



MASTERARBEIT

„Einfluss von *trans*-Resveratrol und des
antineoplastischen Wirkstoffes KP-1339 auf den
Energiestoffwechsel in HepG2 Zellen“

Verena Stöger, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich bei der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza für das vorliegende Thema und für die hilfreichen Anregungen.

Mag. Dr. Marc Pignitter danke ich für seine jederzeitigen Hilfestellungen.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Ernährungsphysiologie und physiologische Chemie, vor allem den Dissertanten Annett Riedel, Barbara Rohm, Christina Hochkogler, Kathrin Liszt, Katharina Schüller, Miriam Ehrnhöfer-Reßler, Ann-Katrin Holik.

Zu guter Letzt möchte ich all meinen Unterstützern während des Studiums danken, ganz besonders Christian.

1.	Einleitung	1
1.1.	Der Energiestoffwechsel der Zelle	1
1.2.	Die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette	2
1.3.	Der sekundäre Pflanzenstoff Resveratrol	5
1.4.	Die Wirkung von Resveratrol und <i>Cis</i> -Platin allein und in Co-Inkubation auf den Energiestoffwechsel in Tumorzellen	14
1.5.	Das antineoplastische Zytostatikum KP-1339	16
1.6.	Der Einfluss von KP-1339 allein und in Kombination mit Resveratrol auf die mitochondriale Atmungskette	19
2.	Fragestellung	22
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Materialien	25
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Kultivierungs- und Versuchsbedingungen	29
3.2.2.	Bestimmung der Zytotoxizität des KCl-Puffers mittels MTT	31
3.2.3.	Nachweis von mitochondrialen Membranpotentialänderungen durch den Farbstoff JC-1	32
3.2.4.	Untersuchung antioxidativer Wirkungen mittels DCF	34
3.2.5.	Ermittlung des Energiepotentials aufgrund der Nukleotidkonzentrationen von AMP, ADP und ATP mittels HPLC	35
3.2.6.	Identifizierung von KP-1339 und trans-Resveratrol mittels LC-MS	40
3.2.7.	LC-MS Analyse von L-Laktat	42
3.2.8.	Bestimmung des Einfluss von KP-1339 und trans-Resveratrol auf die Gen-Expression des Entkopplungsproteins UCP2 mittels (RT-qPCR)	44
4.	Statistik	48
4.1.	Auswertung der Zytotoxizität anhand des Farbstoffes MTT	48
4.2.	Auswertung des Membranpotentials in HepG2 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1	48
4.3.	Auswertung der ROS-Produktion in HepG2 Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCFH-DA	48

4.4. Auswertung der Nukleotidkonzentration ADP und ATP	49
4.5. Auswertung der Expression von UCP2	49
5. Ergebnisse	51
5.1. Zytotoxizitätstest mittels MTT	51
5.2. Nachweis einer Adduktbildung von KP-1339 und trans-Resveratrol in KCl-Puffer	52
5.3. Effekt von KP-1339 und trans-Resveratrol auf das mitochondriale Membranpotential	53
5.4. Einfluss von KP-1339 und trans-Resveratrol auf die zelluläre ROS- Produktion	55
5.5. Nachweis der intrazellulären Produktion von Laktat nach Behandlung mit trans-Resveratrol und KP-1339	61
5.6. Auswirkungen von KP-1339 und trans-Resveratrol auf die Gen- Expression von UCP2	57
5.7. Effekt von KP-1339 und trans-Resveratrol auf die Konzentration der Nukleotide ADP und ATP in HepG2 Zellen	59
6. Diskussion	63
7. Schlussbetrachtung	71
8. Zusammenfassung	76
9. Abstract	78
10. Anhang	80
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Literaturverzeichnis	IX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Mitochondriums	3
Abbildung 2: Die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette	4
Abbildung 3: Strukturformel <i>trans</i> -Resveratrol	5
Abbildung 4: Strukturformel KP-1339	17
Abbildung 5: Aufnahme von KP-1339 in Tumorzellen	18
Abbildung 6: Wirkungsmechanismus des Farbstoffes JC1	32
Abbildung 7: Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffes DCFH-DA in den fluoreszierenden Farbstoff DCF durch ROS	34
Abbildung 8: Standardgeraden der Nukleotide AMP, ADP und ATP	38
Abbildung 9: Repräsentatives Chromatogramm der Nukleotiden AMP, ADP, ATP	39
Abbildung 11: Strukturformel von L-Laktat	42
Abbildung 12: Nachweis der Zytotoxizität von KCl-Puffer	51
Abbildung 13: Adduktbildung von KP-1339 und <i>trans</i> -Resveratrol	52
Abbildung 14: Einfluss von <i>trans</i> -Resveratrol und KP-1339 auf das mitochondriale Membranpotential	54
Abbildung 15: Einfluss von <i>trans</i> -Resveratrol und KP-1339 auf ROS-Produktion	56
Abbildung 16: UV-Chromatogramm von Natriumlaktat	62
Abbildung 17: Einfluss von <i>trans</i> -Resveratrol und KP-1339 auf die mitochondriale Expression von <i>UCP2</i>	58
Abbildung 18: Einfluss von KP-1339 und <i>trans</i> -Resveratrol auf ATP: ADP	60
Abbildung 19: Aufnahme von <i>trans</i> -Resveratrol alleine und in Kombination mit KP-1339 in HepG2 Zellen	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Quellen von Resveratrol	7
Tabelle 2: Aufnahmemengen und mittlere maximale Plasmapeak von Resveratrol	10
Tabelle 3: Bedingungen der HPLC-Methode	36
Tabelle 4: Gradientenverlauf von Acetonitril und KH_2PO_4 -Puffer	36
Tabelle 5: Aufarbeitungsschritte des Zellextraktes	37
Tabelle 6: Einstellungen der LC-MS zur Identifizierung der Substanzen	41
Tabelle 7: Bedingungen der LC-MS Methode	43
Tabelle 8: PCR-Bedingungen zur Umschreibung in cDNA	47
Tabelle 9: PCR-Bedingungen zur Vervielfältigung von PPIA / UCP2	47
Tabelle 10: Gegenüberstellung der Effekte von KP-1339 und <i>trans</i> -Resveratrol auf die Depolarisierung der mitochondrialen Membran	54
Tabelle 11: Gegenüberstellung der Depolarisierung von KP-1339 und <i>trans</i> - Resveratrol	55
Tabelle 12: Gegenüberstellung des prozentualen Gehaltes an ROS von <i>trans</i> - Resveratrol und KP-1339	56
Tabelle 13: Gegenüberstellung des prozentualen Gehaltes an ROS von <i>trans</i> - Resveratrol und KP-1339	57
Tabelle 14: Expression des Proteins UCP2	59
Tabelle 15: Darstellung des Verhältnis von ATP zu ADP	60
Tabelle 16: Darstellung des Verhältnis von ATP zu ADP	60

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BAG4	BAG family molecular chaperone regulator 4
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
cDNA	complementary DNA
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCFH-DA	2',7' Dichlorofluorescein Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPIC-Studie	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FADH₂	Flavin Adenin Dinukleotid
GRP78	Glucose Regulated Protein
HepG2	Hepatocellular carcinoma
JC1,	5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolylcarbocyanin iodid
KCl	Kaliumchlorid
KP-1339	Keppler-1339
LC-MS	Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie
LDH	Laktatdehydrogenase
MEM	Minimal Essential Media
MM	Mastermix
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na₂CO₃	Natriumkarbonat
NAC	N-Acetylcystein
NAD⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A (cyclophilin A)
PREDIMED-Studie	Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SIM	Selective Ion Mode
SOD	Superoxiddismutase
SPE-Säule	Solid Phase Extraction – Säule
TBAHS	Tetrabutylammonium hydrogen sulfat
t-BOOH	Tert-butyl hydroperoxid
tdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
UCP2	Uncoupling Protein 2
UHPLC	Ultra-Hochdruckflüssigchromatographie
UV-Strahlung	Ultraviolette-Strahlung

1. Einleitung

1.1. Der Energiestoffwechsel der Zelle

Der menschliche Körper muss zur Erhaltung seiner Funktionen regelmäßig Energie in Form von Kohlenhydraten, Proteinen und Fett aufnehmen. Spezielle biochemische Prozesse in den Zellen verstoffwechseln diese Hauptnährstoffe, sodass die dabei freiwerdende Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert wird. Kohlenhydrate werden im Rahmen der sogenannten Glykolyse verstoffwechselt. Hier wird durch Abbau von Glukose im Zytosol zu Pyruvat unter aeroben Bedingungen in einer nachfolgenden Reaktion mit Hilfe des Enzyms Pyruvatdehydrogenase Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und 1 Molekül Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) gebildet. Das entstandene Acetyl-CoA tritt anschließend in den Citratzyklus ein und wird vollständig zu 2 Molekülen Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert, wobei wieder 3 Moleküle NADH entstehen sowie 1 Molekül Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2). In der Atmungskette, die in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist, erfolgt unter Verbrauch von Sauerstoff die Reoxidation von NADH zu NAD^+ . Im anaeroben Milieu werden Kohlenhydrate in der Glykolyse ebenso zu Pyruvat abgebaut, jedoch anschließend durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat und ATP verstoffwechselt. Der aerobe Abbau bringt eine höhere Energieausbeute von 30 mol ATP pro Molekül Glukose; im Vergleich dazu liefert der Abbau zu Laktat eine geringe Menge von 2 mol ATP pro Molekül Glukose.

Die Aufnahme von Fett stellt für Zellen eine weitere Energiequelle dar. Im Stoffwechsel wird Fett durch Lipasen zu Fettsäuren gespalten. Durch die Übertragung der Fettsäuren auf Coenzym A erfolgt eine Aktivierung. Die aktivierten Fettsäuren werden anschließend auf Carnitin übertragen und so in die Mitochondrien transportiert. Im Mitochondrium sind alle Enzyme, die für die weitere Verstoffwechselung, die β -Oxidation, benötigt werden bereitgestellt. Fettsäuren werden in dieser weiteren Reaktion zu Acetyl-CoA abge-

baut. Im Citratzyklus wird durch den Abbau von Acetyl-CoA 1 Molekül FADH_2 und 1 Molekül NADH frei. FADH_2 und NADH werden durch Übertragung ihrer Elektronen in die mitochondriale Atmungskette wiederum zur Synthese von ATP verwendet. Für den Abbau von Proteinen bedarf es keiner neuen Stoffwechselreaktionen. Durch Pepitdase werden Proteine enzymatisch in ihre Aminosäuren aufgespalten. Anschließende Transaminierungs- oder Desaminierungsreaktionen führen dazu, dass das Kohlenstoffgerüst der Aminosäure zurückbleibt. Das Kohlenstoffgerüst wird zu einem des Citratzyklus abgebaut und ist dadurch wiederum ein Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette wo es zu CO_2 endoxidiert wird.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Zelle Kohlenhydrate, Fette und Proteine oxidiert, wodurch Elektronen freigesetzt und in Form der Reduktionsäquivalente NADH_2 und FADH_2 verwendet werden. Die drei Hauptnährstoffe werden über verschiedene Stoffwechselwege zu Acetyl-CoA abgebaut, wobei die Reduktionsäquivalente NADH und $\text{FADH}^+ + \text{H}^+$ freigesetzt werden. Durch Übertragung der Elektronen dieser beiden Reduktionsäquivalente und nachfolgender e^- -Transport in der Atmungskette, wird ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, der die Energie zur Synthese von ATP bereitstellt [Löffler & Petrides, 2003].

1.2. Die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette

Die Atmungskette ist ein wichtiger Mechanismus zur Synthese von Energie und befindet sich in der inneren Membran des Mitochondriums. Dieses Organell wird oft als „Kraftwerk der Zelle“ bezeichnet und besteht – wie in Abbildung 1 ersichtlich ist – aus einem Intermembranraum, einem Matrixraum sowie einer äußeren und inneren Membran. Über Letzterer erfolgt die Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung.

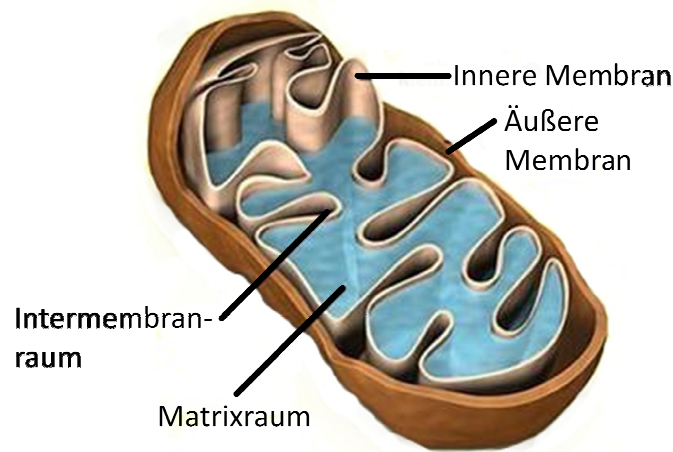


Abbildung 1: Aufbau eines Mitochondriums

Im Detail ist die Atmungskette eine Abfolge von Redoxsystemen und besteht aus fünf Enzymkomplexen. Komplex I, auch NADH: Ubichinon-Oxidoreductase genannt, überträgt Elektronen des Reduktionsäquivalents NADH, das vor allem im Citratzyklus, in der β -Oxidation und durch die Pyruvatdehydrogenase entsteht. Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreductase) überträgt Elektronen von FADH_2 . Die Elektronen der Reduktionsäquivalente werden jeweils auf Ubichinon übertragen, das dadurch zu Ubihydrochinon reduziert wird. Die Reoxidation zum Ubichinon erfolgt ausschließlich über Komplex III, der auch als Ubihydrochinon: Cytochrom c-Oxidoreductase bezeichnet wird. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, befindet sich zwischen Komplex III und IV Cytochrom C, ein kleines Protein das zur Elektronenübertragung zwischen diesen beiden Komplexen dient. Cytochrom c-Oxidase bildet Komplex IV und überträgt Elektronen von Cytochrom C auf Sauerstoff. Die schrittweise Übertragung der Elektronen auf die Komplexe I, III und IV führt zur Bildung eines Protonengradienten. Die freiwerdende Energie aus den Redoxreaktionen ermöglicht ein Pumpen der Protonen über die innere Mitochondrienmembran, wodurch ein elektrochemischer Gradient gebildet wird. Dieser elektrochemische Gradient wird auch als Membrangradient bezeichnet. Der Gradient speichert die Energie bis diese am Ende der Atmungskette durch den Enzymkomplex F_1/F_0 -ATP-Synthase (Komplex V) zur Bildung von ATP verwendet wird. Der Enzymkomplex V besteht aus einem membranständigen F_0 -Teil, durch den die

Protonen aus dem Intermembranraum in den Matrixraum transportiert werden. Der F₁-Teil ist im Matrixraum lokalisiert und enthält Bindungsstellen für die Nukleotide. Der Protonengradient führt zu einer Drehbewegung im F₀-Teil. Diese Rotation wird vom F₁-Teil zur Synthese von ATP genützt.

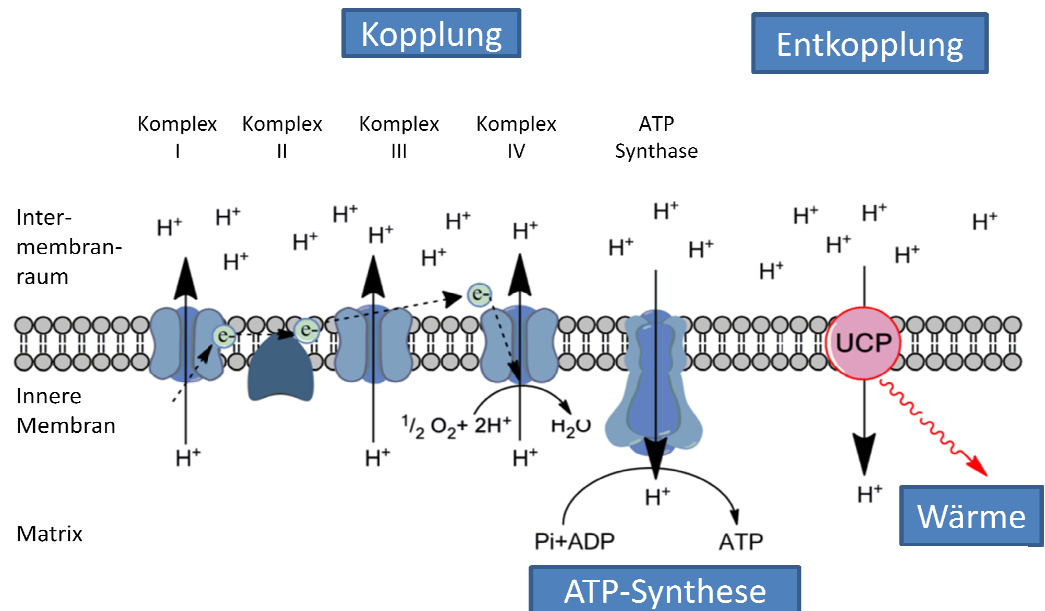


Abbildung 2: Die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette
modifiziert nach Riedel et al., 2012

Wie in Abbildung 2 ersichtlich ist, befindet sich neben den Enzymkomplexen auch das membranständige Entkopplungsprotein UCP2. Dieses Protein transportiert Protonen und verringert so den Protonengradienten, der zur Synthese von ATP verwendet wird. Die so erfolgte Entkopplung verringert den elektrochemischen Gradienten. Die hier freigewordene Wärme wird im Körper zur Thermogenese herangezogen [Löffler & Petrides, 2003].

Aufgrund der zentralen Stellung des Energiestoffwechsels in Zellen wurden bereits mehrere Substanzen auf ihren Einfluss auf die mitochondriale Aktivität untersucht. So führt die Behandlung mit Naturstoffen wie zum Beispiel die Flavonoide Quercetin und Galangin nach einer 15-minütigen Inkubation, von Mitochondrien isoliert aus Gehirnzellen der Ratte, zu einer Abnahme

der ATP Konzentration zwischen 10 % und 40 %. Quercetin und Galangin wurden in den Konzentration 25 μM und 52 μM eingesetzt [Dorta et al., 2005]. Die mitochondriale Atmungskette wird auch von Glaucarubinon, ein Stoff der aus Bittereschengewächsen extrahiert wird, beeinflusst. Eine zweektägige Behandlung des Wurms *C. elegans* mit 10 nM Glaucarubinon führte zu einem 20 % höheren Sauerstoffverbrauch [Zarse et al., 2010]. Einen Einfluss auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel zeigt auch das Polyphenol Resveratrol. Dieser sekundäre Pflanzenstoff induziert eine Depolarisierung des mitochondrialen Membrangradienten in Zellen des uvealen Melanoms. Hier war eine Konzentration von 10 μM Resveratrol ausreichend, um eine über 90 % ige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials aufzuzeigen [van Ginkel et al., 2008].

1.3. Der sekundäre Pflanzenstoff Resveratrol

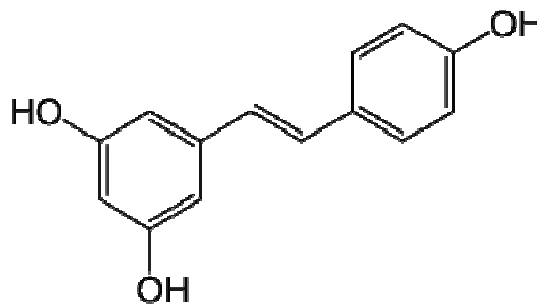


Abbildung 3: Strukturformel *trans*-Resveratrol

Strukturell sind sekundäre Pflanzenstoffe der Gruppe der Polyphenole zuzuordnen, das heißt sie besitzen zumindest zwei Phenolringe. Darüber hinaus gehört die Struktur zu den aromatischen Verbindungen und enthält eine oder mehrere Hydroxylgruppen. Neben Resveratrol zählen auch andere sekundäre Pflanzenstoffe, wie die Farbstoffe Flavonoide und Anthocyane sowie manche Geschmackstoffe und Tannine. Strukturell gesehen ist Resveratrol ein Stilbenderivat. Dies bedeutet, dass eine ungesättigte Kohlenwasserstoffkette Bestandteil des Polyphenolgerüsts ist (siehe Abbildung 3).

Stilbenderivate treten sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Konformation auf. Resveratrol hat ein Molekulargewicht von 228,25 g/mol und wird durch UV-Strahlung von *trans*-Resveratrol in die *cis*-Form umgewandelt, welche weniger stabil ist. In Zellversuchen empfiehlt es sich daher Resveratrol vor Sonnenlicht zu schützen sowie jeweils eine frische Stammlösung anzusetzen [Prokop et al., 2006].

Resveratrol konnte erstmals in der Pflanze *Veratrum grandiflorum* nachgewiesen werden [Langcake et al., 1997]. Später erfolgte der Nachweis dieses Stoffes noch in anderen Pflanzen wie Sojabohnen, Erdnüssen und dem japanischen Staudenknöterich [Nonomura et al., 1963 und Burn et al., 2002]. Besonders hohe Konzentrationen wurden jedoch in Rotwein mit einem Gehalt von bis zu 12 mg/L nachgewiesen [Dourtoglou et al., 1999]. Aber auch andere Lebensmittel sind gute Quellen für Resveratrol, siehe Tabelle 1. Resveratrol hat in Pflanzen eine Schutzfunktion. Nach Angriff von Parasiten und Pilzen wird *trans*-Resveratrol von der Pflanze synthetisiert. Diese Eigenheit erlaubt die Zuordnung von Resveratrol zu den *Phytoalexinen*. Letztere sind Stoffe, die einen weiteren Befall bzw. eine Ausbreitung des mikrobiellen Angriffes verhindern oder reduzieren können [Hopkins, 2003]. Resveratrol, das mit Hilfe des Enzyms Stilbensynthase gebildet wird, ist bereits 24 Stunden nach Infektion in der Pflanze nachzuweisen [Hopkins, 2003]. Neben Resveratrol zählen unter anderem auch Flavonoide, Terpene und Isoflavone zu den Phytoalexinen.

Tabelle 1: Quellen von Resveratrol [nach Übersicht bei Zamora-Ros et al., 2008]

<i>Pflanze</i>	<i>mittlere trans- Resveratrolkonzentration [mg/100 g Frischmasse]</i>	<i>Referenz</i>
Weintrauben, rot	0,250	Cantos et al., 2002
Rotwein	0,181	Lamuela-Raventós et al., 1995
Weintrauben, weiß	0,068	Cantos et al., 2002
Beeren (Blau-, Preiselbeere, Cranberry)	0,008	Rimando et al., 2004
Pistazien, geröstet	0,007	Tokusoglu et al., 2005
Erdnüsse, geröstet	0,006	Sobolev & Cole, 1999

Eine unmittelbare Bildung von Resveratrol in der Pflanze erfolgt auch durch Einwirkung von Schwermetallen, bei Gewebeverletzungen, bei Temperaturschocks und durch UV-Einstrahlungen [Langcake und Pryce, 1977; Roggero & Carciaparrilla, 1995]. UV-Strahlung ist für die Pflanze besonders wichtig, da sie damit Energie produziert. Im Photosyntheseapparat erfolgt die Umwandlung bzw. Speicherung von Lichtenergie in Phosphatverbindungen. Diese Reaktion wird durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begleitet. Im Rahmen der antioxidativen Wirkung von Resveratrol reagieren ROS mit den Hydroxylgruppen des Polyphenols, wodurch ROS neutralisiert werden und die Pflanze so vor radikalischen Reaktionen geschützt wird.

