (ECACC, Porton Down, Großbritannien) bezogen.

Übersichten zu den verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräten befinden sich im Anhang.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Zellkultivierung**

Zur Vervielfältigung der in flüssigem Stickstoff (-195 °C) eingefrorenen C6-Gliomazellen wurden diese zunächst über vier Tage kultiviert (Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Dazu wurden die tiefgefrorenen Zellen im 40 °C warmem Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>/50 ml) mit 5 ml Nährmedium, bestehend aus Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 3 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und Glucose, überführt. Anschließend wurden die mit PBS (37 °C) gewaschenen Zellen mithilfe von Trypsin (37 °C) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen übertragen und nach Zugabe von 6 ml Medium für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert (Zentrifuge, Heraeus, Hannover, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in Medium resuspendiert (Gesamtvolumen: 5 ml). Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (18 Quadrate).

Die Aussaat der Zellen in die mit Poly-D-Lysin beschichteten Petrischalen (Durchmesser: 35 mm, Volumen: 2 ml) erfolgte mit einer Zelldichte von  $110 \cdot 10^3$  Zellen/ml. Nach 72-stündiger Kultivierung der Tumorzellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schloss sich ein

Mediumwechsel an. Nach weiterer 24-stündiger Kultivierung wurde den C6-Gliomazellen 20 µl des *G. pentaphyllum*-Extraktes zugesetzt (Endkonzentrationen 20, 40, 60 µg/ml). Eine weitere Kontrollkultur wurde mit dem Lösungsmittel DMSO versetzt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Werkbank.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um den Verlauf der Zellproliferation zu ermitteln, fanden an drei aufeinander folgenden Tagen Zellzählungen statt. Die erste Zählung erfolgte nach einstündiger Inkubation der Zellen mit der Extrakt-, bzw. der Kontrolllösung. Weitere Zählungen schlossen sich nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation an. Zunächst wurden die Zellen vom Medium befreit und mit PBS gereinigt. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Petrischalen wurden 500 µl Trypsin (37 °C) verwendet. Die Zellsuspension wurde auf 1 ml mit 500 µl PBS aufgefüllt. Um das Verklumpen der gelösten Zellen zu verhindern, wurden sie vorsichtig mithilfe einer Pipette vermischt. Nach Bedarf wurden Verdünnungen mit PBS angefertigt, um die Zellzahl sicher zu bestimmen (Tabelle 2).

	1 h	24 h	48 h
<b>Kontrollzellreihe (DMSO)</b>	1:10	1:50	1:50
<b>20 µg/ml <i>G. pentaphyllum</i>-Extrakt</b>	1:10	1:20	1:20
<b>40 µg/ml <i>G. pentaphyllum</i>-Extrakt</b>	1:10	1:20	1:20
<b>60 µg/ml <i>G. pentaphyllum</i>-Extrakt</b>	1:10	1:10	1:10

**Tabelle 2: Verdünnungsverhältnisse der Zellsuspensionen entsprechend ihrer Kultivierungszeit und konzentrationsabh. Proliferationsverläufe**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an einem Inversionsmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) bei einer 10-fachen Vergrößerung. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer (18 Quadrate) genutzt. 10 µl wurden der Verdünnung entnommen und in die Zählkammer eingefüllt. Die Zählungen wurden in fünf unabhängigen Ansätzen jeweils doppelt durchgeführt.

### 2.2.3 Mikroskopische Analyse

Zur Dokumentation des Proliferationsverlaufes, der mit *G. pentaphyllum* versetzten C6-Gliomazellen, wurden parallel zur Zellzählung Bilder der Tumorzellen bei 10-facher

Vergrößerung angefertigt. Zellen jeder Extraktkonzentration sowie die Kontrollzellen wurden dazu nach einstündiger und nach 48-stündiger Inkubation unbehandelt in den Petrischalen belassen, unter das Objektiv des Inversionsmikroskopes (Olympus, Hamburg, Deutschland) gestellt und im Phasenkontrastmodus gemessen. Mithilfe einer Digitalkamera wurden Fotos erstellt.

#### **2.2.4 Färbung der C6-Gliomazellen**

Der Bestimmung der Zellzahl zur Ermittlung des Proliferationsverlaufes folgten Untersuchungen zur Vitalität und zur Apoptoseaktivierung der mit *G. pentaphyllum* kultivierten Tumorzellen. Dazu fanden zwei verschiedene Färbemethoden Anwendung. Zum einen wurden Vitalfärbungen nach dem Fluoreszeindiacetat (FDA)-Assay (Strauss 1991) angefertigt, zum anderen erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Caspase 3-Aktivität.

##### **2.2.4.1 Fluoreszeindiacetat (FDA)-Assay**

Mithilfe des FDA-Assay wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Zunächst wurde das Nährmedium aus den Petrischalen entfernt. Im Anschluss daran wurden simultan Fluoreszeindiacetat (10 µg/ml PBS, 5 min) und Propidiumiodid (5 µg/ml PBS, 5 min) in die Petrischalen gegeben. Das unpolare Fluoreszeindiacetat passierte die Zellmembran lebender C6-Gliomazellen. Dort wurde es durch cytosolische Esterasen gespalten. Das nun polare Fluoreszein akkumulierte und erschien im Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Zeiss, Jena, Deutschland) grün.

Das Propidiumiodid hingegen gelangte nur durch die geschädigte Zellmembran und ließ die toten Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager) rot erscheinen. Die je nach ihrem Vitalitätszustand unterschiedlich gefärbten Tumorzellen wurden getrennt voneinander gezählt. Daraus ermittelte sich der Anteil der toten Zellen an dem gesamten Zellvorkommen.

##### **2.2.4.2 Immunhistochemie**

Als Immunhistochemie wird eine Methode bezeichnet, die Antikörper zur Sichtbarmachung von Proteinen nutzt. Aufgrund des Vorhandenseins bestimmter Epitope am Protein können dort selektiv Primärantikörper binden. Diese werden wiederum durch Fluorochrom gekoppelte Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Zum hier angestrebten Nachweis der Apoptose in den mit *G. pentaphyllum* kultivierten Tumorzellen wurde als Primärantikörper der polyklonale *rabbit anti-caspase 3*-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland), Verdünnung 1:100, genutzt.

Zur Sicherung der Zellen wurden diese zuvor mit 4-prozentigem PFA 30 min fixiert und anschließend mit PBS gespült. Um ein unselektives Binden von Antikörpern zu verhindern, wurde FKS hinzugegeben. Über Nacht erfolgte eine mehrstündige Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper, gelöst in PBS und 3-prozentigem Triton X-100 bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen dreimal jeweils 5 min mit PBS gewaschen und mit dem Alexa Fluor 546 Sekundärantikörper (*goat-IgG anti-rabbit-IgG*, Molecular Probes, Göttingen, Deutschland), Verdünnung 1:500, für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager) untersucht. Zur Kontrolle der Spezifität der immunhistochemischen Reaktion wurden Zellen mit Puffer anstelle des Primärantikörpers versehen.

### **2.2.5 Bestimmung von zellulärem Wasserstoffperoxid**

Zur Messung des zellulären Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ) wurde das Fluorochrom Dichlorhydrofluoreszein (DCF) genutzt. Es entsteht durch intrazelluläre Esterasen, die nach Aufnahme von 2',7'-Dichlordihydrofluoreszein-diacetat ( $H_2$ -DCF-DA) in die C6-Gliomazellen die Acetatgruppen abspalten. Das nicht fluoreszierende 2',7'-Dichlordihydrofluoreszein ( $H_2$ -DCF) wird durch  $H_2O_2$  oxidiert und so zum fluoreszierenden DCF (Cathcart et al. 1983). Die Fluoreszenzintensität des DCF kann somit als Indikator für die Menge an zellulärem  $H_2O_2$  angesehen werden.

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte nach einstündiger und 48-stündiger Inkubation der Tumorzellen mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum*. Dazu wurde pro Versuchsreihe die Zellmenge aus zwei Petrischalen gepoolt. Jeder Petrischale wurden 500  $\mu$ l PBS (37 °C) und 5  $\mu$ l 50 mM  $H_2$ -DCF-DA zugefügt und nachfolgend für 15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Anschließend folgte eine zweimalige Waschung mit PBS zur Entfernung des überschüssigen extrazellulären  $H_2$ -DCF-DA. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Trypsin (37 °C) und zweiminütiger Inkubation schloss sich die Überführung der Zellen in Eppendorfgefäße an. Diese wurden zur Entfernung des Trypsins

zentrifugiert (5000 U/min), der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz fand das Luminescence Spectrofluorimeter LS 50B (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) Verwendung. In die Messküvette wurden 500 µl Probe überführt. Für 100 s wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm das Fluoreszenzsignal gemessen. Als Bezug für das Fluoreszenzsignal dienten 500 µl PBS. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bezogen auf die Zellzahl dargestellt.

### **2.2.6 Photometrische Untersuchung der SOD-Gesamtaktivität**

Die Bestimmung der SOD-Gesamtaktivität (mitochondriale Mn-SOD und zytosolische Cu/Zn-SOD) wurde photometrisch an einem Varian Cary 100 UV-Vis-Spektrometer, Darmstadt, Deutschland durchgeführt.

Nach Flohè und Ötting erfolgte die Ermittlung der Reduktionsrate des Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase-System (Flohè & Ötting 1984). Zur Generierung von Superoxidanion-Radikalen wurde die Xanthinoxidase verwendet. Das Cytochrom c im Bestimmungsansatz wurde von den Superoxidanion-Radikalen reduziert. Dies war über die Änderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm messbar. Je nachdem wie viel Superoxidanion-Radikale im Bestimmungsansatz vorlagen, veränderte sich die mit dem Spektrometer gemessene optische Dichte. Der Gehalt an Superoxidanion-Radikalen wurde von der in der Untersuchungsprobe vorhandenen SOD-Aktivität beeinflusst. Je höher die SOD-Aktivität war, desto weniger freie Superoxidanion-Radikale lagen im Untersuchungsansatz vor. Entsprechend zeigte sich eine geringere Cytochrom c-Reduktion. Auf diese Weise korrelierte der Gehalt an reduziertem Cytochrom c indirekt proportional mit der SOD-Gesamtaktivität.

Zunächst wurden die Zellen aus den Petrischalen gewonnen, gemäß dem unter 2.2.2 beschriebenen Ablauf, um daraus die Enzymproben für die SOD-Aktivitätsbestimmung herzustellen. Die den Petrischalen entnommenen Zellsuspensionen wurden in Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt und für 5 min zentrifugiert (5000 U/min). Der Überstand wurde entfernt. Die Pellets verblieben am Boden des Gefäßes. Zur Resuspension eines Pellets wurden 100 µl PBS in das Eppendorfgefäß gegeben. Vorsichtig wurde das Zellpellet

mit PBS unter Zuhilfenahme einer Pipette vermischt. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss daran zur Resuspension eines weiteren Pellets verwendet. Dieser Vorgang wurde entsprechend oft wiederholt, bis pro Versuchsreihe die Zellbestände von 4 bis 7 Petrischalen in einem Eppendorfgesäß zusammengefasst waren.

Es folgte die Ermittlung der Zellzahl der im Eppendorfgesäß konzentrierten Zellen. Dazu wurde die Neubauer-Zählkammer genutzt. Entsprechende Verdünnungen (1:100) in PBS wurden angefertigt. Die ermittelte Zellzahl entsprach der Anzahl der Zellen in 1 ml. Um die intrazellulären Enzyme freizusetzen, wurden die Zellmembranen zerstört. Dazu wurden die Zellsuspensionen in flüssigem Stickstoff (-195 °C) gefroren und anschließend in handwarmem Wasser aufgetaut (jeweils 3x).

Eine Lösung A, bestehend aus Xanthin, Cytochrom c, 1 mM NaOH und 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8), wurde hergestellt. Die Xanthinoxidase wurde im 50 mM Phosphatpuffer verdünnt (1:50).

Der Messansatz enthielt 990 µl 25 °C warmer Lösung A. Hinzugefügt wurden 10 µl eisgekühlter Xanthinoxidase, woraufhin die Reaktion begann. Nach einer dreiminütigen Reaktionszeit wurde die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit (Slope) bestimmt. Nach Zugabe von 5 µl eisgekühlter Enzymprobe und einer fünfminütigen Reaktionszeit erfolgte die 2. Slope-Bestimmung. Die Differenz beider Slopes wurde berechnet. Sie ergab sich aus der Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit, die aus dem veränderten Gehalt an reduziertem Cytochrom c resultierte. Die Berechnung der SOD-Gesamtaktivität erfolgte durch Umstellen der Berechnungsformel nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$\Delta E = \varepsilon \cdot d \cdot \Delta c$$

dabei ist:

$\Delta E$  Extinktionsänderung pro Zeiteinheit  $\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$ , entspricht einem Slope

$\varepsilon$  Extinktionskoeffizient  $\left[\frac{\text{l}}{\text{mmol}\cdot\text{cm}}\right]$ ,  $\varepsilon_{\text{cytochrom c}} = 21 \left[\frac{\text{l}}{\text{mmol}\cdot\text{cm}}\right]$

$d$  Schichtdicke [cm]

$\Delta c$  Änderung der Stoffmengenkonzentration  $\left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right]$

Die Formel wird nach  $\Delta c$  umgestellt:

$$\Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d}$$

Wird die Änderung der Stoffmengenkonzentration auf das verwendete Volumen der Enzymprobe bezogen, so erhält man die in der Enzymprobe vorhandene Enzymaktivität, die in *International Units* angegeben wird (*IU*):

$$IU = \frac{\Delta slope \cdot V}{\epsilon \cdot d}$$

dabei ist:

*IU* International Unit  $\left[ \frac{\mu mol}{min} \right]$

$\Delta slope$  Differenz der Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit  $\left[ \frac{1}{min} \right]$

*V* Volumen [*ml*]

Die Enzymaktivität wurde auf die in der Küvette befindliche Anzahl an Zellen bezogen und in Prozent zur Kontrollkultur (der mit DMSO versehenen Zellkultur nach einstündiger Kultivierung) dargestellt. Zur Validierung der Methode wurde die Empfindlichkeit anhand unterschiedlicher Probevolumina (5, 10 und 15  $\mu l$ ) getestet.

## 2.2.7 Proteinanalytik – SOD

### 2.2.7.1 Quantifizierung der Proteine nach Lowry

Bevor die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt wurde, erfolgte die Quantifizierung der Proteinmenge nach Lowry (Lowry et al. 1951). Kupfer(II)-Ionen bilden mit den Peptidbindungen einen Komplex. Werden die Kupfer(II)-Ionen anschließend zu Kupfer(I)-Ionen reduziert und versetzt man diese mit Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, entsteht eine intensive Blaufärbung (Molybdän-Blau). Die Blaufärbung wurde mithilfe der Photometrie zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge genutzt. Als Standard diente BSA.

Je Versuchsreihe wurden Zellen aus zwei Petrischalen gleicher *G. pentaphyllum*-Konzentration gepoolt, mit 100  $\mu l$  Solubilizer-Lösung (bestehend aus 20-prozentigem Glycerol, Tris, DNase, TritonX-100,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) versetzt und in ein Eppendorfgefäß

übertragen. Dieses wurde gewogen. Um die Volumina anzugleichen, sind alle Proben zum maximal gewogenen Gewicht mit PBS aufgefüllt worden. Den Proteinlösungen wurde SDS (Natriumdodecylsulfat) und Glycerin für die nachfolgende SDS-PAGE zugefügt. Die Proben wurden mittels Vortexer gemischt, bei 95 °C 5 min gekocht und anschließend 5 min zentrifugiert (12000 U/min).

