

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger, FACS N.N.-

Walnuss gegen Krebs:
Antiproliferative in vitro Aktivität von *Juglans regia* Extrakten
auf humane Tumorzelllinien

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Gewaltig, geb. Kühle, Christiane Astrid
aus Wattenscheid, jetzt Bochum
2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Hans-Ulrich Spiegel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günther Winde

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger, FACS
Referent: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Hans-Ulrich Spiegel
Koreferent: Prof. Dr. med. Günther Winde

ZUSAMMENFASSUNG

Walnuss gegen Krebs: Antiproliferative in vitro Aktivität von *Juglans regia* Extrakten auf humane Tumorzelllinien

Christiane Gewaltig, geb. Kühle

Eine der auffälligsten Eigenschaften des Walnussbaums *Juglans regia* ist die Allelopathie – die Fähigkeit der Pflanze das Wachstum höherer Pflanzen zu unterdrücken. Würden *Juglans regia* Blätter auch eine Wirkung auf humanoide Tumorzellen zeigen? Daher wurde untersucht, ob a) ein juglonfreier Extrakt der Walnussblätter auch eine wachstumshemmende Eigenschaft an humanen Tumorzellen aufweist, b) es sich hierbei um eine zytostatische oder zytotoxische Eigenschaft handelt, c) diese Eigenschaft auf eine oder mehrere Substanzen zurückgeht und d) diese chromatographisch isoliert werden können.

832g Extrakt, gewonnen aus 23,8kg Walnussblättern wurde hierfür mittels Zellzahlbestimmung anhand der Trypanblau-Methode, Tritiumthymidin-Einbaumethodetests, Bromodeoxyuridin-Einbaumethode und Laktatdehydrogenase-Freisetzungstests in vitro an immortalen Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Baumschweig) eines Adenokarzinom des Dickdarmes (CaCo2), und einer Metastase eines malignen Melanoms (MelHO) auf Zytotoxizität und Wachstumshemmung getestet. Chromatographische Verfahren trennten die jeweils wirksamen Fraktionen des Extrakts bis auf die 9. Ebene.

Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des *Juglans regia* Extraktes hat gezeigt, dass a) ein juglonfreier Extrakt eine wachstumshemmende Eigenschaft an humanen Tumorzellen besitzt, welcher b) nicht zytotoxisch ist und c) auf mehrere, chemisch unterschiedliche Substanzen und Substanzgruppen zurückgeht. Chromatographisch konnten so wachstumsfördernde Fraktionen von wachstumshemmenden getrennt werden. Hierdurch gelang es aus den größenordnungs-mäßig mehr als 100 000 Substanzen der *Juglans regia* Blätter ca. 60 Substanzgruppen niedriger Komplexität zu isolieren, welche in vitro das Wachstum von Melanomzellen in einer Konzentration von 10 µg/ml hochsignifikant um 80% des Wachstum der Kontrollgruppe senkten ($p < 0,01$), wovon 31 Substanzgruppen das Wachstum sogar um 85% senkten ($p < 0,01$).

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Walnuss gegen Krebs: Antiproliferative in vitro Aktivität von *Juglans regia* Extrakten auf humane Tumorzelllinien

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie

unter Anleitung von:

Prof. Dr. med Dipl.-Ing. Hans-Ulrich Spiegel

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Allelopathie	1
1.2	Mechanismus der Allelopathie im Falle der Walnuss	2
1.3	Medizinische Verwendung von <i>Juglans regia</i>	3
1.4	„Krebskrankheiten“	4
1.5	Naturwirkstoffe: potentielle Therapeutika gegen Krebsleiden	5
1.6	Naturwirkstoffe: Strategien zur Erforschung.....	6
1.7	Strategie der vorliegenden Arbeit.....	7
1.8	<i>Juglans regia</i>	8
1.9	Inhaltstoffe von <i>Juglans regia</i>	9
1.10	Wirkung des Chinons Juglon.....	9
1.11	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1	Vorbemerkung.....	12
2.2	Drogenmaterial, Extraktion und Probengewinnung	12
2.2.1	Drogenmaterial	12
2.2.2	Extraktion	13
2.2.3	Aufbewahrung und Lagerung von Extrakten und Fraktionen	13
2.2.4	Probengewinnung für die Testung.....	14
2.3	Trennstrategie.....	14
2.3.1	Entwicklung einer chromatographischen Trennstrategie.....	14
2.4	Dünnschichtchromatographie.....	15
2.4.1	Analytische Dünnschichtchromatographie	15
2.5	Herstellung und Befüllung der verwendeten Säulen	17
2.5.1	Säulenmaterial für die säulenchromatographischen Verfahren	17
2.5.2	Sogbetriebene Säulen	17
2.5.3	Schwerkraftbetriebene Säulen	17
2.5.4	Druckbetriebene Säulen.....	17
2.5.5	Füllen der Säulen und Besonderheiten der Elution.....	18
2.5.5.1	VLC-Säulen (sogbetriebene Säule).....	18
2.5.5.2	Gelpermeationschromatographie (schwerkraftbetriebene Säule).....	19
2.5.5.3	MPLC-Säulen (druckbetriebene Säule)	19
2.6	Vakuumflüssigkeitschromatographie	20
2.7	Molekularsiebchromatographie	20
2.8	Verteilungschromatographische Methoden: Flüssiggegenstromchromatographie	22
2.8.1	Tröpfchengegenstromchromatographie	24

2.8.2	Hochgeschwindigkeitsflüssiggegenstromchromatographie.....	25
2.9	Adsorptionschromatographische Methoden.....	26
2.10	Spektroskopische Methoden.....	28
2.10.1	Gaschromatographie/Massenspektroskopie.....	28
2.10.2	Kernresonanz-Spektroskopie.....	29
2.11	Biologische Testmethoden und Zellkultur.....	30
2.11.1	Zellkultur.....	30
2.11.2	Bestimmung der DNA-Syntheserate per Tritiumthymidin-Einbaumethode.....	31
2.11.3	Bestimmung der DNA-Syntheserate mit Hilfe der Bromodeoxyuridineinbaumethode (5-Bromo-2'-deoxyuridin).....	32
2.11.4	Zytotoxizitätstestung mit Hilfe des Laktatdehydrogenase-Freisetzungstests.....	33
2.11.5	Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Methode.....	34
2.12	Verwendete Software und statistische Auswertung der Daten.....	35
MATERIAL.....		36
2.13	Extraktion.....	36
2.14	Lösungsmittel/Chemikalien.....	36
2.15	Dünnschichtchromatographie.....	36
2.16	Säulenmaterial/Glasmaterial.....	37
2.17	Sorbentien.....	37
2.18	Biologische Testmethoden und Zellkultur.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Vorversuche und ihre methodischen Konsequenzen für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes <i>JR2</i>	40
3.1.1	Zum Einfluss eines wässrigen Extraktes auf die Zahl humaner Melanom- und Dickdarmkarzinomzellen nach 48-stündigem Wachstum mittels der Trypanblau-Methode.....	40
3.1.2	Optimierung der Anwendung der Fraktionen.....	41
3.1.3	Auswahl von Verfahren zur Messung von Zytotoxizität und Wachstumshemmung.....	42
3.1.4	Antiproliferativitätsprüfung der drei Extrakte mittels Zellzahlbestimmung durch die Trypanblau-Methode.....	43
3.1.5	Zytotoxizitätsvergleich der drei Extrakte mittels Zellzahlbestimmung durch die Trypanblau-Methode.....	44
3.1.6	Einfluss von DCM-, Methanol-, und Wasserextrakten auf die Inkorporation von [³ H]-Thymidin in die DNA der Tumorzelllinien.....	46
3.1.7	Einfluss von DCM-, Methanol-, und Wasserextrakten auf die Inkorporation von Bromodesoxyuridin in die DNA der Tumorzelllinien.....	47
3.1.8	Toxizitätsvergleich der drei Extrakte anhand des LDH-Freisetzungstests.....	48