Der Gehalt an Resveratrol in Rotwein wird im Zusammenhang mit einem geringeren Risiko von Herz-Kreislauf Erkrankungen in Frankreich, im Vergleich zu anderen europäischen Ländern diskutiert. Das Phänomen, dass in Frankreich trotz erhöhter Aufnahme an gesättigten Fettsäuren kein erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen besteht, wird als *French Paradox* bezeichnet [Renaud & de Lorgeril, 1992]. Für Resveratrol wurde bereits

mehrmals seine antikanzerogene, antiatherosklerotische, antioxidative und chemopreventive Wirkung beschrieben [Übersicht bei Wenzel & Somoza, 2005 und Cottart et al., 2013].

Die Humanstudie von Almeida et al. (2009) beschreibt die Pharmakokinetik von *trans*-Resveratrol in einer doppel-blinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Studie mit zehn Probanden [Almeida et al., 2009]. Zwei Studienteilnehmer nahmen ein Placebo ein. Weitere acht Probanden wurde sechs Mal am Tag oral eine Menge von 25, 50, 100 oder 150 mg *trans*-Resveratrol in Form von Kapseln verabreicht. Im Zeitraum von 8 Minuten und 1,5 Stunden nach Aufnahme von *trans*-Resveratrol wurden die höchsten Konzentrationen dieses sekundären Pflanzenstoffes im Plasma, mit 0,02 μ M bis 0,28 μ M detektiert [Almeida et al., 2009].

Aufgrund der relativ geringen Bioverfügbarkeit von Resveratrol wurden in dieser Masterarbeit für *in vitro* Versuche Konzentrationen des sekundären Pflanzenstoffes eingesetzt, die nach der Aufnahme von 150 mg bis 5 g Resveratrol im Plasma nachweisbar sind. Für die Auswahl des Konzentrationsbereiches wurde neben der Studie von Almeida et al. (2009) auch die Humanstudien von Boocock et al., und Burkon & Somoza herangezogen [Boocock et al., 2007, Burkon & Somoza, 2008 und Almeida et al., 2009]. In der Arbeit von Boocock et al. wurde Resveratrol in einer klinischen Studie der Phase I getestet. Hierzu nahmen zehn gesunde Probanden einmalig eine Menge von 1 g oder 2,5 g bis höchstens 5 g Resveratrol ein. Die Verabreichung erfolgte durch Tabletten, die jeweils 500 mg *trans*-Resveratrol enthielten. Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitintervallen von 17 Minuten bis 24 Stunden gesammelt. Darüber hinaus erfolgte die Entnahme von Urinproben im Zeitraum von 0 bis 24 Uhr alle vier Stunden. Mit einer HPLC-Methode wurde *trans*-Resveratrol und sechs seiner konjugierten Metabolite quantitativ in Plasmaproben erfasst: Monosulfat, Disulfat, zwei Monoglukuronide und zwei glukuronisierte Sulfate. Die Daten zeigten die höchsten Konzentrationen nach ungefähr 90 Minuten nach Einnahme von 5 g Resve-

ratrol. Die Plasmakonzentrationen nach Aufnahmemengen zwischen 1 g und 5 g bewegten sich zwischen 0,04 μM bis 0,23 μM für Resveratrol-Glukuronide und 0,34 μM bis 2,4 μM für Resveratrol-Sulfate. Die Studie zeigt, dass eine sulfatierte Form (Resveratrol-3-sulfat) im Plasma quantitativ dominierend ist [Boocock et al., 2007]. Welche Konjugate im Körper gebildet werden, wurde in der Studie von Burkon & Somoza aus dem Jahre 2008 detailliert untersucht. In dieser Humanstudie wurde neun Probanden Piceid, die glykosidische Form von Resveratrol, in Form eines Bolus von 85,5 mg Piceid pro 70 kg Körpergewicht appliziert. Die verabreichte Menge an Resveratrol entspricht der in zwei Flaschen Rotwein. Die Konzentrationen der verschiedenen Metabolite wurden sowohl im Plasma als auch im Urin untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sechs bis acht Stunden nach Piceidverabreichung *trans*-Resveratrol-3,5-disulfat mit $1,6 \pm 0,28 \mu\text{M}$ im Plasma die höchste Konzentration aller sulfatierten Metaboliten aufwies. Für die glukuronierten Stoffwechselprodukte wurde der Maximumpeak sechs Stunden nach Verabreichung für *trans*-Resveratrol-diglukuronide im Ausmaß von $0,88 \pm 0,22 \mu\text{M}$ detektiert [Burkon & Somoza, 2008]. Piceid und *trans*-Resveratrol-Aglykone konnten nicht detektiert werden, was auf eine nahezu vollständige Metabolisierung deutet [Burkon & Somoza, 2008]. Zusätzlich zur Metabolisierung wird eine zelluläre Dekonjugation von Resveratrol diskutiert, weshalb in dieser Masterarbeit die freie Form *trans*-Resveratrol verwendet wurde [Menendez et al., 2011]. Die Arbeit von Somoza & Burkon zeigte weiterhin, dass 50 % der verabreichten Dosis Resveratrol nicht-kovalent an Plasmaproteine gebunden vorliegt [Burkon & Somoza, 2005].

Bisherige Humanstudien zeigten eine geringe Bioverfügbarkeit von Resveratrol sowie dessen ausgeprägte Metabolisierung auf.

Tabelle 2: Aufnahmemengen und mittlere maximale Plasmapeak von Resveratrol

Aufnahme menge	Mittlere maximale Plasmakonzentration [μM]	Detektion erfolgte nach [h]	Referenz
5 g t-Resveratrol	0,23 Resveratrol- Glukuronide	1,5	Boocock et al., 2007
85,5 mg Piceid	2,40 Resveratrol-Sulfate 1,6 $\pm$ 0,28 t-Resveratrol- 3,5-disulfat	8	Burkon & Somoza, 2008
150 mg t-Resveratrol	0,88 $\pm$ 0,22 t-Resveratrol- diglukuronide 0,28 t-Resveratrol	6 1,5	Almeida et al., 2009

Derzeit gibt es ausreichend Evidenz, dass Resveratrol den Energiestoffwechsel beeinflusst. Hinsichtlich der Wirkung von Resveratrol auf die mitochondrialen Atmung liegen unterschiedliche Arbeiten vor, in denen Resveratrol sowohl eine Stimulierung als auch eine Inhibierung induzierte [Übersicht bei Pignitter & Somoza, 2012]. So wurde in einer Tierstudie mit 8 bis 12 Wochen alten Wistar Ratten der Einfluss von *trans*-Resveratrol auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette untersucht. Die Versuchstiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Zur Analyse der Komplex I Aktivität wurden die Mitochondrien unmittelbar nach Tötung der Tiere aus der Leber isoliert. Die anschließende Behandlung der Mitochondrien erfolgte durch Zugabe von 100 μM NADH, dessen Elektronen durch NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase auf Ubichinon übertragen werden. Die Bestimmung der Aktivität der Elektronenübertragung basierte auf der Hemmung von Komplex I mittels 1 μM Rotenon. Nach Behandlung mit 25 μM Resveratrol zeigte sich nach 4 Minuten eine Einschränkung der Aktivität von Komplex I um 73 % bei männlichen Versuchstieren und 100 % bei weiblichen Ratten [Moreira et al., 2013]. Obwohl die Verabreichung von 25 μM Resveratrol den Elektronentransport an Komplex I einschränkten, führte die Behandlung am Ende zu keiner Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenti-

als, weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Versuchstieren [Moreira et al., 2013]. Der Einfluss von Resveratrol auf den Energiestoffwechsel konnte bereits in der Humanstudie von Timmers et al. aufgezeigt [Timmers et al., 2011]. Nach einer vier wöchigen Auswaschphase nahmen 11 adipöse Männer 150 mg/Tag Resveratrol für 30 Tage ein. Zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung erfolgten anschließend eine Biopsie des Oberschenkelmuskels *vastus lateralis* sowie eine Isolierung der Mitochondrien aus den Gewebeproben. Mithilfe der Microarray-Methode konnte aufgezeigt werden, dass die Expression von Genen, die mit mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung assoziiert werden, anstieg. Weiterhin führte Resveratrol bei den Probanden zu einer 10 % igen Zunahme der Citrat-Synthase, wodurch vermehrt NADH freigesetzt wird. Durch die vermehrte Freisetzung dieses Reduktionsäquivalents werden auch vermehrt Elektronen an die mitochondrialen Atmungskette abgegeben. Bei Zugabe von Elektronen über Malat, Octanoyl-Carnitin und Glutamat steigt die Aktivität der Komplexe I und II um 10 % [Timmers et al., 2011]. Resveratrol beeinflusst die mitochondriale Atmung durch die Erhöhung des Elektronentransports an Komplex II; diese Beobachtung stellte auch die Arbeitsgruppe um Bernhard et al. fest [Bernhard et al., 2003]. Resveratrol kann in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 5 – 20 μM nicht nur auf Komplex II einwirken, sondern auch auf die Freisetzung des Proteins Cytochrom C. Dieses Protein überträgt Elektronen zwischen Komplex III und Komplex IV [Löffler & Petrides, 2003]. Die Untersuchung von isolierten Mitochondrien aus dem Vorderhirn von Ratten zeigte einen Anstieg der Cytochrom C Freisetzung von 220 ng/mg Mitochondrium auf 340 ng/mg Mitochondrium nach einer 5-minütigen Inkubation von 10 mM Resveratrol. Die Mitochondrien wurden vor Zugabe von Resveratrol in ein „anoxia-reoxygenation“ Modell überführt. Das bedeutet, dass sich das Organell 5 Minuten im anaeroben Milieu befand und anschließend mittels Atmungspuffer eine Regenerationsphase eingeleitet wurde. Resveratrol wurde vor der Regeneration 5 Minuten lang hinzugegeben [Zini et al., 2002]. Diese Studie belegt, dass Resveratrol zu einer Zunahme der Freisetzung von Cytochrom C führt, dies bedeutet ein

vermehrter Elektronentransport zwischen Komplex III und IV. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wäre hier interessant gewesen um nachzuweisen, ob Resveratrol zu einer Depolarisierung führt.

Komplex V der Atmungskette bildet das Enzym ATP-Synthase, das aus einem F_1 sowie F_0 -Teil besteht. Die Aktivität dieses F_0 -Teils lässt sich durch das Antibiotikum Oligomycin hemmen [Löffler & Petrides, 2003]. Zheng & Ramirez (2000) zeigten anhand isolierter Mitochondrien aus Sprague-Dawley Ratten, dass die Behandlung mit 7 $\mu\text{g/mL}$ Oligomycin zu einer Einschränkung der Aktivität der F_0 - F_1 -ATP-Synthase auf 16,1 % führt. Die Kombination von 7 $\mu\text{g/mL}$ Oligomycin und 21 μM Resveratrol zeigen eine weitere Reduktion der Aktivität des Komplexes V auf 15,8 % [Zheng & Ramirez, 2000]. Daraus kann gefolgert werden, dass Resveratrol zur Inhibierung des F_0 - F_1 -ATP-Synthase führt und die Aktivität dieses Komplexes über den F_0 -Teil einschränkt [Zheng & Ramirez, 2000]. Dieses Resultat stimmt auch mit den Ergebnissen von Szkudelska et al. (2009) überein. Diese Autoren erbrachten den Nachweis, dass eine Behandlung von Adipozyten der Ratte mit hohen Konzentrationen Resveratrol (62,5 μM , 125 μM und 250 μM) zu einer Abnahme der ATP Konzentrationen führte [Szkudelska et al., 2009]. Auch eine Inkubation von Adipozyten der Ratte mit niedrigeren Resveratrol-Konzentrationen von 6,25 μM bis 50 μM führten zu einer Abnahme der ATP Konzentration sowie zu einer Senkung des mitochondrialen Membranpotentials innerhalb weniger Minuten [Szkudelska et al., 2011].

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer Einschränkung des Protonengradienten führen kann, basiert auf einer erhöhten Expression des Entkopplungsproteins UCP2 [Andrews et al., 2005]. Resveratrol induziert die Expression des Gens *UCP2*. Diese Tatsache konnte in einer Tierstudie mit 8 Wochen alten Wistar Ratten belegt werden. Zur Untersuchung wurden die Ratten in 3 Gruppen mit jeweils 12 Tieren eingeteilt, wobei das durchschnittliche Gewicht eines Tieres 250 g betrug. Die Kontrollgruppe erhielt Standardnahrung (20 % Protein / 70 % Kohlenhydrate / 10 % Fett). Eine zweite Gruppe

bekam einen erhöhten Anteil an Fett (20 % / 20 % / 60 %). Eine dritte Gruppe erhielt dieselbe Nahrungszusammensetzung wie Gruppe zwei, jedoch zusätzlich täglich 100 ± 5 mg Resveratrol. Nach acht Wochen Fütterung wurden die Versuchstiere getötet und die Leber zur Analyse isoliert. Die Messung mittels Echtzeit-quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) ergab in der Resveratrolgruppe eine 76 % ige Zunahme der *UCP2* Gen-Expression im Vergleich zu Gruppe zwei. Des Weiteren wurde eine 25 %ige Zunahme des Mitochondriengehaltes in Leberzellen beschrieben [Poulsen et al., 2012]. Einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von UCP2 und der ROS-Produktion zeigt Echtay et al. (2002) in isolierten Mitochondrien aus den β -Zellen des Pankreas von Ratten. Eine ROS-Freisetzung wurde durch Gabe von 100 μ M Cyanid in den Mitochondrien induziert. Anschließend wurde das mitochondriale Membranpotential mittels Elektroden gemessen. Die durch die Zugabe von Cyanid induzierte ROS-Freisetzung führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zu einem Anstieg der UCP2-Entkopplungsrate auf 200 nmol H^+ pro Minute pro mg Protein [Echtay et al., 2002] bei einer gleichzeitigen Senkung des Membranpotentials um 70 mV [Echtay et al., 2002]. Der Zusammenhang zwischen ROS-Produktion und der Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials durch UCP2 basiert auf einer Depolarisierung des elektrochemischen Gradienten, wodurch die ROS-Produktion induziert wird [Low et al., 2010]. Die Aktivität von UCP2 wird durch ROS stimuliert [Echtay et al., 2002]. Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt.

1.4. Die Wirkung von Resveratrol und Cis-Platin allein und in Co-Inkubation auf den Energiestoffwechsel in Tumorzellen

Die Gewinnung der energiereichen Phosphatverbindung ATP ist sowohl für gesunde als auch für Tumorzellen ein lebensnotwendiger Prozess. In Tumorzellen wurde aufgezeigt, dass ein veränderter Energiestoffwechsel stattfindet, indem vermehrt die anaerobe Glykolyse zur ATP-Gewinnung herangezogen wird, auch wenn der Zelle ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht. Dieser biochemische Unterschied wurde erstmals von Otto Warburg demonstriert und wird deshalb auch als Warburg Effekt bezeichnet [Warburg und Minami, 1928]. Die vermehrte anaerobe Glykolyse hat intrazellulär eine höhere Konzentration an Laktat zur Folge. Laktat tritt als Nebenprodukt der ATP-Generierung aus Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase in der Zelle auf [Löffler & Petrides, 2003].

Resveratrol wurde bereits in Tumorzellen hinsichtlich seiner Wirkung auf den Energiestoffwechsel getestet, was zu ersten Hinweisen führte, dass dieser sekundäre Pflanzenstoff den Energiestoffwechsel beeinflusst. So zeigte eine 24-stündige Behandlung von lymphatischen Blutkrebszellen (CEM-C7H2) mit 5 μM bis 20 μM Resveratrol eine Intensivierung der Aktivität von Komplex II um 20 %. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Zellviabilitätstests 3-(4,5- Di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Der Farbstoff MTT wird mithilfe der Succinat-Dehydrogenase zu einem lila-gefärbten Formazansalz reduziert. Resveratrol führte zu einer vermehrten Oxidation des MTT-Farbstoffes durch das Enzym des Komplexes II. Um einen direkten reduzierenden Effekt von Resveratrol auf den Farbstoff MTT ausschließen zu können, wurde der Nachweis ohne Zellmodell durchgeführt [Bernhard et al., 2003]. Die Untersuchung zeigte, dass Resveratrol erst in hohen Konzentrationen von 50 μM bis 100 μM zu einer Reduktion des MTT-Farbstoffes führt, sodass eine Interaktion zwischen Resveratrol und dem MTT-Farbstoff bei niedrigen Resveratrolkonzentrationen auszuschließen ist. Darüber hinaus waren für diese Reaktion längere Inkubationszeiten

von 8 Stunden bis 24 Stunden notwendig. Die Bestimmung des Reduktionspotentials demonstrierte, dass Resveratrol in den geringen Konzentrationen von 5 μM bis 20 μM zu einer Stimulation des Komplexes II führte. Höhere Konzentrationen von 80 μM und 100 μM Resveratrol führten in der Zelllinie CEM-C7H2 jedoch zur Abnahme der Zellviabilität und keiner Stimulation der mitochondrialen Respiration [Bernhard et al., 2003]. Eine weitere Studie demonstriert, dass die Zugabe von 10 μM Resveratrol zu humanen Leukämiezellen nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden zu einer 1,5-fachen Zunahme der Superoxid-Anionen führte. Die Zugabe von 50 μM Resveratrol führte nach 18 Stunden hingegen zu keiner Induktion der Superoxid Anionen Produktion [Low et al., 2010]. Eine Zunahme der Superoxid-Anionen in der mitochondrialen Atmungskette deutet auf eine vermehrte Oxidation von Ubichinon zu Ubihydrochinon hin. Bei dieser Reaktion entstehen ROS. Ein hoher Gehalt an ROS kann sowohl als Auslöser einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials oder auch als Konsequenz der Depolarisierung verstanden werden [Fulda et al., 2010]. Ein weiterer Angriffspunkt für den sekundären Pflanzenstoff Resveratrol in der mitochondrialen Respiration stellt Komplex V, die F_0F_1 -ATP-Synthase, dar. Auch dieser Enzymkomplex wird durch Resveratrol in niedrigen Konzentrationen inhibiert, wie die Behandlung von tumoralen C6 Gliazellen mit 10 μM des Polyphenols demonstrierte. Nach dreistündiger Inkubation nahm die Aktivität der F_0F_1 -ATP-Synthase um 40 % ab und nach weiteren drei Stunden wurde eine noch höhere Abnahme um 80 % in C6 Gliazellen aufgezeigt [Ravera et al., 2011]. Im Detail soll Resveratrol im membranständigen F_0 -Teil zur Inhibition des Enzymkomplexes geführt haben [Zheng & Ramirez, 2000].

Zur Behandlung von Tumoren wird in der Praxis häufig das Zytostatikum *Cis*-Platin eingesetzt. *Cis*-Platin wird vor allem zur Behandlung von Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Prostata-, Blasen- und Hodenkrebs eingesetzt und ermöglicht auch in fortgeschrittenen Stadien von Krebs eine vollständige Remission. Dieses Zytostatikum ist sehr effektiv in seiner antikanzerogenen

Wirkung, geht jedoch mit schweren Nebenwirkungen wie Nierentoxizität und Ototoxizität einher. In der Therapie wird *Cis*-Platin in einem Konzentrationsbereich von 60 – 120 mg/m² verabreicht [Mutschler et al., 2001]. *In-vitro* Studien haben bereits gezeigt, dass eine Abnahme der Toxizität von *Cis*-Platin durch eine Kombination mit Resveratrol erreicht werden kann [Björklund et al., 2011 und Zhao et al., 2010]. Generell sollte zu Beginn, bevor *in vitro* Applikationen von Polyphenolen und Metallen in Kombination durchgeführt werden, festgestellt werden, ob daraus ein neuer Komplex entsteht, der für die Wirkungen verantwortlich ist. Esparza et al. (2005) konnte eine Interaktion zwischen Metallen und Polyphenolen detektieren [Esparza et al., 2005].

Aufgrund des, in dieser vorliegenden Arbeit, gezeigten Einfluss von Resveratrol auf den Energiestoffwechsel von humanen Leberkrebszellen wurde dieser Pflanzenstoff in Kombination mit einem Zytostatika getestet. Zytostatika zeigen eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen und können Apoptose über unterschiedliche Mechanismen auslösen. Ein Mechanismus zur Auslösung des programmierten Zelltodes erfolgt über die mitochondriale Atmungskette durch Freisetzung von Cytochrom C, das zur Aktivierung von Caspasen führt. Caspasen sind Enzyme, die Apoptose auslösen [Mutschler et al., 2001].

1.5. Das antineoplastische Zytostatikum KP-1339

Für diese Masterarbeit wurde als Kombinationspartner für Resveratrol das rutheniumbasierte Zytostatikum KP-1339 herangezogen. KP-1339 ist im Vergleich zu *Cis*-Platin, aufgrund seiner sehr geringen Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen und Erschöpfung, die in einer klinischen Phase I Studie festgestellt wurden, ein vielversprechendes Zytostatikum. Die maximal tolerierbare Dosis beträgt 625 mg/m² [Trondl et al., 2012].

Strukturell besteht KP-1339 aus einem Ruthenium als Zentralatom und 2 Indazolringen (siehe Abbildung 4). Für eine verbesserte Löslichkeit wird Natrium als Gegenion verwendet. KP-1339 ist somit ein Salz, dessen Wirkung auf dem Übergangsmetall Ruthenium basiert. Das Zytostatikum trägt den chemischen Namen Natrium *trans*-[Tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)] und hat ein Molekulargewicht von 538,1 g/mol. Bei der Anwendung von KP-1339 ist zu beachten, dass dieses sehr schnell hydrolysiert. Die Hydrolyse kann in humanen Plasmaproben jedoch durch Einstellen einer Chlorid-Konzentration von 150 mM unterdrückt werden [Dömötör et al., 2013]. Der Wirkstoff ist sehr gut in Wasser und Ethanol löslich.

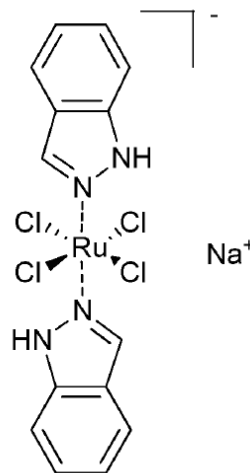


Abbildung 4: Strukturformel KP-1339

Die Wirkung von KP-1339 tritt vor allem in den ersten Stunden nach intravenöser Applikation ein [Heffeter et al., 2010]. Die hohe Bindungsaffinität an Plasmaproteine, hauptsächlich Albumin, beeinflusst die Wirksamkeit und Aufnahme in die Zelle. Durch nicht-kovalente Bindung von KP-1339 an Serumproteine verbleibt dieses länger im Körper und eine sofortige Ausscheidung wird verhindert. Plasmaproteine dienen somit als „Speicher“ [Bytzek et al., 2011]. Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, gelangt KP-1339 selbst als Ruthenium(III), das mit Fe^{2+} und Fe^{3+} konkurriert, über den Transferrin-Rezeptor in die Zelle und wird dort durch Redox-Reaktionen zum aktiveren Ruthenium(II) reduziert [Clarke, 2003 und Kratz et al., 1996]. Nach Auf-

nahme über den Transferrin-Rezeptor werden vermutlich Radikal-Intermediär-Produkte gebildet, die die Krebszelle zerstören, indem das Glukose regulative Proteine78 (GRP78), die Superoxiddismutase (SOD), der BAG molekulare Chaperon Regulator 4 (BAG4) und die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERK) herunter reguliert werden [Dickson et al., 2011]. GRP78 ist ein Chaperon-Protein, das neusynthetisierte unreife Proteine bei der richtigen Faltung unterstützt [Buchner, 2002]. KP-1339 vermindert die Aktivität von Chaperon GRP78, wodurch ein wichtiger Schutzmechanismus gegen Radikal-Intermediär-Produkte beschränkt wird [Dickson et al., 2011]. Weiterhin wird die Aktivität der SOD, welche ROS reduziert, gehemmt. BAG4 und ERK sind Proteine, die an der Zellproliferation beteiligt sind. KP-1339 hemmt die oben genannten Proteine und induziert dadurch in der Zelle Apoptose [Dickson et al., 2011].