Mit der Standard-Reihe (BSA 0, 1, 2, 5 mg/ml in Aqua dest.) wurde wie mit den Proteinlösungen verfahren. Ihnen wurde ebenfalls Solubilizer-Lösung, SDS und Glycerin zugesetzt. Anschließend wurden sie mit PBS so aufgefüllt, das sie das gleiche Gewicht wie die Proteinproben besaßen.

Lösung A	0,1 M NaOH, 2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,1 % SDS
Lösung B	0,5 % CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 1 % Natriumcitrat
Lösung C	Lösung A + Lösung B (50:1)

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Lösungen zur Proteinbestimmung**

Proteinproben und Standards wurden daraufhin mit Lösung C (bestehend aus Lösung A und B) – siehe Tabelle 3 - für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von verdünnter Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:2 mit Aqua dest.) und eine weitere 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Bestimmung der Proteinkonzentration pro Probe erfolgte photometrisch bei 700 nm am Varian Cary 100 UV-Vis-Spektrometer.

### **2.2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dazu wurden während der Proteinpräparation der Proteinlösung Natriumdodecylsulfat (SDS) im Überschuss zugegeben, sowie Dithiothreitol (DTT) und 1-prozentiges Serva blue. Das SDS ist ein stark negatives Detergens, welches zu einer Denaturierung der Proteine führte. Diese nahmen die negative Ladung an, so dass die Auftrennung allein nach dem Molekulargewicht der Proteine erfolgte.

Bei dem hier verwendeten SDS-PAGE-Verfahren nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die Proben zunächst im Sammelgel mit 4 % Polyacrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 49,5 %, Verhältnis 32:1) konzentriert und anschließend im 10-prozentigen Trenngel aufgetrennt (Tabelle 4).

	<b>Sammelgel (4 %)</b>	<b>Trenngel (10 %)</b>
SDS-Gelpuffer (ml)	5,0	5,0
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 49,5 % (ml)	1,2	3,0
Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid	32:1	
Glycerol (ml)		1,5
APS 10 % (µl)	100	100
TEMED (µl)	20	20
Aqua dest. (ml)	7,8	5,5

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels**

Für die SDS-PAGE wurde eine Elektrophoresekammer der Firma BioRad, München, Deutschland verwendet. Als Elektrolyt wurde ein Tris-Tricin-SDS-Puffer (Kathodenpuffer, Tabelle 5) nach Schrägger & Jagow 1987, Verdünnung 1:10 und ein Anodenpuffer (Tabelle 6) bestehend aus Tris und Aqua dest., Verdünnung 1:10 verwendet.

<b>Material</b>	<b>Einsatz</b>
1 M Tris	60,4 g
1 M Tricin	89,6 g
1 % SDS	5,0 g
Aqua dest.	500 ml

**Tabelle 5: Ansatz Kathodenpuffer**

<b>Material</b>	<b>Einsatz</b>
2 M Tris	121 g
Aqua dest.	500 ml
HCl zur Anpassung des pH auf 8,9	

**Tabelle 6: Ansatz Anodenpuffer**

Die Protein-Homogenate wurden so in die Taschen des Sammelgels pipettiert, dass sich pro Tasche 20 µg Protein befanden. Dazu wurde zuvor der Proteingehalt bestimmt und das entsprechende Volumen in die Taschen gefüllt. Als Molekularmassenmarker wurden 10 µl BioRad Standard low verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 40 V und anschließend für 2 h bei 100 V. Die aufgetrennten Proteine konnten daraufhin im Western Blot auf Nitrocellulosemembranen transferiert und nachgewiesen werden.

### **2.2.7.3 Western Blot**

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren, dass elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus Gelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert (*blotting*), um sie dann durch Bindung mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen (Towbin et al. 1979).

Das Gel wurde dazu aus der Elektrophoresekammer entnommen, 5 min in Transferpuffer (Tabelle 7) gespült und anschließend in die Blott-Kammer (Bio Rad, München, Deutschland) übertragen. Dort wurde das Gel luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht und beidseits von einem mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapier sandwichartig umgeben. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schaumstoffschichten so in die Blottingapparatur eingelegt, dass die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 90 V.

Material	Einsatz
48 mM Tris	3,03 g
0,2 M Glycin	14,4 g
20 % Methanol	200 ml
Auf 1000 ml Aqua dest., pH 8,5	

**Tabelle 7: Ansatz Transferpuffer**

#### **2.2.7.4 Detektion und Visualisierung**

Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit TBST (100 ml TBS mit 0,5 ml 0,05 % Tween 20 auf 1000 ml Aqua dest.) gewaschen. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an der Nitrocellulosemembran zu verhindern, wurde diese über Nacht mit *blocking*-Lösung (TBST 0,05 %, Milchpulver 3 %) inkubiert und anschließend zweimal für 5 min mit TBST gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 1 h mit 5 ml primärem Antikörper, zum einen gegen Beta-Aktin, zum anderen gegen Mn-SOD (Tabelle 8), bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit TBST für 15 min gewaschen.

Protein	Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Beta-Aktin	Monoclonal mouse anti beta-actin	1:2500	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Mn-SOD	Polyclonal rabbit anti-Mn SOD	1:8000	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 8: Im Western Blot verwendete Primärantikörper**

Die Markierung der Primärantikörper erfolgte durch entsprechende Sekundärantikörper (entsprechend *anti-mouse*-Antikörper, Verdünnung 1:2000; *anti-rabbit*-Antikörper, Verdünnung 1:3000, beides Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde 20X LumiGLO® Reagent (Cell Signaling Technology/New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 20X Peroxide (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) eingesetzt.

Durch die Peroxidaseaktivität der sekundären Antikörper wurde eine Chemilumineszenz induziert, die in der Fotokamera (Amersham/GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland) Fotopapier (FujiFilm, FP-3000B, Japan) belichtete. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mithilfe des *Bio Tec Analyze Transluminators* der Firma Biometra und der dazugehörigen Software *Bio Doc Analyze*.

## 2.3 Statistik

Die statistische Analyse der Signifikanz erfolgte mit dem gepaarten Student's t-Test. Das Signifikanzniveau wurde zu 0,05 festgelegt. Demnach galten die Ergebnisse als signifikant bei  $p$ -Werten kleiner 0,05. Im nachfolgenden Ergebnisteil sind in den Abbildungen die Werte mit einem Plus gekennzeichnet, bei denen eine konzentrationsabhängige Signifikanz in Bezug auf die dazugehörige Kontrolle (0  $\mu\text{g/ml}$  versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) vorlag (+ =  $p < 0,05$ ). Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Werte weisen eine zeitabhängige Signifikanz in Bezug auf die dazugehörige Kontrolle (Zellkultur nach 1 h Kultivierung innerhalb einer Konzentration) auf. Die Linie unterhalb des Sternchens gibt den jeweiligen Bezug an (  \* =  $p < 0,05$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vitalitätsbestimmungen

#### 3.1.1 Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Zellzahl

Eine Aussage über das Vermehrungsverhalten der C6-Gliomazellen ließ sich mithilfe der Neubauer-Zählkammer erhalten. Über einen Zeitraum von 48 h wurden die Zellen zu drei Zeitpunkten (1, 24 und 48 h) in Doppelbestimmung gezählt.

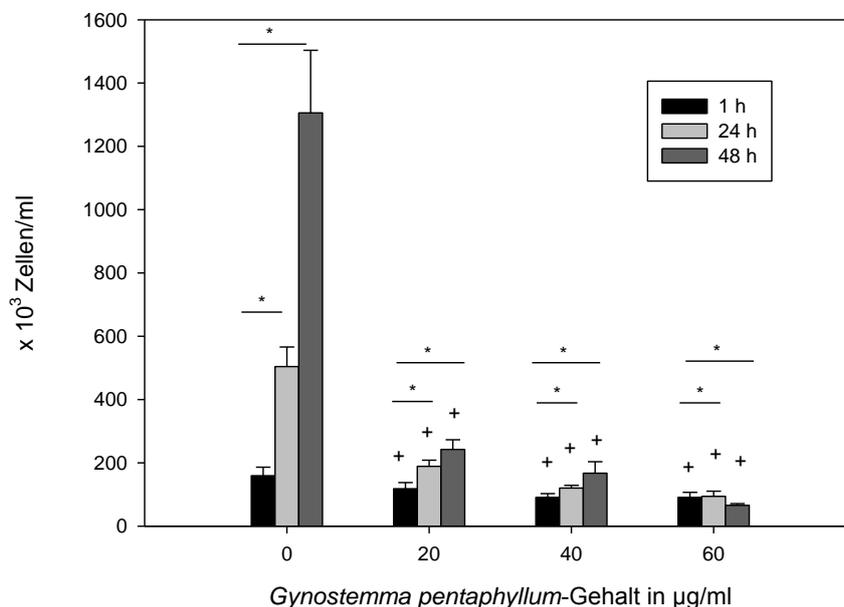
Nach einstündiger Kultivierung der Tumorzellen mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* (Endkonzentration 20, 40, 60 µg/ml) bzw. mit DMSO erfolgte die erste Zellzahlbestimmung. Dieser ließ sich kein Unterschied der Zellmenge trotz Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Extraktkonzentrationen entnehmen. Die durchschnittliche Zellzahl betrug in allen Kulturen  $115 \cdot 10^3$  Zellen/ml ( $SEM \pm 16 \cdot 10^3$ ).

Eine Veränderung der Zellproliferation aufgrund der *G. pentaphyllum*-Applikation wurde nach einer 24-stündigen Kultivierungszeit sichtbar. Es lag ein Wachstumsnachteil bei den mit dem Pflanzenextrakt versehenen Tumorzellen vor. Dabei war die Höhe der zugesetzten Extraktkonzentration zunächst von geringerer Bedeutung, denn auch die Kultivierung mit einer kleineren Wirkstoffmenge führte zu einer Verlangsamung der Zellvermehrung. So ließen sich in der mit 20 µg/ml Extrakt versehenen Zellkultur 37 % der Zellmenge zählen, die sich im gleichen betrachteten Zeitraum in der DMSO-Kultur befand. Die mit 60 µg/ml Pflanzenextrakt versehenen Tumorzellen wiesen sogar nur einen 19-prozentigen Anteil des Zellgehaltes der DMSO-Kultur auf.

Nach 48-stündiger Kultivierung der Tumorzellen fand sich in den mit 60 µg/ml Wirkstoff versehenen Kulturen sogar ein Rückgang an Zellen um ca. ein Drittel. Während nach 24-stündiger Kultivierung noch  $94 \cdot 10^3$  Zellen/ml ( $SEM \pm 16 \cdot 10^3$ ) gezählt wurden, lagen nach 48 h noch  $66 \cdot 10^3$  Zellen/ml ( $SEM \pm 5,2 \cdot 10^3$ ) vor. Die Tumorzellen, denen 20 µg/ml und 40 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt zugesetzt wurden, zeigten eine im Vergleich zur DMSO-Kultur abgeschwächte Vermehrungstendenz. Ein Zellzuwachs von ca. 30 % war zwischen 24-stündiger und 48-stündiger Betrachtungszeit der Zellzählung zu entnehmen. Nach 24-stündiger Kultivierung der Tumorzellen mit 20 µg/ml Extrakt fanden sich  $190 \cdot 10^3$  Zellen/ml ( $SEM \pm 19 \cdot 10^3$ ) vor, während es nach 48 h  $250 \cdot 10^3$  Zellen/ml ( $SEM \pm 30 \cdot 10^3$ ) waren. In den

mit 40 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Zellkulturen stieg die Zellzahl von  $120 \cdot 10^3$  Zellen/ml (SEM  $\pm 8 \cdot 10^3$ ) auf  $170 \cdot 10^3$  Zellen/ml (SEM  $\pm 35 \cdot 10^3$ ).

Die Zellkulturen, die frei von *G. pentaphyllum* waren, wuchsen dagegen heran. Die Zellzählung zeigte eine Zunahme der Zellzahl in der DMSO-Kultur um das Achtfache zum Ausgangswert. So wurden zu Beginn der Untersuchung  $160 \cdot 10^3$  Zellen/ml (SEM  $\pm 27 \cdot 10^3$ ) gezählt, während es nach 24 h  $500 \cdot 10^3$  Zellen/ml (SEM  $\pm 60 \cdot 10^3$ ) und nach 48 h  $1300 \cdot 10^3$  Zellen/ml (SEM  $\pm 200 \cdot 10^3$ ) waren. Nach 48-stündiger Kultivierung befanden sich somit in den mit *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Kulturschalen im Mittel nur 10 % der Zellmenge im Vergleich zur Zellmenge in den Kontrollkulturen.



**Abbildung 5: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Proliferation von C6-Gliomazellen**

Nach 1-, 24- und 48-stündiger Kultivierung, der mit verschiedenen Konzentrationen des ethanolischen *G. pentaphyllum*-Extraktes (0, 20, 40, 60 µg/ml) versetzten C6-Gliomazellen, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Dazu wurden Verdünnungen der Zellproben angefertigt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Zählung erfolgte bei 10-facher Vergrößerung am Inversionsmikroskop von Olympus, Hamburg, Deutschland,

+ - Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (0 µg/ml versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) war signifikant bei  $p < 0,05$

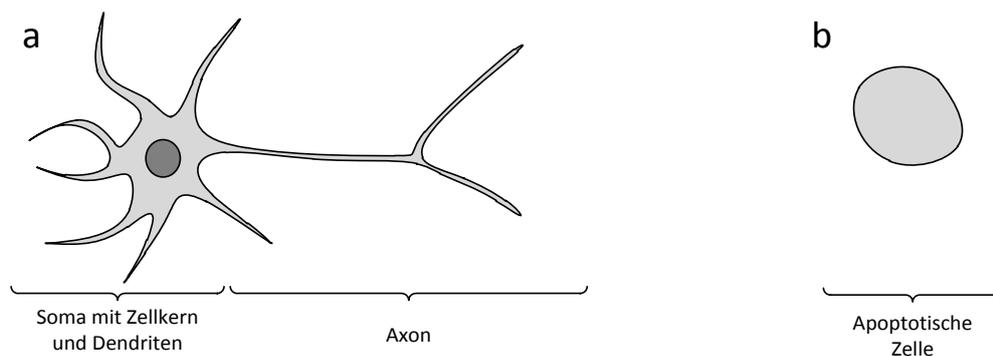
\* - Dargestellt ist die zeitabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Zellkultur nach 1 h Kultivierung innerhalb einer Konzentration) war signifikant bei  $p < 0,05$

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung einschließlich der SEM dargestellt. Sie entstanden durch Bildung des Mittelwertes der fünfmalig in Doppelbestimmung durchgeführten Versuche.