3.1.9	Vergleich der antiproliferativen und zytotoxischen Aktivität des DCM-Extraktes mit der des bekannten Walnussinhaltsstoffes Juglon anhand der Zellzahlbestimmung nach Färbung mit Trypanblau.....	49
3.1.10	Methodische Konsequenzen der bisher dargestellten Ergebnisse für die weiteren Vorversuche und die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes <i>JR2</i>	52
3.2	Fraktionierung <i>JR1WMD</i>	52
3.2.1	Fraktionierungsebene 1.....	52
3.2.1.1	Separierung an mikrokristalliner Cellulose durch VLC.....	52
3.2.2	Fraktionierungsebene 2.....	53
3.2.2.1	Separierung an Kieselgel mittels VLC.....	53
3.2.3	Fraktionierungsebene 3.....	54
3.2.3.1	Hochgeschwindigkeitsflüssiggegenstromchromatographie	54
3.2.4	Fraktionierungsebene 4.....	55
3.2.4.1	MPLC der Fraktion 4 aus der Fraktionierungsebene 3	55
3.2.4.2	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 11-13	56
3.2.4.3	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 18-20	56
3.2.4.4	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Sammelfraktion 30-32.....	56
3.2.4.5	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 33-40	57
3.2.5	Fraktionierungsebene 5.....	57
3.2.5.1	MPLC der Fraktion 41-50 aus der vorhergegangenen MPLC	57
3.2.6	Abschätzung der Komplexität des Extraktes und der notwendigen Drogenmenge des Extraktes <i>JR2</i>	57
3.3	Fraktionierung des Extraktes aus dem Jahre 1998, <i>JR2MD</i>	59
3.3.1	Fraktionierungsebene 1.....	59
3.3.1.1	Separierung an mikrokristalliner Cellulose durch VLC (Alle Familien)	59
3.3.2	Fraktionierungsebene 2.....	63
3.3.2.1	VLC-Trennung der Sammelfraktion VC4-34 an Kieselgel (Alle Familien)	63
3.3.3	Fraktionierungsebene 3.....	65
3.3.3.1	Molekularsiebchromatographie der Sammelfraktion 26-39 an Sephadex LH-20 (Alle Familien).....	65
3.3.4	Fraktionierungsebene 4.....	68
3.3.4.1	HSCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122</i> (Familien 1, 2 und 3)	68
3.3.4.2	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154</i> (Familien 4 und 5)	70
3.3.5	Fraktionierungsebene 5.....	72
3.3.5.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2</i> (Familie 1)	72
3.3.5.2	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4</i> (Familie 2)	74
3.3.5.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5</i> (Familie 3)	75
3.3.5.4	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3</i> (Familie 4).....	77
3.3.5.5	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4</i> (Familie 5).....	78

3.3.6	Fraktionierungsebene 6.....	80
3.3.6.1	HSCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65</i> (Familie 1).....	80
3.3.6.2	Aufarbeitung der DCCC-Fraktionen aus <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4</i> . (Familie 2).....	81
3.3.6.2.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC12-15</i> (Familie 2).....	81
3.3.6.2.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC16-19</i> (Familie 2).....	82
3.3.6.2.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC20-24</i> (Familie 2).....	84
3.3.6.2.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC25-28</i> (Familie 2).....	84
3.3.6.2.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC29-33</i> (Familie 2).....	85
3.3.6.2.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC34-44</i> (Familie 2).....	85
3.3.6.2.7	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC60-71</i> (Familie 2).....	86
3.3.6.2.8	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC72-84</i> (Familie 2).....	86
3.3.6.2.9	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC85</i> (Familie 2).....	86
3.3.6.3	DCCC der drei wirksamen Fraktionen aus der Trennung von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5: MC281-331, 332-551, 552-627</i> (Familie 3).....	87
3.3.6.4	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331</i> (Familie 3).....	87
3.3.6.4.1	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551</i> (Familie3).....	88
3.3.6.4.2	DCCC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627</i> (Familie3).....	90
3.3.6.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3</i> (Familie 4).....	91
3.3.6.5.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC1-2</i> (Familie4).....	92
3.3.6.5.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC3-10</i> (Familie 4).....	92
3.3.6.5.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC11-17</i> (Familie 4).....	93
3.3.6.5.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC18-25</i> (Familie 4).....	93
3.3.6.5.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC26-37</i> (Familie 4).....	93

3.3.6.5.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC38-43</i> (Familie 4).....	94
3.3.6.5.7	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC44-54</i> (Familie 4).....	94
3.3.6.5.8	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC55-66</i> (Familie 4).....	95
3.3.6.5.9	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC67-76</i> (Familie 4).....	95
3.3.6.5.10	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3. DC113-132</i> (Familie 4).....	97
3.3.6.5.11	MPLC der Fraktion <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154. DC2+3. DC188-208</i> (Familie 4).....	97
3.3.6.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC</i> (Familie 5)	97
3.3.6.6.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC1-13</i> (Familie 5)	98
3.3.6.6.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19</i> (Familie 5).....	98
3.3.6.6.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC20-36</i> (Familie 5).....	98
3.3.6.6.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43</i> (Familie 5).....	99
3.3.6.6.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC44-48</i> (Familie 5).....	99
3.3.6.6.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC49-62</i> (Familie 5).....	99
3.3.6.6.7	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC63-85</i> (Familie 5).....	100
3.3.6.6.8	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC138</i> (Familie 5).....	101
3.3.7	Fraktionierungsebene 7.....	101
3.3.7.1.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65. HS1-24</i> (Familie 1).....	101
3.3.7.1.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65. HS25-29</i> (Familie 1).....	102
3.3.7.1.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65. HS30-37</i> (Familie 1).....	103
3.3.7.1.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65. HS38-42</i> (Familie 1).....	103
3.3.7.2	Keine Fraktionierungsebene 7 der Familie 2	104
3.3.7.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-627.DC</i> (Familie 3).....	104

3.3.7.3.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331</i> , DC10-17 (Familie 3)	104
3.3.7.3.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331</i> , DC18-29 (Familie 3)	105
3.3.7.3.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331</i> , DC30-38 (Familie 3)	105
3.3.7.3.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331</i> , DC39-54 (Familie 3)	106
3.3.7.3.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5. MC332-551</i> , DC1-17 (Familie 3)	106
3.3.7.3.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551</i> , DC18-27 (Familie3)	107
3.3.7.3.7	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551</i> , DC28-40 (Familie3)	107
3.3.7.3.8	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551</i> , DC41-54 (Familie3)	107
3.3.7.3.9	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627</i> , DC21-28 (Familie3)	108
3.3.7.3.10	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627</i> , DC29-45 (Familie3)	108
3.3.7.3.11	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627</i> , DC46-103 (Familie3)	108
3.3.7.4	Keine Fraktionierungsebene 7 der Familie 4	108
3.3.7.5	Fraktionierungsebene 7 der Familie 5	109
3.3.7.5.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4. DC14-19.MC24-28</i> (Familie 5)	109
3.3.7.5.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19. MC29-33</i> (Familie 5)	110
3.3.7.5.3	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19. MC34-40</i> (Familie 5)	111
3.3.7.5.4	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19. MC41-56</i> (Familie 5)	111
3.3.7.5.5	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43. MC1-18</i> (Familie 5)	111
3.3.7.5.6	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43. MC19-22</i> (Familie 5)	111
3.3.7.5.7	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43. MC23-31</i> (Familie 5)	112