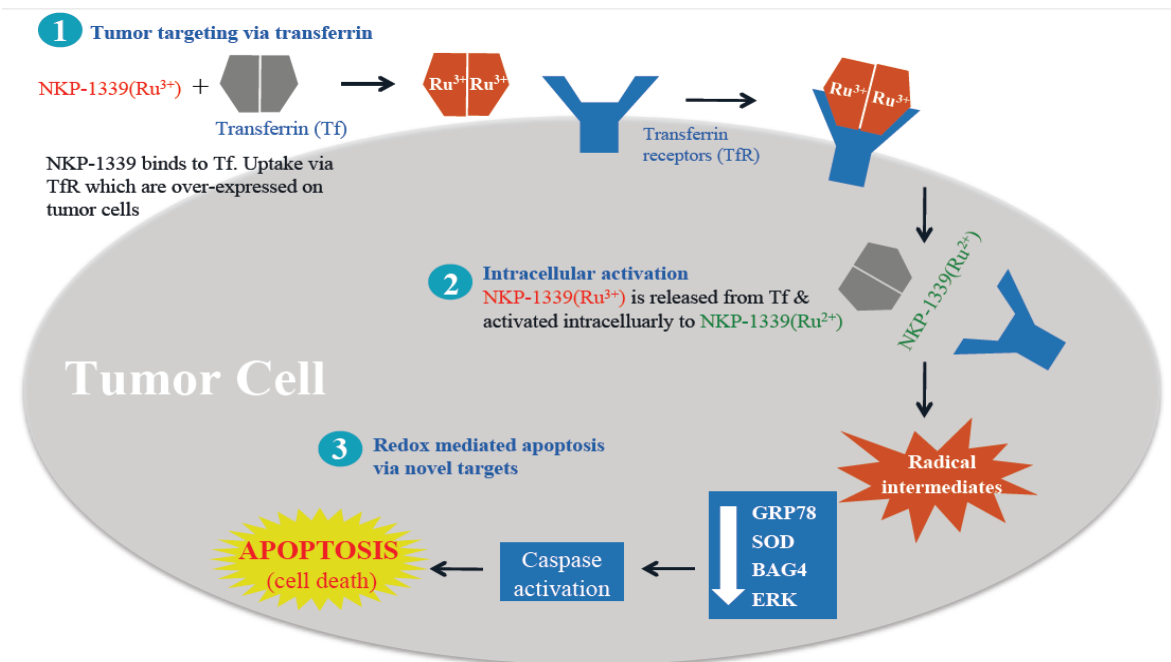


Abbildung 5: Aufnahme von KP-1339 in Tumorzellen [Dickson et al., 2011]

1.6. Der Einfluss von KP-1339 allein und in Kombination mit Resveratrol auf die mitochondriale Atmungskette

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse der mitochondrialen Atmung nach gemeinsamer Behandlung mit Resveratrol und KP-1339 in humanen Leberkrebszellen. Darüber hinaus sollen Veränderungen im Energiestoffwechsel von HepG2 Zellen durch die Kombination des sekundären Pflanzenstoffes und dem Zytostatikum untersucht werden. Bisherige Studien zeigen eine Interaktion des sekundären Pflanzenstoffes mit der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran von gesunden Zellen sowie von Tumorzellen [Timmer et al., 2011, Zheng & Ramirez, 2000 und Poulsen et al., 2012].

Aufgrund der zentralen Stellung des Energiestoffwechsels in gesunden und entarteten Zellen, ist die Aufklärung des Einflusses von Resveratrol von Bedeutung. Wie obige Studien belegen, beeinflusst der sekundäre Pflanzenstoff die mitochondriale Atmung und somit den Energiestoffwechsel (siehe Kapitel 1.3). Die bisherige Literatur zeigt aber nicht nur einen Einfluss von Resveratrol auf den Energiestoffwechsel der Zelle, auch das Zytostatikum *Cis-Platin* führte mit 33 μM für 24 h in der Arbeit von Santandreu et al (2010) in isolierten Mitochondrien aus Karzinomzellen des Dickdarms, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zu einem Anstieg der mitochondrialen ROS-Freisetzung sowie einer Zunahme der mitochondrialen Membrandepolarisierung [Santandreu et al., 2013]. Aufgrund der geringen Nebenwirkungen des rutheniumbasierte Zytostatikum KP-1339 im Vergleich zu *Cis-Platin* [Mutschler et al., 2011] ist KP-1339 ein vielversprechendes Therapeutikum. KP-1339 zeigte in der klinischen Studie Phase I geringe Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erschöpfung. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass KP-1339 den Energiestoffwechsel inhibiert. Dieser Effekt wurde in einer Studie von Heffeter et al. (2010) erstmals gezeigt. Hier bewirkte eine Konzentration von 400 μM KP-1339 nach 24 Stunden in Tumorzellen der Zervix (KB-3-1) eine 61%ige Depolarisierung des mitochondria-

len Membranpotentials. Weiterhin konnte eine prooxidative Wirkung nach einer 72 stündigen Behandlung 150 μM des Zytostatikums aufgezeigt werden, nachdem KB-3-1 Zellen für 30 Minuten mit 2mM N-Acetylcystein vorbehandelt wurden. N-Acetylcystein schützte die Tumorzellen vor ROS und es kam lediglich zu einer 25-fachen Abnahme der Wachstumsrate. Im Vergleich dazu führte KP-1339 zu einer 75-fache Abnahme der Wachstumsrate von KB-3-1 Zellen, wenn keine Vorbehandlung mit N-Acetylcystein erfolgte [Heffeter et al., 2010].

Da sowohl Resveratrol als auch Zytostatika antiproliferativ auf Tumorzellen wirken, wurde die Wirkung deren Kombination auf den Energiestoffwechsel analysiert. Björklund et al. zeigten 2011, dass ein erneutes Wachstum von ovariellen Tumorzellen (A2780), die zuvor 48 Stunden mit 2 μM *Cis*-Platin behandelt wurden, durch eine 48-stündige Nachbehandlung mit 40 μM Resveratrol um das 3,5-fache abnahm [Björklund et al., 2011]. Die Co-Inkubation von 100 $\mu\text{mol/L}$ Resveratrol mit *Cis*-Platin senkte nach 48 Stunden die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (SPC-A-1/CDDP) von $0,68 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ auf $0,30 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. [Zhao et al., 2010]. Auch in der Arbeit von Kurzwernhart et al. (2012) wurde aufgrund der Verwendung von Ru(II)-Komplexen, die mit Liganden basierend auf 3-Hydroxyflavon koordiniert waren, eine Reduktion der IC_{50} festgestellt. Diese Abnahme der IC_{50} wurde in ovariellen Krebszellen, Dickdarmzellen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen sowie in humanen Zellen der Harnblase, der Lunge und des Pankreas nachgewiesen. Je länger die Behandlung der Zellen mit dem Ru(II)-Komplex koordiniert mit Ligandenderivaten aus 3-Hydroxyflavon dauerte, desto geringer war der IC_{50} -Wert. So konnte in den Dickdarmzellen eine Senkung der IC_{50} von 40 μM nach 1 h auf 7 μM nach 96 h festgestellt werden. Des Weiteren induzierte der Metallkomplex mit dem Flavonoid-Ligand, in Konzentrationen von 16 μM bis 32 μM , ein Abbrechen der Zellzyklusphase G_2/M sowie eine Abnahme der G_0/G_1 -Phase [Kurzwernhart et al., 2012].

Aufgrund der bisherigen Datenlage, welche günstige Effekte einer Kombination von sekundären Pflanzenstoffen mit metallbasierenden Zytostatika auf den Energiestoffwechsel in der Zelle aufzeigte, erfolgte in dieser Masterarbeit erstmals die Kombination von Resveratrol und KP-1339. Im Detail wurde der Einfluss der beiden Substanzen, einzeln und in deren Kombination, auf den Energiestoffwechsel in Leberkrebszellen untersucht.

2. Fragestellung

Durch Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels kann das Zellwachstum gehemmt werden. Für die Behandlung von Tumorzellen ist diese Wirkung ein wichtiger Ansatz, um deren Proliferation zu unterdrücken. Bisherige Studien zeigen, dass der sekundäre Pflanzenstoff Resveratrol den Energiestoffwechsel beeinflusst [Moreira et al., 2013 und Bernhard et al., 2003]. Auch das Zytostatikum *Cis*-Platin, welches zur Behandlung von Tumoren häufig eingesetzt wird, führte in der Arbeit von Santandreu et al. (2010) nach 6 h mit 33 μM zu einem Effekt auf den Energiestoffwechsel in isolierten Mitochondrien von Dickdarmzellen. In therapeutischen Dosen von 60 – 120 mg/m^2 ist *Cis*-Platin jedoch mit schweren Nebenwirkungen, vor allem Niereninsuffizienz, verbunden [Mutschler et al., 2001]. Das rutheniumbasierende Zytostatikum KP-1339 ist aufgrund seiner vergleichsweise geringeren Nebenwirkungen [Trondl et al., 2012] ein vielversprechender Wirkstoff zur Therapie von Tumorpatienten. Bisher konnten bereits erste Effekte von KP-1339 auf die mitochondriale Atmungskette festgestellt werden [Heffeter et al., 2010]. Eine Kombination von *Cis*-Platin mit Resveratrol *in-vitro* führte zu einer Abnahme der IC_{50} [Zhao et al., 2010]. Die induzierte Senkung der IC_{50} von *Cis*-Platin durch Resveratrol führt zu der Annahme, dass die Wirkung von *Cis*-Platin durch die Kombination mit Resveratrol verstärkt werden kann. In dieser Masterarbeit soll untersucht werden, ob die Kombination von KP-1339 mit dem sekundären Pflanzenstoff Resveratrol eine Veränderung der Wirkung von KP-1339 induziert. Anhand erster Hinweise aus der Arbeit von Kurzwernhart et al., (2012) zeigte auch eine Koordination von Rutheniumkomplexen mit derivatisierten Liganden aus 3-Hydroxyflavon eine Senkung der IC_{50} in Dickdarmzellen.

Aufgrund der geringen Nebenwirkungen des Zytostatikums KP-1339 [Trondl et al., 2012] und erster Hinweise auf einen Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette [Heffeter et al., 2010], sollte in dieser Masterarbeit gezeigt werden, ob eine Kombination von Resveratrol mit KP-1339 zu einem verän-

derden Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette führt. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus in Leberkrebszellen erfolgte die Inkubation mithilfe eines KCl-Puffers ohne Zusatz von Serum, sodass eine ungebundene Form von Resveratrol und KP-1339 sichergestellt wurde. Beide Substanzen binden an Serumproteine bzw. im Wachstumsmedium von HepG2 Zellen an fötales Kälberserum, wodurch eine eingeschränkte Aktivität zu erwarten ist [Burkon & Somoza, 2005 und Bytzek et al., 2011].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung von *trans*-Resveratrol und KP-1339, in Abwesenheit von Serumproteinen auf den Energiestoffwechsel in der humanen Leberkrebszelllinie HepG2 untersucht. Bevor eine Behandlung von HepG2 Zellen mit den Substanzen Resveratrol und KP-1339 stattfand, wurde mittels Flüssigchromatographie eine mögliche Interaktion beider Substanzen überprüft. Der Nachweis einer möglichen Bindung zwischen Resveratrol und KP-1339 ist wesentlich, da eine Komplexbildung zwischen Polyphenolen und Metallen möglich ist [Esparza et al., 2005]. Die genaue Analyse der Atmungskette sollte Erkenntnisse über die Wirkung von KP-1339 und Resveratrol auf den Energiestoffwechsel in Tumorzellen liefern.

Nach Ausschluss einer Zelltoxizität von *trans*-Resveratrol und KP-1339 in den getesteten Konzentrationen, erfolgte im Rahmen eines Zellscreenings die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels des fluoreszierenden Farbstoffes 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaniniodid (JC-1). Dieses Screening sollte in dieser Masterarbeit erste Hinweise, dass Resveratrol auf die Atmungskette einen Effekt zeigen. Des Weiteren wurde analysiert, ob eine Co-Inkubation mit KP-1339 die Wirkung von *trans*-Resveratrol auf die mitochondriale Atmungskette beeinflusste. Der Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe von JC-1 führte zur Auswahl der Testkonzentrationen von Resveratrol und KP-1339. Induzierte Resveratrol und die Kombination mit KP-1339 eine Depolarisierung des elektrochemischen Protonengradienten, so wurde nachfolgend die intra-

zelluläre Freisetzung von ROS anhand des fluoreszierenden Farbstoffes 2',7'-Dichlor-fluorescein diacetat (DCFH-DA) bestimmt. Das weitere Vorgehen basierte auf der Arbeit von Fulda et al., 2010, in der aufgezeigt wird, dass eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials mit einer erhöhten Freisetzung von ROS einhergeht [Fulda et al., 2010]. Die nachfolgenden Experimente zur Bestimmung des Verhältnisses der Nukleotide ATP zu ADP sowie die Expression des Gens *UCP2* sollten zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus dienen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Zellkultur:

Chemikalie/Gebrauchsmaterial	Firma
15mL und 50mL Röhrchen	BD Falcon
175cm ² Zellkulturflasche, steril, 650mL	Greiner Bio One
6- bzw. 96-well Zellkulturplatten, steril mit Deckel	Greiner Bio One
75cm ² Zellkulturflasche, steril, 250mL	Greiner Bio One
Adenosindiphosphat monosodium salt, 1g	Calbiochem
Adenosinmonophosphat disodium salt, 5g	Sigma Aldrich, Austria
Adenosintriphosphat	ROTH
Ameisensäure ≥ 98%, 500mL	ROTH
Ammoniumhydroxid ≥ 99,9%, 100mL	Sigma Aldrich, Austria
Arbeitsbank Telstar biohazard	BioStarPlus
Bidestilliertes Wasser mittels	Sartorius Stedim Biotech Arium 611 VF
Cell Scraper, 28cm	Greiner Bio One
Cryogenic Vials, 1,8mL	Starlab
Dimethylsulfoxid ≥ 99,9%	Sigma Aldrich, Austria
Einmal-Injektions-Kanülen, Größe 2	Braun
Einmal-Spritzen, 2mL	Braun
Ethanol absolut zur Analyse, 2,5L	Australco Österreich

Examination gloves powder free nitrile	Microflex Xceed
Fötales Rinder Serum (FBS)	Gibco, fetal bovine serum
FrameStar FastPlate 96	Genxpress
Handy Step	Brand
HepG2 Zellen	ATCC
Hochdruckflüssigchromatographie	Ultimate 3000
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems
<u>KCl-Puffer:</u>	
20 mM HEPES, 18 mM D-Glukose, 110 mM KCL, 20 mM NaCl, 1 mM, 1 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 1 mM NgSO_4	ROTH und Sigma Aldrich, Austria
L-Glutamin 200mM, steril filtriert	Sigma Aldrich, Austria
Flüssigchromatographie Massenspektrometer 2020	Shimadzu
Methanol 2,5L	ROTH
Rotisolv HPLC	
Mikroskop	VWR
N-Acetyl-L-cysteine 99%, 50g	Sigma Aldrich, Austria
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior
Nylon Membran Filter 0,2 μm	Whatman
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas	ROTH
PBS (= Phosphate Buffered Saline) 171mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 ,	Sigma Aldrich, Austria

3,4mM KCl, 1,8mM KH ₂ PO ₄	
PCR Stepone plus	Applied Biosystems
pegGOLD Total RNA Kit	Peqlab
Penicilin-Streptomycin, steril filtiert	Sigma Aldrich, Austria
Perchlorsäure (0,6M), 250mL	Applichem
pH-Meter	Hanna Instruments pH211
Pipette boy	Thermo Scientific Matrix
Pipetten 2,5µL 10µL 20µL 100µL 200µL 1.000µL 5.000µ	Eppendorf research
Pipettenspitzen TipOne 2,5µL 10µL 20µL 100µL 200µL 1.000µL 5.000µ	Starlab
Plattenlesegerät	Tecan, infinite M200
Präzisionsdispenser tip, 5mL steril	Brand
Präzisionswischtücher	Kimtech Science
Primer ppiA	
Primer UCP2	Sigma Aldrich, Austria
QPCR optical clear film	Peqlab
Reaktionsgefäß, 1,5mL Natural Flat Cap Microcentrifuge Tube	Starlab
Rotilabo Reaktionsgefäß, 1,5mL	Eppendorf
RPMI-Medium 1640 L-Glutamin und NaHCO ₃ , 500mL	Sigma Aldrich, Austria

Rührgerät VMS-C4	VWR
Säule für Nukleotide und Laktat	
Luna 5u C18(2), 250x3mm	phenomenex
Sodium L-Lactate $\geq 99\%$, 10g	Sigma Aldrich, Austria
Solid Phase Extraction 30mg/1mL	Strata X AW, Phenomenex
Software (Plattenlesegerät)	Tecan, i-control 1.6
Tetrabutylammonium bisulfat $\geq 99\%$, 50g	Sigma Aldrich, Austria
Tissue Box	ROTH
<i>trans</i> -Resveratrol $>99\%$, 500mg	Sigma Aldrich, Austria
Trypanblau Lösung 0,4%, steril filtriert	Sigma Aldrich, Austria
Trypsin-EDTA Solution (1x), steril filtriert	Sigma Aldrich, Austria
Ultramikrowaage Pioneer TM	OHAUS
Vials, Inlay, Septum	Shimadzu
Vortexer RS-VA10	Phenix Instruments
Wasserbad open bath steel	VWR
Zellkulturschale Easy Grip, 60x15mm und 30x15mm	BD Falcon
Zentrifuge Centrifuge 5804R	eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5415R	eppendorf

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierungs- und Versuchsbedingungen von HepG2 Zellen

Die Zelllinie entstammt von einem 15 jährigen Mann mit hepatozellulärem Karzinom. Die Subkultur HepG2 Zellen sind immortale Adhäsionszellen, welche einschichtig in kleinen Aggregaten wachsen. Zum Anwachsen an das Kultivierungsgefäß benötigen die Zellen 24 Stunden und verdoppeln sich anschließend wiederum alle 24 Stunden. Als Nährlösung eignet sich für diese Zelllinie das Kulturmedium RPMI1640 mit den Zusätzen FBS 10%, L-Glutamin 1% und Penstrep 1%.

Auftauen: Für die Kultivierung junger Zellen wird ein Zellaliquot (1 mL), das in flüssigem Stickstoff gelagert ist, aufgetaut und anschließend in 9 mL Kulturmedium aufgenommen. Dieser Schritt dient der Verdünnung des toxischen Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem die Zellen eingefroren wurden, von 10 auf 1%, Zur Entfernung von DMSO wird die Lösung bei 110 xg und 25°C für 10 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in 10 mL frischem Medium resuspendiert und in eine 75 cm³ Kulturflasche übergeführt. Bevor die Zellen für Versuche verwendet werden können, ist zwei- bis dreimaliges Passagieren notwendig, damit ein regelmäßiges Zellwachstum eintritt.

Passagieren: HepG2 Zellen müssen nach Erreichen der Konfluenz cirka alle fünf Tage mit neuem Medium versorgt und in eine neue Kulturflasche überführt werden. Dazu wird vorher mit PBS ein Waschschrift durchgeführt um Mediumreste zu entfernen, und, je nachdem, ob eine 75 cm³ oder 175 cm³ Flasche in Verwendung ist, mit 1 mL – 2,5 mL Trypsin behandelt, welches die Zellen enzymatisch ablöst. Durch Zugabe von 5-10 mL Kulturmedium wird die Reaktion gestoppt und nach mehrmaligem Resuspendieren der Zellen kann die gewünschte Menge in frischem Medium weitergeführt werden. Jedes Passagieren bedeutet eine Erhöhung des Zellpassage um 1. HepG2 Zellen werden für dieses Versuchsreihe maximal bis zur Passage 22 verwendet, damit eine gleichbleibende Stoffwechselaktivität der Zellen gegeben ist.

Ausstreuen: Für jeden Zellversuch muss die Zellkonzentration ermittelt werden. Dieser Schritt erfolgt mithilfe der Neubauer Zählkammer. Dazu werden wenige Mikroliter der Zellsuspension, die beim Schritt des Passagierens entsteht, entnommen und im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Zum Auszählen wird das Deckglas auf der Zählkammer durch leichtes Andrücken befestigt und die Trypanblaulösung mit den Zellen in die Kammer pipettiert. Unter dem Mikroskop werden die Zellen der acht Quadrate ausgezählt. Anschließend wird der Mittelwert, welcher den Verdünnungsfaktor 10 der Trypanblaulösung sowie den Faktor 10.000 der Zählkammer berücksichtigt. Die Berechnung ergibt die relative Zellzahl pro Milliliter.

3.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität des KCl-Puffers mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden Inkubationslösung (KCl-Puffer) und die jeweiligen Substanzen (Resveratrol und KP1339) allein und in Kombination auf ihre Toxizität getestet. Hierfür war der sogenannte MTT-Test nach Mosmann T. aus dem Jahr 1983 geeignet [Mosmann, 1983]. Die Funktionsweise eines MTT-Tests beruht auf der Messung der Zellviabilität. Lebende Zellen können den gelblichen Farbstoff MTT einerseits durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase sowie durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums in das blau-violette Formazan reduzieren [Bernas & Dobrucki, 2002]. Die Intensität dieses reduzierten Produktes wird anschließend mit dem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden HepG2 Zellen einen Tag vor Durchführung in eine 96-well Platte, mit einer Konzentration von 60.000 Zellen in 100 µL Kulturmedium pro Well, ausgestreut. Nach Behandlung der Zellen mit KP-1339 und / oder *trans*-Resveratrol, wurde das Inkubationsmedium entfernt und durch 100 µL MTT-Reagenz (1mg/mL) ersetzt, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Je nach Zelllinie und Toxizität der Substanzen benötigen die Zellen zur Umsetzung zum Tetrazolium-Salzes unterschiedlich lange. Bei einer einstündigen Behandlung von 60.000 HepG2 Zellen pro Well in KCl-Puffer mit den jeweiligen Substanzen, reichte eine Inkubationszeit von einer halben Stunde. Anschließend wurde das MTT-Reagenz entfernt und 150 µL DMSO zur Lösung der entstandenen, in Wasser unlöslichen Formazansalze hinzugegeben. Die Absorption bei 570nm wird anschließend mit Hilfe eines Plattenlesegerätes bestimmt; die dazugehörige Referenzwellenlänge wurde bei 650nm eingestellt.