### 3.1.2 Phasenkontrastmikroskopie

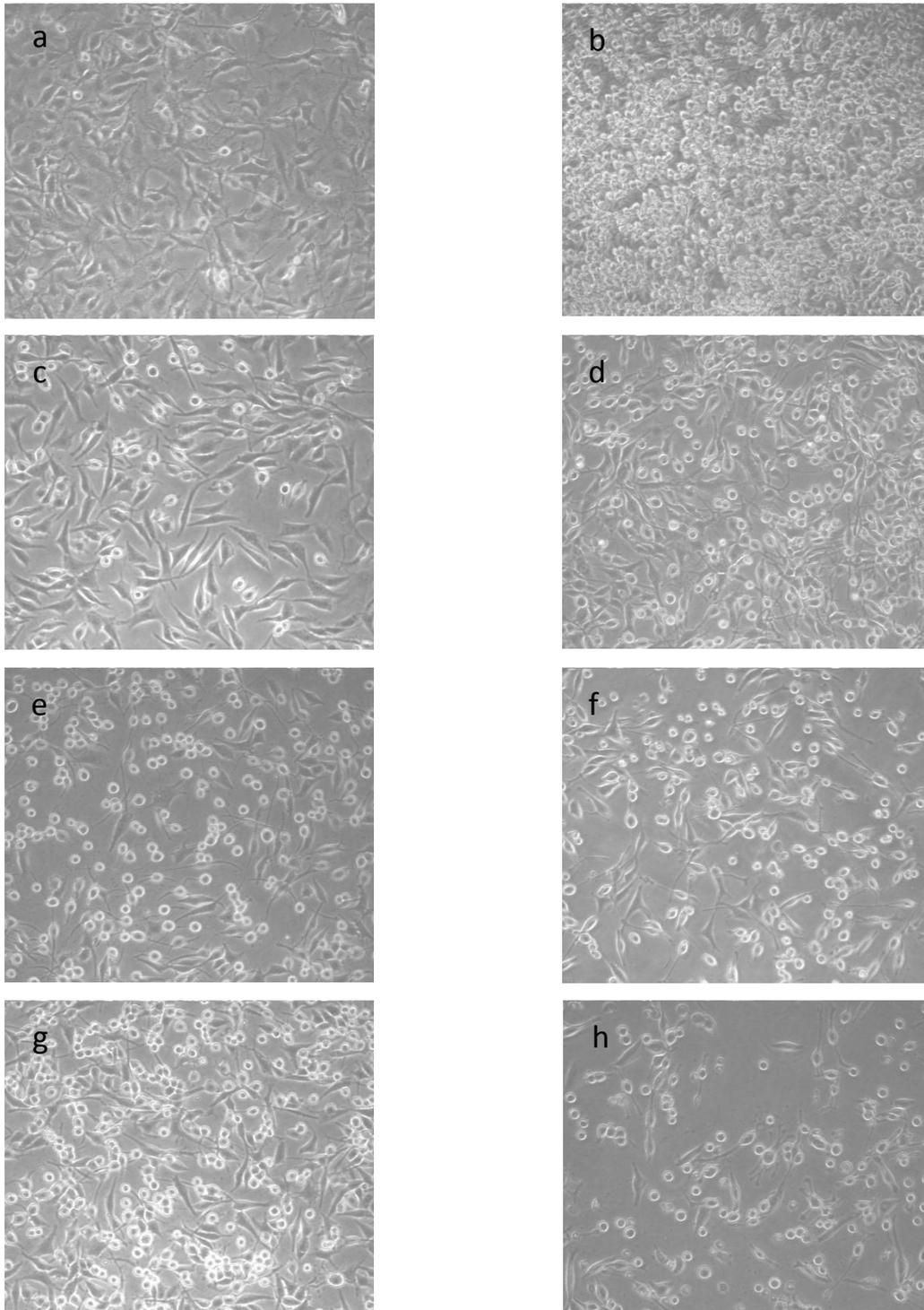
Die Abbildungen 7a-h zeigen repräsentative Ausschnitte der mit verschiedenen Konzentrationen des ethanolischen Extraktes von *G. pentaphyllum* versehenen Zellkulturen. Die Aufnahmen entstanden nach einstündiger und 48-stündiger Kultivierung der Zellen mit dem Inversionsmikroskop, Olympus, Hamburg, Deutschland im Phasenkontrastmodus.

Auf den Bildern lassen sich lebende und tote C6-Gliomazellen erkennen. Die lebenden Tumorzellen zeichnen sich durch ein Soma (Zellkörper) aus. Vom Soma gehen sternförmig die Dendriten und das Axon (Nervenfortsatz) ab, wie schematisch in Abbildung 6a dargestellt ist. Bei den auf den Bildern rund erscheinenden Zellen, die weder Dendriten noch ein Soma aufweisen, handelt es sich um tote Zellen, die sich vom Boden der Kulturschale gelöst haben (Abbildung 6b).



**Abbildung 6: a: Darstellung einer lebenden C6-Gliomazelle, b: Darstellung einer apoptotischen C6-Gliomazelle**

Auf den Abbildungen 7c, e, g sind die Zellkulturen nach einstündiger Kultivierung mit dem *G. pentaphyllum*-Extrakt dargestellt. Auf ihnen lässt sich eine Zunahme toter Zellen erkennen, die unabhängig von der zugegebenen Extraktkonzentration ist. In den mit DMSO versehenen Kontrollkulturen sind hingegen nur vereinzelt tote Zellen zu finden (Abbildung 7a).



**Abbildung 7: Fotografie der mit *G. pentaphyllum* versetzten C6-Gliomazellen und der Kontrollzellen**

Dargestellt sind die Zellkulturen, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen des ethanolicen Extraktes von *G. pentaphyllum* nach einstündiger und nach 48-stündiger Kultivierung: **a:** 0 µg/ml nach 1 h, **b:** 0 µg/ml nach 48 h, **c:** 20 µg/ml nach 1 h, **d:** 20 µg/ml nach 48 h, **e:** 40 µg/ml nach 1 h, **f:** 40 µg/ml nach 48 h, **g:** 60 µg/ml nach 1 h, **h:** 60 µg/ml nach 48 h. Die Aufnahmen entstanden mit dem Inversionsmikroskop, Olympus, Hamburg, Deutschland im Phasenkontrastmodus bei einer 10-fachen Vergrößerung.

Bei Betrachtung der Bilder, die nach 48-stündiger Kultivierung angefertigt wurden, fällt auf, dass sich die mit DMSO versehenen Tumorzellen stark vermehrt haben. Sie weisen einen Zellrasen auf, durch den sich die einzelnen Zellen kaum voneinander abgrenzen lassen (Abbildung 7b). Dagegen lässt sich bei den mit 20 µg/ml *G. pentaphyllum* Extrakt versetzten C6-Gliomazellen nach 48-stündiger Kultivierung eine nur mäßige Zelldichtenzunahme erkennen. Ein großer Teil der Zellen erscheint abgerundet und vom Boden gelöst (Abbildung 7d).

Bei der vergleichenden Betrachtung des Zellvorkommens zwischen einstündiger und 48-stündiger Kultivierung der mit 40 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt versehenen Tumorzellen zeigt sich ein nur geringer Unterschied zueinander (Abbildungen 7e, f). Eine Zunahme der Zellen, wie die zuvor beschriebenen, lässt sich nicht erkennen.

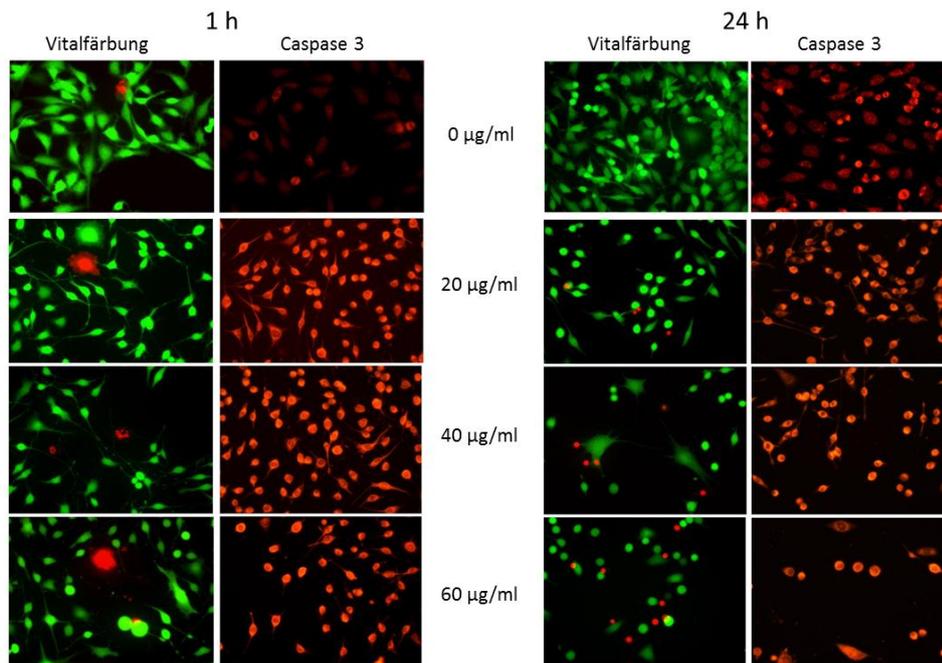
Die Zellen mit nochmals gesteigerter Extraktkonzentration (60 µg/ml) zeigen nach 48-stündiger Kultivierung eine deutliche Abnahme der Zelldichte im Vergleich zur entsprechenden Voraufnahme (Abbildungen 7g, h). Lebende Zellen liegen nur noch einzeln vor und sind umgeben von abgerundeten toten Zellen.

Werden die Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen versehen wurden, nach 48-stündiger Kultivierung zueinander betrachtet, lässt sich die unter 3.1.1 beschriebene konzentrationsabhängige Abnahme der Zellmenge auch fotografisch festhalten. Auf den Abbildungen 7b, d, e und h lässt sich diese konzentrationsabhängige Abnahme der Zellen erkennen.

### **3.1.3 Quantitative Vitalitätsbestimmung**

Der Fluoreszein-Diacetat-Assay (FDA-Assay) und die Immunhistochemie wurden genutzt, um den zuvor geschilderten Effekt der Wachstumsbeeinflussung durch den ethanolschen Extrakt von *G. pentaphyllum* zu sichern und weiter zu untersuchen.

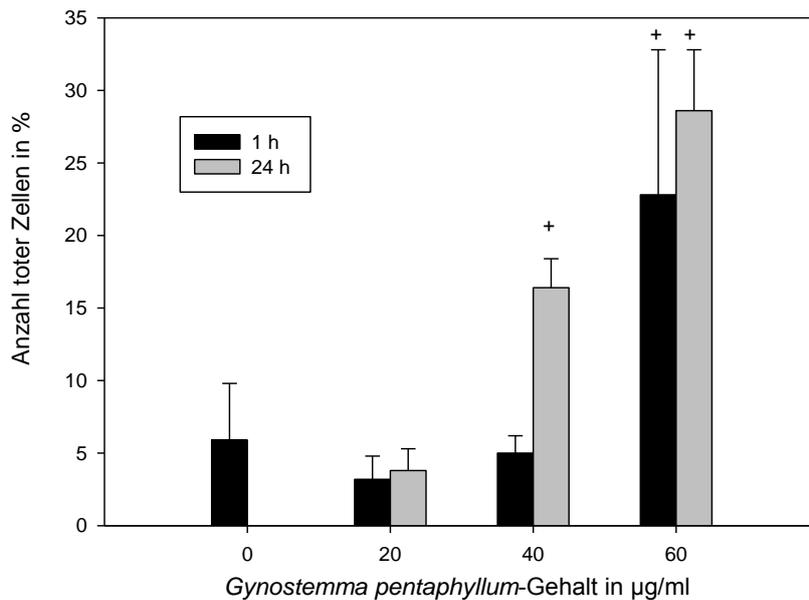
Das objektive Verfahren des FDA-Assay wurde gewählt, um die lebenden und die toten Zellen voneinander abzugrenzen. Durch die unterschiedliche Vitalität der Zellen waren diese in der Lage verschiedene Farbstoffe aufzunehmen, die im Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager, Zeiss, Jena, Deutschland, grün (lebende Zellen) bzw. rot (tote Zellen) erschienen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Vitalität und Caspase 3-Aktivität der C6-Gliomazellen**

Am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die mit Fluoreszeindiacetat und Propidiumiodid (FDA-Assay) markierten C6-Gliomazellen nach einstündiger und nach 24-stündiger Kultivierung analysiert. Die lebenden Tumorzellen erschienen grün, die toten Tumorzellen rot. Die in der Immunhistochemie markierten roten Tumorzellen kennzeichnen die Caspase 3-Aktivität (rot).

Zur quantitativen Bestimmung wurden die Zellen nach einstündiger und nach 24-stündiger Kultivierung im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Anschließend wurden die lebenden und die toten Zellen getrennt voneinander gezählt. Nach dreimaliger Wiederholung des FDA-Assay mit entsprechender Zellzählung wurde daraus der prozentuale Anteil der toten Zellen an dem gesamten Zellvorkommen innerhalb einer Kultur ermittelt (Abbildung 9). Zusätzlich zum FDA-Assay erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung, die das Vorliegen der Caspase 3-Aktivität testete.



**Abbildung 9: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Vitalität der C6-Gliomazellen**

Dargestellt ist die quantitative Analyse der in dreimaliger Wiederholung angefertigten Vitalfärbungen (FDA-Assay). Nach einstündiger und 48-stündiger Kultivierung der C6-Gliomazellen mit einem ethanolschen Extrakt von *G. pentaphyllum* erfolgte die Auszählung der toten und lebenden Zellen. Dadurch konnte auf den prozentualen Anteil der toten Zellen an dem gesamten Zellvorkommen innerhalb der Zellkultur geschlossen werden. Die Ergebnisse entstanden durch Bildung der Mittelwerte. Dargestellt sind auch die SEM.

+ - Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (0 µg/ml versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) war signifikant bei  $p < 0,05$

### 3.1.3.1 Fluoreszein-Diacetat-Assay (FDA-Assay)

Beide Abbildungen (Abbildung 8, Abbildung 9) spiegeln die unter 3.1.1 erhobenen Ergebnisse wider. Nach einstündiger Kultivierung ist zwischen den mit *G. pentaphyllum* kultivierten Tumorzellen und den mit DMSO versetzten Zellen ein nur geringer Unterschied zu erkennen. Eine leichte konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl ließ sich jedoch auf den Bildern der mit 20 µg/ml und 40 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt kultivierten Tumorzellen erkennen. Der Anteil an toten Zellen betrug bei allen Zellkulturen im Mittel 5 %, abgesehen von den Zellen, die mit maximaler Extraktkonzentration versehen wurden. Dort zeigte sich nach einstündiger Kultivierung ein prozentualer Anteil an toten Zellen von 20 %.

Nach 24-stündiger Kultivierung der Tumorzellen wurde der FDA-Assay wiederholt. Nun konnte eine deutliche Reduktion der mit *G. pentaphyllum*-Extrakt versehenen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gezeigt werden. Der prozentuale Anteil toter Zellen stieg mit

steigender *G. pentaphyllum*-Konzentration. So betrug dieser bei den mit 40 µg/ml Extrakt versetzten Zellen 16 % (SEM von  $\pm 2$  %) und bei den mit 60 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt kultivierten Zellen 30 % (SEM von  $\pm 4$  %).

### **3.1.3.2 Immunhistochemische Untersuchung der Caspase 3-Aktivität**

In der Immunhistochemie (siehe Abbildung 8) ließ sich schon nach einstündiger Kultivierung erkennen, dass die mit *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Tumorzellen von dem für die Caspase 3-Aktivität spezifischen Antikörper markiert wurden. Das blieb bei den Kontrollkulturen aus.