3.3.7.5.8	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43. MC32-37</i> (Familie 5).....	112
3.3.7.5.9	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43. MC38-48</i> (Familie 5).....	113
3.3.7.5.10	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC49</i> (Familie 5).....	113
3.3.8	Fraktionierungsebene 8.....	114
3.3.8.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.</i> <i>MC24-28.MC21-28</i> (Familie 5).....	114
3.3.8.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.</i> <i>MC29-33.MC19-26</i> (Familie 5).....	114
3.3.8.2.1	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.</i> <i>MC19-22.MC15+16</i> (Familie 5).....	115
3.3.8.2.2	MPLC von <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.</i> <i>MC19-22.MC17+18</i> (Familie 5).....	115
3.3.8.3	MPLC des aus den Fraktionen <i>JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.</i> <i>DC37-43.MC32-37.MC1-19</i> und <i>.MC38-48.MC15-20</i> zusammengesetzten Gemisches (Familie 5).....	116
3.3.9	Fraktionierungsebene 9 (Familie 5).....	116
4	DISKUSSION	118
4.1	Experimentelle Vorgehensweise und Ergebnisdarstellung.....	118
4.2	Versuchsbedingungen: chromatographische Aspekte.....	119
4.3	Vorhandensein von Juglon in den Extrakten.....	123
4.4	Testbezogene Aspekte.....	123
4.5	Zubereitung der Proben.....	125
4.6	Wirkstärke der gesuchten Substanz(en).....	127
4.7	Sterilisierung der Proben oder Modifikation der Methoden als Voraussetzung für die Testung der Fraktionen.....	128
4.8	Aus den Vorversuchen stammende Isolate.....	129
4.9	Aktivitätsgeleitete Fraktionierung.....	131
4.10	Ausrichtung der Isolationsstrategie auf nur in Spuren vorhandene Stoffe wie Progesteron.....	131
4.11	Isolierung antiproliferativer Inhaltsstoffe unter Kombination klassischer und moderner Methoden der Chromatographie.....	133
4.12	Auswahl geeigneter Testmodelle zur Isolation antiproliferativer Inhaltsstoffe.....	134
4.13	Spekulationen über die Beschaffenheit der antiproliferativen Substanzen.....	136
4.14	Ausblick.....	137
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	138

1 Einleitung

Die Walnuss, *Juglans regia*, wird in der lateinischen Antike Iovis glans, „Nuss Jupiters“, griechisch Διός βάλανος, „Gottesnuss“ auch „Nuss des Zeus“ genannt [110]. Wir genießen die Walnuss im Gebäck, in Salaten, im Speiseeis und auf fast jedem Weihnachtsteller ist sie zu finden. Ihr Öl gilt als besonders delikat in Salatsaucen. Selbst Winzer setzen sie in der Weinerzeugung zur Veredelung ein. Der Walnussbaum wächst langsam zu beträchtlicher Größe; daher ist sein Holz fest und seit jeher beliebt in der Möbelproduktion. Gerne wird er in Hausnähe gepflanzt. Hier ist er nicht Zierde: dem Duft seines Laubes schreibt man die Fähigkeit zu, Mücken und Fliegen fernzuhalten. Allerdings hat das Laub weitere, vom Besitzer des Baumes unerwünschte Eigenschaften. Einmal gefallen, und regennass, wird es, wie die fleischigen „Nusschalen“ glitschig und klebrig, und hinterlässt schwarz-grüne Flecken an allem, mit dem es in Berührung kommt. Wo es liegen bleibt, wächst im nächsten Frühjahr kaum noch etwas. Und fast noch schlimmer: Es lässt sich nicht ohne weiteres kompostieren. Nicht nur, dass es sehr schwer verrottet: Das Endprodukt ist unbrauchbar, es fördert nicht, sondern es hemmt das Wachstum. Lässt man die Blätter der Walnuss liegen, entsteht um den Stamm ein so genannter „Baumsee“, ein Gebiet in dem keine höheren Pflanzen wachsen.

1.1 Allelopathie

Während die Europäische Walnuss, *Juglans regia*, „die königliche Nuss Jupiters“, das bekannteste Beispiel für das Phänomen „Baumsee“ darstellt, gibt es noch andere Arten, an denen man es beobachten kann. Die Birke z.B., in unseren Breiten eine Pionierpflanze für den beginnenden Hochbewuchs, drängt mit diesem Mechanismus den vorgehenden Niederbewuchs auf Brachland zurück.

Die Hemmung anderer Organismen, eine Strategie, die man botanisch als allelopathische Eigenschaft einer Pflanze, oder als Allelopathie bezeichnet, gab den Anlass zu der Idee dieser Arbeit: Da die Walnuss wie die höheren Pflanzen zu den Eukaryonten gehören, sollte überprüft werden, ob sich der wachstumshemmende Effekt auch auf tierische Zellen, insbesondere auf neoplastischen Zellen, übertragen ließe.

Bereits die Römer wussten von der Eigenschaft der Walnuss, in ihrer unmittelbaren Umgebung das Wachsen zahlreicher Pflanzen wie Getreide oder Bohnen zu hemmen. So sagte etwa Varro: „Si enim ad limitem querquetum habet (sc. vicinus), non possis recte secundum eam silvam serere oleam, quod usque eo est contrariam natura, ut arbores non solum minus ferant, sed etiam fungiant, ut introrum in fundum se reclinent, ut vitis adsita ad holus facere solet, Ut quercus, sic iuglandes magnae et crebrae finitimae fundi oram faciunt sterilem [110] „Wenn er (der Nachbar) an der Grenze einen Eichenwald hat, kannst Du nicht richtig neben diesem Wald Oliven pflanzen. Das ist so sehr gegen die Natur, dass die Bäume nicht nur weniger tragen, sondern sogar fliehen, indem sie sich in den Boden zurück wegbeugen, wie es die Weinrebe zu tun pflegt, die neben Kohl angesiedelt ist. Wie die Eiche, so machen große und viele Walnussbäume in der Nachbarschaft den Rand des eigenen Bodens steril“. Plinius der Ältere sagte über die Walnuss: „Iam quaedam umbrarum proprietas; iuglandum gravis et noxia, etiam humano omnibusque iuxta satis. (...) (Umbra) iuglandum quidem pinorumque et picearum et abietis quaecum que attingere non dubie venenum“. [92, 93]. „Nun haben die Schatten der Bäume besondere Eigenschaften: Der der Walnuss ist drückend und schädlich, sogar für den Kopf des Menschen und für alle in der Nähe befindlichen Pflanzen. (...) (Der Schatten) der Walnussbäume, der Pinien, Kiefern und der Tanne ist ohne allen Zweifel Gift für alles, was er berührt“.

Der Begriff Allelopathie umfasst die wechselseitige, - meist hemmende, seltener auch stimulierende -, Beeinflussung höherer Pflanzen mit Hilfe aktiver oder passiver Ausscheidung biologisch aktiver Substanzen über die Wurzeln oder die Blätter. Es kann als ein Verhalten der Pflanze angesehen werden, sich gleichsam chemisch zu verteidigen, aber auch als einen Mechanismus, die eigene Art weiter zu verbreiten [60, 79].

1.2 Mechanismus der Allelopathie im Falle der Walnuss

Die Allelopathie, der sich die Walnuss wie einige andere Pflanzen bedient, besteht aus der Freisetzung phytotoxischer Substanzen. Kaum eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen kann dabei ausgeschlossen werden [115]. Die von *Juglans regia* unter anderen freigesetzte Substanz ist das Juglon, ein Inhaltsstoff, der den Juglandaceae generell zueigen ist. Es wurde 1856 von Vogel und Reischauer entdeckt [112] und wenig später auch synthetisiert [13]. Doch erst 1950 gelang es Daglish Juglon rein zu isolieren. 1955

klärten Hayes und Thomson die Struktur von Juglon endgültig [29, 56]. Die Schwierigkeit, Juglon aus *Juglans* zu isolieren, begründet sich aus dem System Hydrojuglon- β -glukosid \rightarrow Hydrojuglon (= α -Hydrojuglon) \rightarrow Juglon. Hierbei entsteht Juglon erst sekundär nach Verwundung oder beim Absterben der Gewebe aus einem glykosidischen Vorläufer. So fand Daglish, dass Hydrojuglonglukosid in allen Geweben von *Juglans regia* vorkommt [29]. Je nach dem Entwicklungszustand, der Vorbehandlung des Materials und den verwendeten Isolationsmethoden überwiegen Hydrojuglonglukosid, Hydrojuglon oder Juglon beim Verarbeiten des pflanzlichen Materials. Bereits Tunmann [109] hatte nachgewiesen, dass im pflanzlichen Gewebe das Hydrojuglon sehr leicht in Juglon übergeht und nach Verwundung eine starke Vermehrung des Juglon stattfindet und es vermutlich einen Wundschutzstoff von *Juglans regia* darstellt. Heute ist nachgewiesen, dass die Walnuss sich dabei vor ihrer eigenen Schädigung schützt und als „Prodrug“ 4-Glucosyl-1,4,5-trihydroxynaphthalin, ein Naphtalinglycosid, in den grünen Pflanzenteilen bildet. Aus dieser nichttoxischen Vorläufersubstanz entsteht im Boden durch Hydrolyse und anschließender Oxidation unter Bildung der Zwischenstufe Hydrojuglon das eigentlich allelopathisch aktive 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon, das Juglon [32, 115].