3.2.3 Nachweis von mitochondrialen Membranpotentialänderungen durch den Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaniniodid (JC-1)

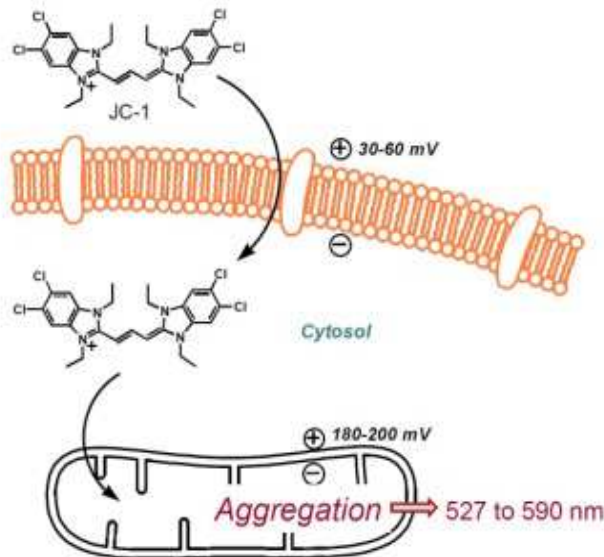


Abbildung 6: Wirkungsmechanismus des Farbstoffes JC1

Quelle:
<http://lcbim.epfl.ch/research>;
 Zugriff, am 26.03.2013,
 15:25 Uhr

Der Nachweis, ob die angewandten Substanzen, eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials induzierten, erfolgte mit dem fluoereszierenden Farbstoff (JC-1). Das Prinzip umfasst eine Färbung der Zellen mittels des fluoereszierenden Farbstoffs JC-1, der bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden muss. Hierbei bilden nicht-apoptotische Zellen, deren Membrangradient negativ ist, rote Aggregate im Matrixraum. Bei depolarisierenden Zellen kollabiert der Gradient und der Farbstoff bleibt als grünes Monomer im Zytosol zurück. Das Ausmaß der Depolarisierung wird mit dem Durchflusszytometer bestimmt [Cossarizza et al., 1993]. Für die Messung wurde eine HepG2-Zellkonzentration von 500.000 Zellen in 2 mL Kulturmedium pro Well, in einer 6-well Zellkulturplatte, benötigt. Nach einstündiger Inkubation mit KCl-Puffer und der bzw. den gewünschten Substanzen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und fünf Minuten mit einer Lösung bestehend aus PBS, 2mM EDTA und 5mM Glukose zur Ablösung der Zellen behandelt. Die Reaktion, welche die Zellen vom Plattenboden ablöst, wurde mittels Kulturmedium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette aufge-

nommen und bei 300 xg, fünf Minuten zentrifugiert. Für die Färbung wurde das Zellpellet in MEM aufgenommen und mit 4 μ M JC-1 Farbstoff, der in DMSO gelöst ist, versetzt. Als Positivkontrolle wurden 50 μ M des Entkopplers CCCP eingesetzt, der ebenfalls beim Schritt des Färbens einer unbehandelten Probe hinzugefügt wurde. Die Färbung fand für 15 Minuten im Inkubator statt. Durch erneutes fünfminütiges Zentrifugieren bei 300 xg, wurde das Zellpellet von der Färbelösung abgetrennt. Vor der Messung mit dem Durchflusszytometer wurde dieses Zellpellet zur Entfernung von Farbstoff- und Mediumresten mit einem Waschpuffer gewaschen und wiederum fünf Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Für die nachfolgende Messung wurde das Pellet in 1 mL Waschpuffer resuspendiert.

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Grün gebildeten Monomere werden bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm detektiert und die roten Aggregate, bei einer Wellenlänge von 590 nm. Die Flußrate lag bei 0,5 μ L pro Sekunde, wofür eine maximale Zellkonzentration von 500 Zellen / μ L zulässig ist.

3.2.4 Untersuchung antioxidativer Wirkungen mittels 2',7'-Dichlor-fluorescein diacetat (DCFH-DA)

Die Bestimmung, ob die verwendeten Substanzen als Radikalfänger wirkten, erfolgte durch die Reaktion mit dem Farbstoff DCFH-DA. Wie in Abbildung 7 dargestellt gelangt dieser mittels passiver Diffusion in die Zelle, wo durch Esterasen eine Deacetylierung zum Farbstoff DCFH stattfindet. Sind nun ROS anwesend, erfolgt die Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden Farbstoff DCF.

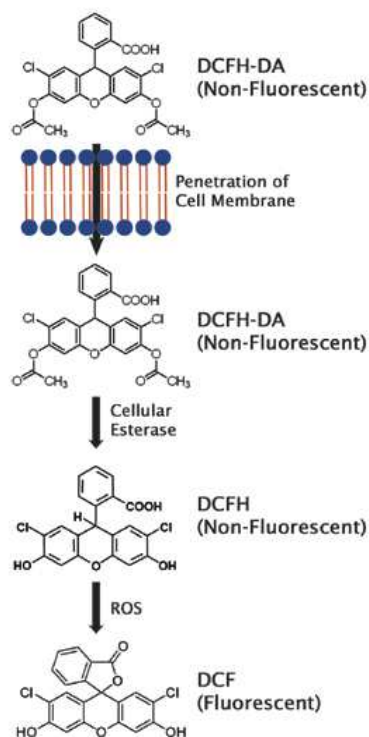


Abbildung 7: Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffes DCFH-DA in den fluoreszierenden Farbstoff DCF durch ROS,

[<http://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>]

Das Plattenlesegerät regt den Farbstoff bei einer Wellenlänge von 485 nm (Bandbreite 9 nm) an und misst die Emission bei 530 nm (Bandbreite 20 nm) [LeBel et al., 1992]. Die Messung erfolgt alle zwei Minuten über einen Zeitraum von 1 Stunde.

Für die Versuchsdurchführung war eine HepG2-Zellanzahl von 35.000 Zellen, pro Well in einer 96-well Platte notwendig. Die Zellen wuchsen einen Tag in der Kulturplatte an. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde eine halbe Stunde im Inkubator die Färbung der Zellen mit 5 μ M DCFH-DA, gelöst in KCl-Puffer, durchgeführt. Anschließend wurde der Farbstoff entfernt und die Substanzen Resveratrol sowie KP-1339 in den Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M und die Kombinationen 0,1 μ M Resveratrol und 10 μ M KP-1339 bzw. 10 μ M Resveratrol und

10 μM KP-1339 auf die Zellen gegeben und unmittelbar danach die Fluoreszenz gemessen. Als Positivkontrolle dienten 25 μM *Tert-butyl*-hydroperoxid (*t*-BOOH) sowie 1 mM NAC - als Einzelsubstanz und Kombination um einen An- und Abstieg der ROS-Konzentration anzuzeigen.

Um den Effekt über den Zeitverlauf zu erfassen, wurde anhand der Fluoreszenzwerte die Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt.

3.2.5 Ermittlung des Energiepotentials aufgrund der Nukleotidkonzentrationen von AMP, ADP und ATP mittels HPLC

Energie wird in der Zelle in Form von ATP bereitgestellt. Die Phosphorylierung erfolgt entweder durch Substratkettenphosphorylierung ausgehend von organischen Stoffen, wie Kohlenhydrate und Fette oder über den Elektronentransport in den Mitochondrien. Die Übertragung eines bzw. zweier Phosphatreste auf AMP bzw. ADP führt zur Produktion von ATP [Löffler, 2008]. Wirken fremde Faktoren auf den Energiestoffwechsel ein, kann es zu einer Veränderung der Bereitstellung von ATP kommen. Die Analyse der Nukleotide erfolgte anhand der HPLC-Methode [Riedel et al, 2012]. Das Prinzip der Flüssigchromatografie beruht auf der Auftrennung von Stoffen unter hohem Druck durch Verwendung einer polaren und einer unpolaren Phase. Bei der Ultra-Hochdruckflüssigchromatographie (U-HPLC) werden polare vor unpolaren Substanzen eluiert.

Zur chromatographischen Auftrennung der Nukleotide wurden die nachstehenden Bedingungen verwendet:

Tabelle 3: Bedingungen der HPLC-Methode

U-HPLC-System	Dionex UltiMate 3000 Standard LC System
Pumpe	Dionex UltiMate 3000 Binary Pump, Hochdruckpumpe
Detektor	Dionex Diodenarraydetektor, DAD-3000
Stationäre Phase	C18(2) Luna ®, 100 A, 250 x 3,00 mm, 5 µm, Phenomenex
Mobile Phase	Komponente 1:100 % Acetonitril Komponente 2:10 % Acetonitril, 10 mM Tetrabutylammonium hydrogen sulfat (TBAHS); 10 mM KH ₂ PO ₄ in bidest. Wasser pH-Wert: 7
Flussrate	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	50 µL
Detektionswellenlänge	259 nm

Tabelle 4: Gradientenverlauf von Acetonitril und KH₂PO₄-Puffer

Zeit [min]	Mobile Phase	
	Acetonitril [%]	KH ₂ PO ₄ -Puffer [%]
0	0	100
1	0	100
8	8	92
13,5	30	70
18	0	100
29	0	100

Zur Versuchsausführung wurden zwei Tage vor der Aufarbeitung HepG2 Zellen in einer Zellkonzentration von drei Millionen Zellen pro Kulturschale (Durchmesser: 5 cm) ausgestreut. Die absolute Zellzahl betrug am Versuchstag somit sechs Millionen pro Schale. Zur Aufarbeitung wurden

die Zellen, nach einstündiger Inkubation, zwei Mal mit PBS gewaschen und mit eiskalter 0,3 M Perchlorsäure lysiert. Die Trennung der Zellbestandteile von der Lösung erfolgte durch Zentrifugieren (16000xg, 10 min, 4°C).

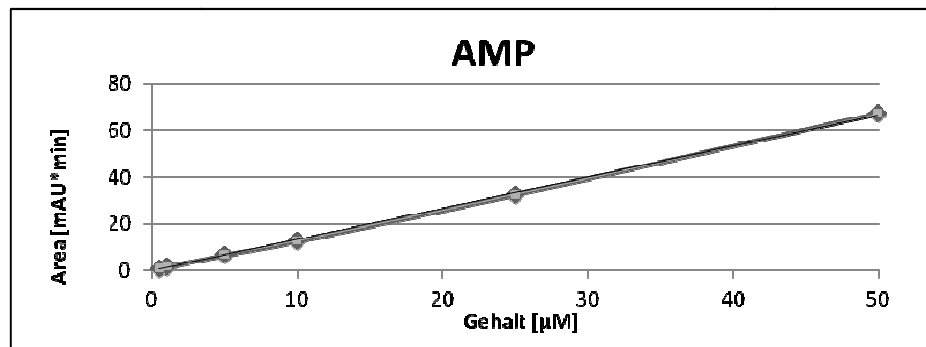
Eine 1 M Na_2CO_3 -Lösung neutralisierte anschließend den Überstand. Bis alle fünf Passagen bereit waren, befanden sich die Proben im Gefrierschrank bei -80°C. Vor Injektion in die HPLC wurde als letzter Aufarbeitungsschritt eine Festphasenextraktion mittels Anionenaustauscher durchgeführt. Hierzu wurde folgendes Schema verwendet:

Tabelle 5: Aufarbeitungsschritte des Zellextraktes

Konditionierung	1. 1 mL 100% CH_3OH
	2. 1 mL $\text{ACOOH} \text{CH}_3\text{OH} \text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ im Verhältnis 2/25/73)
	3. 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
Beladung	4. Zugabe von 400 μL Probe
Waschen	5. 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
	6. 1 mL $\text{CH}_3\text{OH} \text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ im Verhältnis 50/50
Eluierung	7. 350 μL $\text{NH}_4\text{OH} \text{CH}_3\text{OH} \text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ im Verhältnis 2/25/73

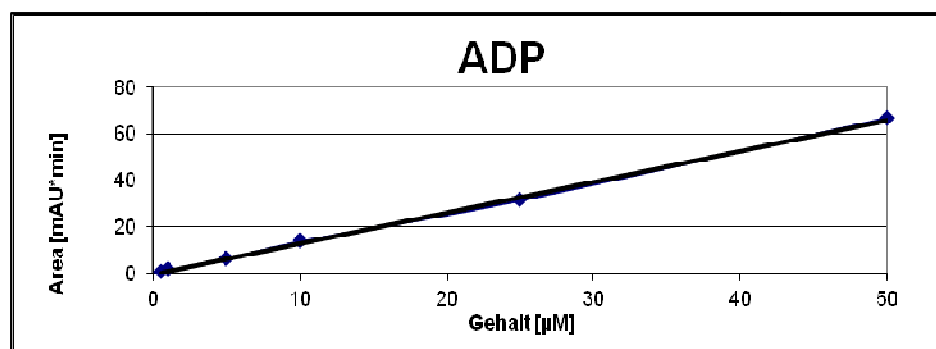
Nach Eluierung wurde die Probe noch mit einem 0.2 μm Nylonfilter gereinigt und konnte anschließend injiziert werden.

Zur Auswertung der Messungen müssen Standardgeraden erstellt werden. Der Konzentrationsbereich der Geraden wurde für AMP, ADP und ATP zwischen 0,5 μM bis 50 μM gewählt. In den nachfolgenden Abbildungen sind jene Standardgeraden, die für die Berechnungen herangezogen wurden, dargestellt.



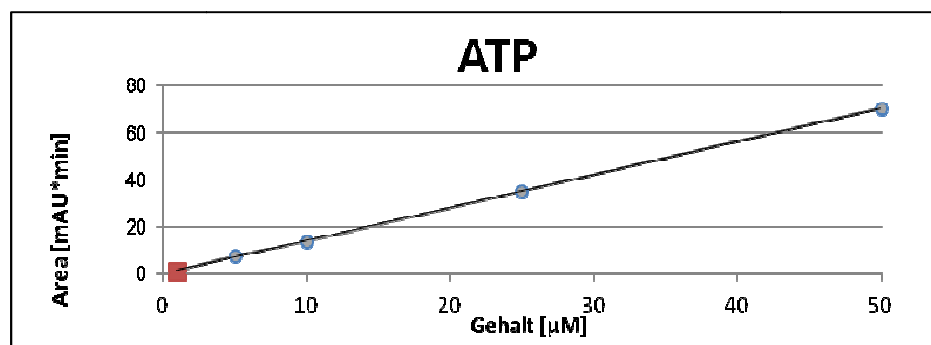
$$y = 1,3403x - 0,2798$$

$$R^2 = 0,9996$$



$$y = 1,319x - 0,0375$$

$$R^2 = 0,999$$



$$y = 1,4072x + 0,0262$$

$$R^2 = 0,9999$$

Abbildung 8: Die einzelnen Standardgeraden für die Nukleotide AMP, ADP und ATP im Konzentrationsbereich 0,5 µM bis 50 µM

Für eine exakte Quantifizierung ist darüber hinaus eine prozentuale Wiederfindung zu berücksichtigen. Die Wiederfindung wird berechnet, indem eine bekannte Konzentration an AMP, ADP und / oder ATP zur einer un-behandelten Zellprobe, nach Aufarbeitung, hinzugefügt wird. Sind die Pro-

ben mittels HPLC gemessen, kann zurückgerechnet werden wie viel der vorher hinzugefügten Nukleotide tatsächlich nachgewiesen werden konnte. Die tatsächliche Konzentration kann so anteilmäßig von der Soll-Konzentration berechnet werden.

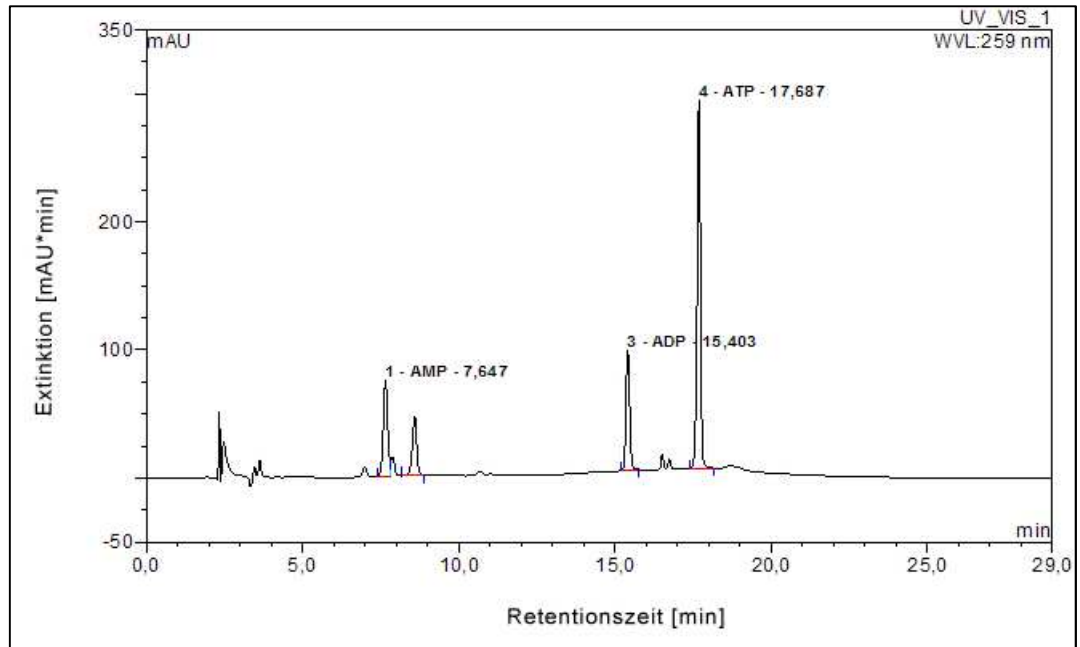


Abbildung 9: Repräsentatives Chromatogramm mit den Nukleotiden AMP nach 7,6 Minuten, ADP nach 15,4 Minuten und ATP nach 17,7 Minuten detektiert in HepG2 Zellen

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$AN \text{ } \mu M = \left[\frac{MW \text{ mAU} * \text{min} - d}{k} \right] \times VF \times \left[\frac{100}{WF [\%]} \right]$$

<i>AN</i>	Adenosinnukleotid
<i>MW mAU*min</i>	gemittelte "Fläche unter dem Signal" (milli absorbance units)
<i>d</i>	Achsenabschnitt der zugehörigen Kalibriergerade für das Adenosinnukleotid
<i>k</i>	Steigung der zugehörigen Kalibriergerade
<i>VF</i>	Verdünnungsfaktor 0,442 (1024/900)*(350/900)

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 278: 1039-1044.

Folgende Einstellungen wurden für die LC-MS getroffen:

Tabelle 6: Einstellungen der LC-MS zur Identifizierung der Substanzen

LC-MS-System	LCMS-2020 Shimadzu
<i>Detektor</i>	Single-Quadrupol Massenspektrometer mit ESI als Interface
<i>Pumpe</i>	Quartärpumpe
<i>Stationäre Phase</i>	C18(2) Luna®, 100 Å, 250 x 3,00 mm, 5 µm, Phenomenex
<i>Mobile Phase</i>	0,3 % Ameisensäure in H ₂ O _{dd}
<i>Flussrate</i>	0,5 mL pro Minute
<i>Injektionsvolumen</i>	5 µL
<i>Spraygas</i>	1,5 L pro Minute
<i>Trockengas</i>	15 L pro Minute
<i>Temperatur der Transkapilla- re</i>	250°C
<i>Heizblocktemperatur</i>	200°C
<i>Schnittstellenspannung</i>	4,5 kV
<i>Detektionswellenlänge</i>	285 nm
<i>Software</i>	LabSolutions Version 5

3.2.7 LC-MS Analyse von L-Laktat

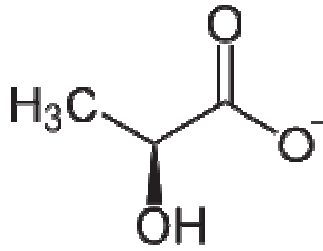


Abbildung 10: Strukturformel von L-Laktat

Die Zelle erhält ihre Hauptenergie aus dem aeroben Energiestoffwechsel in den Mitochondrien. Wie unter Punkt 1.1 erwähnt, erfolgt diese über Phosphorylierung von AMP und ADP zu ATP. Ist in Tumorzellen eine Energiebereitstellung über den aeroben Weg nicht mehr möglich, schaltet die Zelle alternativ auf die Energiegewinnung aus Glykogen bzw. Glukose aus dem Zytosol um. Der Abbau von Glykogen führt zur Gewinnung von ATP und das Zwischenprodukt Brenztraubensäure wird in weiterer Folge zu Laktat abgebaut [Warburg und Minami, 1923]. Die vermehrte Energiegewinnung über Glykogen bzw. Glukose aus dem Zytosol, trotz Anwesenheit von Sauerstoff, ist ein beschriebenes Phänomen in Tumorzellen und wurde nach seinem Entdecker Otto Warburg, als Warburg Effekt bezeichnet [Warburg und Minami, 1923].



Mittels LC-MS erfolgte der Nachweis von Laktat, um herauszufinden, ob verschiedene Konzentrationen von Resveratrol und / oder KP-1339 die Zelle vermehrt zur anaeroben Energiegewinnung zwingt. Eine hohe Konzentration von Laktat führt zur Acidose und somit zur Denaturierung von wichtigen - im Energiestoffwechsel beteiligten - Enzymen.

Für den Nachweis war eine Zellkonzentration von sechs Millionen Zellen pro Zellkulturschale notwendig. Zur Probenaufarbeitung wurden dieselben

Zellkulturschalen verwendet, die bereits für die Nukleotidmessung vorbereitet wurden. Nach der einstündigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und für 20 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Behältnis transferiert und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Tabelle 7: Bedingungen der LC-MS Methode

LC-MS-System	LCMS-2020 Shimadzu
<i>Detektor</i>	Single-Quadrupol Massenspektrometer mit ESI als Interface
<i>Pumpe</i>	Quartärpumpe
<i>Stationäre Phase</i>	C18(2) Luna ®, 100 Å, 250 x 3,00 mm, 5 µm, Phenomenex
<i>Mobile Phase</i>	20 % Methanol
<i>Flussrate</i>	0,5 mL pro Minute
<i>Injektionsvolumen</i>	5 µL
<i>Spraygas</i>	1,5 L pro Minute
<i>Trockengas</i>	5,0 L pro Minute
<i>Desolvation line Temperatur</i>	250 C
<i>Heizblocktemperatur</i>	200°C
<i>Schnittstellenspannung</i>	4,5 kV
<i>Detektionswellenlänge</i>	190 nm
<i>Software</i>	LabSolutions Version 5

Die Detektion von Laktat erfolgte im negativen SIM-Modus bei einer m/z von 89 durchgeführt. Der Laktatpeak des Standards Natriumlaktat, erscheint bei isokratischer Messung nach 4.2 Minuten. In-source Fragmentierung zur Identifizierung: 45 m/z.

3.2.8 Bestimmung des Einfluss von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf die Gen-Expression des Entkopplungsproteins *UCP2* mittels Echtzeit-quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

In der mitochondrialen Atmungskette wird Energie in Form von ATP gebildet. Die Membran des Mitochondriums enthält auch das Entkopplungsprotein UCP2, das den Protonengradienten „kurzschließt“ und somit die Energie in Form von Wärme abzugeben, anstatt diese in ATP zu überführen. Es wird vermutet, dass ein Umleiten der Energieproduktion vor allem dann erfolgt, wenn die Zelle durch ROS geschädigt wurde bzw. der Übergang zur Apoptose stattfand [Krauss et al., 2005]. Mithilfe der RT-qPCR sollte aufgezeigt werden, ob eine Behandlung mit den oben genannten Substanzen eine Änderung der Expression des *UCP2*-Gens verursacht. Hierfür wird die mRNA aus HepG2 Zellen isoliert und revers in cDNA (complementary DNA) transkribiert. In der PCR wird die doppelsträngige DNA bei 95°C aufgetrennt. So können sich die Primer bei 60°C an die entsprechende Zielsequenz anlegen, wodurch der anschließende Renaturierungsschritt mittels DNA-Polymerase ausgelöst wird. Am Ende der Synthese entstehen zwei neue Doppelstränge.