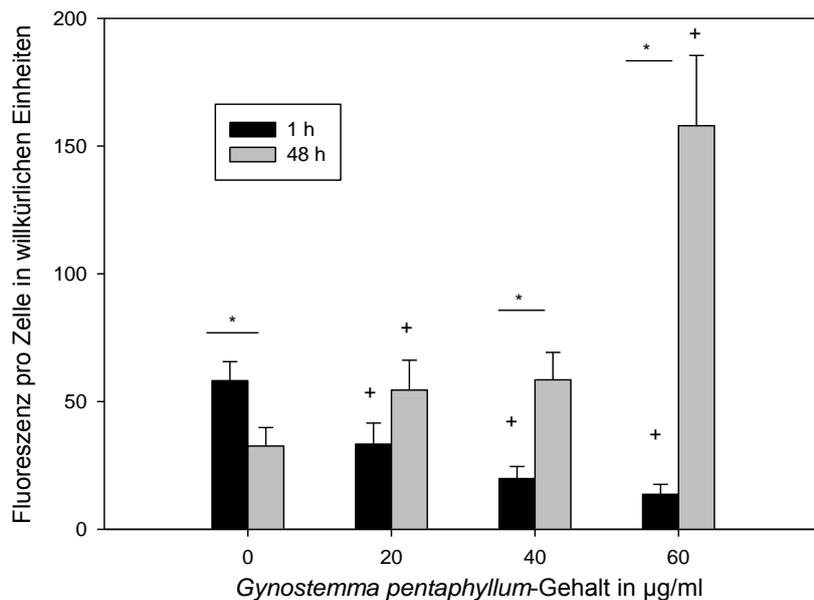
Nach weiteren 24 h Wachstumszeit war wiederum eine Verringerung der Zellmenge insbesondere in den mit 40 µg/ml und 60 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Tumorzellen zu erkennen. Die noch verbliebenen Zellen wurden zudem von dem Antikörper gegen die Caspase 3-Aktivität markiert.

## **3.2 Prozesse in der Zelle**

### **3.2.1 Einfluss von *G. pentaphyllum* auf den zellulären Wasserstoffperoxidgehalt**

Fluorimetrische Messungen wurden durchgeführt, um den zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt nach einstündiger und nach 48-stündiger Kultivierung der C6-Gliomazellen mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* zu ermitteln. Die in Abbildung 10 dargestellten Fluoreszenzintensitäten ergaben sich aus Bildung der Mittelwerte der fünfmalig in Doppelbestimmung durchgeführten Messungen. Sie wurden auf die Zellzahl bezogen.

Nach einstündiger Kultivierung der Tumorzellen mit dem Wirkstoff ließ sich eine zunächst konzentrationsabhängige Verringerung des zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehaltes in den C6-Gliomazellen erkennen. In den mit 20 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Tumorzellen wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Fluoreszenz von 33 willkürlichen Einheiten (SEM  $\pm 8$ ) ermittelt, in den mit 40 µg/ml Wirkstoff versehenen Tumorzellen 20 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm 5$ ) und in den mit 60 µg/ml Extrakt versehenen Tumorzellen von nur 14 willkürlichen Einheiten (SEM  $\pm 4$ ). Die mit DMSO versehenen Kontrollkulturen wiesen dagegen nach einstündiger Kultivierung einen zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt auf, der durch eine Fluoreszenz von 58 willkürlichen Einheiten (SEM  $\pm 7$ ) repräsentiert wurde.



**Abbildung 10: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf den zellulären Wasserstoffperoxid-Gehalt**

Nach einstündiger und nach 48-stündiger Kultivierung der C6-Gliomazellen mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* erfolgten fluorimetrische Messungen am Luminescence Spectrofluorimeter LS 50B von Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland. Unter Verwendung von Dichlorhydrofluoreszein (DCF) wurde auf die Menge von zellulärem  $H_2O_2$  getestet. Dabei ist die DCF-Intensitätszunahme als Maß für den zellulären  $H_2O_2$ -Gehalt anzunehmen. Die dargestellten Ergebnisse entstanden durch Bildung des Mittelwertes der fünfmalig in Doppelbestimmung durchgeführten Messungen. Sie wurden auf die Zellzahl bezogen. Dargestellt ist auch der SEM.

+ - Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (0 µg/ml versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) war signifikant bei  $p < 0,05$

\* - Dargestellt ist die zeitabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Zellkultur nach 1 h Kultivierung innerhalb einer Konzentration) war signifikant bei  $p < 0,05$

Die Analyse des zellulären  $H_2O_2$ -Gehaltes nach 48-stündiger Kultivierung der Tumorzellen mit dem Extrakt ließ dagegen auf eine signifikante konzentrationsabhängige Zunahme des  $H_2O_2$  schließen. Besonders deutlich erschien diese in den mit 60 µg/ml Extrakt versetzten Tumorzellen. In diesen stieg der  $H_2O_2$ -Gehalt um mehr als das 10-fache. Eine Steigerung der Fluoreszenz von 14 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  4) auf 158 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  25) wurde ermittelt. Geringer fiel die Zunahme der  $H_2O_2$ -abhängigen Fluoreszenzintensitäten in den Tumorzellen aus, denen Wirkstoffkonzentrationen von 20 µg/ml und 40 µg/ml zugesetzt wurden. Die mit 20 µg/ml Extrakt versetzten C6-Gliomazellen zeigten eine Erhöhung um das 1,5-fache, von 33 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  8) auf 55 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  12). Die mit 40 µg/ml Extrakt versetzten Tumorzellen zeigten eine Erhöhung um das 3-fache, von 20 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  5) auf 59 willkürliche Einheiten (SEM  $\pm$  11).

Die mit DMSO versehenen Kontrollkulturen wiesen dagegen nach 48-stündiger Kultivierung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um ca. 50 % auf. Während der zelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt nach einstündiger Kultivierung noch eine Fluoreszenz von 58 willkürliche Einheiten ( $\text{SEM} \pm 7$ ) aufwies, fiel diese nach 48 h auf 33 willkürliche Einheiten ( $\text{SEM} \pm 8$ ).

### **3.2.2 Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Superoxiddismutase**

$\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht aus der katalytischen Umwandlung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  durch die SOD. Da eine durch *G. pentaphyllum* beeinflusste Erhöhung des zellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehaltes in den C6-Gliomazellen gezeigt wurde, schlossen sich Untersuchungen zur SOD an. Zum einen erfolgten fotometrische Bestimmungen zur SOD-Gesamtaktivität, zum anderen proteinbiochemische Untersuchungen zum Mn-SOD-Gehalt der Tumorzellen.

#### **3.2.2.1 Aktivitätsbestimmung mittels UV/VIS-Photometrie**

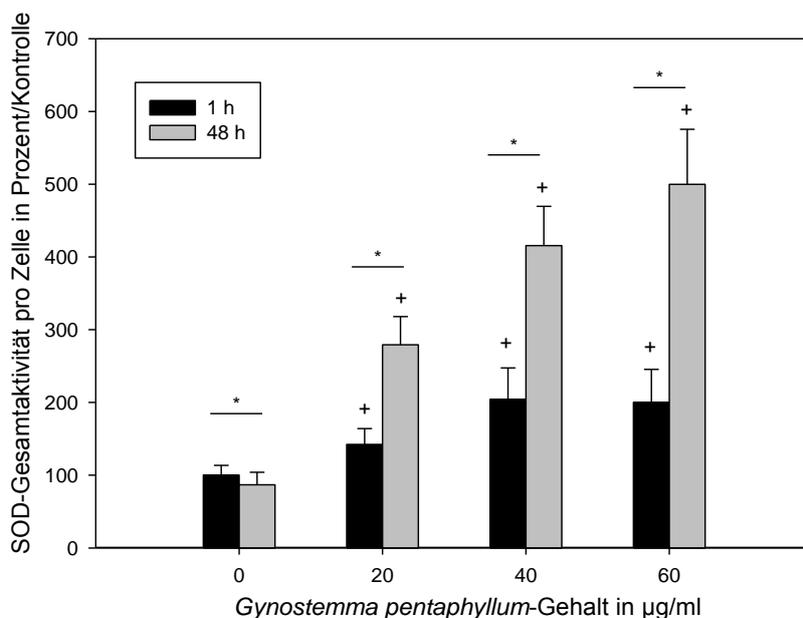
Zur Bestimmung der SOD-Gesamtaktivität wurde das Varian Cary 100 UV/VIS- Spektrometer, Darmstadt, Deutschland genutzt. In fünfmalig in Doppelbestimmung durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass Tumorzellen, die mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* kultiviert wurden, eine höhere SOD-Gesamtaktivität aufwiesen, als die mit DMSO versetzten Kontrollkulturen (Abbildung 11).

Der Effekt der Aktivitätssteigerung war schon nach einstündiger Kultivierung sichtbar. Als Referenz, entsprechend 100 %, wurde die SOD-Gesamtaktivität in den Kontrollkulturen (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nach einstündiger Kultivierung angenommen. Die 100 % entsprechen einem Absolutwert von  $1,2 \cdot 10^{-7}$  Units/Zelle ( $\text{SEM} \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  Units/Zelle). An ihm gemessen zeigte sich eine Aktivitätszunahme auf 142 % ( $\pm 22$  %) bei den mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  versetzten Zellen. Die mit 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *G. pentaphyllum*-Extrakt versetzten Tumorzellen wiesen eine doppelt so hohe SOD-Gesamtaktivität auf wie die Kontrollzellen im gleichen Zeitraum.

Die Untersuchung der SOD-Gesamtaktivität nach 48-stündiger Kultivierung ließ eine weitere Aktivitätszunahme erkennen. Während sie in den mit DMSO versetzten Zellen innerhalb der 48 h auf 87 % ( $\pm 17$  %) des Ausgangswertes abnahm, stieg die SOD-Aktivität in den mit *G. pentaphyllum*-Extrakt versehenen Tumorzellen konzentrationsabhängig. So verdoppelte sie sich innerhalb der betrachteten 48 h in den mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *G. pentaphyllum* Extrakt versetzten Zellen. In den mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Extrakt versetzten C6-Gliomazellen fand sich

nach einstündiger Kultivierung eine SOD-Gesamtaktivität pro Zelle gemessen an der Kontrollkultur von 142 % ( $\pm$  22 %), die nach 48 h auf 279 % ( $\pm$  39 %) anstieg. In den mit 40  $\mu$ g/ml Extrakt versetzten C6-Gliomazellen betrug die SOD-Gesamtaktivität pro Zelle gemessen an der Kontrollkultur zunächst 204 % ( $\pm$  43 %) und stieg nach 48 h auf 416 % ( $\pm$  54 %). Am deutlichsten war die SOD-Gesamtaktivitätszunahme bei den mit höchster Extraktkonzentration versehenen Tumorzellen (60  $\mu$ g/ml). Dort stieg sie von zunächst 200 % ( $\pm$  45 %) auf 500 % ( $\pm$  76 %).

Nach 48-stündiger Kultivierung ließ sich gegenüber den Kontrollzellen eine Verdreifachung der SOD-Gesamtaktivität zu den mit 20  $\mu$ g/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt kultivierten Tumorzellen erkennen, zu den mit 40  $\mu$ g/ml eine Vervierfachung und zu den mit 60  $\mu$ g/ml Wirkstoff versetzten Tumorzellen eine Verfünffachung der SOD-Gesamtaktivität.



**Abbildung 11: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Superoxiddismutase-Gesamtaktivität**

Nach einstündiger und 48-stündiger Kultivierung der C6-Gliomazellen mit einem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* erfolgten die Messungen zur SOD-Gesamtaktivität pro Zelle am UV/VIS Spektrometer, Varian, Darmstadt, Deutschland. Die erhaltenen Ergebnisse wurden zur Berechnung der SOD-Gesamtaktivität nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz genutzt. Die SOD-Gesamtaktivität wurde auf die Kontrollkultur (0  $\mu$ g/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt nach einstündiger Kultivierung) bezogen. Dargestellt ist auch der  $\pm$  SEM.

+ - Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (0  $\mu$ g/ml versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) war signifikant bei  $p < 0,05$

\* - Dargestellt ist die zeitabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Zellkultur nach 1 h Kultivierung innerhalb einer Konzentration) war signifikant bei  $p < 0,05$

### 3.2.2.2 Western Blot zur Bestimmung des Mn-SOD-Gehaltes

Zur Verifizierung der spektrometrisch erhobenen Ergebnisse wurden parallel zu den SOD-Aktivitätsmessungen für jede Zellkultur nach einstündiger und nach 48-stündiger Kultivierung zwei Western Blots angefertigt. Der eine (Abbildung 12a) diente der Kontrolle gleicher Proteinauftragung anhand des „house keeping proteins“ Beta-Aktin. Der andere Western Blot untersuchte den zellulären Mn-SOD-Gehalt (Abbildung 12b).

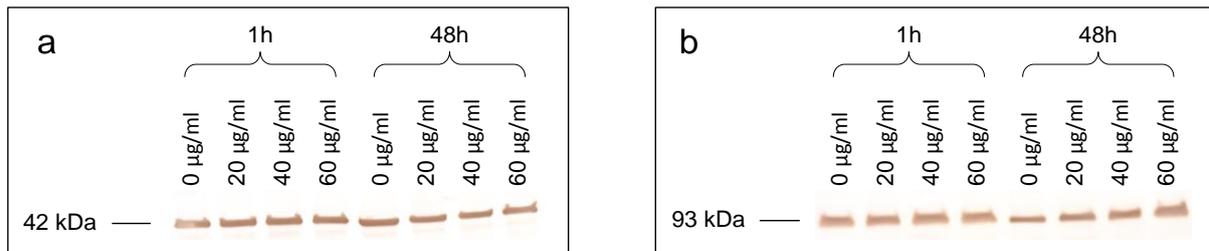
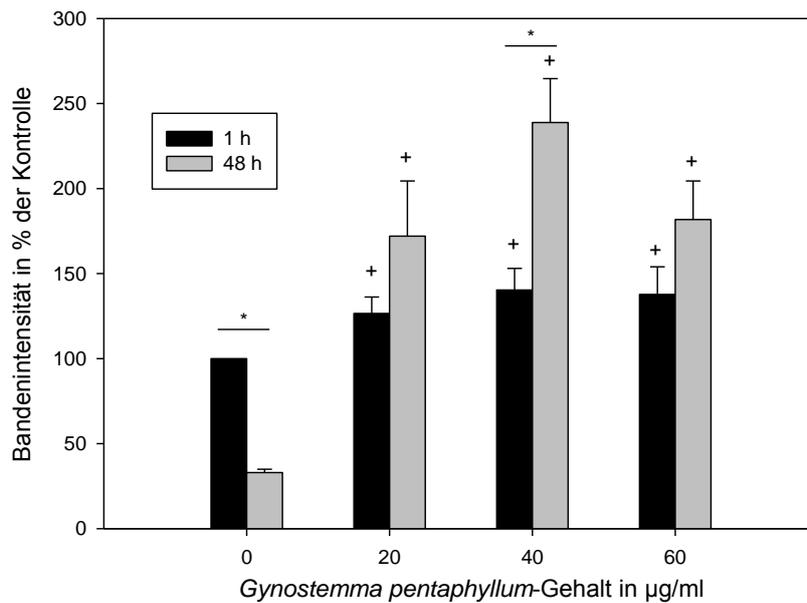


Abbildung 12: Western Blot a Beta-Aktin, b Mn-SOD

Nach einstündiger und 48-stündiger Kultivierung der mit und ohne *G. pentaphyllum*-Extrakt versehenen C6-Gliomazellen wurden Proteinproben angefertigt und diese einer Gelelektrophorese unterzogen. Nach dem *blotting* auf die Nitrocellulosemembran erfolgte die Markierung durch zwei unterschiedliche Primärantikörper: Zur quantitativen Darstellung des gesamten aufgetragenen Proteins diente der Beta-Aktin-AK. Die mitochondriale SOD wurde durch den Mn-SOD-AK sichtbar gemacht.