1.3 Medizinische Verwendung von *Juglans regia*

Weder in der Volksmedizin, noch in der Schulmedizin wird allerdings von einer Verwendung von *Juglans regia*-Extrakten gegen tumoröse Erkrankungen in irgendeiner Form berichtet. Die Indikationen für deren Anwendung sind:

1. Aufgrund des Gerbstoffgehaltes als Adstringens zur externen Anwendung in Form von Bädern, Spülungen oder Umschlägen bei Hautleiden wie purulenten Dermatosen, Akne, Ekzemen, Scrophulose, sowie übermäßiger Schweißabsonderung z.B. an den Füßen und Händen [1, 83, 114].
2. Es gibt einige Fertigarzneimittel (Immunstimulans *Juglans*, Ampullen u.a.) [1].
3. Bei Magen-Darmkatarrhen, als Anthelmintikum und als so genanntes „Blutreinigungsmittel“ wurde die Droge in der Volksmedizin auch innerlich als Adjuvans verwendet. Aufgrund von Nebenwirkungen des Extraktes ist eine innerliche Anwendung heute obsolet [40].

4. Eine fungistatische Wirkung wird dem enthaltenen Öl [82] beziehungsweise Juglon [5] zugeschrieben. Juglon und die enthaltenen ätherischen Öle wirken in vitro fungistatisch [5, 82] was ebenfalls schon den Griechen und Römern nicht unbekannt gewesen ist [103].
5. Weitere Indikationen werden bei Syphilis [31], bei Tuberkulose und – intravenös appliziert - bei Lupus vulgaris [12] berichtet; auch als Kontrazeptivum in Form eines Infuses ist die Droge verwendet worden [19].
6. Extrakte der Droge *Juglans regia* fanden äußerlich seit dem 17. Jahrhundert in russischen Militärkrankenhäusern zur Reinigung und schnelleren Heilung von Wunden und Ulcera Verwendung. Heute wird es dort klinisch bei vielen Hautkrankheiten, besonders zur Behandlung der Hauttuberkulose gebraucht [65].

Zwar gab es in den sechziger Jahren in den USA Untersuchungen über eine vermutete Wirkung von Juglon und anderen Inhaltsstoffen der Walnuss gegen Krebs [14, 87], jedoch verhinderte die lokale Unverträglichkeit der Substanzen deren weitere Erprobung. Bevor eine antiproliferative Wirkung entstehen konnte, entwickelte sich eine in der Therapie unbedingt zu vermeidende Nekrose. Allerdings weisen die Naphthoquinone Juglon und Plumbagin krebs-präventive Eigenschaften bei Ratten nach Gabe des Darmkrebs-induzierenden Azoxymethans auf [107].

1.4 „Krebskrankheiten“

Keine andere „Krankheit“ erscheint so verschiedenartig, derartig Schrecken einflößend und in der Gesellschaft so sehr angstbehaftet wie die Krebskrankheiten. Daher ist die Suche nach pflanzlichen Inhaltsstoffen auch gegen diese Krankheiten Gegenstand der Forschung, seitdem Menschen Pflanzen als Heilmittel entdeckt haben. So entdeckte Georg Ebers im Jahre 1873 einen Papyrus [33], der eine medizinische Rezeptsammlung enthielt und aus der Zeit um 1500 v. Chr. stammt. Sie gibt einen Überblick über die in Ägypten verwendeten Gewürze, Drogen und Pflanzen [33]. So wiesen nicht nur die Ägypter sondern auch Araber, Griechen, Römer und viele andere Kulturen auf den Nutzen der Pflanzen gegen Krankheiten wie Krebs hin. Allerdings begann die Forschung im wissenschaftlichen Sinne erst in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts [53, 54]. Hartwell und seinen Mitarbeitern haben sich dadurch hervorgetan, eine detaillierte Übersicht über die bis dahin in der vorhandenen Literatur bekannten Pflanzen mit antipro-

liferativen Inhaltsstoffen aufzuzeigen. Diese Übersicht gliederten sie in Artikelserien, organisiert nach Pflanzenfamilien [43-52].

Aktuelle Schätzungen geben an, dass jeder dritte Mann und jede vierte Frau im Laufe des Lebens an Krebs erkranken; im Jahre 2002 erkrankten etwa 424.250 Menschen neu an Krebs (Schätzung des Robert Koch-Instituts; Männer 218.250, Frauen 206.000) [2]. In etwa 25% aller Fälle der Krebs die Ursache der inzidenten Mortalität. Damit ist der Krebs die nach den Herz-Kreislaufkrankungen zweithäufigste Todesursache. Erkrankten Männern und Frauen gehen im Mittel 8 Jahre ihrer fernen Lebenserwartung durch den Krebs verloren, insgesamt, bezogen auf die Bevölkerung Deutschlands, 2 868 000 Lebensjahre [3]. In den USA erleidet einer von zwei Männern bzw. eine von drei Frauen eine Krebskrankheit in seinem/ihrem Leben, und einer von drei Männern bzw. eine von fünf Frauen verstirbt an ihr [98].

1.5 Naturwirkstoffe:

potentielle Therapeutika gegen Krebsleiden

Intensive und systematische Forschung an der Entwicklung von Naturstoffen wie auch von Synthetika zu Pharmaka gegen Krebs (z.B. NCI, National Cancer Institute, USA seit 1954 [106] gelangen immense Fortschritte in der Behandlung und in der Grundlagenforschung der Tumorbilogie. Jedoch bleibt fest zu halten, dass die Mortalität aufgrund von Krebsleiden annähernd auf demselben Niveau bleibt. Grund hierfür ist eine stetig gestiegene und noch ansteigende Inzidenz. Ohne Medikamente wie Vincristin, Vinblastin, Stoffe mit einer Wirkung auf die mitotische Teilungsspindel; zytostatisch wirkende Antibiotika wie Adriamycin, Daunorubicin, Mitomycin; Etoposid, ein Topoisomerase-II-Inhibitor; Taxol, ein Mitosehemmer, der zur Verklumpung der Mikrotubuli führt oder andere Naturstoffe müsste die Medizin große Erfolge entbehren. Obgleich nur eine relativ kleine Anzahl von neuen wirksamen Naturstoffen die rigorosen Prüfverfahren und Testungen, welche der Einführung von Pharmaka in den alltäglichen klinischen Gebrauch vorausgehen, überstanden, ist doch ihre Entdeckung noch in anderer Hinsicht wertvoll und nützlich. Sie dienen beim so genannten „Drug-Design“ als Vorlage zur Modellierung von Analoga mit verstärkter Aktivität. Darüber hinaus dienen sie als Proben gleichsam der Untersuchung von biochemischen Prozessen auf molekularem Niveau bei Pflanze und Tier.

1.6 Naturwirkstoffe: Strategien zur Erforschung

Bei der Auswahl von Pflanzen zur näheren Untersuchung im Hinblick auf neuartige Naturwirkstoffe, unabhängig vom Indikationsgebiet, gibt es fünf Strategien: Das Zufallsprinzip, den taxonomischen Ansatz, den chemotaxonomischen Ansatz, den informationsbasierten Ansatz und das Vorgehen nach ethnomedizinischen Gesichtspunkten.

Wählt man die Pflanzen nach dem Zufallsprinzip, sammelt man alle verfügbaren Spezies und alle verfügbaren Pflanzenteile ungeachtet von möglicherweise vorhandenem Wissen oder schon bestehender Erfahrung mit dieser Pflanze. Dieser Strategie folgend, wurden schon eine große Anzahl von Proben pflanzlichen Ursprungs, auch aus maritimen Habitaten, von Flechten, Pilzen und Mikroben Screeningtests unterzogen und viele Hunderte aktiver Substanzen isoliert. So screenete allein das National Cancer Institute in den USA bis 1982 114 045 Pflanzenextrakte durch, von denen 4 897 zytotoxische Eigenschaften aufwiesen [106]. Seitdem Naturextrakte als Komponente in das NCI-Screeningprogramm integriert worden sind, entwickelten sich daraus tatsächlich Impulse für neue Untersuchungsfelder, in denen nach antineoplastischen Chemotherapeutika gesucht wird. Obwohl viele Verbindungen auf diese Weise entdeckt wurden, die eine gute Aktivität in den In-vitro- und In-vivo-Testungen aufwiesen, überstand nur eine geringe Anzahl die klinischen Tests und setzte sich durch. Daher besteht auch angesichts der demographischen Entwicklung ein bleibender Bedarf nach aktiven Verbindungen mit neuartigen Strukturen und Wirkmechanismen.