Für die Gewinnung der RNA war eine Zellkonzentration von 500.000 Zellen in einer Zellkulturschale mit 3 cm Durchmesser notwendig. Die Proben wurden – einen Tag nach dem Ausstreuen - eine Stunde mit den jeweiligen Substanzen im KCl-Puffer behandelt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des „genaue Bezeichnung“ der Firma PeqLab isoliert. Die Isolation erfolgte laut Beschreibung des beigelegten Protokolls. Zusammenfassend wurde nach Entfernung der Inkubationslösung die Zellen mit 400 µL PBS gewaschen. Die Membrane und Zellkern der Zellen wurden mittels Zugabe von 400 µL Lysepuffer aufgeschlossen. Um die cDNA zu entfernen wurde das Lysat auf die DNA-Removing Säule aufgetragen. DNA bleibt durch Reaktion mit dem Säulenmaterial haften, sodass mittels Zentrifugation DNA aus der Probe entfernt wird. Das RNA-haltige Eluat

wurde mit demselben Volumen an 70igem % Ethanol vermischt, auf die orange PerfectBind RNA-Säule überführt und im Anschluss wieder zentrifugiert. Die RNA befand sich jetzt auf der Säule und wurde ein Mal mit RNA-Waschpuffer I und zwei Mal mit Waschpuffer II gereinigt. Damit im Eluat keine Reste der Waschlösung verbleiben, ist es wichtig, die Säule durch Zentrifugation vollständig trocknen zu lassen. Als letzter Schritt erfolgte eine drei-minütige Inkubation mit 25 µL nukleasefreiem Wasser. Die darauffolgende Zentrifugation ermöglicht das Auffangen der RNA in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß. Zur Erzielung möglichst hoher Ausbeuten, wurde die Säule ein zweites Mal mit 25 µL nukleasefreiem Wasser beladen und anschließend zentrifugiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte anhand des Plattenlesegeräts bei 260 nm.

Da RNA leicht durch ubiquitär vorkommende RNAasen abgebaut werden kann, erfolgte nach der Isolierung mittels PCR die Umschreibung in die stabilere und somit auch lagerungsfähige cDNA. Dieser Vorgang erfolgte mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits der Firma life technologies. Dazu wurde wie im Protokoll des Kits angegeben ist, der Mastermix vorbereitet, der unter anderem das Enzym Reverse Transkriptase enthält, das einen komplementären DNA-Strang bildet. Darüber hinaus enthält die Mastermix-Lösung Random-Primers als Startpunkt für das Enzym Reverse Transkriptase sowie freie Basen zur Synthese. Das Enzym RNase Inhibitor verhindert den Abbau der RNA. Für die Reaktion wurden in einer 96-well PCR-Platte pro Vertiefung jeweils 10 µL Mastermix und 10 µL Probe vereint. Die Umschreibung erfolgte laut Temperaturprogramm in Tabelle 7.

Nachdem dieser Vorgang abgeschlossen war, bestand entweder die Möglichkeit die Proben bei -20°C zu lagern oder sofort den Schritt der Amplifikation vorzunehmen. Dieser Vorgang wird für die Bestimmung verwendet, ob eine Behandlung mit dem oben genannten Substanzen eine Auswirkung auf die Expression des Gens *UCP2* hat. Um die Expression des

UCP2 Gens bestimmen zu können, wird es auf eine endogene Kontrolle, (Referenzgen) bezogen. Diese sollte konstant exprimiert werden und von den Testsubstanzen unbeeinflusst bleiben. Für HepG2 Zellen hatte sich *PPIA* als endogenes Gen bewährt, da es stabil und konstant exprimiert wird [Fox et al., 2010]. Für die Reaktion ist wiederum die Herstellung einer Mastermix-Lösung notwendig. Folgende Bestandteile muss diese enthalten: fluoreszierender Farbstoff Fast Sybr Green, Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer und nukleasefreies Wasser. Bei dieser Reaktion lagert sich der Farbstoff in den Doppelstrang ein und gibt so ein Fluoreszenzsignal, d.h. je mehr doppelsträngige DNA vorhanden ist, desto intensiver ist das Fluoreszenzsignal. Abhängig davon welches Gen detektiert werden soll, müssen entweder die Primer des endogenen Gens *PPIA* in die Mastermix-Lösung hinzugefügt werden oder die des Zielgens *UCP2*. Die Primer der endogenen Kontrolle *PPIA* haben folgende Sequenzen [Fox et al., 2010]:

Forward: GCCGCTGTCTCTTTTCGCCG;

Reverse: GGAACCTTGTCTGCAAACAGCTCG.

Für das Gen *UCP2* wurde die Primersequenz mittels der Software Primer 3 generiert und von Sigma Aldrich, Austria synthetisiert:

Forward: GGAGGTGGTCGGAGATACCAA

Reverse: ACAATGGCATTACGAGCAACAT.

Für die Amplifikation wurden die Probe zuvor im Verhältnis 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Es wurden jeweils drei technische Replikate gemessen und jede Platte enthielt eine Negativ-Kontrolle, d.h. anstelle von cDNA wurde nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Das Zeit und Temperaturprogramm der PCR-Reaktion ist in Tabelle 6 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms LinReg PCR 2012.1.

Folgende Temperaturen und Zeiten wurden angewandt:

Tabelle 8: PCR-Bedingungen zur Umschreibung in cDNA (Standardprotokoll des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Life Technologies)

	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit [min]</i>
Anlagerung der Primer und Aktivierung der Polymerase	25	10
Synthese des DNA-Strangs	37	120
Abbau der RNA	85	5
Kühlung	4	∞

Tabelle 9: PCR-Bedingungen zur Vervielfältigung von PPIA / UCP2 (Standardprotokoll des Mastermix Sybr Green von Life Technologies)

	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit [sek]</i>	<i>Zyklen</i>
Aktivierung der Polymerase	95	20	1
Denaturierung der Doppelstränge	95	3	40
Anlagerung der Primer und Renaturierung	60	30	

Die statistische Auswertung der x-fachen Anreicherung basiert auf einem studentischen T-Test mit $p < 0,05$.

4. Statistik

4.1. Auswertung der Zytotoxizität anhand des Farbstoffes MTT

Zur statistischen Bewertung wird von den Absorptions-Rohdaten zuerst der Leerwert, der die Ergebnisse sonst verfälschen würde, subtrahiert. Dieser Rechenschritt berücksichtigt die Eigenabsorption der Zellkulturplatte und des MTT-Reagenz. Anschließend wird der Mittelwert der Kulturmedium-Kontrolle und der KCl-Puffer-Kontrolle gebildet, sodass die einzelnen Daten auf ihre jeweilige Kontrolle bezogen werden können.

Eine Überprüfung der Daten auf Ausreißer erfolgt mittels Nalimov. Mittels Statistikprogramm SigmaPlot 11.0 erfolgt die Analyse durch eine einfaktorielle ANOVA gefolgt von einem Holm-Sidak-Post hocTest, $p < 0,05$. Im Balkendiagramm sind T/C (Treated over Control) –Daten in Prozent als Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

4.2. Auswertung des Membranpotentials in HepG2 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1

Die Methode zur Messung des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 gibt die Rohdaten prozentuell pro Quadrant aus. Die Darstellung in SigmaPlot 11.0 als Liniendiagramm, zeigt die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Anhand der Methode nicht-parametrische ANOVA, werden die statistischen Signifikanzen ($p < 0,05$) ermittelt.

4.3. Auswertung der ROS-Produktion in HepG2 Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCFH-DA

Mittels Plattenlesegerät wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen. In SigmaPlot 11.0 erfolgt die Berechnung der Fläche unter der Kurve, um den Effekt über den Zeitverlauf von einer Stunde zu beurteilen. Ausreißer wer-

den anhand des Nalimov Tests ermittelt. Die Bestimmung der Effekte basiert auf nicht-parametrische ANOVA ($p < 0,05$). In einem Liniendiagramm sind Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

4.4. Auswertung der Nukleotidkonzentration ADP und ATP

Die Berechnung der Nukleotidkonzentrationen ist in Kapitel 6.2 Methoden beschrieben. Eine statistische Auswertung mittels nicht-parametrische ANOVA, ($p < 0,05$) zeigte keine Effekte. Die Nukleotide ATP und ADP sind im Verhältnis zueinander in einem Liniendiagramm in SigmaPlot 11.0 dargestellt.

4.5. Auswertung der Expression von UCP2

Mithilfe des Programms LinReg RT PCR, erfolgte die Berechnung der N_0 (N-Null)-Werte.

C_q ... Zyklus der Quantifizierung

N_0 ... Anfangskonzentration

Eff ... Effizienz

$$N_0 = \text{threshold} / (\text{Eff_mean}^{C_q})$$

Dieser Wert gibt Auskunft über die Konzentration des gesuchten Gens (*PPIA*, *UCP2*) bevor die qPCR durchgeführt wurde. N_0 berücksichtigt darüber hinaus die Effizienz der Amplifikation, dieser Parameter definiert wie effizient die Amplifikation, die von mehreren Parametern beeinflusst wird, erfolgt. Die durch das Programm LinReg RT PCR identifizierten i Ausreißer (<10 %) wurden aus der Berechnung ausgeschlossen.

Mittels studentischem T-Test, werden signifikante ($p < 0,05$) Änderungen der Expression bestimmt. Die Veränderung der einzelnen Konzentrationen zum Mittelwert der KCl-Puffer-Kontrolle ist in einem Liniendiagramm als Mittelwert der x-fachen Änderung mit Standardabweichung dargestellt.

5. Ergebnisse

In-vitro Experimente zur Erfassung der Effekte von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf den Energiestoffwechsel

5.1. Zytotoxizitätstest mittels MTT

Die Versuchsreihen dieser Arbeit zielten darauf ab, den Einfluss von KP-1339 und *trans*-Resveratrol in Kombination auf den Energiestoffwechsel zu untersuchen. Voraussetzung für diese Untersuchungen war, dass die Substanzen in für die Zellen nicht-toxischen Konzentrationen eingesetzt werden. Die Toxizität der Substanzen wurde mithilfe des MTT-Tests bestimmt.

Die Behandlung der HepG2-Zellen erfolgte durch KP-1339 und *trans*-Resveratrol, jeweils in den Konzentrationen 0,1, 1, 5, 10 μM und 10 μM . Nach einstündiger Inkubation in KCl-Puffer zeigten die HepG2-Zellen keine Einschränkung ihrer Viabilität im Vergleich zur Kontrolle, die nur Kulturmedium erhielt. Für alle Versuchsbedingungen wurde eine relative Zahl lebender Zellen, im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen (=100 %) von 90 %, nie unterschritten (Abbildung 11).

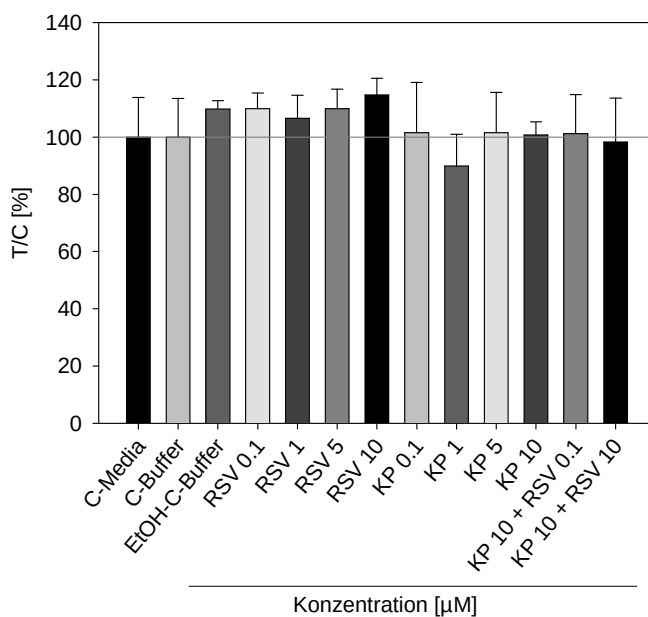


Abbildung 11: Nachweis der Zytotoxizität von KCl-Puffer, *trans*-Resveratrol und KP-1339 in HepG2 Zellen mittels MTT-Test, nach einstündiger Inkubation; $n=3$, T/C [%] (treatment over control) bezeichnet das prozentuale Verhältnis der Effekte von behandelten zu unbehandelten Zellen

Einfaktorielle ANOVA mit Holm-Sidak post hoc, $p < 0,05$

5.2. Nachweis einer Adduktbildung von KP-1339 und *trans*-Resveratrol in KCl-Puffer

Das Zytostatikum und der sekundäre Pflanzenstoff sind bislang nicht in einer Kombination getestet worden. Es besteht die Möglichkeit, dass KP-1339 und *trans*-Resveratrol eine chemische Reaktion eingehen und somit auch ihre Wirkungsweise verändert wird. Mittels Flüssigchromatographie erfolgte der qualitative Nachweis einer Reaktion zwischen *trans*-Resveratrol und KP-1339. Dazu wurden *trans*-Resveratrol in Co-Inkubation mit KP-1339 in 50 % Ethanol gelöst und anschließend mit Wasser oder KCl-Puffer verdünnt. Zur Detektion wurde die Lösung für 1 Stunde bei 37°C ins Wasserbad gegeben, um die Inkubationsbedingungen der Zellkulturexperimente nachzustellen.

Getestet wurden *trans*-Resveratrol und mit KP-1339 in einer Konzentration von 10 µM in KCl-Puffer, sowohl in Co-Inkubation als auch einzeln.

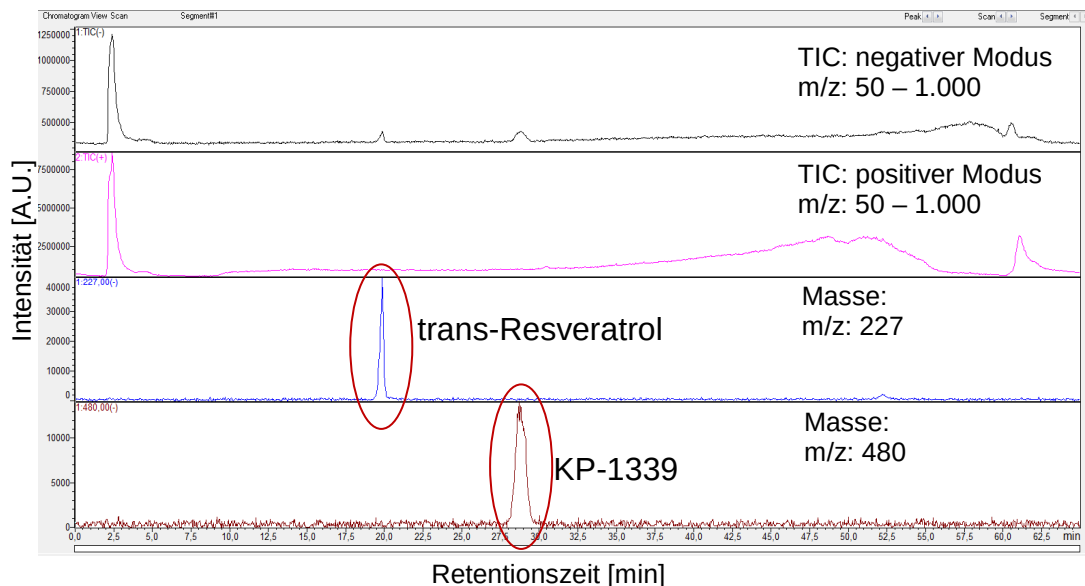


Abbildung 12: Die Kombination 10 µM *trans*-Resveratrol und 10 µM KP-1339 in KCl-Puffer zeigen nach 1 Stunde sowohl im negativen als auch positiven Ionenscan-Modus keinen neuen Komplex.

In Abbildung 12 ist aufgrund des Ionenscans im positiven und negativen Modus ersichtlich, dass kein neuer Komplex entsteht. Durch ein gezieltes Suchen von Ionen mit einer Masse von 227 g/mol und 540 g/mol wurde *trans*-Resveratrol nach 19,9 Minuten detektiert und KP-1339 nach 27,8 Minuten.

5.3. Effekt von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf das mitochondriale Membranpotential

Eines der frühen Ereignisse in der Apoptose ist die Depolarisierung des elektrochemischen Gradienten in der inneren Mitochondrienmembran. Diese Abnahme des mitochondrialen Membranpotential wurde mithilfe des Farbstoffes JC-1 nachgewiesen. Bei einer vorliegenden Einschränkung des mitochondrialen Membranpotentials bleibt der Farbstoff im Zytosol der Zelle und ein grünes Fluoreszenzsignal wird detektiert. Ist der elektrochemische Gradient der inneren Mitochondrienmembran aufrecht, gelangt JC-1 in den Matrixraum des Mitochondriums.

Eine einstündige Inkubation mit 1 μM *trans*-Resveratrol im KCl-Puffer führte zu einer signifikant höheren Depolarisierung um $5,4 \pm 5,2 \%$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die lediglich 0,5 % Ethanol als Lösungsmittelkontrolle enthielten. Die Behandlung mit 5 μM *trans*-Resveratrol erzielte einen weiteren depolarisierenden Effekt in der Höhe von $7,9 \pm 2,5 \%$. KP-1339 zeigte in einer Konzentration von 5 μM eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials von $10,8 \pm 9,7 \%$. Eine maximale Depolarisierung von $32,4 \pm 15,1 \%$ wurde mit 10 μM KP-1339 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei einer einstündigen Inkubation, detektiert.

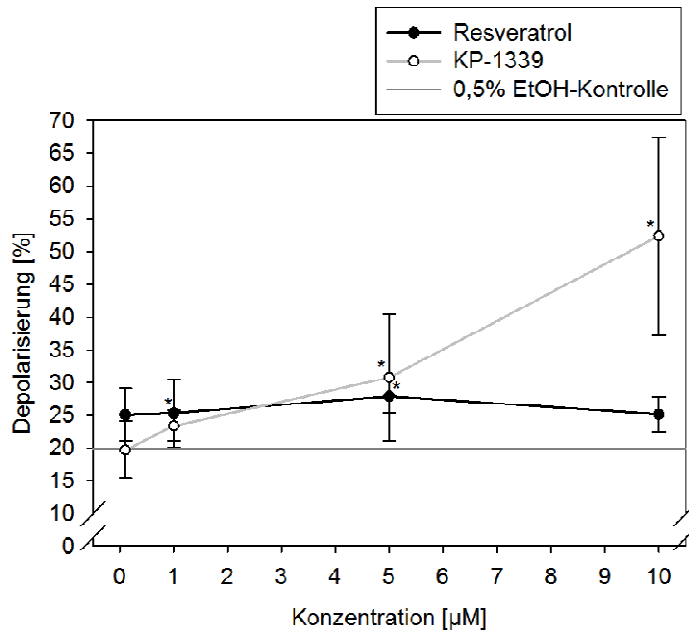


Abbildung 13: Einfluss von trans-Resveratrol und KP-1339 auf das mitochondriale Membranpotential in HepG2 Zellen; n=5

nicht-parametrische ANOVA, $p < 0,001$

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Effekte von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf die Depolarisierung der mitochondrialen Membran in deren Kombinationen und als Einzelsubstanz in HepG2 Zellen; Darstellung der Medianwerte basierend auf einer nicht-parametrischen ANOVA, n=5, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen unterschiedliche Signifikanzen $p < 0,05$; Kontrollzellen zeigen eine Depolarisierung von $21,2 \pm 1,30$ %;

Substanz	Depolarisierung [%]	Minimum – Maximum [%]
Resveratrol 0,1 µM	25,1 ^a	18,8 – 31,1
KP-1339 10 µM	53,0 ^b	28,7 – 71,5
Resveratrol 0,1 µM + KP-1339 10 µM	34,5 ^b	29,9 – 39,6

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Depolarisierung von KP-1339 und *trans*-Resveratrol in deren Kombinationen und als Einzelsubstanz in HepG2 Zellen; Darstellung der Medianwerte basierend auf einer nicht-parametrischen ANOVA, n=5, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede $p < 0,05$; Kontrollzellen zeigen eine Depolarisierung von $21,2 \pm 1,30 \%$;

<i>Substanz</i>	<i>Depolarisierung [%]</i>	<i>Minimum – Maximum [%]</i>
Resveratrol 10 μ M	25,1 ^a	20,5 – 29,0
KP-1339 10 μ M	53,0 ^b	28,7 – 71,5
Resveratrol 10 μ M + KP-1339 10 μ M	28,5 ^a	24,6 – 45,0

5.4. Einfluss von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf die zelluläre ROS-Produktion

Aufgrund der depolarisierenden Wirkungen von *trans*-Resveratrol und KP-1339 erfolgte im Anschluss die Untersuchung der intrazellulären ROS-Freisetzung. Eine Beeinträchtigung des elektrochemischen Protonengradienten soll mit einer erhöhten Produktion an ROS einhergehen [Fulda et al., 2010].

Mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes DCF, welcher mit intrazellulären ROS reagiert, wird die Analyse durchgeführt. In dieser Versuchsreihe zeigten HepG2 Zellen nach einer Behandlung 0,1 μ M *trans*-Resveratrol eine Abnahme der intrazellulären ROS auf 88,6 %. Ebenso wurde eine Senkung des intrazellulären ROS-Gehaltes auf 89,0 % festgestellt, wenn 10 μ M des sekundären Pflanzenstoffes eingesetzt wurden.

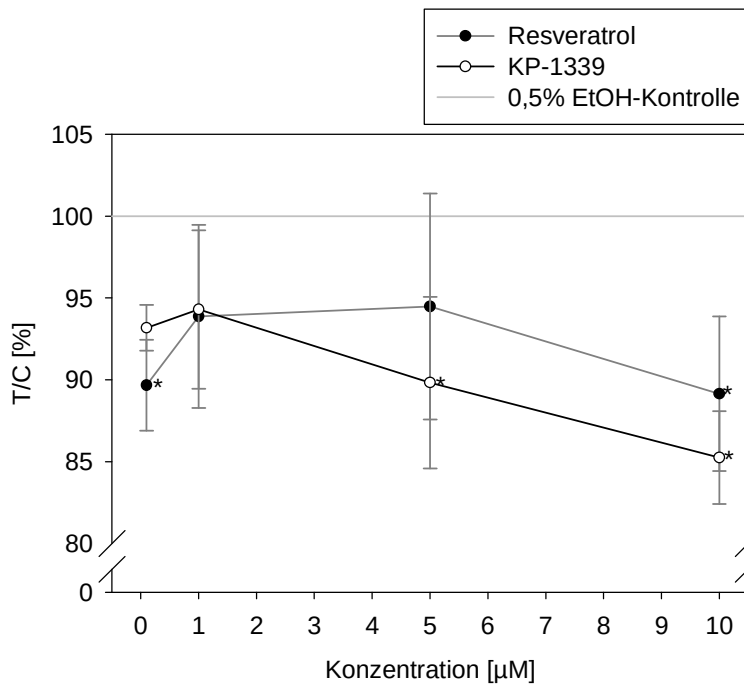


Abbildung 14: Einfluss von *trans*-Resveratrol und KP-1339 auf ROS-Produktion in HepG2 Zellen, n=5, T/C [%] (treatment over control) bezeichnet das prozentuale Verhältnis der Effekte von behandelten zu unbehandelten Zellen

nicht-parametrische ANOVA $p < 0,05$

Co-Inkubationen von 10 µM *trans*-Resveratrol und 10 µM KP-1339 hatten einen größeren Effekt auf die intrazelluläre ROS-Konzentration im Vergleich zur Einzel-Inkubation (Tabelle 12). Eine Konzentration von 0,1 µM *trans*-Resveratrol in Kombination mit 10 µM KP-1339 führten zu einer Abnahme auf 83,6 % der intrazellulären ROS-Freisetzung im Vergleich zur Einzel-Behandlung der HepG2 Zellen mit 0,1 µM *trans*-Resveratrol von 88,6 %.