In Abbildung 13 ist die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten der Western Blots dargestellt. Aus ihr kann ebenfalls entnommen werden, dass zwischen der Applikation des *G. pentaphyllum*-Extraktes und der Erhöhung der Mn-SOD-Menge in den C6-Gliomazellen ein Zusammenhang bestand. Als 100 % und gleichzeitig als Ausgangswert wurde die Bandenintensität angenommen, die der Mn-SOD-Menge in den DMSO-Zellen nach einstündiger Kultivierung zuzuordnen war. Alle weiteren Werte bezogen sich darauf.

Nach einstündiger Kultivierung der mit dem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* versetzten C6-Gliomazellen ergab sich ungeachtet der zugegebenen Wirkstoffkonzentration eine durchschnittliche Erhöhung der Mn-SOD-Menge um 35 % (SEM  $\pm$  4 %).



**Abbildung 13: Einfluss von *G. pentaphyllum* auf den Mn-SOD-Gehalt der C6-Gliomazellen**

Der Mn-SOD-Gehalt ermittelte sich aus der quantitativen Analyse der fünfmalig in Doppelbestimmung hergestellten Western Blots. Als 100 % wurden die Werte der Kontrollkultur (0 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt nach einstündiger Kultivierung) angenommen. Dargestellt ist auch der  $\pm$  SEM.

+ - Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (0 µg/ml versetzte Zellkulturen nach entsprechender Inkubationszeit) war signifikant bei  $p < 0,05$

\* - Dargestellt ist die zeitabhängige Signifikanz, Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (Zellkultur nach 1 h Kultivierung innerhalb einer Konzentration) war signifikant bei  $p < 0,05$

Die fortdauernde Inkubation der Tumorzellen mit dem Extrakt führte zu einer weiteren signifikanten Erhöhung des Mn-SOD-Gehaltes. Während in den mit DMSO versehenen Tumorzellen der Mn-SOD-Gehalt um zwei Drittel zurückging, ließ sich, wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, eine deutliche Zunahme der Mn-SOD-Menge in allen mit *G. pentaphyllum*-Extrakt versehenen Tumorzellen zeigen. Besonders auffällig war dabei die Mengenzunahme bei der Wirkstoffkonzentration von 40 µg/ml. Diese betrug nach 48-stündiger Kultivierung gemessen am Anfangswert (C6-Gliomazellen nach einstündiger Kultivierung mit 40 µg/ml *G. pentaphyllum*-Extrakt) 70 %. Verglichen mit dem Ausgangswert (C6-Gliomazellen nach einstündiger Kultivierung mit DMSO) bedeutete dies eine Erhöhung der Mn-SOD-Menge um ca. 140 %. Die mit 20 µg/ml und 60 µg/ml Extrakt kultivierten Zellen wiesen nach 48-stündiger Kultivierung eine Zunahme ihrer Mn-SOD-Menge um ca. 35 % auf, von zu Beginn durchschnittlich 132 % (SEM  $\pm$  13 %) auf durchschnittlich 177 % (SEM  $\pm$  28 %).

## 4 Diskussion

Hochmaligne Grad IV-Gliome des menschlichen Gehirns besitzen ein ausgesprochen aggressives Wachstumsverhalten. Mit einer Überlebenserwartung von rund 14 Monaten ab Diagnosestellung hat die Erkrankung an einem Grad IV-Gliom eine dramatische Prognose zur Folge (Ohka et al. 2012). Derzeit stehen keine Therapien zur Verfügung, die fortdauernde Erfolge versprechen (Hayat 2011). Daher sind Untersuchungen zur Tumorgenese, zu entsprechenden Stoffwechselprozessen und zu zellulären Merkmalen notwendig, um daraus neue Therapieoptionen ableiten zu können.

Diese Arbeit widmet sich diesem Thema. An einer C6-Glioma-Zelllinie der Ratte, die histopathologisch den Astrozytomen zu zuordnen ist (Barth 1998), wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Grundlage für eine mögliche Therapieoption darstellen. Die Zellen wurden mit dem ethanolischen Extrakt einer asiatischen Pflanze, *Gynostemma pentaphyllum*, behandelt. Über einen Zeitraum von 48 Stunden bzw. 72 Stunden wurde die Reaktion der Tumorzellen auf den Extrakt beobachtet. Experimente zur Zellvitalität und zu den zellulären Stoffwechselprozessen wurden durchgeführt.

### 4.1 Zellvitalität

Die Vitalität der C6-Gliomazellen wurde auf verschiedene Weisen untersucht. Die qualitativen wie auch die quantitativen Analysen zeigten dabei einen bisher unbekanntem hemmenden Einfluss des *G. pentaphyllum*-Extraktes auf das Wachstum der C6-Gliomazellen. Dieser war zeit- und konzentrationsabhängig.

#### 4.1.1 Qualitative Bestimmung – Zellzählung

Zu Beginn der experimentellen Arbeit erfolgte die manuelle Bestimmung der Zellzahl der mit *G. pentaphyllum* behandelten Tumorzellen und der Kontrollzellen. Auf diese Weise konnte ein erster Eindruck von dem bis dato nicht untersuchten veränderten Wachstumsverhalten der C6-Gliomazellen gewonnen werden. Dabei zeigte sich wiederholt, dass *G. pentaphyllum* konzentrations- und zeitabhängig die Vermehrung der Tumorzellen verlangsamte, während sich der Gehalt an Tumorzellen in der Kontrollkultur (C6-Gliomazellen mit DMSO-Zusatz)

massiv erhöhte. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf den mit dem Inversionsmikroskop hergestellten Fotografien (Abbildung 7, siehe 3.1.2, S.29) wiederfinden.

#### 4.1.2 Vitalitätsbestimmung

Im Weiteren schlossen sich Bestimmungen zur Vitalität der Tumorzellen an. Dazu wurde der Fluoreszeindiacetat-Assay (FDA-Assay) angewendet. Den zuvor in der Zellzählung erhobenen Ergebnissen konnte auf diese Weise weiter nachgegangen werden. Durch Färbung der Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden die lebenden und die toten Zellen markiert. So ließen sie sich unter dem Fluoreszenzmikroskop voneinander unterscheiden. Das im FDA-Assay, einem objektiven Test, erhaltene Ergebnis entsprach den neu gewonnen Erkenntnissen aus der Zellzahlbestimmung. Der Anteil toter Zellen nahm in dem mit *G. pentaphyllum* versehenen Kulturschalen, zeit- und konzentrationsabhängig, deutlich zu, während in den Kontrollkulturen keine Veränderungen festzustellen waren.

Die wachstumshemmende Wirkung von *G. pentaphyllum* auf verschiedene Tumorzellentitäten war bereits durch vielfältige Untersuchungen diverser Forscherteams an unterschiedlichsten Tumorentitäten bekannt. So untersuchten Guohua et al. 2006 den Wirkstoff an **Huh-7-Lebertumorzellen**. Cheng et al. 2011 isolierten aus *G. pentaphyllum* mittels Säulenchromatographie *Flavonoid*- und *Saponin*fraktionen, mit denen sie dann weitere Untersuchungen an **PC-3-Prostatakarzinomzellen** durchführten. Die Forschergruppen der China Medical University, Taichung, Taiwan, Volksrepublik China (Hsu et al. 2011, Chen et al. 2006, Lin et al. 2011) verwendeten für ihre Experimente, u.a. an **WEHI-3-Leukämiezellen**, **Colo-205-Tumorzellen** und **HL-60-myeloide Leukämiezellen**, gezielt die aus *G. pentaphyllum* isolierte *Saponin*komponente, die *Gypenoside*. Untersuchungen an **C6-Gliomazellen** wurden erstmals durch Schild et al. 2010 durchgeführt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente und die daraus gewonnenen Ergebnisse leisteten einen Beitrag dazu.

Guohua et al. 2006 führten Experimente an Huh-7-Lebertumorzellen und zum Vergleich an gesunden Fibroblasten durch. Zur Analyse der Zellpopulationen und der durch *G. pentaphyllum* ausgelösten Veränderungen nutzten sie die Durchflusszytometrie. Dabei zeigten sie, dass *G. pentaphyllum* eine Reduktion der Tumorzellanzahl bewirkte. 56 % der

Tumorzellen gingen in Apoptose, während der Anteil bei den Fibroblasten 12 % betrug. Daher lag die Annahme nahe, dass *G. pentaphyllum* in Tumorzellen den Zelltod herbeiführte. Gleichzeitig blieben die gesunden Zellen unbeschadet (Guohua et al. 2006).

Cheng et al. 2011 isolierten aus *G. pentaphyllum* mittels der Säulenchromatographie den *Flavonoid*- und *Saponin*anteil, um damit gezielt weitere Untersuchungen an PC-3-Prostatakarzinomzellen durchzuführen. Zuvor analysierten sie die Wirkstoffgruppen mithilfe der HPLC und MS (Cheng et al. 2011). Dabei identifizierten sie bestimmte *Flavonoide* und *Gypenoside* (*Gypenoside* aus der *Saponin*fraktion,). Ein Teil der darin bestimmten Komponenten ließen sich auch durch HPLC und MS-Analyse des in dieser Arbeit verwendeten Extraktes identifizieren. Somit lassen sich die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse mit den von Cheng et al. erhobenen Ergebnissen vergleichen.

Die Vitalität der PC-3-Prostatakarzinomzellen untersuchten Cheng et al. mithilfe des MTT-Assays. Konzentrationsorientierend (30, 50, 80, 100, 150 µg/ml *Flavonoid*fraktion; 10, 30, 50, 80, 100 µg/ml *Saponin*fraktion) führten sie nach 72-stündiger Inkubation die Experimente durch. Folgende Ergebnisse ließen sich feststellen: *Saponine* und *Flavonoide* hatten einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Zellvitalität. Während geringe Dosen eine kleine Wirkung auf das Zellüberleben ausübten, führten hohe Dosen zu einer deutlichen Hemmung der Lebensfähigkeit (bis zu 80 % durch 100 µg/ml *Saponin*inkubation, bzw. 150 µg/ml *Flavonoid*inkubation).

Chen et al. 2006, Hsu et al. 2011 und Lin et al. 2011 führten die „*Gypenosid*-Untersuchungen“ an verschiedenen Tumorentitäten durch: Hsu et al. an WEHI-3-Leukämiezellen (Hsu et al. 2011), Chen et al. an humanen Colo-205-Tumorzellen (Chen et al. 2006) und Lin et al. an HL-60-myeloiden Leukämiezellen (Lin et al. 2011). Versuchsaufbau und Untersuchungsinhalte ähnelten sich jedoch, so dass sie hier gemeinsame Erwähnung finden. Den Zellkulturen setzten sie unterschiedliche Konzentrationen der *Gypenoside* (0, 60, 90, 120, 150, 180 µg/ml) zu. Die einzelnen Experimente fanden nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation statt. Außerdem führten sie zeitabhängige Versuche mit 150 µg/ml konzentrierten *Gypenosid* versehenen Zellen nach 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden durch. Den Kontrollkulturen wurde DMSO zugesetzt.

Alle drei Teams untersuchten die Zellvitalität der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden die Zellen zuvor mit Propidiumiodid markiert. Als Ergebnis ließ sich eine

konzentrations- und zeitabhängige Reduktion der Zellvitalität erkennen. Außerdem dokumentierten sie ihre Ergebnisse mit der Phasen-Kontrast-Mikroskopie. Dies ermöglichte einen Vergleich der in dem Rahmen dieser Arbeit hergestellten Abbildungen (siehe Abbildung 7, siehe 3.1.2, S.29) mit den ihrigen. Dabei wurde deutlich, dass sich jeweils eine durch *G. pentaphyllum* bzw. *Gypenoside* ausgelöste morphologische Veränderung an den verschiedenen Tumorzellentitäten darstellte. Zudem konnte fotografisch ein konzentrations- und zeitabhängiger Proliferationsrückgang festgehalten werden.

FDA-Assay, Durchflusszytometrie sowie auch der MTT-Assay gaben einen genauen, quantitativen Eindruck von den untersuchten Zellpopulationen und von den durch die *Gypenoside*, bzw. *G. pentaphyllum* verursachten Veränderungen an ihnen. Möglichen Ungenauigkeiten, die bei der hier angewendeten manuellen Zellzählung entstanden sein könnten, wurden durch den Gebrauch verschiedener anderer Verfahren zum Nachweis der Zellvitalität vorgebeugt. Dennoch weisen die Ähnlichkeiten der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen auf einen einheitlichen Wirkungsmechanismus von *G. pentaphyllum* an verschiedenen Tumorentitäten hin. Alle Untersucherteams konnten einen durch *G. pentaphyllum* bzw. eine darin vorkommende Wirkstoffgruppe der *Saponine*, die *Gypenoside*, ausgelösten konzentrations- und zeitabhängigen Rückgang lebender Tumorzellen darstellen. Es kann vermutet werden, dass ein allgemein gültiger Mechanismus nicht nur für den hier nachgewiesenen Niedergang der C6-Gliomazellen verantwortlich ist, sondern vermutlich auch auf andere bisher noch nicht untersuchte Tumorentitäten übertragbar ist.

#### **4.1.3 Untersuchungen zur Apoptose**

Anhand der Bestimmung der Zellzahl konnte zu Beginn der hier beschriebenen Untersuchungen eine durch *G. pentaphyllum* verursachte Einschränkung der C6-Gliomazellvermehrung dargestellt werden. In der Phasenkontrastmikroskopie ließen sich parallel dazu morphologische Veränderungen an den mit Extrakt kultivierten C6-Gliomazellen erkennen. Der daraufhin durchgeführte Vitalitätstest (FDA-Assay) zeigte, dass es sich bei den veränderten Tumorzellen um tote Zellen handelte. Daher folgten erstmalig Untersuchungen zum durch *G. pentaphyllum* ausgelösten Zellniedergang an den C6-Gliomazellen. Als Untersuchungsmethode wurde die Immunhistochemie gewählt. Sie diente

dem Nachweis der Caspase 3-Aktivität, der Aktivität eines Proteins, das eine Schlüsselrolle im Prozess des programmierten Zelltodes übernimmt (Turner & Cidlowski 2007). Wie aus der Abbildung 8 (siehe 3.1.3, S. 31) hervorgeht, verursachte die Kultivierung der C6-Gliomazellen mit dem Extrakt von *G. pentaphyllum* eine Aktivitätszunahme der Caspase 3. Dieses Ergebnis korreliert mit den Erkenntnissen der anderen Arbeitsgruppen. Diese testeten ebenfalls auf eine durch *G. pentaphyllum* gesteigerte Caspase 3-Aktivität (Hsu et al. 2011 und Lin et al. 2011) und Caspase 3-Menge (Chen et al. 2006) in anderen, den Gliomazellen nicht verwandten Tumorzellsystemen. Zudem untersuchten sie weitere für die Apoptose charakteristische Proteine.