Im taxonomischen Ansatz untersucht man Pflanzen, deren Wirkung bzw. Anwendungsgebiet bereits bekannt ist. Mit dem Ziel, höhere Ausbeuten an bekannten Substanzen zu erreichen oder neuartige Analoga bekannter Verbindungen zu entdecken, die möglicherweise wirksamer als die Originalsubstanz sind, erforscht man verwandte Spezies. Gäbe es zum Beispiel Interesse daran, das Taxol, das aus der Spezies *Taxus brevifolia* gewonnen wird, mit einer höheren Ausbeute zu isolieren, so suchte man nach *Taxus*-verwandten Spezies, um dort nach höheren Gewinnraten von Taxol und anderen Taxol-Analoga, welche möglicherweise in höherer Konzentration vorhanden und leicht in Taxol umwandelbar wären, zu finden.

Bei dem chemotaxonomischen Ansatz ist eine bestimmte Substanzklasse von besonderem biologischem Interesse. Pflanzen, bei denen man annimmt, dass sie

verwandte Verbindungen enthalten, werden daraufhin untersucht. Dabei besteht die Hoffnung, den schon bekannten Mitgliedern der Familie dieser Verbindungsklasse neue hinzufügen zu können.

Der Informations-basierende Ansatz orientiert sich an Pflanzen mit bekannter Wirkung aber unbekannter Wirksubstanz. Derartige Pflanzen untersucht man in der Hoffnung auf neuartige Substanzen und Wirkmechanismen.

Beim Vorgehen nach ethnomedizinischen Gesichtspunkten werden für die Untersuchung Pflanzen berücksichtigt, von denen überliefert ist, dass sie medizinisch verwendet werden bzw. wurden. Nach kritischer Beurteilung dieser Quellen und Informationen wird nach der betreffenden Pflanze gesucht und die Forschung begonnen [28].

1.7 Strategie der vorliegenden Arbeit

Der vorliegenden Arbeit liegt streng genommen keiner dieser Ansätze zugrunde. Es handelt sich weder um eine Suche nach dem Zufallsprinzip, noch um systematische Untersuchungen, nach taxonomischem, chemotaxonomischem oder ethnomedizinischem Ansatz. Informationsbasiert war der Anlass für die vorliegende Arbeit ebenfalls nicht, da nicht bekannt war, ob das Vorhandensein der Eigenschaft der Allelopathie gleichzeitig auch bedeutet, dass die Pflanze antiproliferative Inhaltsstoffe bezüglich bösartiger Neubildungen des Menschen beinhaltet. Erst nach einem möglichen, positiven Ergebnis dieser Arbeit könnte der Liste die neue Strategie hinzugefügt werden, nämlich in Bezug auf die Suche nach neuen antiproliferativen Naturstoffen auch der allelopathischen Eigenschaft mancher Pflanzen nachzugehen.

Obwohl der vorliegenden Arbeit kein informationsbasierter Ansatz zugrunde liegt, ist es von Bedeutung, die teilweise über einhundert Jahre alten Nachrichten über *Juglans regia* und seine Inhaltsstoffe vorzustellen.



Abb. 1:

Walnussbaum, Nussbaum, *Juglans regia*.

[89]

1.8 *Juglans regia*

Die Walnuss, *Juglans*, gehört zur Familie der Juglandaceen. Botanisch gesehen eigentlich keine Nuss, sondern eine Steinfrucht. Sie ist in Südosteuropa, Kleinasien bis Nordindien, China und Zentralasien heimisch und wird in ganz Europa, Nordafrika, Nordamerika und Ostasien kultiviert [1]. Zur Gattung gehören u. a.:

Die aus Südosteuropa stammende Gemeine Walnuss, die für die vorliegende Arbeit verwendet worden ist (Abb. 1: Walnussbaum, Nussbaum, *Juglans regia*); ein bis 25m hoher Baum mit aus drei bis vier Fiederpaaren zusammengesetzten Blättern, dessen kugelige, grüne Früchte einen hellbraunen, gefurchten Steinkern besitzen.

Die im Osten Nordamerikas vorkommende Schwarznuss (Schwarze Walnuss, *Juglans nigra*), ein bis 40m hoher Baum mit tief rissiger Borke und 30-60cm langen Blättern, die sechs und mehr Fiederpaare aufweisen. Endblättchen fehlen oft. Ihre Früchte sind kugelig, 4-5cm groß, mit sehr dicker, dunkelbrauner Schale und schwarzem, dickschaligem Steinkern. Beide Arten werden in Mitteleuropa kultiviert.

Kulturgeschichtlich zeigen Ausgrabungsfunde in Österreich sowie oberitalienischen und süddeutschen Pfahlbauten, dass die Walnuss nicht erst durch die Griechen nach Italien kam und später durch die Römer nördlich der Alpen eingeführt wurde. Die Nuss war im frühen Mittelalter schon über ganz Mitteleuropa verbreitet, worauf die in verschiedenen

europäisch-indogermanischen Sprachen parallel, aber aus demselben Stamm gebildeten, verschiedenen Bezeichnungen hinweisen.

1.9 Inhaltstoffe von *Juglans regia*

Bekannte Inhaltsstoffe von *Juglans regia* sind nach DAC 1986: in großer Menge mit einem Gehalt von 10% Gerbstoffe vom Typ der Ellagitannine und das schon erwähnte Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) und Hydrojuglon, fast ausschließlich in Form der Monoglukoside [32, 116]. Die Blätter enthalten Galloylglycosen und Ellagitannine, sowie das dimere Rosaceen-Ellagitannin Saguin-H6 [55]. Juglon kommt im Blattwachs zu ca. 30% vor [96]; freies Juglon ist instabil und polymerisiert leicht zu braunen und schwarzen Pigmenten, weshalb es in älteren Blättern und in der Droge nur in Spuren vorliegt [1]. Juglon ist 1968 auch aus *Juglans nigra* reinisoliert worden [15, 29]. Der Anteil von ca. 3,4% Flavonoiden [24] teilt sich auf das Quercitin, dessen -3-O-galactosid (Hyperosid, 0,2-0,6%), -3-O-rhamnosid (Quercitrin) und 3-O-arabinosid, auf das Kämpferol und sein -3-O-arabinosid. Als Phenolcarbonsäuren sind u.a. Kaffeesäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxyphenylelessigsäure, Gallusäure, Salicylsäure, Chlorogensäure und Neochlorogensäure [75, 114] enthalten. Es besteht zu etwa 0,01-0,03% aus ätherische Öle, mit Germacren D als Hauptkomponente; weiterhin wurden Cryophyllen, (E)- β -Ocimen, β -Pinen und Limonen nachgewiesen [23, 114] Sabinen, Myrcen, Ocimen, Linalool, Borneol, Myrtenal, Carvon, Campher, Thymol und Cineol. Es finden sich verschiedene Sesquiterpene; darunter reichlich beta-Eudesmol; das Diterpen Isophytol; geringe Mengen an Phenylpropans Eugenol; 23-Alkane und 21-Fettsäuren. Insgesamt handelt es sich um 11% freie und 13% gebundene Fettsäuren, 27% Alkane, und eigentliche ätherische Öle in der Terpenoid- und Phenylpropan-Fraktion nur 45%. [114] Erwähnenswert erscheint der 0,85-1%ige Gehalt von Ascorbinsäure in Walnussblättern [67].