Tabelle 12: Gegenüberstellung des prozentualen Gehaltes an ROS von *trans*-Resveratrol und KP-1339 in Co-Inkubation und als Einzelsubstanz in HepG2 Zellen, Darstellung der Medianwerte basierend auf einer nicht-parametrischen ANOVA, n=5, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen unterschiedliche Signifikanzen $p < 0,05$, T/C [%] (treatment over control) bezeichnet das prozentuale Verhältnis der Effekte von behandelten zu unbehandelten Zellen

<i>Substanz</i>	<i>T / C</i> [%]	<i>Minimum – Maximum</i> [%]
Resveratrol 0,1 µM	88,6 ^a	86,8 – 94,8
KP-1339 10 µM	84,5 ^b	81,7 – 89,8
Resveratrol 0,1 µM + KP-1339 10 µM	83,6 ^b	75,9 – 88,8

Tabelle 13: Gegenüberstellung des prozentualen Gehaltes an ROS von *trans*-Resveratrol und KP-1339 in Co-Inkubation und als Einzelsubstanz in HepG2 Zellen, Darstellung der Medianwerte basierend auf einer nicht-parametrischen ANOVA, n=5, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen unterschiedliche Signifikanzen $p < 0,05$, T/C [%] (treatment over control) bezeichnet das prozentuale Verhältnis der Effekte von behandelten zu unbehandelten Zellen

<i>Substanz</i>	<i>T / C</i> [%]	<i>Minimum – Maximum</i> [%]
Resveratrol 10 µM	89,0 ^a	81,1 – 97,0
KP-1339 10 µM	84,5 ^a	81,7 – 89,8
Resveratrol 10 µM + KP-1339 10 µM	77,8 ^b	65,2 – 88,9

5.5. Auswirkungen von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf die Gen-Expression von UCP2

Das in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes gebildete UCP2 ist in der Lage, den Protonengradienten durch passiven Rückstrom von Protonen in den mitochondrialen Matrixraum zu entkoppeln [Löffler & Petrides, 2003]. In der Folge wird Energie nicht für die Synthese von ATP verwendet, sondern als Wärme frei. Mittels quantitativer PCR wurde ermittelt, ob die Behandlung mit KP-1339 und *trans*-Resveratrol die Genexpression von UCP2 beeinflusst.

Im Detail zeigte eine Behandlung mit 0,1 µM und 5 µM *trans*-Resveratrol eine verminderte Expression von UCP2 auf $0,86 \pm 0,01$ bzw. $0,84 \pm 0,07$

bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, deren x-fache Anreicherung mit *UCP2* auf 1 gesetzt wurde. 0,1 μM des Zytostatikums führten zu einer Abnahme der Expression von *UCP2* auf $0,90 \pm 0,08$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Eine Behandlung mit 5 μM des Zytostatikums hatten eine effektive Erhöhung der *UCP2* Expression mit einer mittleren Anreicherung von $1,25 \pm 0,20$ gegenüber der Lösungsmittelkontrolle zur Folge.

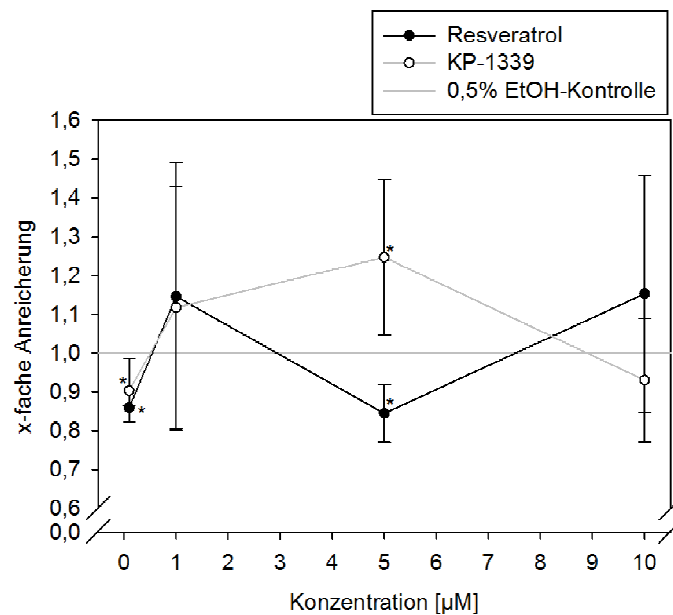


Abbildung 15: Einfluss von *trans*-Resveratrol und KP-1339 auf die mitochondriale Expression von *UCP2* in HepG2 Zellen; n=4, T-Test, $p < 0,05$

Tabelle 14: Expression des Proteins UCP2 in Abhängigkeit der Kombination 0,1 μM *trans*-Resveratrol und 10 μM KP-1339 in HepG2 Zellen; n=4, nicht-parametrische ANOVA, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen unterschiedliche Signifikanzen $p < 0,05$

Substanz	x-fache Anreicherung	Minimum – Maximum [%]
Resveratrol 0,1 μM	0,86 ^a	0,85 – 0,87
KP-1339 10 μM	0,91 ^{a,b}	0,75 – 1,17
Resveratrol 0,1 μM + KP-1339 10 μM	0,99 ^b	0,91 – 1,04

In der Kombination Resveratrol 10 μM mit KP-1339 10 μM wurde im Vergleich zu den jeweiligen Einzel-Inkubationen keine statistischen Unterschiede festgestellt.

Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigen, dass die einstündige Behandlung von HepG2 Zellen mit 5 μM *trans*-Resveratrol, aber auch mit 5 μM KP-1339 die Expression von *UCP2* im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle veränderten. Ein Nachweis mit weiteren Zeitpunkten könnte einen möglichen zeitabhängigen Effekt aufzeigen, sodass auch die Kombination von 0,1 μM bzw. 10 μM *trans*-Resveratrol mit 10 μM KP-1339 zu einer signifikanten Änderung der Expression führen.

5.6. Effekt von KP-1339 und *trans*-Resveratrol auf die Konzentration der Nukleotide ADP und ATP in HepG2 Zellen

Das Verhältnis der Verbindungen zueinander kann unter anderem zur Beurteilung des Protonengradienten bzw. des apoptotischen Zustandes herangezogen werden. Eine Abnahme der ATP-Konzentration weist auf eine Einschränkung des Energiestoffwechsels hin.

Die Resultate zeigen keine Effekte von *trans*-Resveratrol und KP-1339 auf das Verhältnis der Nukleotide ATP zu ADP (Abbildung 17).

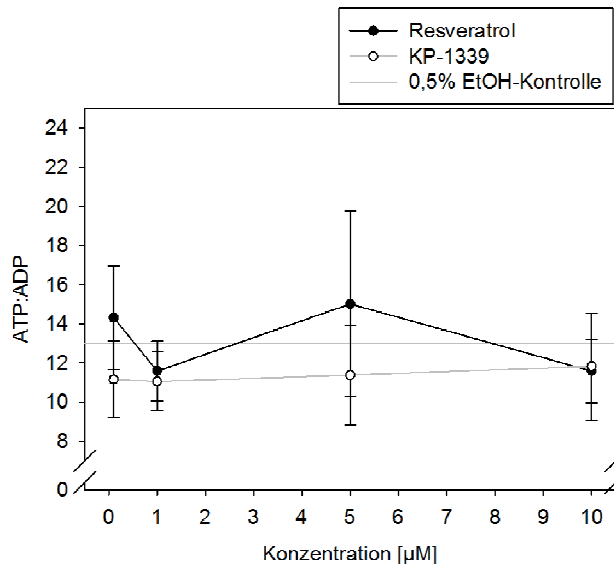


Abbildung 16: Einfluss von *trans*-Resveratrol und KP-1339 auf das Verhältnis ATP zu ADP, n=5, ANOVA on Ranks, $p < 0,05$ n.s.

Tabelle 15: Darstellung des Verhältnis von ATP zu ADP in HepG2 Zellen nach einstündiger Behandlung mit *trans*-Resveratrol und KP-1339 in KCl-Puffer; Darstellung der Medianwerte;

Substanz	ATP:ADP	Minimum – Maximum [ATP:ADP]
Lösungsmittelkontrolle	12,3	10,8 – 23,7
Resveratrol 0,1 μM	14,1	9,9 – 13,5
Resveratrol 10 μM	12,0	8,9 – 13,7
KP-1339 10 μM	11,6	8,9 – 15,1

Eine Veränderung des Verhältnisses von ATP und ADP wurde durch die Kombinationen von *trans*-Resveratrol und KP-1339 nicht induziert (Tabelle 15).

Tabelle 16: Darstellung des Verhältnis von ATP zu ADP in HepG2 Zellen nach einstündiger Behandlung mit *trans*-Resveratrol und KP-1339 in KCl-Puffer; Darstellung der Medianwerte;

Substanz	ATP:ADP	Minimum – Maximum [ATP:ADP]
Lösungsmittelkontrolle	35,3	26,3 – 47,7
Resveratrol 10 μM + KP-1339 10 μM	30,4	23,9 – 62,4
Resveratrol 0,1 μM + KP-1339 10 μM	28,8	27,5 – 34,1

Bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle zeigte eine Behandlung der HepG2 Zellen weder mit den Kombinationen noch mit den Einzelsubstanzen keine Änderung des Nukleotidstatus.

5.7. Nachweis der intrazellulären Produktion von Laktat nach Behandlung mit *trans*-Resveratrol und KP-1339

Eine Abnahme der mitochondrialen ATP-Synthese, sodass die Tumorzelle einen Mangel an ATP hat, zwingt die Zelle zur alternativen Energiegewinnung über Laktat. Unter Abwesenheit von Sauerstoff erfolgt durch Abbau von Glykogen die Synthese von ATP und Milchsäure [Warburg und Minami, 1923].

Die Detektion von Natriumlaktat erfolgte mittels LC-MS zunächst isokratisch mit einer 20 % Methanollösung. Da unter diesen Bedingungen Natriumlaktat im Puffer nicht detektiert wurde, erfolgte der Austausch des Laufmittels gegen 20 % Acetonitril sowie die Anwendung eines Gradienten.

Eine Detektion von in Wasser gelösten Natriumlaktat funktionierte problemlos mit beiden Laufmitteln.

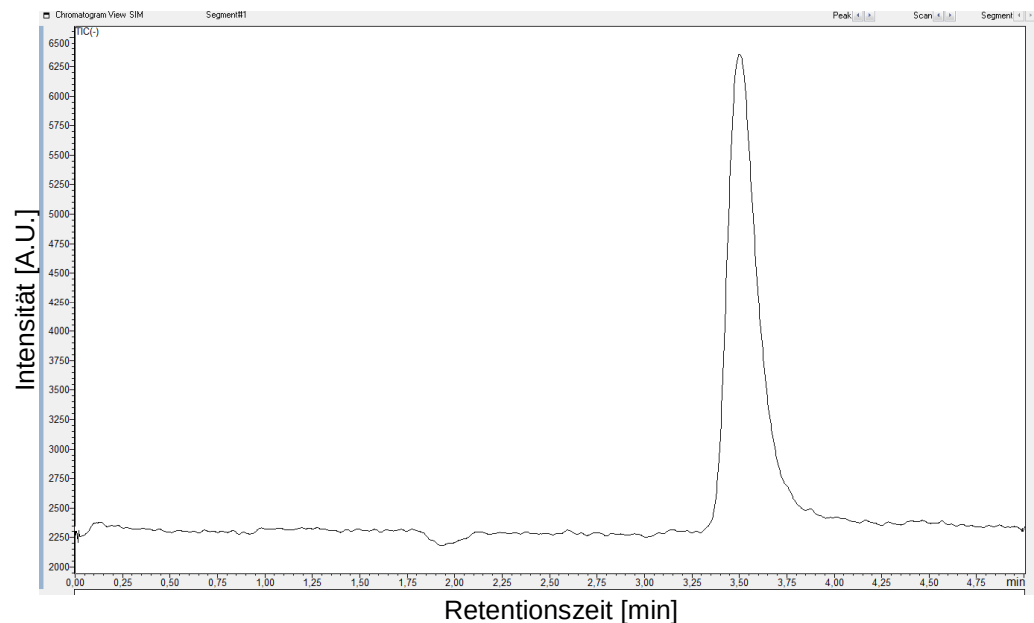


Abbildung 17: UV-Chromatogramm von 20 µg Natriumlaktat gelöst in bidestilliertem Wasser

Wurde Natriumlaktat jedoch im Puffer gelöst, gab dieses kein Signal mehr. Als Ursache könnten Matrixeffekte, welche vom KCl-Puffer ausgelöst wurden, verantwortlich gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit, Laktat dennoch zu detektieren, wäre die Aufarbeitung der Probe mittels Festphasenextraktion.

6. Diskussion

Die Gewinnung von ATP ist für das Überleben der Zelle von essentieller Bedeutung. Im Rahmen des Energiestoffwechsels erfolgt durch biochemische Prozesse der Abbau von Kohlenhydrate, Fette und Proteine zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP). ATP wird hauptsächlich in Anwesenheit von Sauerstoff in der mitochondrialen Atmungskette generiert [Löffler & Petrides, 2003].

Aufgrund der wichtigen Bedeutung der Mitochondrien zur Energiegewinnung lag der Fokus dieser Masterarbeit auf der Analyse der mitochondrialen Atmungskette in HepG2 Zellen. Die bisherige Literatur liefert einige Hinweise, dass der sekundäre Pflanzenstoff Resveratrol den Energiestoffwechsel beeinflusst [Timmers et al., 2011; Zheng & Ramirez, 2000 und Poulsen et al., 2012]. So führte eine Behandlung von isolierten Gehirn-Mitochondrien aus Wistar Ratten mit 25 μM Resveratrol, zu einer Abnahme der Aktivität von Komplex I der Atmungskette um 73 % [Moreira et al., 2013]. Des Weiteren nahm die Aktivität von Komplex II nach einer 24-stündigen Inkubation mit Konzentrationen von 5 μM bis 20 μM Resveratrol um bis zu 20 % zu [Bernhard et al., 2010]. Die Arbeiten zu Resveratrol zeigen sowohl eine Stimulierung als auch eine Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette. Der Mechanismus wie Resveratrol die mitochondriale Atmungskette verändert ist noch nicht geklärt, es scheint jedoch, dass die Wirkung von Resveratrol sowohl von der Zelllinie als auch vom Konzentrationsbereich abhängt [Übersicht bei Pignitter & Somoza, 2011]. Neben dem sekundären Pflanzenstoff Resveratrol zeigen auch verschiedene Zytostatika wie zum Beispiel *Cis*-Platin eine Wirkung auf den Energiestoffwechsel von Tumorzellen. *Cis*-Platin induziert eine Freisetzung von Cytochrom C der Atmungskette was eine Aktivierung von Caspasen zur Folge hat, die wiederum Apoptose auslösen [Mutschler et al., 2001]. Aufgrund des Einflusses von Resveratrol und *Cis*-Platin auf den Energiestoffwechsel von Zellen wurden diese in der vorliegenden Arbeit in Kombination untersucht. In

einer anderen Arbeit führte die Behandlung mit dem antiproliferativ wirkenden Zytostatikum *Cis*-Platin nach 48 Stunden in Kombination mit 100 µmol/L Resveratrol zu einer 2,3-fachen Abnahme der IC₅₀ in kleinzelligen Lungenkarzinomen [Zhao et al., 2010]. Eine Senkung der IC₅₀ aufgrund der Kombination des Zytostatikums mit Resveratrol bedeutet eine verbesserte Wirkung von *Cis*-Platin. Durch die Kombination mit sekundären Pflanzenstoffen kann jedoch auch die so induzierte Toxizität von Rutheniumkomplexen, wie zum Beispiel das Zytostatikum KP-1339, reduziert werden. Eine Koordination von Rutheniumkomplexen mit Ligandenderivaten aus 3-Hydroxyflavon induzierte eine Senkung der IC₅₀ [Kurzwehnhart et al., 2012]. Aufgrund der Wirkung einer Kombination von Rutheniumkomplexen mit 3-Hydroxyflavon sowie erster Effekte von KP-1339 auf den Energiestoffwechsel [Heffeter et al., 2010] führten zur erstmaligen Co-Inkubation von KP-1339 und *trans*-Resveratrol. In dieser Masterarbeit wurde erstmals die Wirkung von Resveratrol in Co-Inkubation mit dem rutheniumbasierten Zytostatikum KP-1339 untersucht. Dieses Zytostatikum auf Metallbasis ist aufgrund seiner im Vergleich zu *Cis*-Platin geringen Nebenwirkungen und breitem Wirkungsspektrum ein geeigneter Kombinationspartner [Dickson et al., 2011].

Bevor molekularbiologische Versuche mit der humanen Leberkrebszelllinie HepG2 durchgeführt wurden, erfolgte mittels LC-MS Methode die Untersuchung einer möglichen Komplexbildung zwischen *trans*-Resveratrol und KP-1339. Eine Arbeit von Esparza et al. weist daraufhin, dass Polyphenole und Metalle Komplexe bilden können [Esparza et al., 2005]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Masterarbeit zeigen jedoch, dass es unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zu keiner Adduktbildung zwischen *trans*-Resveratrol und KP-1339 kommt. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war eine mögliche Bindung des sekundären Pflanzenstoffes als auch des Zytostatikums an Serumproteine [Burkon & Somoza, 2008 und Bytze et al., 2011]. Es wäre denkbar, dass im Fall von *in vitro* Versuchen mit HepG2 Zellen die Substanzen an fötales Kälberserum im Kultivierungsmedium binden. Die Analyse des Wirkungsmechanismus in HepG2 Zellen wird

jedoch durch die ungebundene Form von *trans*-Resveratrol und KP-1339 begünstigt. Aus diesem Grund wurde für die Inkubation serumfreier KCl-Puffer verwendet. Die anschließende Festlegung der verwendeten Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM erfolgte aufgrund der ermittelten Plasmakonzentrationen in den Humanstudien von Boocock et al. (2007) und Wenzel & Somoza (2008). Beide Arbeiten zeigten Plasmakonzentrationen von Resveratrol im unteren mikromolaren Bereich bis höchstens 2,4 μM nach Gabe von 5 g *trans*-Resveratrol bzw. 85,5 mg Piceid pro 70 kg Körpergewicht [Boocock et al. ,2007 und Wenzel & Somoza, 2008]. Die Auswahl der 1-stündigen Inkubationszeit der Zellen basiert auf der Tatsache, dass KP-1339 vor allem in den ersten Stunden nach Verabreichung wirksam ist [Heffeter et al., 2010].

Als erstes Zellscreening wurde das mitochondriale Membranpotential mit Hilfe des Durchflusszytometers und des fluoreszierenden Farbstoffes JC-1 nach Inkubation mit *trans*-Resveratrol durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit den Konzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM Resveratrol führte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, in den Konzentrationen 1 μM und 5 μM zu einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials von $5,4 \pm 5,2 \%$. Das Zytostatikum induzierte in HepG2 Zellen mit den Konzentrationen 5 μM bzw. 10 μM eine Depolarisierung von $10,8 \pm 9,7$ bzw. $32,4 \pm 15,1 \%$. Die Ergebnisse der Einzelsubstanzen des JC-1 Versuches führten zur Co-Inkubation von 0,1 μM bzw. 10 μM *trans*-Resveratrol mit 10 μM KP-1339. In der Kombination 0,1 μM *trans*-Resveratrol mit 10 μM KP-1339 nahm die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf 14,5 % zu. Die Ergebnisse der Zellversuche zeigen, dass sowohl *trans*-Resveratrol als auch KP-1339 zu einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials führen. In Kombination mit *trans*-Resveratrol wird der Depolarisierungseffekt von KP-1339 jedoch abgeschwächt. Das Zytostatikum KP-1339 induziert mit *trans*-Resveratrol in HepG2 Zellen eine geringere Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials. Da gezeigt wurde, dass eine Abnahme des

mitochondrialen Membranpotentials mit einer erhöhten Freisetzung von ROS einhergeht [Fulda et al., 2010], erfolgte im Anschluss die Detektion der intrazellulären ROS-Produktion mittels des fluoreszierenden Farbstoffes DCF. Die Behandlung der Zellen mit *trans*-Resveratrol zeigte in Kombination mit dem Zytostatikum KP-1339 synergistische Effekte. Die Kombination von 10 µM des sekundären Pflanzenstoffes mit 10 µM KP-1339 führte in den Zellen zu einer Abnahme um 22,2 % der ROS-Freisetzung im Vergleich zu 10 µM *trans*-Resveratrol alleine mit 11 % Reduktion. Eine Behandlung der Zellen mit den Kombinationen induzierte eine geringere intrazelluläre ROS-Freisetzung im Vergleich zu 10 µM KP-1339 allein. Dieser Effekt stimmt mit jenem des mitochondrialen Membranpotentials überein, da auch hier die Kombination in den Zellen weniger depolarisierte im Vergleich zu 10 µM KP-1339 alleine. Um den Wirkungsmechanismus von *trans*-Resveratrol und KP-1339 in der mitochondrialen Atmungskette weiterhin aufklären zu können, erfolgte die Bestimmung der Expression des *UCP2* Gens. Auch in diesem Zusammenhang gibt es bereits Hinweise, dass Resveratrol die Expression des *UCP2* Gens induziert, wie eine Tierstudie von Poulsen et al. (2012) aufzeigt. Da dieses Entkopplungsprotein den Rückstrom der Protonen in den Matrixraum des Mitochondriums induziert, kommt es zur Einschränkung des elektrochemischen Protonengradienten bzw. zur Abnahme der ATP-Konzentration in der Tumorzelle. In vorliegender Arbeit führte die Co-Inkubation von HepG2 Zellen mit 0,1 µM *trans*-Resveratrol und 10 µM KP-1339 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu keiner Abnahme der Expression des *UCP2* Gens. Eine Behandlung mit der höchsten Konzentration von 10 µM KP-1339 zeigte ebenso keinen Effekt. Nachdem die Inkubation der Zellen für 1 Stunde durchgeführt wurde, könnte der Nachweis einer veränderten Expression von *UCP2* mit einem längerfristigen Zeitpunkt erfolgen.

Obwohl in Studien mehrfach belegt werden konnte, dass eine Behandlung mit Resveratrol zu einer Abnahme der ATP-Synthase Aktivität führte [Zheng & Ramirez, 2000 und Szkudelska et al., 2009] zeigte die nachfolgende Ab-

klärung des Verhältnisses der Nukleotide ATP zu ADP in vorliegender Arbeit keinen Effekt. Aus dem unveränderten Status lässt sich folgern, dass HepG2 Zellen keinen Mangel an ATP hatten und somit ausreichend mit Energie versorgt gewesen sein müssten. Aufgrund der in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse, kann vermutet werden, dass auch hier eine längere Inkubationsdauer von über 1 Stunde zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses von ATP zu ADP erreicht werden kann. Da die Lösungsmittelkontrolle eine hohe altersabhängige Streuung aufweist, können die Ergebnisse der Inkubation mit den Einzelsubstanzen nicht mit jenen der Kombination verglichen werden.