Zunächst testeten Chen et al. 2006 mittels Durchflusszytometrie das Vorhandensein apoptotischer Zellen. Dazu färbten sie die humanen Colo-205-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI). Dieser färbt starke Chromosomenkondensationen an, die charakteristisch für die frühe Phase der Apoptose sind. Auf diese Weise konnten Chen et al. zu Beginn ihrer Untersuchungen einen konzentrationsabhängigen Einfluss der *Gypenoside* auf die Apoptosemechanismen in humanen Colo-205-Zellen darstellen (Chen et al. 2006). Im Folgenden gingen sie dieser Erkenntnis weiter nach. Mittels Gelelektrophorese zeigten sie eine vermehrte DNA-Fragmentierung, die ebenfalls konzentrationsabhängig war. Der Western Blot wurde genutzt, um Veränderungen der Caspase 3-Menge sowie weiterer Mengenänderungen typischer Apoptoseproteine (u.a. Bax, Bcl-2, Caspase 9, p53) nachzuweisen. So stellten Chen et al. unter Einsatz verschiedener Untersuchungsmethoden einen Zusammenhang zwischen der *Gypenosid*-Behandlung der humanen Colo-205-Tumorzellen und der Apoptoseinduktion her.

Arbeitsgruppen um Hsu et al. 2011 und Lin et al. 2011 führten ebenfalls gezielte Experimente zu den Apoptosevorgängen in den von ihnen untersuchten Tumorzellentitäten durch (Hsu et al.: WEHI-3-Leukämiezellen; Lin et al.: HL-60-myeloiden Leukämiezellen). Diese waren vergleichbar zu den oben beschriebenen Experimenten von Chen et al. 2006. So fanden folgende Verfahren Anwendung: Lin et al.: DAPI-Färbung, DNA-Gelelektrophorese und Western Blot typischer Apoptoseproteine (Lin et al. 2011); Hsu et al.: Western Blot typischer Apoptoseproteine (Hsu et al. 2011). Obwohl sie sich auf verschiedene Tumorentitäten stützten, glichen sich die von Hsu et al., Lin et al. und Chen et al. ermittelten

Ergebnisse. Den genannten Experimenten schlossen sich weitere Tests bezüglich der durch *Gyenoside* ausgelösten Apoptosewirkung an. So testeten Hsu et al. und Lin et al. auf eine veränderte Caspase 3- und 8-Aktivität. Dafür markierten sie die Zellen mit CaspaLux8-L1D2 und PhiPhiLux-1D2 und führten sie der Durchflusszytometrie zu. Als Resultate fanden sich eine mit zunehmender Inkubationsdauer der *Gyenoside* ansteigende Caspase 3- und 8-Aktivität (Hsu et al. 2011, Lin et al. 2011).

Guohua et al. 2006 führten ebenfalls Experimente zu den Apoptosemarkern in den mit *G. pentaphyllum* versehenen Huh-7-Zellen durch. Sie fertigten Western Blots an, aus denen hervorging, dass die Inkubation der Tumorzellen mit *G. pentaphyllum* eine Verringerung der Bcl-2-Expression und eine Erhöhung der Bax-Expression zur Folge hatte (Guohua et al. 2006). Bei beiden Vorgängen handelte es sich, wie unter 1.3 beschrieben, um für die Apoptoseeinleitung förderliche Mechanismen.

Die von Cheng et al. 2011 angewendeten Experimente zur Apoptose in mit *Saponinen* und *Flavonoiden* versehenen PC-3-Prostatakarzinomzellen erbrachten ebenfalls Hinweise auf einen allgemeingültigen, von *G. pentaphyllum* bzw. seinen Inhaltsstoffen ausgelösten Mechanismus der Apoptoseeinleitung. Cheng et al. färbten die mit unterschiedlichen *Saponin*- und *Flavonoid*konzentrationen versehenen PC-3-Zellkulturen nach 48-stündiger Inkubation mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) an. Diese kombinierte Färbung diente der Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose. Annexin V kennzeichnete die frühe Apoptose. Im Gegensatz zu PI färbte es die zeitigen Zellmembranveränderungen (Translokation von Phosphatidylserinen von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran), noch bevor es zum kompletten Verlust der Membranintegrität kam. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der größere Teil der toten Zellen in Apoptose befand, weniger in nekrotischem Zustand (Cheng et al. 2011). Außerdem fertigen Cheng et al. Western Blots an, die den oben beschriebenen vergleichbar waren. Sie ließen ebenfalls auf eine durch *Saponin*- und *Flavonoid*inkubation veränderte Expression pro- und antiapoptotischer Proteine (Bcl-2 Genfamilie, Caspase 3) schließen (Cheng et al. 2011).

Die hier beschriebenen Experimente zu den durch *G. pentaphyllum* bzw. ihrer Inhaltsstoffe beeinflussten Apoptosemechanismen weisen auf einen vermutlich allgemeingültigen Vorgang der Apoptoseeinleitung hin. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten an

unterschiedlichen Tumorentitäten die proapoptotische Wirkung des Extraktes gegenüber Tumorzellen heraus. So konnte auch in dieser Arbeit ein proapoptotischer Effekt (Steigerung der Caspase 3-Aktivität) von *G. pentaphyllum* an den bisher nicht untersuchten C6-Gliomazellen gezeigt werden. Diese Arbeit liefert daher einen Beitrag zu den neuen Erkenntnissen der antikanzerogenen Wirkung von *G. pentaphyllum*.

## 4.2 Prozesse in der Zelle

Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich den Untersuchungen zur Zellvitalität der durch *G. pentaphyllum* beeinflussten C6-Gliomazellen. Der zweite Teil diente der Betrachtung zellulärer Mechanismen, die auf die Apoptose wirken.

Aus Untersuchungen ist bekannt, dass *G. pentaphyllum* neben zahlreichen weiteren gesundheitsförderlichen Wirkungen antioxidative Eigenschaften besitzt (siehe 1.4.3). So greift es in das Vorkommen zellulärer ROS ein (Li et al. 1993). Neuere Erkenntnisse aus der Tumorforschung deuten darauf hin, dass Veränderungen im zellulären ROS-Haushalt Auswirkungen auf das Wachstum von Malignomen haben. ROS und im Besonderen das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> übernehmen eine wichtige Funktion als Signalträger in Wachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen, sowie Apoptosevorgängen (Rhee 2006). Die Zellen benötigen zum Wachsen und zur Vermehrung ein Optimum an ROS. Ein Zuwenig wie auch ein Zuviel an ROS hemmen das Zellwachstum (Day & Suzuki 2006). Das übermäßige Vorhandensein der ROS stellt einen Ausgangspunkt der mitochondrial-vermittelten Apoptose dar.

Das Wissen über die in 1.2 beschriebenen Tumorstadiumsregulatorien sowie die unter 4.1 beschriebenen Ergebnisse zur Zellvitalität, verursacht von *G. pentaphyllum*, führten zu weiteren Untersuchungen. Es schlossen sich Experimente an, die den von *G. pentaphyllum* beeinflussten zellulären ROS-Haushalt in den C6-Gliomazellen untersuchten. Durchgeführt wurden Analysen zum zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt, sowie Experimente zum SOD-Gehalt und ihrer Aktivität.

#### 4.2.1 Einfluss von *G. pentaphyllum* auf den zellulären Wasserstoffperoxidgehalt

Fluorimetrische Bestimmungen wurden durchgeführt, um den zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt zu ermitteln (Cathcart et al. 1983). Damit fand eine sehr genaue und erprobte Methode Anwendung, um auch kleinste Mengen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu detektieren.

Auffällig war bei den Untersuchungen ein zunächst antioxidativer Effekt. Nach einstündiger Inkubation der Tumorzellen mit *G. pentaphyllum* zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehaltes pro Zelle (Abbildung 10, siehe 3.2.1, S. 34). Diese ROS-reduzierende Eigenschaft hatte dagegen keinen Effekt auf die Tumorzellen. In den Vitalitätsuntersuchungen fanden sich keine Unterschiede zu den mit DMSO versetzten Kontrollzellen innerhalb der 24-stündigen Kultivierung. Die Untersuchung des zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehaltes 48 Stunden später ließ jedoch eine signifikante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zunahme erkennen. Daraus war zu schließen, dass sich mit zunehmender Inkubationszeit das Wirkungsmuster von *G. pentaphyllum* veränderte. So wurde auf der einen Seite die bereits bekannte antioxidative Eigenschaft von *G. pentaphyllum* auch in Tumorzellen gefunden. Auf der anderen Seite wurden ROS-bildungsfördernde Eigenschaften in Tumorzellen dargestellt. Dieser nach 48-stündiger Extraktinkubation vorhandene hohe intrazelluläre ROS- bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt war vermutlich verantwortlich für die von *G. pentaphyllum* ausgelöste Zytotoxizität.

Im Rahmen der von Hsu et al. 2011 und Chen et al. 2006 durchgeführten Untersuchungen zu den von den *Gypenosiden* ausgelösten Apoptosemechanismen wurden auch Experimente zu den Veränderungen des ROS-Haushaltes angefertigt. Die Arbeitsgruppen nutzten dazu die Durchflusszytometrie. Sie färbten die entsprechenden Tumorzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA an. Die Färbung war dieselbe, wie die in dieser Arbeit verwendete, die Auswertung erfolgte hingegen maschinell. Das Ergebnis, welches sie erhielten, glich jedoch dem Ergebnis dieser Arbeit. Sie zeigten, dass die *Gypenoside*, als einzelne Komponente von *G. pentaphyllum*, zu einer Erhöhung des ROS-Gehaltes in den Tumorzellen führte (Hsu et al. 2011, Chen et al. 2006).

*G. pentaphyllum* bzw. *Gypenoside* beeinflussten die Balance des intrazellulären ROS-Haushaltes, im Besonderen das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Vorkommen. Dieses Verhalten konnte durch Chen et al. 2006 an humanen Colo-205-Zellen, durch Hsu et al. 2011 an WEHI-3-Leukämiezellen sowie auch in dieser Arbeit an C6-Gliomazellen gezeigt werden. Der Extrakt nahm auf diese Weise

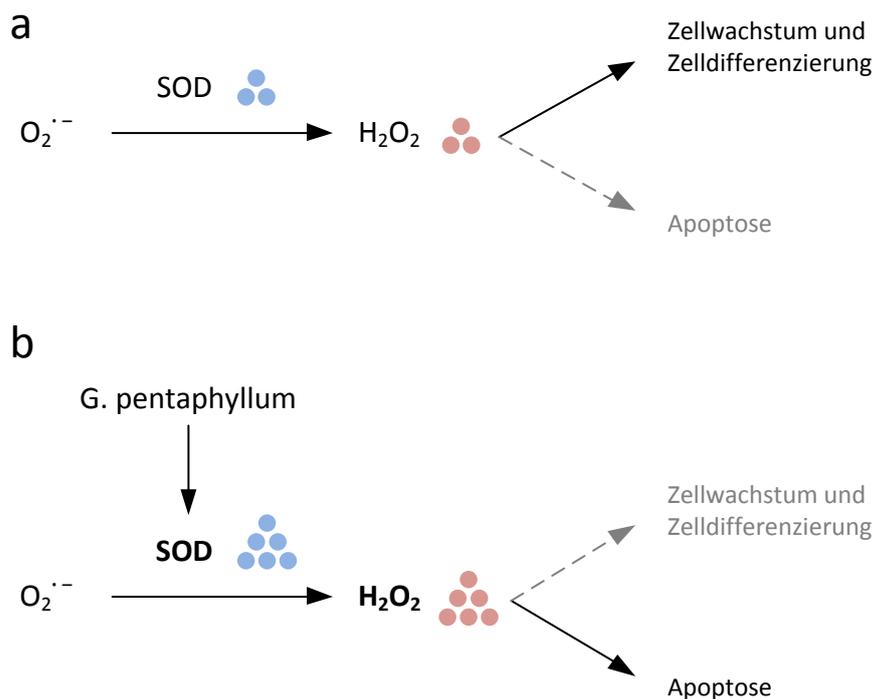
Einfluss auf den zellulären Gehalt eines Signalmoleküls der Zellproliferation und -differenzierung (Rhee 2006) sowie der Apoptoseeinleitung (Gao et al. 2012). Das zum Wachsen benötigte ROS-Optimum war in den Tumorzellen (Valko et al. 2006) gestört. Es lag ein Zuviel an  $H_2O_2$  vor. In der Folge wurde die mitochondrial-vermittelte Apoptose in den Tumorzellen eingeleitet, so auch in den C6-Gliomazellen. Die Zellen gingen zugrunde und erschienen, wie unter 3.1.2 dargestellt, in der Phasenkontrastmikroskopie verändert, abgerundet. In der Immunhistochemie ließ sich daraufhin der Apoptosemarker, die Caspase 3-Aktivität, verstärkt nachweisen.

#### **4.2.2 Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Superoxiddismutase**

Da die SOD das Enzym im Zellstoffwechsel ist, das Superoxidanionen-Radikale zu  $H_2O_2$  umwandelt (siehe Kapitel 1.2.1), wurde sie als Ursache für den erhöhten  $H_2O_2$ -Gehalt in den C6-Gliomazellen angenommen. Es schlossen sich daher den Analysen zum zellulären  $H_2O_2$ -Gehalt Experimente zur SOD an. Zwei verschiedene Verfahren fanden Anwendung. Die SOD-Gesamtaktivität wurde photometrisch ermittelt. Auf den Mn-SOD-Gehalt wurde durch das Anfertigen von Western Blots mit anschließender quantitativer Auswertung geschlossen. Beide Tests führten zu der Erkenntnis, dass *G. pentaphyllum* konzentrations- und zeitabhängig Einfluss auf die SOD nahm. Durch die Inkubation der C6-Gliomazellen mit dem Pflanzenextrakt kam es zu einem signifikanten Anstieg der SOD-Gesamtaktivität pro Zelle bei zunehmendem Mn-SOD-Gehalt. Die Steigerung der SOD-Gesamtaktivität ließ sich schon nach einstündiger Inkubation der Zellen mit dem *G. pentaphyllum*-Extrakt erkennen, jedoch in einem moderaten Maß. Daher könnte es einen Zusammenhang zu dem unter 4.2.1 beschriebenen antioxidativen Effekt geben, der sich nach einstündiger Extraktinkubation in der  $H_2O_2$ -Untersuchung darstellte. Die kurzfristige SOD-Aktivitätssteigerung könnte so zu einem mäßigen Anstieg des zellulären  $H_2O_2$  geführt haben, was im Weiteren von den entsprechenden  $H_2O_2$ -metabolisierenden Enzymen (Katalase, GPx) in weniger toxische Substanzen umgewandelt wurde. Somit ließ sich in der  $H_2O_2$ -Fluorimetrie nach einstündiger Extraktinkubation eine konzentrationsabhängige Verringerung der zellulären  $H_2O_2$ -Menge detektieren (Abbildung 10, siehe 3.2.1, S. 34). Die Wirkung von *G. pentaphyllum* erschien daher zunächst antioxidativ (Schild et al. 2010). Dass es sich bei diesem Effekt aber auch um eine direkte von *G. pentaphyllum* ausgelöste antioxidative Wirkung gehandelt haben könnte,

ließen die von Schild et al. 2009 erhobenen Ergebnisse vermuten. In ihren Untersuchungen wurden hippocampale Astrozyten einem kurzen hypoxisch-hypoglykämischen Reiz ausgesetzt. Die durch die Ischämie eingetretene funktionale Schädigung wurde über die Erstellung von evozierten Potentialen ermittelt. Die Untersuchungen hatten gezeigt, dass eine sofortige Applikation des *G. pentaphyllum*-Extraktes zeitgleich zur Reperfusion die Hirnzellen vor der ischämischen Schädigung schützte, indem es eine direkte antioxidative Wirkung ausübte (Schild et al. 2009). Zwei verschiedene Mechanismen könnten somit für die antioxidativen Effekte ursächlich sein.