1.10 Wirkung des Chinons Juglon

In chemotaxonomischer Hinsicht von Bedeutung sind die Chinone mit dem schon mehrmals erwähnten Vertreter Juglon, das für Angiospermen, Pilze und Fische toxische Eigenschaften besitzt [7, 66, 74, 104]. Beim Juglon handelt es sich nicht um ein Herbi-

zid mit breitem Wirkspektrum, denn allgemein wächst z.B. Gras unterhalb von Walnussbäumen [103]. Walnussextrakte vermögen Goldfische [7], *Daphnia magna*, Ratten, Kaninchen, Flussbarsche und Frösche zu sedieren [39, 113]. Juglon wirkt toxisch auf Pilzbakterien und Hefen [66]. Der isolierte Inhaltsstoff Juglon besitzt bei intraperitonealer Applikation an der Maus eine Hemmwirkung gegenüber Tumoren (z.B. Ehrlich-Ascites-Tumor) [14, 87]. Das Juglon scheint den Eintritt der Zellen in die Mitose zu verhindern. Außerdem bewirkt es die Entstehung von Metaphaseanomalien, wodurch der Prozess der Zellteilung gestoppt wird. Die orale Gabe von Juglon wirkt geringer zytotoxisch als die intraperitoneale und verringert die Menge an Ascites im genannten Tumormodell, verlängert jedoch, genauso wenig wie eine i.p. Applikation, das Leben der Versuchstiere nicht. Weitere Untersuchungen weisen ebenfalls auf eine tumorhemmende Wirkung der *Juglans nigra* hin. Die intraperitoneale Applikation von Ellagsäure, Juglon, „starken“ und „schwachen“ Säuren aus Schalen der Nüsse und aus den Blättern von *Juglans nigra* über 9 bis 12 Tage bewirkte an Mäusen mit verschiedenartig verursachtem Tumorwachstum eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums [14]. Obwohl die Untersuchungen von E. Lagrange 1954 zeigten, dass ein wässriger Extrakt frischer Walnussblätter, der frei von Juglon war, auf der einen Seite eine starke bakterizide Wirkung aufwies, auf der anderen jedoch keinerlei Toxizität gegenüber Mäusen [73] wurde in diesem Gebiet nicht weiter geforscht.

1.11 Ziel der vorliegenden Arbeit

Aufgrund der hier zugrunde liegenden Idee hat die vorliegende Arbeit folgende Ziele:

1. Die Frage zu beantworten, ob die in Natura beobachtete Eigenschaft der Allelopathie des Walnussbaumes sich in die Tumorbiologie übertragen lässt, ob also ein wässriger, juglonfreier Extrakt eine wachstumshemmende Eigenschaft an Tumorzellen aufweist.
2. Zu klären, ob es sich um eine zytostatische oder um eine zytotoxische Eigenschaft handelt.
3. Bei Nachweis antiproliferativer bzw. antineoplastischer Eigenschaften sollte die Extraktion der diese Eigenschaft vermittelnden Substanzen aus dem Walnusslaub optimiert werden.

4. Es sollte eine optimale Trennstrategie entwickelt werden, mit deren Hilfe sich solche Substanzen isolieren ließen.
5. Mit einer Aufreinigung zu beginnen, an deren Endpunkt die Darstellung einer reinen Substanz stehen soll, die die antiproliferativen Eigenschaften besitzt.

2 Material und Methoden

2.1 Vorbemerkung

Aufgrund der Fülle der in der vorliegenden Arbeit angewandten und den für den jeweils anstehenden nächsten Versuchsschritt durchgeführten Optimierungen und Anpassungen finden in diesem Teil lediglich die Prinzipien der Methoden beschrieben. Dementsprechend folgen die von Fall zu Fall variierenden, speziellen Angaben der Übersichtlichkeit halber jeweils an dem korrespondierenden Ort im Ergebnisteil. So lag größtes Augenmerk vor allem an der Erklärung der Separationsvorgänge.

Ebenfalls im Sinne der Übersichtlichkeit wurden die verwendeten Materialien nicht in den Text eingearbeitet, sondern jeweils zu den einzelnen Methodenkapiteln passend aufgeteilt, am Schluss dieses Abschnitts aufgezählt.

2.2 Drogenmaterial, Extraktion und Probengewinnung

2.2.1 Drogenmaterial

Das Drogenmaterial stammte aus zwei Blätterernten eines Walnussbaumes (*Juglans regia*) mit Standort in Münster, NRW. Den Baum bestimmte Professor Albers im Institut für Botanik der Westfälischen Wilhelms- Universität; ein Belegexemplar eines Blätterstandes ist im Institut für Botanik hinterlegt.

Beide Blätterernten erfolgten jeweils im Herbst in den Jahren 1997 und 1998, gegen Mitte Oktober, zu einer Zeit, zu der der Baum das Laub schon abzuwerfen begann. Bei der Ernte 1997 wurden 13,5 kg Blätter gepflückt, die zum Schutz vor etwaigen Veränderungen sofort bei -80°C bis zu ihrer Weiterverarbeitung eingefroren wurden. In den darauf folgenden Tagen schloss sich, nach Entfernung der Blattstiele, in einem Mörser unter Stickstoff die Zerreibung der Blätter zu einem Pulver sowie die Lagerung der Droge bei ebenfalls -80°C an. Die Ernte 1998 brachte 23,8 kg Blätter, mit analoger Präparation. Die Droge des Jahres 1997, genannt *JR1*, diente zu Vorversuchen; das Hauptexperiment erfolgte unter Verwendung der Droge des Jahres 1998, *JR2*.

2.2.2 Extraktion

Vier Kilogramm der Droge *JR1* kamen zur Extraktgewinnung. In einem 20 l Becherglas wurde die Droge zunächst mit Wasser übergossen; die Aufschlemmung wurde dann mit einem Ultra Turrax[®] durchmischt und durch mehrere Tuchfilter abgenutscht. Der durch diese Wirbelextraktion erhaltene olivgrüne Extrakt, der nach einigen Stunden ins bräunliche umschlug, wurde zur Entfernung von Schwebstoffen 10 min bei ca. 3 500 U/min zentrifugiert, danach dekantiert, bis zum Auftreten einer Schaumbildung mittels Rotationsverdampfer eingengt und schließlich gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden mit insgesamt 10 l Wasser in drei Durchgängen schließlich 105 g Extrakt erhalten.

In einem zweiten Schritt erfolgte analog die Extraktion des hellgrünen Rückstandes der Wasserextraktion mit insgesamt 9 l Methanol in drei Durchgängen, während derer die Aufschlemmung für 10 Minuten mit dem Ultra Turrax[®] stattfand. Nach Einengung mittels Rotationsverdampfer betrug das Trockengewicht dieses Extraktes 141 g.

Schließlich wurde der Rückstand der beiden vorhergegangenen Extraktionsschritte noch mit insgesamt 16 l Dichlormethan (DCM) in vier Durchgängen erschöpfend extrahiert. Nach der Einengung verblieben 318 g einer viskösen, schwärzlichen Masse. Die insgesamt 564 g schweren Extrakte blieben im Exsiccator unter Vakuum mit Blaugel. Das Verhältnis von Droge zu Extrakt betrug somit 7,1:1.

Die Droge *JR2* wurde im nachfolgenden Jahr nur noch mit Methanol und DCM extrahiert, da sich der wässrige Extrakt im Vergleich mit den beiden anderen als schwächer erwies. Nach Extraktion von 7 kg der Droge mit insgesamt 15 l Methanol und 16 l DCM wurden so 832 g Extrakt erhalten. Das Verhältnis von Droge zu Extrakt betrug somit 8,4:1.

2.2.3 Aufbewahrung und Lagerung von Extrakten und Fraktionen

Falls nicht anders angegeben verblieben die Extrakte und Fraktionen nach Trocknung bei -80°C. Ließen sich Fraktionen im Luftstrom nicht ausreichend trocknen, oder verhielten sich hygroskopisch geschah deren Aufbewahrung im Exsiccator in Anwesenheit von Blaugel unter Vakuum.