In Abbildung 18 wird der hier postulierte Wirkungsmechanismus anhand der Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt. Die Aufnahme von Resveratrol in die Zelle wird in der Literatur über zwei Hauptwege diskutiert, einerseits über passive Diffusion [Delmas & Lin, 2011]. Andererseits gibt es Evidenz, dass der Transporter Organo-Anion Transporter (OATP) zur Aufnahme in die Zelle dient [Lancon et al., 2004]. In dieser Masterarbeit zeigte *trans*-Resveratrol nach 1 Stunde eine Depolarisierung der mitochondrialen Atmungskette. Resveratrol kann in den Komplexen I bis IV auf verschiedenen Wegen zur Einschränkung der Atmungskette führen. An Komplex I und II kann die Übertragung der Elektronen aus den Reduktionsäquivalenten NADH bzw. FADH_2 sowohl vermehrt induziert als auch inhibiert werden. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass die Oxidation von Ubichinon zu Ubihydrochinon ebenso induziert bzw. inhibiert werden kann. Bei dieser Reaktion werden reaktive Sauerstoffspezies frei [Löffler & Petrides, 2003], die von *trans*-Resveratrol reduziert werden könnten. An Komplex III erfolgt die Reoxidation von Ubihydrochinon zu Ubichinon. Wird diese Reaktion eingeschränkt, können weniger Elektronen entlang des mitochondrialen Membranpotentials transportiert werden und so zu einer Einschränkung der Atmungskette führen. *Trans*-Resveratrol kann jedoch auch die Freisetzung des Proteins Cytochrom C beeinflussen, wie in der Arbeit von Zini et al. (2002) aufgezeigt wird. Die Behandlung von Mitochondrien der Ratte mit

10 mM Resveratrol führte in dieser Arbeit zu einem Anstieg der Cytochrom C Freisetzung [Zini et al., 2002].

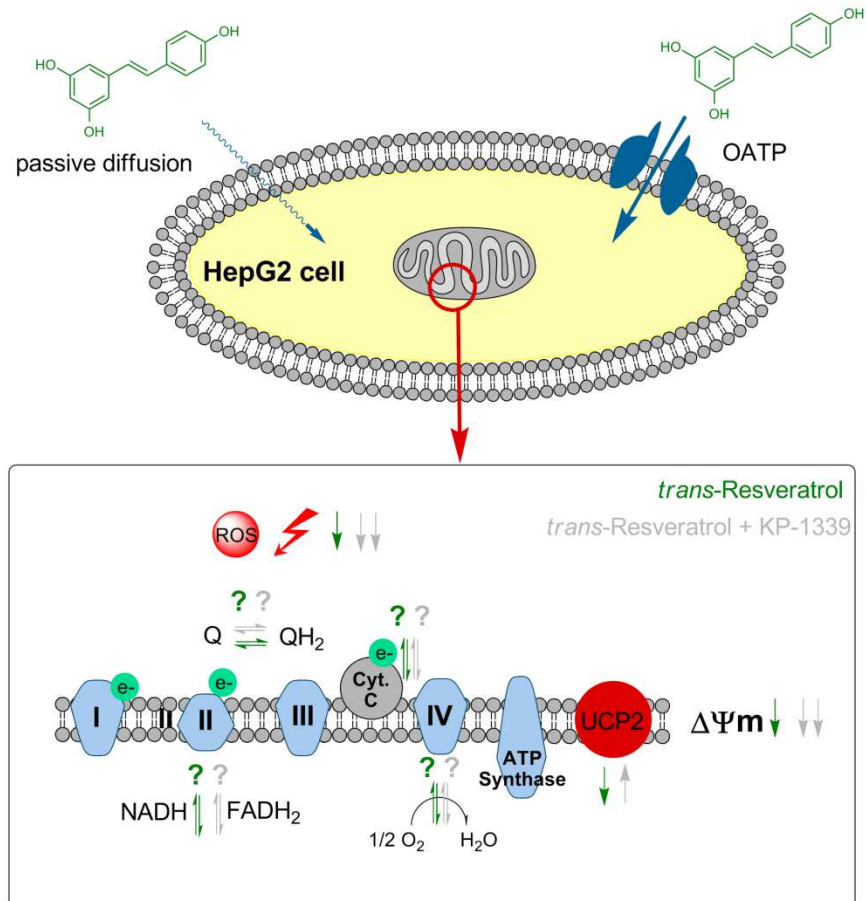


Abbildung 18: Aufnahme von *trans*-Resveratrol alleine und in Kombination mit KP-1339 in HepG2 Zellen

Der nachfolgende Nachweis der intrazellulären ROS-Freisetzung in HepG2 Zellen zeigte in der vorliegenden Arbeit eine Abnahme an freigesetzten ROS durch die Behandlung mit *trans*-Resveratrol und KP-1339 in Kombination. Ein antioxidativer Effekt kann einerseits auf eine Reaktion mit ROS die bei der Oxidation von Ubichinon freigesetzt werden oder durch eine Zunahme des Protonenstroms aus der mitochondrialen Matrix. Der nachfolgende Nachweis der Expression des *UCP2* Gens zeigt in der vorliegenden Arbeit für die Co-Inkubation mit KP-1339 eine Zunahme der Expression im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit *trans*-Resveratrol allein. Ein Anstieg der Expression von *UCP2* ist mit einer Abnahme des mitochondrialen

Membranpotentials assoziiert [Echtay et al., 2000]. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte eine geringere Abnahme der Expression des *UCP2* Gens nachgewiesen werden, wenn KP-1339 mit *trans*-Resveratrol co-inkubiert wurde. Dieses Ergebnis ist mit jenen der mitochondrialen Depolarisierung stimmig, da auch infolge des JC-1 Screenings die Kombination des Zytostatikums mit dem sekundären Pflanzenstoff geringer ausfiel, als die Behandlung der Zellen mit KP-1339 alleine. Das Verhältnis ATP zu ADP wurde durch *trans*-Resveratrol jedoch nicht beeinflusst.

Bisherige Arbeiten mit *Cis*-Platin in co-Inkubation mit Resveratrol zeigen eine verstärkte Wirkung des Zytostatikums aufgrund des Polyphenols [Santandreu et al., 2010]. In dieser Masterarbeit führte die Behandlung der Zellen mit KP-1339 in co-Inkubation mit *trans*-Resveratrol zu einer Abschwächung der zytotoxischen Wirkung. Dieser abschwächende Effekt könnte in der Therapie möglicherweise zur Empfehlung führen, dass Patienten im Rahmen der Zytostatikatherapie mit KP-1339 die Aufnahme von Resveratrol, aus zum Beispiel Traubensäften, meiden sollten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Hypothese, dass *trans*-Resveratrol und KP-1339 als Einzelsubstanzen und in Co-Inkubation, in Abwesenheit von Serumproteinen einen Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette haben, bestätigt. Die Tumorzelle weist trotz Beeinträchtigung der Atmungskette ein ausreichend hohes Verhältnis von ATP zu ADP auf. Diese Tatsache könnte mit dem veränderten Stoffwechsel von Krebszellen zusammenhängen, welche trotz Anwesenheit von Sauerstoff ihre Energie vermehrt über anaerobe Glykolyse beziehen [Warburg und Minami, 1928]. Durch den Nachweis der Laktatkonzentration im Zytoplasma könnten weitere Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus von *trans*-Resveratrol mit KP-1339 gewonnen werden. Darüber hinaus könnte aufgezeigt werden, ob *trans*-Resveratrol und KP-1339 im endoplasmatischen Retikulum (ER) das Chaperon GRP78 inhibieren. GRP78 schützt als Chaperon im ER neusynthetisierte Proteine bei ihrer Reifung [Buchner, 2002]. Die Tatsache, dass ein

gewisser Grad an ER-Stress - welcher durch missgefaltete Proteine oder Glukosemangel induziert wird - zu einer morphologischen Veränderung des Mitochondriums führt, wodurch in diesem eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C stattfindet, zeigt die Verbindung zwischen den beiden Organellen. Eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C führt zum Anschwellen der Mitochondrienmembran, wodurch eine Depolarisierung des Membranpotentials eingeleitet wird [Faccenda et al., 2013]. Tatsächlich konnte bereits für *trans*-Resveratrol [Um et al., 2010] als auch für KP-1339 [Thompson et al., 2012] die Inhibierung des Chaperons GRP78 nachgewiesen werden. Eine Co-Inkubation von KP-1339 mit *trans*-Resveratrol wurde hinsichtlich des Proteins GRP78 noch nicht getestet.

7. Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Wirkung des sekundäre Pflanzenstoffes *trans*-Resveratrol und des rutheniumbasierten Zytostatikums KP-1339 in Kombination auf den Energiestoffwechsel getestet. Aufgrund der essentiellen Bedeutung des Energiestoffwechsels für Zellen lag der Fokus dieser Arbeit auf der Aufklärung des Wirkungsmechanismus wie *trans*-Resveratrol in Co-Inkubation mit KP-1339 die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran beeinflusst. Es gibt bereits eindeutige Hinweise, dass Resveratrol einen Effekt auf den Energiestoffwechsel in Tumorzellen hat [Timmer et al., 2010, Zheng & Ramirez, 2000 und Poulsen et al., 2012]. In den bisherigen Arbeiten von Resveratrol und dessen Effekt auf den Energiestoffwechsel wird sowohl eine Stimulierung als auch eine Inhibierung beschrieben [Übersicht bei Pignitter & Somoza, 2011]. Eine Behandlung mit Resveratrol zeigte sowohl eine Induktion der Aktivität von Komplex I und II [Timmers et al., 2011] als auch eine Zunahme der Freisetzung von Cytochrom C [Zini et al., 2012]. Die erhöhte Freisetzung dieses Proteins führt zu einer Induktion des Elektronentransports entlang der Atmungskette, wodurch es zu einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials kommen kann [Löffler & Petrides, 2003]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Resveratrol die Expression des Gens *UCP2* reduziert, wodurch der elektrochemische Protonengradient in der Membran beeinflusst wird [Andrews et al., 2005]. Resveratrol hatte nicht nur einen Einfluss auf die Aktivität der Enzymkomplexe in der mitochondrialen Atmungskette, sondern führte auch in einer Konzentration von 21 μ M zur Inhibierung der ATP-Synthase wie die Arbeit von Zheng & Ramirez [2000] demonstrierte. Aber auch Zytostatika wie *Cis*-Platin beeinflussen den Energiestoffwechsel [Santandreu et al., 2010]. Aufgrund der Toxizität von *Cis*-Platin [Mutschler et al., 2001] erfolgte eine Kombination mit Resveratrol, wodurch es im Zellversuch zu einer Abnahme der IC_{50} kam [Zhao et al., 2010]. Ein alternatives Zytostatikum mit im Vergleich zu *Cis*-Platin geringeren Nebenwirkungen [Trondl et al., 2012] könnte das rutheniumbasierte Zytostatikum KP-1339

sein. In der Arbeit von Heffeter et al. (2010) wurde eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch die Behandlung mit KP-1339 nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten rutheniumbasierende Komplexe, wie zum Beispiel KP-1339 einer ist, durch eine Koordination mit 3-Hydroxyflavon abgeleiteten Liganden, eine Reduktion der IC_{50} Konzentration in ovariellen Krebszellen [Kurzwehnart et al., 2012]. Die Arbeit von Kurzwehnart (2012) führt zur Hypothese, dass die Wirkung von KP-1339 durch eine Co-Inkubation mit Resveratrol verstärkt wird. In dieser Masterarbeit erfolgte eine Co-Inkubation von *trans*-Resveratrol mit KP-1339 aufgrund der bisherigen Hinweise, dass 100 μM /L des sekundären Pflanzenstoffes in Kombination mit dem Zytostatikum *Cis*-Platin nach 48 h zu einer Abnahme der IC_{50} und somit zu einer verbesserten Wirkung von *Cis*-Platin führte [Zhao et al., 2010], sowie aufgrund der Ergebnisse der Arbeit von Kurzwehnart et al. (2012).

Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von *trans*-Resveratrol und KP-1339 auf die mitochondriale Atmungskette erfolgte die Anwendung eines serumfreien KCl-Puffers zur Inkubation. Durch die Verwendung einer Pufferlösung anstelle des Zellkulturmediums sollte verhindert werden, dass *trans*-Resveratrol und KP-1339 an Serumproteine binden [Wenzel & Somoza, 2005 und Heffeter et al., 2010]. Die Festlegung des Konzentrationsbereiches von 0,1 μM bis 10 μM beruht auf die nachgewiesenen Plasmakonzentration von 2,4 μM bzw. 1,6 μM Resveratrol nach Verabreichung von 5 g Resveratrol bzw 85,5 mg Piceid aus den Humanstudien von Bocock et al., 2007 und Wenzel & Somoza, 2005. Die Inkubationszeit von 1 Stunde mit den Substanzen *trans*-Resveratrol und KP-1339 basiert auf der Tatsache, dass das Zytostatikum vor allem in den ersten Stunden nach Applikation am aktivsten ist [Dömötör et al., 2013]. Bevor die Analysen in HepG2 Zellen durchgeführt wurden, wurde mittels Flüssigchromatographie aufgezeigt, dass *trans*-Resveratrol und KP-1339 keinen Komplex miteinander bilden. Das darauffolgende Screening des mitochondrialen Membranpotentials mittels des fluoreszierenden Farbstoffes JC-1 in HepG2 Zellen diene als

Grundlage zur Auswahl der Konzentration 0,1 μM bzw. 10 μM *trans*-Resveratrol in Co-Inkubation mit 10 μM KP-1339 für die nachfolgenden Experimente. KP-1339 in einer Konzentration von 10 μM hatte eine höhere Depolarisierung von 33,0 % des mitochondrialen Membrans im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Eine Co-Inkubation von KP-1339 mit *trans*-Resveratrol führte zu einer Depolarisierung des elektrochemischen Gradienten in der Höhe von 14,5 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. *trans*-Resveratrol führte zu einer Abschwächung der Wirkung von KP-1339 hinsichtlich der Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials. Eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist mit einer erhöhten Freisetzung der intrazellulären ROS assoziiert [Fulda et al., 2010], weshalb zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Farbstoff DCFH-DA zur Detektion intrazellulärer ROS-Freisetzung angewandt wurde. Anhand dieser Methode wurde ein synergistischer Effekt bei einer Co-Inkubation von 10 μM *trans*-Resveratrol und 10 μM KP-1339 nachgewiesen. Eine Behandlung mit 10 μM *trans*-Resveratrol führten zu einer Abnahme der intrazellulären ROS auf 89,0 %. Die Kombination von 10 μM *trans*-Resveratrol mit 10 μM KP-1339 induzierte in HepG2 Zellen eine Reduktion der intrazellulären ROS-Freisetzung auf 77,8 % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, die 100 % beträgt. Die weitere Abnahme der intrazellulären ROS-Freisetzung stimmt mit der geringeren Depolarisierung von KP-1339 überein, wenn dieses in Co-Inkubation mit *trans*-Resveratrol getestet wurde. Im Rahmen der Atmungskette kann eine vermehrte *UCP2*-Expression zu einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials führen [Jones et al., 2005]. In vorliegender Arbeit führte die Behandlung mit *trans*-Resveratrol in einer Konzentration von 0,1 μM zu einer Abnahme der Genexpression auf 0,86 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Die Kombination induzierte keine Änderung der Expression des *UCP2* Gens. Die Ergebnisse der qPCR deuten darauf hin, dass auch hier eine Co-Inkubation mit *trans*-Resveratrol zu einer weniger zytotoxischen Wirkung von KP-1339 führte. Um das Ausmaß des Einfluss von KP-1339 in Co-Inkubation mit *trans*-Resveratrol zu analysieren, erfolgte als

nächster Schritt die Bestimmung des Nukleotidstatus ATP und ADP. Obwohl *trans*-Resveratrol in Kombination mit KP-1339 das mitochondriale Membranpotential senkte, wurde das Verhältnis ATP zu ADP nicht verändert. Aufgrund des unveränderten Verhältnisses der Nukleotide ist anzunehmen, dass HepG2 Zellen keinen ATP-Mangel hatten. Bei der Beurteilung des Nukleotidstatus ist zu berücksichtigen, dass eine längere Behandlung der Zellen sowie höhere Konzentrationen den Effekt von *trans*-Resveratrol bzw. KP-1339 auf das Verhältnis von ATP zu ADP, möglicherweise beeinflussen könnten. Bei einer Inkubationszeit von 1 Stunde zeigen 10 µM KP-1339 knapp ($p < 0,057$) keinen Effekt auf das Verhältnis ATP zu ADP.

Die Untersuchung der Parameter in der mitochondrialen Atmungskette führte zur Annahme des folgenden Mechanismus: eine Behandlung von HepG2 Zellen mit KP-1339 führte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, wobei eine Co-Inkubation mit *trans*-Resveratrol die depolarisierende Wirkung von KP-1339 abschwächte. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch die Kombination *trans*-Resveratrol und KP-1339 könnte durch Einwirkungen auf die einzelnen Komplexe in der Atmungskette verursacht werden. Eine Kombination von *trans*-Resveratrol und KP-1339 zeigte eine Abnahme der intrazellulären ROS im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Eine Reaktion, bei der ROS in der Atmungskette entstehen, findet an Komplex II durch die Oxidation von Ubichinon zu Ubihydrochinon statt [Löffler & Petrides, 2003]. Die Behandlung von Zellen mit *trans*-Resveratrol und KP-1339 könnte aber auch zu einer Induzierung des Protonenstroms aus der mitochondrialen Matrix geführt haben, wodurch vermehrt Elektronen in die Atmungskette übertragen werden. Eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials könnte auch aufgrund der veränderten Expression von *UCP2*, bei einer Behandlung von 0,1 µM *trans*-Resveratrol mit 10 µM KP-1339, induziert worden sein.

Die Hypothese, dass *trans*-Resveratrol und KP-1339 in Abwesenheit von Serumproteinen die mitochondriale Atmungskette beeinflusst, wird durch die Daten dieser Arbeit gestützt. Weiterhin kann aus den Daten eine Abnahme der Wirkung von KP-1339 durch *trans*-Resveratrol abgeleitet werden. Für weitere Analysen der Kombination wären höhere Konzentrationen sowie längere Inkubationszeiten von Interesse. Um den Energiestoffwechsel der Tumorzelle weiter aufklären zu können, könnte der Gehalt von Laktat im Zytoplasma bestimmt werden. Die Hypothese von Warburg postuliert, dass auch unter aeroben Bedingungen Tumorzellen vermehrt anaerobe Glykolyse betreiben, bei der Laktat als Endprodukt entsteht [Warburg & Minami, 1928]. Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus könnte die Detektion des Chaperons GRP78 im ER beitragen. Die Expression von GRP78 wird zum Schutz unreife Proteine im ER erhöht. Es gibt Hinweise, dass KP-1339 GRP78 inhibiert und so ein Schutz gegen ER-Stress fehlt [Trondl et al., 2012].

8. Zusammenfassung

Für den Energiestoffwechsel der Zelle ist die Synthese von ATP von zentraler Bedeutung. Die Synthese von ATP kann in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff ablaufen. In vorangegangenen Arbeiten zeigten sowohl der sekundäre Pflanzenstoff *trans*-Resveratrol als auch das Zytostatikum *Cis*-Platin einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel. Das rutheniumbasierte Zytostatikum KP-1339 wurde bereits in einer klinischen Studie der Phase I getestet und führte im Vergleich zu *Cis*-Platin zu schwächeren Nebenwirkungen. Außerdem sind erste Hinweise auf einen Einfluss von KP-1339 auf die mitochondriale Atmungskette vorhanden. Die bisherige Auswertung der Literatur zeigte weiterhin, dass eine Kombination von *trans*-Resveratrol mit dem Zytostatikum *Cis*-Platin sowie eine Koordination von Rutheniumkomplexen mit Liganden aus 3-Hydroxyflavonon, zu einer Reduktion der IC_{50} *in-vitro* führten. Da somit die Kombination eines Zytostatikums mit einem Polyphenol eine verbesserte zytotoxische Wirkung des Zytostatikums zeigte, wurde in dieser Arbeit erstmals eine Co-Inkubation von *trans*-Resveratrol mit dem rutheniumbasierten Zytostatikum KP-1339 untersucht. Der Fokus lag sowohl auf der Analyse des Energiegewinnungsmechanismus über die mitochondriale Atmungskette sowie der Untersuchung, ob durch die Kombination von KP-1339 mit *trans*-Resveratrol in geringen Konzentrationen eine verbesserte Wirkung des Zytostatikums eintritt, wie es bei *Cis*-Platin demonstriert wurde.

In vorliegender Arbeit zeigte sich in einem ersten Screening des mitochondrialen Membranpotentials von humanen Leberkrebszellen (HepG2), dass die Kombination 0,1 μ M *trans*-Resveratrol mit 10 μ M KP-1339 zu einer geringeren Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10 μ M KP-1339 führte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass *trans*-Resveratrol die Wirkung von KP-1339 abschwächt. Eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials ist mit einer intrazellulären ROS-Freisetzung assoziiert. Die Behandlung der

HepG2 Zellen mit 10 μ M *trans*-Resveratrol in Co-Inkubation mit 10 μ M KP-1339 führte weiterhin zu einer Verringerung der intrazellulären ROS-Freisetzung. Somit wurden in vorliegender Arbeit eine verringerte Freisetzung von intrazellulären ROS sowie gleichzeitig eine geringere Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt. Eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials kann jedoch nicht nur mit einem verringerten Elektronentransport, sondern auch mit einer erhöhten Expression des Entkopplungsproteins UCP2 in der Atmungskette assoziiert sein. In vorliegender Arbeit zeigte sich jedoch keine Veränderung der Expression von UCP2 in Abhängigkeit der Behandlung der HepG2 Zellen mit *trans*-Resveratrol und KP-1339.

Die Ergebnisse dieser Masterarbeit führen zur Annahme, dass *trans*-Resveratrol in Co-Inkubation mit KP-1339 einen Einfluss auf die Enzymkomplexe der Atmungskette ausübt. Die veränderte intrazelluläre ROS-Freisetzung ist möglicherweise auf eine Reaktion von *trans*-Resveratrol und KP-1339 mit ROS, die aus der Oxidation von Ubichinon zu Ubihydrochinon stammen könnten, zurückzuführen. Darüber hinaus könnten ROS aus dem Protonenstrom der mitochondrialen Matrix freigesetzt worden sein. Obwohl ein Effekt auf das mitochondriale Membranpotential gezeigt wurde, gab es keine Änderung der UCP2-Expression. Eine längerfristige Inkubationszeit könnte möglicherweise einen Effekt auf die UCP2-Expression induzieren.

Um den Wirkungsmechanismus von KP-1339 und *trans*-Resveratrol hinsichtlich des Energiestoffwechsels aufklären zu können, sollten in weiterführenden Studien der Einfluss einer längeren Inkubationszeit sowie der höheren Konzentrationen der Testsubstanzen herangezogen werden.