Nach 48-stündiger Inkubation der C6-Gliomazellen mit *G. pentaphyllum* zeigte sich, wie in Abbildung 14 dargestellt, eine deutliche SOD-Mengen- und Aktivitätszunahme. Dies war gleichzeitig durch einen signifikanten zellulären  $H_2O_2$ -Anstieg gekennzeichnet. Die hohe zelluläre  $H_2O_2$ -Menge stellte für die C6-Gliomazellen wahrscheinlich ein toxisches Produkt dar, welches zum Niedergang der Zellen führte.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Wirkung von *G. pentaphyllum* auf den zellulären Radikalstoffwechsel und das zelluläre Schicksal. **a** Zellulärer Radikalstoffwechsel und zelluläres Schicksal ohne *G. pentaphyllum*, **b** mit *G. pentaphyllum*

Vermutlich hatte *G. pentaphyllum* auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolisierenden Enzyme (Katalase und GPx) in den C6-Gliomazellen keine Wirkung, so dass das gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Vorkommen nicht in ausreichendem Maß verstoffwechselt werden konnte. Um diese Aussage jedoch mit Sicherheit tätigen zu können, müssten sich weitere Untersuchungen an den C6-Gliomazellen zum Einfluss von *G. pentaphyllum* auf die Katalase und die GPx anschließen.

Untersuchungen zu Veränderungen von SOD-Aktivität/-Menge sowie zur GPx-Aktivität/-Menge an gesunden Zellen zeigten einen anderen Effekt der *Gypenoside*, bzw. von *G. pentaphyllum*.

Wang et al. führten 2010 diesbezüglich Untersuchungen an „gesunden“ Hirnzellen von Mäusen durch, die künstlichem oxidativem Stress ausgesetzt waren. Auf der Suche nach neuen potenziellen Therapieoptionen der Parkinsonerkrankung versetzten sie diese mit *Gypenosiden*. Zur SOD-Aktivitätsbestimmung nutzten sie Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der sich in Gegenwart von Superoxidanion-Radikalen zum dunkelblauen Formazan umwandelt (Reduktionsreaktion). Fehlen die Superoxidanionen, z. B. aufgrund einer erhöhten SOD-Aktivität, so unterbleibt der Farbwechsel (Kono 1978). Quantitativ kann dies durch eine veränderte Extinktion photometrisch ermittelt werden. Obwohl dieses Verfahren gewisse Nachteile bot (fehlende Selektivität der NBT-Reduktion), kamen Wang et al. zu dem Ergebnis, dass die *Gypenoside* die Aktivität der SOD steigerten. Gleichzeitig zeigten sie eine Erhöhung der GPx-Aktivität in den Hirnzellen, ebenfalls photometrisch. Da die GPx das anfallende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Wasser umwandelte, wurden die entsprechenden nigrostriatalen Hirnzellen vor der Apoptose geschützt (Wang et al. 2010).

Schild et al. führten 2012 in dem Bezug Untersuchungen an hippocampalen Astrozyten durch. Nach 48-stündiger Kultivierung der Astrozyten mit einem ethanolischen Extrakt von *G. pentaphyllum* testeten sie die Zellen auf Veränderungen der SOD-Gesamtaktivität und SOD-Menge sowie auf die GPx-Aktivität und -Menge. Mittels Photometrie wurden durch Bestimmungen der Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge von 550 nm auf die durch *G. pentaphyllum* ausgelöste SOD-Aktivitätsänderung geschlossen sowie bei einer Wellenlänge von 340 nm auf die durch *G. pentaphyllum* ausgelöste GPx-Aktivitätsänderung. Die SOD- und GPx-Mengenbestimmungen erfolgten über die Herstellung von Western Blots

mit anschließender quantitativer Auswertung. Alle Experimente wiesen darauf hin, dass *G. pentaphyllum* die Aktivität und Menge sowohl der SOD als auch der GPx steigerte. Die zuvor durchgeführte fluorimetrische Bestimmung des zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsprach diesen Ergebnissen. Schild et al. konnten keine signifikante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zunahme aufzeigen, viel mehr blieb das zelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Vorkommen in ihren Untersuchungen an den Astrozyten unverändert (Schild et al. 2012).

*G. pentaphyllum* bzw. eine in ihr vorkommende Wirkstoffgruppe, die *Gypenoside*, wiesen in gesunden nicht-neoplastisch veränderten Zellen eine andere, entgegengesetzte Wirkung auf als in Krebszellen. Während *G. pentaphyllum* in Krebszellen, wie in dieser Arbeit an C6-Gliomazellen gezeigt, den Gehalt an zytotoxischen Sauerstoffradikalen so erhöhte, dass sie in Apoptose gingen (Schild et al. 2010), besaß es in gesunden Hirnzellen eine antioxidative Wirkung (Schild et al. 2012, Wang et al. 2010). Die Hirnzellen wurden so vor einer oxidativen Schädigung mit nachfolgender Apoptose geschützt. Dieser Wirkungsunterschied an den verschiedenen Zellpopulationen stellt einen Vorteil für eine Anwendung *G. pentaphyllums* als Malignomtherapeutikum dar. Es scheint, als würde *G. pentaphyllum* gezielt gegen Krebszellen wirken, während die umgebenden gesunden Zellen durch den gleichen Wirkstoff vor dem Zelltod geschützt werden. Ist diese Annahme richtig, so hätte *G. pentaphyllum* einen selektiven toxischen Effekt ausschließlich auf Tumorzellen. Der Extrakt könnte Einsatz finden, ohne Risiken für das gesunde Gewebe aufzuweisen.

### 4.3 *In vivo*-Experimente mit Gypenosiden an Tumorzellen

Einen Hinweis auf potenzielle *in vivo*-Wirkungen der *Gypenoside* liefern die Forschungen von Hsu et al. 2011 und Lin et al. 2011. Ihre Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Erforschung der im *G. pentaphyllum* enthaltenen *Gypenoside* an lebenden Tieren. Sie führten neben den in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro*-Experimenten (siehe 4.1) Tests an lebenden Mäusen durch.

Hsu et al. 2011 ordneten dazu jeweils 10 Mäuse (8 Wochen alt) 4 Gruppen zu. 30 Mäusen injizierten sie WEHI-3-Leukämiezellen. Über zwei Wochen vermehrten sich diese *in vivo*. Danach bekamen 20 der infizierten Mäuse und 10 gesunde Mäuse *Gypenoside*, in Olivenöl gelöst, oral für zwei Wochen verabreicht. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Überlebensrate der mit *Gypenoside* behandelten Mäuse dosisabhängig zunahm, und dass sich die Zahl der CD3- und CD19- Zellen in diesen Mäusen erhöhte, während sich die Anzahl der neoplastischen Zellen in der Milz wahrscheinlich verringerte bzw. dass sie mit den verwendeten Mitteln nicht nachweisbar waren (Hsu et al. 2011).

Lin et al. 2011 injizierten 26 Mäusen (6 Wochen alt) HL-60-myeloide Tumorzellen. Diese lösten ein Tumorwachstum an der betreffenden Stelle aus. Nach sieben Tagen wurden 16 Mäuse mit *Gypenosid*-Injektionen unterschiedlicher Konzentrationen (5 und 20 mg/kg) intraperitoneal behandelt. 8 Mäuse bekamen als Kontrollgruppe DMSO verabreicht. Als Ergebnis fand sich nach vier Wochen „Therapie“ eine Tumorreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lin et al. 2011).

Auch wenn für diese Experimente eine nur kleine Tierpopulation Verwendung fand, sind die beschriebenen Ergebnisse beeindruckend. Sie zeigen, welches Potenzial sich in den in *G. pentaphyllum* enthaltenen *Gypenosiden* verbirgt.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein ethanolischer Extrakt der asiatischen Pflanze *Gynostemma pentaphyllum* in Bezug auf seine antikanzerogenen Eigenschaften an einer C6-Gliomazelllinie getestet. Aus den durchgeführten Untersuchungen ging hervor, dass *G. pentaphyllum* eine zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen ausübte. Über eine Steigerung des zellulären  $H_2O_2$  wurde die Apoptose in den C6-Gliomazellen eingeleitet. Als Ursache für den signifikant erhöhten zellulären  $H_2O_2$ -Gehalt wurde eine durch *G. pentaphyllum* vermittelte Steigerung der SOD-Aktivität und SOD-Menge gefunden. In Abbildung 15 sind die durch *G. pentaphyllum* eingeleiteten Wirkungen an den C6-Gliomazellen zusammenfassend dargestellt.

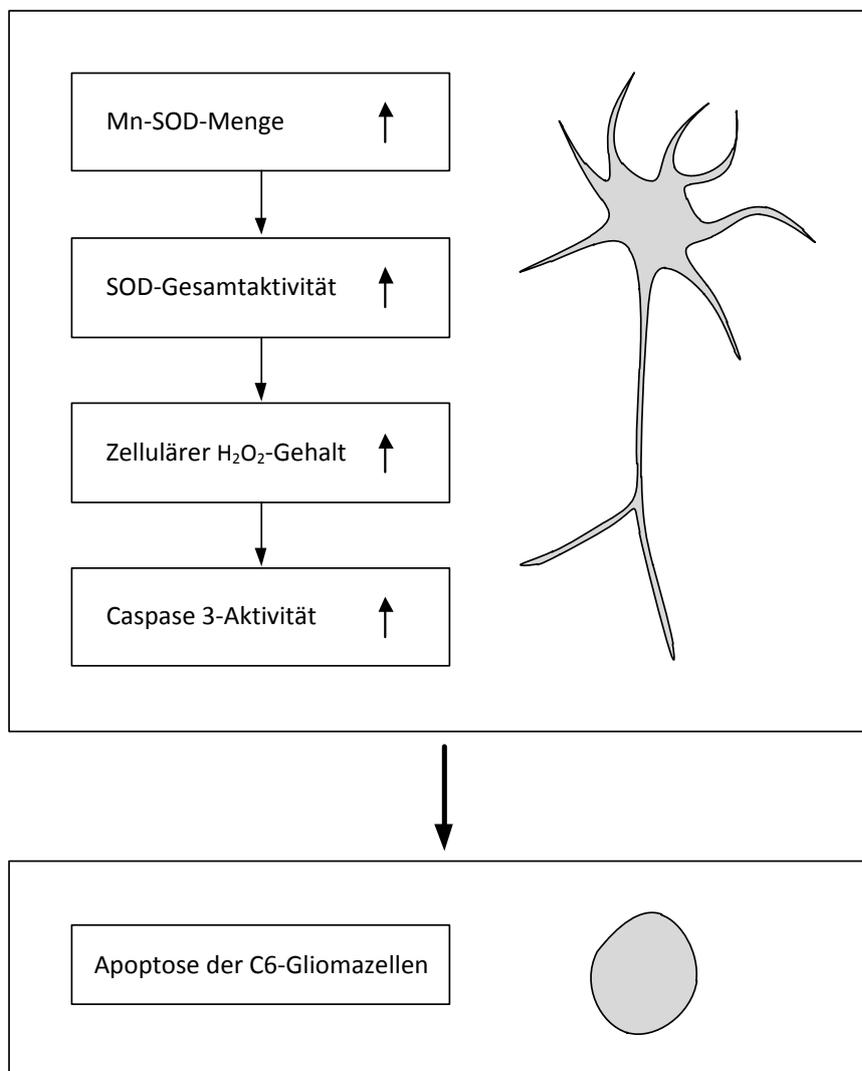


Abbildung 15: Schematische Darstellung der durch *G. pentaphyllum* veränderten Stoffwechselprozesse in den C6-Gliomazellen

Um *G. pentaphyllum* jedoch als potentielle Therapieoption zu etablieren, sind weitere Untersuchungen

- zum Nebenwirkungspotential bzw. zur Nutzen-Nebenwirkungs-Relation
- zur optimalen Applikationsform – oral, intravenös, peritoneale Injektion
- zur Dosierung, um einen antikanzerogenen Effekt zu erzielen
- zu den einzelnen Inhaltsstoffen der Pflanze: Herstellung als Reinstoffe, Zuordnung der jeweiligen Wirkung und Nutzbarkeit für die klinische Anwendung

anzuschließen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ethanolischer Extrakt der asiatischen Heilpflanze *G. pentaphyllum* auf seine antikanzerogene Wirkung am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie untersucht. Die Tumorzellen wurden über 48 Stunden mit verschiedenen Endkonzentrationen (20, 40, 60 µg/ml) des Extraktes kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl ergab eine konzentrations- und zeitabhängige Verlangsamung der Zellvermehrung. Während sich nach 48-stündiger Kultivierung ein deutlicher Zellzuwachs in den mit DMSO versehenen Kontrollkulturen auf  $1300 \cdot 10^3$  Zellen/ml fand, nahm die Zellzahl in den mit 20 µg/ml und 40 µg/ml versehenen Tumorzellen nur mäßig auf im Mittel  $210 \cdot 10^3$  Zellen/ml zu. Die mit 60 µg/ml versehenen Tumorzellen wiesen einen Rückgang an Zellen in der Zellpopulation auf  $66 \cdot 10^3$  Zellen/ml auf. Ein vermehrtes Vorkommen toter Zellen konnte durch die Markierung der Tumorzellen mit Fluoreszeindiacetat und Propidiumiodid (FDA-Assay) in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Auf eine gesteigerte Caspase 3-Aktivität ließ die Immunhistochemie schließen. Als Ursache für den apoptotischen Zelluntergang der C6-Gliomazellen wurde das durch *G. pentaphyllum* gesteigerte zelluläre  $H_2O_2$ -Vorkommen angenommen. Signifikante Steigerungen der  $H_2O_2$ -Fluoreszenzintensitäten pro Zelle konnten nach 48-stündiger Kultivierung der C6-Gliomazellen mit dem Extrakt konzentrationsabhängig gemessen werden. Die Steigerung des zellulären  $H_2O_2$ -Gehaltes ging mit einer konzentrations- und zeitabhängigen Zunahme der SOD-Gesamtaktivität und der Mn-SOD-Menge einher. Eine maximale Steigerung der SOD-Gesamtaktivität auf 500 % fand sich nach 48-stündiger Kultivierung bei den mit 60 µg/ml Extrakt versehenen Tumorzellen in der Photometrie. Die Kontrollzellen wiesen dagegen einen Rückgang der SOD-Gesamtaktivität auf 87 % auf. Die Ergebnisse der Photometrie korrelierten mit den quantitativen Analysen der angefertigten Western Blots zur Bestimmung des Mn-SOD-Gehaltes pro Protein. Die deutlichste Mengenzunahme wiesen die mit 40 µg/ml Extrakt versehenen Tumorzellen auf. Eine Steigerung um 140 % zur Kontrollkultur nach einstündiger Kultivierung wurde ermittelt.