2.2.4 Probengewinnung für die Testung

Zur Testung der antiproliferativen Aktivitäten kamen jeweils von den Extrakten, Fraktionen oder Reinsubstanzen zwei Proben mit 0,5% des Gesamtgewichtes. Dies geschah nach der Wägung der einzelnen Fraktionen und deren Wiederauflösen in organischen Lösungsmitteln durch Volumetrie. Die Trocknung der Proben erfolgte im Luftstrom. Nachfolgendes Aufziehen eines Vakuums im Exsiccator mit Blaugel sicherte die vollständige Entfernung der Lösungsmittel. Die Proben wurden in Aqua ad injectabilia wieder aufgelöst. Bei schwerlöslichen Proben erfolgte erst ein Löseversuch mit Ultraschall, als nächstes ein Versuch mit Ultraschall unter Wärmezufuhr, und schließlich die Anwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO), auch in Verbindung mit Ultraschall. Die Konzentration von DMSO überschritt dabei nie die Grenze von zwei Promille in der Zellkultur. Der Wert von zwei Promille ergab sich aus Vorversuchen, und stellte für beide verwendeten Zelllinien eine Konzentration dar, die das Wachstum nicht messbar beeinflusst. War keine oder keine ausreichende Lösung der Stoffe zu erzielen, wurden Suspensionen verwendet. Bei den Testungen betrug die Probenkonzentration 10 µg/ml.

2.3 Trennstrategie

2.3.1 Entwicklung einer chromatographischen Trennstrategie

Die Trennung der Extrakte und weitere Auftrennung der Fraktionen erfolgte unter dem Einsatz beinahe sämtlicher bekannter Prinzipien der Chromatographie, also verschiedener Adsorptions-, Sieb- und Verteilungseffekte von Substanzen. Um möglichst auch Substanzen noch nachweisen zu können, die nur in Spuren im Extrakt vorhanden waren, kamen folgende Strategie für die Aufreinigung zur Anwendung, und zunächst bei der Aufarbeitung der Droge *JR1* auf Durchführbarkeit untersucht:

Die Fraktionierung eines Extraktes oder einer Fraktion sollte in möglichst nur einem Trennungsvorgang geschehen, um Vielfachfraktionierung mit nachfolgender Wiedervereinigung korrespondierender Fraktionen aus gleichen Trennungsgängen derselben Probe zu vermeiden. Dies erfolgt nicht nur zur Reduktion der benötigten Zeit und aus Kapazitätsgründen, sondern auch mit äußerstem Augenmerk auf die zu erreichende Trennschärfe.

Entscheidende Voraussetzung für den Beginn eines Trennungsganges bildet eine geeignete Zusammensetzung des Säulenmaterials mit erforderlicher Kapazität. Daher war es notwendig, besonders für den Beginn des Trennganges, geeignetes Säulenmaterial zu konstruieren. Der Trennungsgang verlief strikt aktivitätsgeleitet nach dem Merkmal „antiproliferative Aktivität“ als Bioassay.

„Benachbarte“ wirksame Fraktionen wurden wiedervereinigt. Dies stellte sicher, dass eine einzige wirksame Substanz nicht auf zwei verschiedene Fraktionen verteilt werden konnte. Fraktionen, die sich in der Testung als unwirksam erwiesen, jedoch im DC-Verlauf „benachbarten“, wirksamen Fraktionen ähnelten- sich folglich als chemisch ähnlich herausstellten, wurden den wirksamen Fraktionen jeweils wieder hinzugeführt. Die möglicherweise in diesen Fraktionen aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit vorhandenen Anteile einer gesuchten Substanz wurden somit nicht verworfen.

Der schließlich bis zu neunstufige Trennungsgang wurde in Vortrennungen, Anreicherung der Aktivität und in die weitere Feinaufreinigung aufgeteilt. Bei den Vortrennungen wurden dafür die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Sorbentien, wie der mikrokristallinen Cellulose, des Kieselgels und von Sephadex LH-20 genutzt. Um jeweils in nur einem Schritt die ganze Probe aufzutrennen, wurden anfangs aufgrund ihrer höheren möglichen Beladung vakuumgetriebene Säulen verwendet, anschließend schwerkraftbetriebene. Es folgten Flüssiggegenstromchromatographien und Mitteldruckflüssigkeitschromatographie.

Allgemein wurde der Extrakt mittels eines der oben genannten chromatographischen Verfahren getrennt, sodann unter DC-Kontrolle in Gruppen eingeteilt. Anschließend wurden die einzelnen Gruppen bzw. in einigen Fällen auch alle einzelnen Fraktionen per Testverfahren in wirksame und nicht wirksame Fraktionen unterteilt. Nur die wirksamen Fraktionen wurden weiter nach obiger Methodik chromatographisch aufgetrennt.

2.4 Dünnschichtchromatographie

2.4.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Kieselgel einer mittleren Porenweite von 60 Å in einer Dicke von 0,2 mm beschichtete Aluminiumfolien verwendet, die einen bei einer Wellenlänge von 254 nm grün-gelb fluoreszierenden In-

dikatorstoff enthielten. So konnte unter Ultraviolettlicht einer Wellenlänge von 254 nm die auf der Platte anwesenden fluoreszenzlöschenden Substanzen aufgefunden und markiert werden. Bei einem Licht der Wellenlänge 366 nm wurde die Eigenfluoreszenz von Substanzen, beispielsweise von Aromaten, untersucht; ihre Lokalisation wiederum eingezeichnet.

Zum Auftragen der Proben wurden Kapillarpipetten von 2 µl, 5 µl und 10 µl Volumen benutzt. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit wurden die Proben in kleinen Volumina strichförmig aufgetragen, im Luftstrom getrocknet und bis zu acht mal, je nach Konzentration der enthaltenen Substanzen, an der selben Stelle wieder aufgetragen. Damit wurde ein Verlaufen der Probe auf der Platte verhindert. Als Fließmittel kamen für unpolare Fraktionen relativ unpolare Gemische zum Einsatz, wie z.B. ein Gemisch aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis von 80:20 v:v, für polare Fraktionen je nach den Erfordernissen relativ polare Gemische, wie z.B. ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis von 80:19:1 v:v. Dabei wurde das DC-Trennsystem sowohl als verteilungschromatographische Methode im Falle der Chromatographie sehr polarer Substanzen mit einer polaren Fließmittelkomponente wie Wasser, das sich gern an das Kieselgel anlagert und auf diese Weise einen Teil der stationären Phase bildet [68, 105], als auch als rein adsorptionschromatographische Methode verwendet.

Die Entwicklung der Platten erfolgte jeweils in einer Kammer ohne Einstellung einer Kammersättigung mit dem Fließmittel. Der Grund hierfür lag darin, sowohl zeit- als auch Kosten sparend zu arbeiten. So wurde das Fließmittelsystem jeweils daraufhin optimiert, eine bestmögliche Trennung des Gemisches zu erreichen, um im Sinne der vorgestellten Trennstrategie möglichst gut die Ähnlichkeit oder Unähnlichkeit benachbarter Fraktionen beurteilen zu können. Hierbei wurde das Phänomen der freiwerdenden Adsorptionswärme durch Verdampfung bewusst dazu genutzt, die bei Kammersättigung für eine Trennung niedrigeren R_f-Werte zu erhöhen und doch noch eine Trennung an Kieselgel zu erreichen, um nicht mit einer Umkehrphase ein zweites Sorptionsmittel einsetzen zu müssen und die weit über 10 000 gebildeten Fraktionen ein zweites Mal auftragen zu müssen.

Die Detektion erfolgte nach der Beurteilung unter Ultraviolettlicht durch Eintauchen in Anisaldehydschwefelsäurereagenz in einer Zusammensetzung von Essigsäure zu Anisaldehyd zu rauchender Schwefelsäure von 100:1:2 v:v:v.

2.5 Herstellung und Befüllung der verwendeten Säulen

2.5.1 Säulenmaterial für die säulenchromatographischen Verfahren

Das Säulenmaterial für die in der Arbeit verwendeten chromatographischen Verfahren wurde den Erfordernissen entsprechend angefertigt. Die Säulendimensionen sind der Übersichtlichkeit halber im Ergebnisteil jeweils der Beschreibung der einzelnen Trennschritte zugefügt. Im Folgenden wird auf die prinzipielle Bau- und spezielle Funktionsweise der angefertigten sog-, schwerkraft-, und druckbetriebenen Säulen näher eingegangen.