9. **Abstract**

Energy metabolism plays an essential role in every organism. ATP synthesis occurs in the presence and absence of oxygen. The combination of *trans*-Resveratrol and the cytostatic drug *cis*-platin was shown to affect the mitochondrial energy metabolism. In a clinical phase I study, KP-1339, a ruthenium based cytostatic drug, demonstrated fewer and less pronounced side effects than *cis*-platin. KP-1339 was also tested for its effects on the mitochondrial energy metabolism. In these studies *cis*-platin, in combination with *trans*-Resveratrol, could reduced IC₅₀ values. Also, for ruthenium based complexes coordinated with 3-hydroxyflavone ligands, lower IC₅₀ values as compared to ruthenium based complexes were demonstrated. Based on this data, the hypothesis arises whether a combination of a cytostatic drug, such as, KP-1339, with a polyphenol like *trans*-Resveratrol, may enhance the cytostatic effect of the drug. To test this hypothesis, an initial screening of the mitochondrial membrane potential, in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by means of the fluorescent dye JC-1 demonstrated that 0,1 µM *trans*-resveratrol in co-incubation with KP-1339 induces a depolarisation of the mitochondrial membranes. In contrast, treatment with 10 µM KP-1339 alone showed a less pronounced effect. From the literature it is known that an intracellular release of ROS is associated with a depolarisation of the mitochondrial membrane. In this work, a decrease of intracellular ROS was detected after incubation with 10 µM *trans*-Resveratrol in combination with 10 µM KP-1339. However, a reduction of the mitochondrial membrane potential has also been associated with changes in the expression of the uncoupling protein UCP2 that is located in the mitochondrial respiratory chain. In this work, gene expression of *UCP2* in HepG2 showed no effect after the treatments. Also, the ratio of the nucleotides ATP to ADP in HepG2 cells was not affected by any of the experimental conditions. Future studies should identify whether longer incubation periods and higher concentrations of the test compounds affect the protein expression of UCP2 and ATP synthesis.

In conclusion, the here presented results lead to the assumption that *trans*-Resveratrol in combination with KP-1339 affects the activity of the five enzyme complexes in the mitochondrial respiratory chain. The observed reduction of intracellular ROS, could be explained by a reaction of *trans*-Resveratrol and KP-1339 with ROS, which are generated by oxidation of ubiquinone to ubihydroquinone. Moreover, an increased proton influx via the inner mitochondrial membrane is another source for intracellular ROS. Although there was an effect on the mitochondrial membrane potential, there was no change for the expression of *UCP2* and for the ratio of ATP to ADP after treatment with *trans*-Resveratrol and KP-1339 demonstrated. In conclusion, this work supports the hypothesis that *trans*-Resveratrol and KP-1339 influence the mitochondrial respiratory chain in the absence of serum proteins. Moreover, co-incubation with *trans*-Resveratrol and KP-1339 resulted in less pronounced effects as compared to treatments with KP-1339 alone.

10. Anhang

Bestimmung der Zytotoxizität von KP-1339 und *trans*-Resveratrol in KCl-Puffer nach einstündiger Inkubation

Angabe der Daten als *T/C* [%]:

	Medium-kontrolle	KCl-Puffer Kontrolle	0,5 % Ethanol-Kontrolle
	81,5	88,5	107
	118	104	108
	100	108	
	90,5	101	114
	123	77,8	108
	86,2	121	109
	103	109	
	95,3	105	113
	102	85,5	
Mittelwert	99,9	100,0	109
Standard-abweichung	13,7	13,5	2,93

	0,1 µM <i>trans</i> -Resveratrol 10 µM KP-1339	10 µM <i>trans</i> -Resveratrol 10 µM KP-1339
	75,5	111
	111	119
	92,7	108
	89,6	105
		77,3
	117	106
		85,6
	103	98,99
Mittelwert	98,3	101,2
Standard-abweichung	15,3	13,6

	trans- Resveratrol 0,1 µM	trans- Resveratrol 1 µM	trans- Resveratrol 5 µM	trans- Resveratrol 10 µM
	105	111	103	114
	115	110	111	106
	109	98,1	114	112
	103	96,6	99,0	113
	117	117	119	124
	105	111		120
	118	116	113	110
	109	96,8	111	119
	109	103		
Mittelwert	110	110	107	110
Standard- abweichung	2,87	5,56	8,05	6,85

	KP-1339 0,1 µM	KP-1339 1 µM	KP-1339 5 µM	KP- 1339 10 µM
	119	81,6	113	101
	96,6	93,7	104	108
	81,9	108	105	105
	116	82,6	114	103
	118	87,1	117	
	112	83,6	92,0	98,3
	112		89,5	96,2
	80,5	78,8	77,0	100
	77,0	104		93,7
Mittelwert	115	101	90,0	102
Standard- abweichung	5,89	17,6	11,0	14,1

Daten der mitochondrialen Depolarisierung nach einstündiger Behandlung mit *trans*-Resveratrol und KP-1339

Angabe in % Depolarisierung:

	0,5 % Ethanol- Kontrolle	CCCP	0,1 μ M <i>trans</i> - Resveratrol 10 μ M KP-1339	10 μ M <i>trans</i> - Resveratrol 10 μ M KP- 1339
	19,5	99,9	30,0	27,9
	20,0	99,7	29,9	27,0
	20,5	99,8	30,0	28,5
	20,1	82,2	32,1	28,5
	23,3	83,5	32,7	28,4
	24,4	82,0	31,5	28,8
	21,1	95,1	39,6	45,0
	22,0	93,8	37,7	44,9
	22,0	93,6		
	21,3	96,9	35,6	24,6
	19,9	96,0	36,4	26,5
	20,8	95,6	37,4	27,6
	21,1	86,0	34,1	42,3
	21,0	86,0	35,5	42,5
	21,7	85,0	34,9	40,0
Mittelwert	21,2	91,7	34,1	33,0
Standard- abweichung	1,31	6,75	3,14	7,82

	<i>trans</i> - Resveratrol 0,1 μ M	<i>trans</i> - Resveratrol 1 μ M	<i>trans</i> - Resveratrol 5 μ M	<i>trans</i> - Resveratrol 10 μ M
	28,8	21,1	24,0	25,2
	29,3	20,9	24,3	24,5
	30,0	22,8	24,7	25,0
	24,2	29,5	28,6	28,7
	25,1	28,8	30,8	29,0
	31,1	29,4	32,1	
	22,4	29,4	27,3	28,1
	23,6	29,4	27,3	26,6
	23,8	31,7	29,4	27,1
	18,8	27,8	28,9	24,7
	19,0	28,0	28,8	25,0
	19,3	28,8	28,8	25,8
	26,6	17,9		20,8
	27,2	17,3		20,5
	27,7	17,5		21,6
Mittelwert	25,1	25,4	27,9	25,2
Standard- abweichung	4,03	5,14	2,53	2,72

	KP-1339 0,1 µM	KP-1339 1 µM	KP-1339 5 µM	KP-1339 10 µM
	27,0	22,7	21,9	28,7
	26,8	22,7	22,1	28,9
	26,0	22,6	22,3	29,6
	15,6	20,0	27,8	44,0
	16,8	21,0	27,7	46,1
	17,7	21,4	28,1	46,0
	22,3	26,2	43,0	66,6
	22,2	25,7	45,1	65,4
	22,5	25,4	45,4	66,6
	14,1	21,0	19,2	50,2
	14,7	20,8	20,4	53,0
	16,1	23,6	23,3	54,3
	18,3	25,1	38,3	66,7
	17,7	25,9	38,0	68,3
	18,3	27,0	39,5	71,5
Mittelwert	19,7	23,4	30,8	52,4
Standard- abweichung	4,40	2,31	9,64	15,09

Rohdaten zur Bestimmung der zellulären ROS-Produkte

Angaben in *T/C [%]*:

	0,1 µM <i>trans</i> - Resveratrol 10 µM KP-1339	10 µM <i>trans</i> - Resveratrol 10 µM KP-1339
	81,2	85,8
	83,6	88,9
	81,9	84,3
	87,6	82,0
	80,9	76,7
	80,4	84,6
	83,9	73,9
	85,1	77,4
	77,9	71,9
	80,4	78,2
	88,5	84,7
	87,5	78,3
	75,9	66,4
	88,8	67,1
		76,2
		65,2
		70,5
	86,7	70,0
	77,2	80,0
	85,4	80,5
Mittelwert	83,1	77,1
Standardabweichung	4,05	6,94

	0,1 µM <i>trans</i>- Resveratrol	1 µM <i>trans</i>- Resveratrol	5 µM <i>trans</i>- Resveratrol	10 µM <i>trans</i>- Resveratrol
	87,9	94,0	93,7	82,8
	92,8	95,6	98,9	95,0
	94,8	99,3	97,4	97,0
		95,7	98,9	96,8
		99,0	85,4	84,8
			88,1	89,3
	87,0	92,4	103	86,6
	93,1		101	87,4
	91,4	92,2	84,5	89,1
	86,8	94,4	86,1	
	88,1	85,1	87,2	81,1
		86,1	95,9	87,8
		98,4	89,6	96,7
	88,6	104	88,3	84,8
	88,9	86,9	98,7	89,0
	91,5	88,4	103	91,5
	87,1	97,5	88,8	87,8
	86,9		92,8	84,5
	87,2	100	102	90,8
	92,9	87,1	108	90,7
Mittelwert	89,7	93,9	94,5	89,1
Standard- abweichung	2,77	5,60	7,03	4,71

	0,1 µM KP-1339	1 µM KP-1339	5 µM KP-1339	10 µM KP-1339
	91,5	92,5	84,0	87,0
		101	88,5	82,1
	92,2	89,1	91,0	81,7
	95,3	89,6	93,5	83,9
		90,9		82,2
		96,3	82,5	
			86,8	82,5
	92,4		97,0	84,7
	95,4	99,8	81,5	88,8
		101	86,6	86,4
	94,0	95,4	89,8	82,0
	93,4	86,3	98,5	83,7
	91,6	102	89,8	87,8
	94,3	96,3	90,5	88,5
	93,0	92,2	97,1	88,4
		87,7	96,4	
	91,0	98,4	85,3	
	93,2		88,4	
	94,7	94,5		84,5
	92,6	91,2		89,8
Mittelwert	93,2	94,3	89,8	85,2
Standard- abweichung	1,41	4,94	5,24	2,83

Daten der Nukleotide ADP und ATPAngaben der Daten im Verhältnis *ATP* zu *ADP*:

	0,1 μM <i>trans</i>- Resveratrol 10 μM KP-1339	10 μM <i>trans</i>- Resveratrol 10 μM KP-1339
	27,6	28,5
	27,5	29,3
	29,6	23,9
	30,0	62,4
	33,0	29,2
	30,9	35,0
	34,1	25,3
	33,5	24,8
Mittelwert	30,8	32,3
Standard- abweichung	2,57	12,7

	0,1 μM <i>trans</i>- Resveratrol	1 μM <i>trans</i>- Resveratrol	5 μM <i>trans</i>- Resveratrol	10 μM <i>trans</i>- Resveratrol
	14,4	10,4	16,1	12,9
	14,7	9,9	16,3	13,1
	11,4	10,9	10,7	9,6
	11,3	11,4	11,1	8,9
	15,1	13,5	12,8	11,1
	14,5	13,4	13,6	10,9
	20,9			12,0
	13,5			12,1
	13,5		24,6	13,7
	13,8			
Mittelwert	14,3	11,6	15,0	11,6
Standard- abweichung	2,65	1,53	4,75	1,61

	0,1 µM KP-1339	1 µM KP-1339	5 µM KP-1339	10 µM KP-1339
	7,7		13,3	9,7
	8,0	9,3	13,3	9,8
	12,0			15,1
	12,1	8,5	8,2	15,1
	13,4	11,3	8,8	
	13,5	11,4	9,1	
	11,3	13,0	13,5	8,9
	11,1	12,6	13,6	9,0
	11,2	11,2		13,4
	11,2	11,2		13,6
Mittelwert	11,2	11,1	11,4	11,8
Standard- abweichung	1,95	1,51	2,54	2,73

Daten der *UCP2* Gen-Expressiion

Angaben der Daten als fold change:

	0,1 µM <i>trans</i>- Resveratrol 10 µM KP-1339	10 µM <i>trans</i>- Resveratrol 10 µM KP-1339
	0,97	1,16
	0,95	1,17
	1,00	1,15
	1,62	2,02
	1,65	1,99
	1,51	2,01
	0,77	3,23
		3,63
	0,91	3,49
	1,04	1,02
	1,04	0,95
	0,97	0,83
Mittelwert	1,13	1,89
Standard- abweichung	0,31	1,03

	0,1 µM <i>trans</i>- Resveratrol	1 µM <i>trans</i>- Resveratrol	5 µM <i>trans</i>- Resveratrol	10 µM <i>trans</i>- Resveratrol
	0,86	0,93 1,47	0,76	0,90 1,198
	0,85	0,90	0,87	0,84
	0,87	0,82	0,95	1,63
		1,53	0,94	
	0,86	0,92	0,77	0,91
		1,48		1,33
	0,86	0,96	0,84	0,83
	0,86	0,82	0,93	1,59
		1,71	0,85	
	0,85	0,88	0,71	0,91
		1,54		1,27
		0,90	0,87	0,92
		0,79	0,81	1,52
		1,56	0,83	
Mittelwert	0,86	1,15	0,84	1,15
Standard- abweichung	0,01	0,35	0,07	0,31

	0,1 µM KP-1339	1 µM KP-1339	5 µM KP-1339	10 µM KP-1339
	0,88	1,10	1,11	1,11
	0,89	1,24	1,49	
	0,98	0,83	0,94	0,75
	0,75	0,69	1,39	0,75
	1,00	1,43	1,16	0,95
	0,88	1,13	1,08	1,16
	0,86	1,32	1,54	
	0,96	0,88	1,01	0,78
	0,78	0,72	1,38	0,79
	1,01	1,47	1,13	1,00
		1,29	1,18	1,17
	0,89	1,37	1,58	
	1,00	0,86	1,08	0,82
	0,86	0,74	1,40	0,88
		1,68	1,23	1,01
Mittelwert	0,90	1,12	1,25	0,93
Standard- abweichung	0,08	0,31	0,20	0,16

Literaturverzeichnis:

1. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Rocha JF, Nunes T, Wright L, Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53 (1): 7-15
2. Bernhard D, Schwaiger W, Crazzolara R, Tinhofer I, Kofler R, Csordas A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters*. 2003, 195:193-199
3. Björklund M, Roos J, Gogvadze V, Shoshan M. Resveratrol induces SIRT1- and energy-stress-independent inhibition of tumor cell regrowth after low-dose platinum treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011, 68: 1459-1467
4. Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE. Phase I Dose Escalation Pharmacokinetic Study in Health Volunteers of Resveratrol, a Potential Cancer Chemopreventive Agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007, 16:1246-1252
5. Burkon A, Somoza V. Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides – Two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Mol Food Nutr Res* 2008, 52:549-557
6. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002;50(11):3337-3340
7. Bytzek AK, Boeck K, Hermann G, Hann S, Keppler BK, Hartinger CG, Koelensperger G. LC– and CZE–ICP-MS approaches for the in vivo analysis of the anticancer drug candidate sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1339) in mouse plasma. *Metallomics*. 2011, 3:1049–1055
8. Cantos E, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J Agric Food Chem*. 2002, 50: 5691-5696

9. Clarke M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* 2003, 236: 209-233
10. Collins P, Jones C, Choudhury S, Damelin L, Hodgson H. Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis. *Liver Int.* 2005, 25(4):880-7
11. Cossarizza A, Baccarani-Contrì M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(1):40-5
12. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, J. Beaudoux L, Resveratrol bioavailability and toxicity in humans, *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 54:7-16
13. Delmas D, Lin HY. Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res.* 2011, 55(8):1142-53
14. Dickson NR, Jones SF, Burris HA, Ramanathan RK, Weiss GJ, Infante JR, Bendell JC, McCulloch W, Von Hoff DD. A Phase I Dose Escalation Study of NKP-1339 in Patients with Advanced Solid Tumors Refractory to Treatment. *ASCO Annual Meeting* 2011
15. Dömötör O, Hartinger CG, Bytzek AK, Kiss T, Keppler BK, Enyedy EA. Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP-1019 and KP-1339 on human serum albumin via competition studies. *J Biol Inorg.* 2013, 18:9-17
16. Dorta JD, Pigoso AA, Mingatto FE, Rodrigues T, Prado IMR, Helena AFC, Uyemura SA, Santos AC, Curti C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chemico-Biological Interactions.* 2005, 152:67-78
17. Dourtoglou VG, Makris DP, Bois-Dounas F, Zonas C. Trans-Resveratrol Concentration in Wines Produced in Greece. *JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS.* 1999,12: 227-233

18. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002, 415:96-99
19. Esparza SI, Santamar C, Garcia-Mina JM, Fernandez JM. Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 543 267–274
20. Faccenda D, Tan CH, Seraphim A, Duchon MR, Campanella M. IF(1) limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ*, 2013
21. Fox BC, Devonshire AS, Schutte ME, Foy CA, Minguez J, Przyborski S, Matlman S, Bokhari M, Marhsall D. Validation of reference gene stability for APAP hepatotoxicity studies in different in vitro systems and identification of novel potential toxicity biomarkers. *Toxicol. In Vitro*. 2010
22. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene*. 2004, 23:6702-6711
23. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010, 9:447-464
24. Heffeter P, Böck K, Atil B, Hoda Reza MA, Körner W, Bartel C, Jungwirth U, Keppler BK, Micksche M, Berger W, Koellensperger G. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. *J Biol Inorg Chem*. 2010, 15:737-748
25. Hopkins WG. *Physiologie végétale*. De Boeck Université. 2003, S. 40. ISBN 2-7445-0089-5
26. J. Buchner: Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol. Life Sci* 59. 2002, 1587-1588.
27. Juan ME, Maijo M, Planas JM, Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J. Pharm Biomed. Anal*. 2010, 51:391-398
28. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2005, 6:248-261

29. Kurzwernhart A, Kandioller W, Bachler S, Bartel C, Martic S, Buczkowska M, Muhlgassner G, Jakupec MA, Kraats HB, Bednarski PJ, Arion VB, Marko D, Keppler BK, Hartinger CG. Structure-activity relationships of targeted RuII(η^6 -p-cymene) anticancer complexes with flavonol-derived ligands. *J Med Chem*. 2012;55(23):10512-22
30. Lamuela-Raventós R, Romero-Pérez A, Waterhouse A, de la Torre-Boronat M. Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceic isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric Food Chem*. 1995, 43:281-283
31. Lançon A, Delmas D, Osman H, Thénot JP, Jannin B, Latruffe N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 16;316(4):1132-7
32. Langcake P, Pryce RJ. *Experientia*. 1977, 33:151-152
33. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992, 5(2):227-31
34. Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. Springer 7. Auflage. 2008, 167-175
35. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(6):807-19
36. Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, Moreno L, Zarzuelo MJ, Rodríguez-Gómez I, Duarte J, Santos-Buelga C, Perez-Vizcaino F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?. *Mol Nutr Food Res*. 2011, 55(12):1780-90
37. Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardão VA. Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: investigation of the role of gender. *Food Chem Toxicol*. 2013, 53:18-26
38. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63
39. Mutschler *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie* von Ernst Mutschler, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer und Monika

- Schäfer-Korting. 8. Auflage. Stuttgart: wiss. Verl.-Ges., 2001 ISBN 3-8047-1763-2
40. Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* Sieb ET Zucc.) [J]. *Yakugaku Zasshi*. 1963, 83: 988-990
 41. Poulsen MM, Larsen JO, Hamilton-Dutoit S, Clasen BF, Jessen N, Paulsen SK, Kjoer TN, Richelsen B, Perdersen SB. Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research*. 2012, 701-708
 42. Prokop J, Abrman P, Seligson AL, Sovak M. Resveratrol and Its Glycon Piceid Are Stable Polyphenols. *Journal of Medicinal Food*. Spring. 2006, 9(1): 11-14
 43. Prokop J, Abrman P, Seligson AL, Sovak M. Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *J Med Food*. 2006, 9:11–14
 44. Ravera S, Aluigi MG, Calzia D, Ramoino P, Morelli A, Panfoli I. Evidence for ectopic aerobic ATP production on C6 glioma cell plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol*. 2011, 31(2):313-21
 45. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339(8808):1523-6
 46. Riedel A, Pignitter M, Hochkogler CM, Rohm B, Walker J, Bytof G, Lantz I, Somoza V. Caffeine dose-dependently induces thermogenesis but restores ATP in HepG2 cells in culture. *Food Funct*. 2012, 3(9):955-64
 47. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene and picetannol in *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem*. 2004, 52: 4713-4719
 48. Roggero JP, Garciaparrilla C. *Sci Aliment*. 1995, 15: 411-422
 49. Santandreu FM, Roca P, Oliver J. Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010, 49: 658-666
 50. Sobolev VS, Cole RJ. Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem*. 1999, 47: 1435-1439

51. Szkudelski K, Nogowski L, Szkudelski T. The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes. *Eur J Clin Invest.* 2009, 39(10):899-905
52. Szkudelski T, Resveratrol-induced inhibition of insulin secretion from rat pancreatic islets: evidence for pivotal role of metabolic disturbances. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 2007, 293: E901-E907
53. Thompson D, Weiss GJ, Jones SF, Burris HA, Ramanatan K, Infante JR, bendell JC, Ogden A, Von Hoff DD. NKP-1339: Maximum tolerated dose defined for first-in-human GRP78 targeted agent. *ASCO Annual Meeting Abstract 2012: abstract ID 3033*
54. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 2011, 4(5):612-22
55. Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F. Determination of the phytoalexin Resveratrol (s,5,4'trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem.* 2005, 53: 5003-5009
56. Trondl R, Heffeter P, Jakupiec MA, Berger W, Keppler BK. NKP-1339, a first-in-class anticancer drug showing mild side effects and activity in patients suffering from advanced refractory cancer. *BMC Pharmacology and Toxicology* 2012, 13(Suppl 1):A82
57. Van Ginkel PR, Darjatmoko SR, Sareen D, Subramanian L, Bhattacharya S, Lindstrom MJ, Albert DM, Polans AS. Resveratrol Inhibits Uveal Melanoma Tumor Growth via Early Mitochondrial Dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008, 49 (4): 1299-1306
58. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis Jr. JE, Walle UK, High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos. The Biol. Fate Chem.* 2004, 32:1377-1382

59. Warburg O, Minami S. Versuche an Überlebendem Carcinomgewebe. *Journal of molecular medicine*. 1923, 776-777
60. Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V, Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res*. 2005, 49:482-494
61. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res*. 2005, 49:472-481
62. Zarse K, Bossecker A, Müller-Kuhrt L, Siems K, Hernandez MA, Berendsohn WG, Birringer M, Ristow M. The Phytochemical Glauucarubinone Promotes Mitochondrial Metabolism, Reduces Body Fat, and Extends Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Horm Metab Res*, 2010
63. Zhao W, Bao P, Qi H, You H. Resveratrol down-regulates surviving and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells. *Oncology reports*. 2010, 23: 279-286
64. Zheng J, Ramirez VD. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):1115-23
65. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. *Life Sci*. 2002, 71(26):3091-108

Curriculum vitae:

geboren in Schwaz, Österreich

- | | |
|--------------------|--|
| 2004 - 2007 | Studium des Wirtschaftsrechts – Universität Innsbruck, Abschluss des ersten Studienabschnitts |
| 2007 - 2013 | Studium der Ernährungswissenschaften an der Hauptuniversität Wien |
| 2012 - 2013 | Masterarbeit am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie – Universität Wien- unter der Leitung von Prof. Veronika Somoza |

Berufliche Erfahrungen

- | | |
|--------------------|--|
| 2010 – 2012 | fit10-Ernährungsberaterin, Beratung und Betreuung von Klienten nach der fit10-Methode |
| 05/2010 | Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften, Datenaufarbeitung für das Projekt „Global Burden of Disease“ |
| 07-08/2009 | Adolf Darbo AG, Praktikum im Labor der Mikrobiologie |
| 05-10/2008 | Unternehmensentwicklung GmbH, Assistenz |