Den Untersuchungen war zu entnehmen, dass *G. pentaphyllum* über das Eingreifen in den zellulären ROS-Stoffwechsel eine antikanzerogene Wirkung auf die C6-Glioma-Zelllinie ausübte. Diese Arbeit leistet daher einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung des malignen Grad IV-Glioms.

## Literaturverzeichnis

- 1 Adams JM: Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17. 2481–2495 (2003)
- 2 Barth RF: Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neurooncol.* 36. 91-102 (1998)
- 3 Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP: Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282. 1183-92 (2007)
- 4 Blumert, M., Lui, J.: *Jiaogulan: China's "Immortality" Herb.* pp. 57-8 Torchlight Publishing, Inc. USA 2003
- 5 Cai H: Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* 68. 26-36 (2005)
- 6 Cathcart R, Schwiers E, Ames BN: Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem.* 134. 111-6 (1983)
- 7 Chen JC, Lu KW, Lee JH, Yeh CC, Chung JG: Gypenosides induced apoptosis in human colon cancer cells through the mitochondria-dependent pathways and activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 26. 4313-26 (2006)
- 8 Chen JC, Lu KW, Tsai ML, Hsu SC, Kuo CL, Yang JS, Hsia TC, Yu CS, Chou ST, Kao MC, Chung JG, Wood WG: Gypenosides induced G0/G1 arrest via Chk2 and apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human tongue cancer SCC-4 cells. *Oral Oncol.* 45. 273-83 (2009)
- 9 Cheng TC, Lu JF, Wang JS, Lin LJ, Kuo HI, Chen BH: Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Agric Food Chem.* 59. 11319-29. (2011)
- 10 Chou SC, Chen KW, Hwang JS, Lu WT, Chu YY, Lin JD, Chang HJ, See LC: The add-on effects of *Gynostemma pentaphyllum* on nonalcoholic fatty liver disease. *Altern. Ther. Health Med.* 12. 34-9 (2006)
- 11 Cui JF, Eneroth P, Bruhn JG: *Gynostemma pentaphyllum*: Identification of major saponinins and differentiation from *Panax* species. *Eur. J. Pharm. Sci.* 8. 187-191 (1999)
- 12 Day RM, Suzuki YJ: Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response.* 3. 425-42 (2006)

- 13 Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82. 47–95 (2002)
- 14 Fahn S, Cohen G: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32. 804 – 812 (1992)
- 15 Finkel T: Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194. 7-15 (2011)
- 16 Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408. 239–247 (2000)
- 17 Flohé L, Ötting F: Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105. 93-104 (1984)
- 18 Gao FH, Liu F, Wei W, Liu LB, Xu MH, Guo ZY, Li W, Jiang B, Wu YL: Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 29. 649-55 (2012)
- 19 Gil Del Valle L: Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomed. Aging Pathol.* 1. 1–7 (2011)
- 20 Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci PG: Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* 122. 221-33 (2005)
- 21 Guohua Y, Jin W, Jingguo Z, Xiaolan G, Minghui Y: Apoptosis of human hepatoma cells induced by *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*. Volume 5. Number 3. 173-177 (2006)
- 22 Hampton MB, Orrenius S: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414. 552-6 (1997)
- 23 Hayat, M.A.: *Tumors of the Central Nervous System*. Volume 1. p. 3. Springer Science + Business Media B.V. 2011
- 24 Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK: Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int. J. Mol. Sci.* 12. 7114-62 (2011)
- 25 Hsu HY, Yang JS, Lu KW, Yu CS, Chou ST, Lin JJ, Chen YY, Lin ML, Chueh FS, Chen SS, Chung JG: An experimental study on the antileukemia effects of gypenosides in vitro and in vivo. *Integr. Cancer Ther.* 10. 101-12 (2011)
- 26 Huang WC, Kuo ML, Li ML, Yang RC, Liou CJ, Shen JJ: Extract of *Gynostemma pentaphyllum* enhanced the production of antibodies and cytokines in mice. *Yakugaku Zasshi.* 127. 889-896 (2007)

- 27 Huyen VT, Phan DV, Thang P, Hoa NK, Ostenson CG: Antidiabetic effect of *Gynostemma pentaphyllum* tea in randomly assigned type 2 diabetic patients. *Horm. Metab. Res.* 42. 353–357 (2010)
- 28 Jones SA, O'donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 271. H1626–H1634 (1996)
- 29 Kao TH, Huang SC, Inbaraj BS, Chen BH: Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) makino by liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 626. 200-11 (2008)
- 30 Katsuyama M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C: Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50. 9-22 (2012)
- 31 Kono Y: Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 186. 189-95 (1978)
- 32 La Cour B, Molgaard P, Yi Z: Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *J. Ethnopharmacol.* 46. 125-129 (1995)
- 33 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227. 680-5 (1970)
- 34 Li L, Jiao L, Lau BH: Protective effect of gypenosides against oxidative stress in phagocytes, vascular endothelial cells and liver microsomes. *Cancer Biother.* 8. 263-72 (1993)
- 35 Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW: The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60. 3927-39 (2000)
- 36 Lin JJ, Hsu HY, Yang JS, Lu KW, Wu RS, Wu KC, Lai TY, Chen PY, Ma CY, Wood WG, Chung JG: Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo using a HL-60 cells murine xenograft model. *Phytomedicine.* 18. 1075-85 (2011)
- 37 Liou GY, Storz P: Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44. 479-96 (2010)
- 38 Liu SB, Lin R, Hu ZH: Histochemical localization of ginsenosides in *Gynostemma pentaphyllum* and the content changes of total gypenosides. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 38. 54-60 (2005)

- 39 López-Lázaro M: A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol. Med.* 16. 144-53 (2010)
- 40 López-Lázaro M: Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* 252. 1-8. (2007)
- 41 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-75 (1951)
- 42 Mao Y, Song G, Cai Q, Liu M, Luo H, Shi M, Ouyang G, Bao S: Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gastric carcinoma MGC803 cells. *Cell. Biol. Int.* 30. 332-7 (2006)
- 43 Marnett LJ: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21. 361-70 (2000).
- 44 Mason WP, Cairncross JG: The expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas. *Neurology.* 71. 365-73 (2008)
- 45 McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244. 6049-55 (1969)
- 46 McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr: Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu. Rev. Nutr.* 25. 261-95 (2005)
- 47 Megalli S, Davies NM, Roufogalis BD: Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9. 281-91 (2006)
- 48 Müller C, Gardemann A, Keilhoff G, Peter D, Wiswedel I, Schild L: Prevention of free fatty acid-induced lipid accumulation, oxidative stress, and cell death in primary hepatocyte cultures by a *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine.* 19. 395-401(2012)
- 49 Norberg A, Hoa NK, Liepinsh E, Van Phan D, Thuan ND, Jörnvall H, Sillard R, Ostenson CG: A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Biol. Chem.* 279. 41361-7 (2004)
- 50 Oberley LW: Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.* 59. 143-8 (2005)
- 51 Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T: Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol. Res. Int.* 878425 (2012)
- 52 Ough M, Lewis A, Zhang Y, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ: Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. *Free Radic. Res.* 38. 1223-33 (2004)

- 53 Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R: Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol.* 3. 279–296 (2011)
- 54 Reardon DA, Wen PY: Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist.* 11. 152-64 (2006)
- 55 Rhee SG: Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 312. 1882-3 (2006)
- 56 Reth M: Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* 3. 1129-34 (2002)
- 57 Robbins D, Zhao Y: Oxidative Stress Induced by MnSOD-p53 Interaction: Pro- or Anti-Tumorigenic? *J. Signal Transduct.* 101465 (2012)
- 58 Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D: The anti-gastric ulcer effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Phytomedicine* Volume 11. Issue 5. 431–435 (2004)
- 59 Schafer FQ, Buettner GR: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30. 1191-212 (2001)
- 60 Schägger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166. 368-79 (1987)
- 61 Schlegel U: *Klinische Neurologie.* pp. 688-90. P. Berlit (Hrsg.), Springer- Verlag Berlin. Heidelberg 2011
- 62 Schild L, Roth A, Keilhoff G, Gardemann A, Brödemann R: Protection of hippocampal slices against hypoxia/hypoglycemia injury by a *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine* 16. 734-43 (2009)
- 63 Schild L, Chen BH, Makarov P, Kattengell K, Heinitz K, Keilhoff G: Selective induction of apoptosis in glioma tumour cells by a *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine* 17. 589-97 (2010)
- 64 Schild L, Cotte T, Keilhoff G, Brödemann R: Preconditioning of brain slices against hypoxia induced injury by a *Gynostemma pentaphyllum* extract - Stimulation of anti-oxidative enzyme expression. *Phytomedicine* 19. 812-8 (2012)
- 65 Strauss GH: Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res.* 252. 1-15 (1991)

- 66 Tanner MA, Bu X, Steimle JA, Myers PR: The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. *Nitric Oxide*. 3. 359-365 (1999)
- 67 Thannickal VJ, Fanburg BL: Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J. Biol. Chem.* 270. 30334-8 (1995)
- 68 Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76. 4350-4 (1979)
- 69 Turner JL, Cidlowski JA: *Encyclopedia of stress*. Volume 1. pp. 244-248, Elsevier Inc. (2007)
- 70 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39. 44-84 (2007)
- 71 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160. 1-40 (2006)
- 72 Veal EA, Day AM, Morgan BA: Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell.* 26. 1-14 (2007)
- 73 Venkataraman S, Jiang X, Weydert C, Zhang Y, Zhang HJ, Goswami PC, Ritchie JM, Oberley LW, Buettner GR: Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene*. 24. 77-89 (2005)
- 74 Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR: Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol.* 24. 512-517 (2003)
- 75 Wang P, Niu L, Gao L, Li WX, Jia D, Wang XL, Gao GD: Neuroprotective effect of gypenosides against oxidative injury in the substantia nigra of a mouse model of Parkinson's disease. *J. Int. Med. Res.* 38. 1084-92 (2010)
- 76 Wang QF, Chiang CW, Wu CC, Cheng CC, Hsieh SJ, Chen JC, Hsieh YC, Hsu SL: Gypenosides induce apoptosis in human hepatoma Huh-7 cells through a calcium/reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. *Planta Med.* 73. 535-44 (2007)
- 77 Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK: Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene*. 14. 481-90 (1997)

## Anhang: Material

### Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bio Rad Standard low	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Bisacrylamid	Plus One, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cytochrom c	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein-diacetat (DCFH-DA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutathion	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Glycerol	Plus One, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Herbasin (Shenyang) Co., Ltd., China
20X LumiGLO® Reagent	Cell Signaling Technology/New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O))	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver (3 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
20X Peroxide	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Poly-D-Lysin	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tertiäres Butylhydroperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris buffered saline (TBS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	PAA, Cölbe, Deutschland
Tween 20	Plus One, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Xanthin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Xanthinoxidase	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

## Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Bio Tec Analyze Transluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
Blott-Kammer	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hannover, Deutschland
Cary 100 UV-Vis-Spektrometer	Varian, Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager, Zeiss, Jena, Deutschland
Fotokamera	Amersham/GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Gießkammer	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland...
Inversionsmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Luminescence Spectrometer LS 50B	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
pH-Messgerät	WTW, Weilheim, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hannover, Deutschland

## Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorfgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	Bio Rad, Kanada
Fotopapier	FujiFilm, FP-3000B, Japan
Gewebekulturflaschen (20 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen (35x10 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glioblastom, WHO Grad IV, MRT T1-Wichtung mit KM (Schlegel 2011).....	1
Abbildung 2: Entstehungswege reaktiver Sauerstoffspezies .....	3
Abbildung 3: <i>Gynostemma pentaphyllum</i> .....	8
Abbildung 4: Charakterisierung des ethanolischen Extraktes von <i>G. pentaphyllum</i> .....	10
Abbildung 5: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Proliferation von C6-Gliomazellen.....	27
Abbildung 6: a: Darstellung einer lebenden C6-Gliomazelle, b: Darstellung einer apoptotischen C6-Gliomazelle .....	28
Abbildung 7: Fotografie der mit <i>G. pentaphyllum</i> versetzten C6-Gliomazellen und der Kontrollzellen.....	29
Abbildung 8: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Vitalität und Caspase 3-Aktivität der C6- Gliomazellen .....	31
Abbildung 9: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Vitalität der C6-Gliomazellen .....	32
Abbildung 10: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf den zellulären Wasserstoffperoxid-Gehalt. 34	
Abbildung 11: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf die Superoxiddismutase-Gesamtaktivität ..	36
Abbildung 12: Western Blot a Beta-Aktin, b Mn-SOD.....	37
Abbildung 13: Einfluss von <i>G. pentaphyllum</i> auf den Mn-SOD-Gehalt der C6-Gliomazellen..	38
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Wirkung von <i>G. pentaphyllum</i> auf den zellulären Radikalstoffwechsel und das zelluläre Schicksal. a Zellulärer Radikalstoffwechsel und zelluläres Schicksal ohne <i>G. pentaphyllum</i> , b mit <i>G. pentaphyllum</i> .....	48
Abbildung 15: Schematische Darstellung der durch <i>G. pentaphyllum</i> veränderten Stoffwechselprozesse in den C6-Gliomazellen.....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gradeinteilung der Hirntumoren.....	2
Tabelle 2: Verdünnungsverhältnisse der Zellsuspensionen entsprechend ihrer Kultivierungszeit und konzentrationsabh. Proliferationsverläufe .....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung der Lösungen zur Proteinbestimmung.....	22
Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels .....	23
Tabelle 5: Ansatz Kathodenpuffer.....	23
Tabelle 6: Ansatz Anodenpuffer.....	23
Tabelle 7: Ansatz Transferpuffer .....	24
Tabelle 8: Im Western Blot verwendete Primärantikörper .....	24

## **Danksagung**

Nach Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in den Laborräumen des Bereiches Pathologische Biochemie und die hilfreichen Diskussionen bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild für seine Anleitung und die hilfsbereite Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, im Besonderen Frau S. Niemann, des Labors des Bereiches Pathologische Biochemie für die Einweisung, Hilfe und Unterstützung bei den laborchemischen Untersuchungen.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Keilhoff aus dem Institut für Biochemie und Zellbiologie und ihrer Mitarbeiterin Frau L. Bück für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Vitalitätsfärbungen (FDA-Assay und Immunhistochemie).

Für die hilfreiche Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild, Frau Dr. I. Wiswedel, K. Hermann und G. Tschiersch bedanken.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zum Einfluss eines *Gynostemma pentaphyllum*-Extraktes auf das Wachstum von Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie“

an dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,

mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. rer. nat. Lorenz Schild

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 22.10.2012

---

Kerstin Heinitz

## Darstellung des Bildungsweges

Name, Vorname	Heinitz, Kerstin
Geburtsdatum	30. Juni 1986
Geburtsort	Bad Belzig
Familienstand	Ledig

### Hochschulstudium

10/2005 bis 10/2011	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
09/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

08/2010 bis 12/2010	Chirurgie - Universitätsklinikum Magdeburg Klinik für Herz-und Thoraxchirurgie Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
12/2010 bis 03/2011	Anästhesie - Universitätsklinikum Magdeburg
03/2011 bis 07/2011	Innere Medizin - Klinikum Schönebeck

### Schulbildung

1998-2005	Fläming Gymnasium, Bad Belzig Abschluss mit Abitur
1992-1998	Grundschule, Wiesenburg

Magdeburg, 22.10.2012

---

Kerstin Heinitz