2.5.2 Sogbetriebene Säulen

Die sogbetriebenen Säulen, die für die Vakuumflüssigkeitschromatographie (vacuum liquid chromatography: VLC) verwendet wurden, ähnelten in der Bauweise sehr den schwerkraftbetriebenen Säulen. Da die Belastung höher war, waren sie aus einem Glas mit einer dickeren Wandung gefertigt als die schwerkraftbetriebenen Säulen. Im Unterschied zu diesen, war an der Unterseite kein Hahn angeflanscht, sondern ein Normschliff 15/13. Hierüber konnte die Säule mit einer angefertigten Vorrichtung verbunden werden, die einerseits die Anlage des Vakuums an die Säule, andererseits das Auffangen des Eluates in einem Schliffkolben an der Unterseite dieses Vakuumzwischenstücks erlaubte. Der Durchmesser der Säulen betrug jeweils 4cm.

2.5.3 Schwerkraftbetriebene Säulen

Die verwendeten schwerkraftbetriebenen Säulen bestanden aus einem Säulenunterteil mit einer gezogenen Spitze, in die ein Teflonhahn eingelötet war; darüber befand sich eine Glasfritte der Porengröße 3. Am oberen Ende war ein Normschliff eingelötet, mit dessen Hilfe die Säule um ein weiteres Stück verlängert werden konnte. Der Durchmesser der Säulen betrug jeweils 4 cm.

2.5.4 Druckbetriebene Säulen

Die druckbetriebenen Mitteldruckflüssigkeitschromatographiesäulen (mean pressure liquid chromatography: MPLC) variierten im Durchmesser zwischen 0,8 cm und 4 cm, wie auch in der Länge zwischen 30 cm und 55 cm. Allen Säulen war die Bauweise aus

Glas gemein, um die Chromatographie beobachten zu können. Bei der MPLC war der Druck durch die Belastungsgrenzwerte des Teflonschlauchmaterials auf ca. 50 bar limitiert. Der druckdichte Abschluss der Säulen wurde durch die Spreizung und damit das Anpressen einer doppelt konisch gearbeiteten Teflonlamelle gegen die innere Wandung erreicht. Der Grad des Anpressdruckes konnte durch ein Gewinde im Stempelkopf reguliert werden, so dass es möglich war, trotz dichten Abschlusses den Stempel bei Bedarf noch zu bewegen. Die Fixierung erfolgte entweder mittels einer Teflonkrampe, die unter das umgekrempte Säulenende geklemmt mittels einer Säulenkopfhülse den Stempel hielt, oder durch das Einspannen der Säule in eine Stahlträgerkonstruktion.

2.5.5 Füllen der Säulen und Besonderheiten der Elution

2.5.5.1 VLC-Säulen (sogbetriebene Säule)

Bei der VLC dienten über der Glasfritte zwei Membranfilter mit einer dazwischen liegenden Schicht von etwa 5 mm Seesand als unterer Abschluss der Säule. Um das Sorbens oder die Probe bei der Aufgabe des Elutionsmittels nicht hochzuwirbeln, bestand der obere Abschluss der Säule aus einem Filter und einer dünnen Schicht Watte, auf die wiederum ca. 2 cm dick Seesand aufgestreut war. Das Elutionsmittel wurde nicht direkt auf die Säule geschüttet, sondern auf einen über den Seesand gehaltenen Glasstempel. Das Befüllen der Säule erfolgte, um quer- oder längsgerichtete Entmischungen des Materials durch Schütteln zu verhindern, durch Einschleppen einer methanolischen Suspension des Sorbens. Sodann wurde die Säule nach Präkonditionierung mit Ethanol zur Vermittelung der Mischung der Lösemittel mit zwei Säulenvolumina Hexan äquilibriert.

Für die Trennungen wurde in Anlehnung an Coll [27, 90] oben beschriebene Glasapparatur konstruiert, die es erlaubte, durch Anschluss eines durch einen Hahn regulierbaren Vakuums das Eluens beschleunigt durch die Säulenpackung zu ziehen und direkt in einem Schliffkolben aufzufangen. Dies allein wäre durch die Schwerkraft aufgrund der Packungsdichte nicht mehr möglich gewesen. Die Besonderheiten im Unterschied zur Literatur [97] bestanden in Folgenden:

1. Es wurde diejenige Packungshöhe ermittelt, bei der mit einer Membranpumpe das Lösemittel der höchsten Viskosität, im gegebenen Falle Wasser, gerade noch über die Säule transportiert werden konnte. Die Säulen, die anhand der erworbe-

nen Kenntnisse neu konstruiert wurden, hatten daher erheblich größere Ausmaße und erlaubten eine größte Packhöhe von bis zu 100cm Cellulose, wodurch es bei einem maximalen Durchmesser von 14 cm möglich war, bis zu 1,5kg Sorbens zu verwenden.

2. Im Gegensatz zur Literatur wurden die Säulen auf der jeweils ersten Trennstufe bis zu einem Verhältnis Probe zu Sorbens von 1:2 überladen. Es wurde jedoch darauf geachtet, die Säulen nicht zu überlasten. Im Sinne der oben vorgestellten Trennstrategie waren jeweils so genannte Recyclingchromatographieschritte initial geplant, d.h. die Wiederholung der durchgeführten Chromatographie unter denselben Bedingungen nach Aufgabe des als wirksam getesteten Teils des Eluates. Auf dieses Vorgehen wurde jedoch verzichtet, da die erhaltenen Substanzpeaks nicht nennenswert verbreitert waren und das Probengewicht um mehr als vier Fünftel verringert werden konnte. Der Recyclingchromatographie wurde daher der Wechsel des Sorbens vorgezogen.
3. Die Proben wurden auf einen Anteil des Sorbens adsorbiert, der dann als oberste Schicht nach Trocknung auf die äquilibrierte Säule aufgetragen wurde, darüber Filter und Seesand.

Die Elution erfolgte schrittweise unter Anwendung von Stufengradienten, wobei das Elutionsvolumen der einzelnen Fraktionen durch die maximale Kolbengröße vorgegeben war, die dem anliegenden Vakuum noch standzuhalten schien.

2.5.5.2 Gelpermeationschromatographie (schwerkraftbetriebene Säule)

Bei der Gelchromatographie wurde das Sorbens, in der vorliegenden Arbeit Sephadex LH-20, in einem großen Messbecher mit der mobilen Phase Methanol : DCM 1:1 äquilibriert, und dann in die Säule gefüllt.

2.5.5.3 MPLC-Säulen (druckbetriebene Säule)

MPLC-Säulen wurden, um Sedimentationseffekte und damit die Entmischung von Partikeln verschiedener Größe bei der Säulenpackung möglichst gering zu halten, unter Anwendung der so genannten Hochviskositätsmethode befüllt. Hierzu wurde das Sorbens mit einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. Isopropanol, aufgeschwemmt und in die Säule eingeschlemmt. Eine möglichst dichte Packung wurde durch das sofortige

Verschließen der Säule und Durchdrücken von Isopropanol unter der höchstmöglichen, durch die Haltbarkeit des Teflonmaterials drucklimitierten Flussrate erreicht. Der Vorgang wurde dann abgebrochen, wenn sich bei konstanter Durchflussrate der aufzuwendende Pumpendruck nicht weiter erhöhte und das Packungsvolumen sich nicht weiter verringerte. Das durch den Pressvorgang freigewordene Säulenvolumen wurde unter Wiederholung der Prozedur ebenfalls gefüllt.

2.6 Vakuumflüssigkeitschromatographie

Die VLC wurde mit den oben näher beschriebenen Säulen ausschließlich als Normalphasenchromatographie, d.h. unter Anwendung polarer Sorbentien, zur groben Vortrennung der großen Extraktmengen benutzt. Sowohl zur Auftrennung des Extraktes *JR1* als auch zur Auftrennung des Extraktes *JR2* wurde zunächst an mikrokristalliner Cellulose, und im zweiten Schritt an Kieselgel 60, einem gebrochenen, asphärischen Material einer Korngröße zwischen 32-63 μm und einer Porengröße von 60 \AA separiert. Die Oberfläche dieses Kieselgels ist mit Silanogruppen (SiOH) bedeckt, über die mit polaren Gruppen des zu trennenden Gemisches temporär Wasserstoffbrücken bzw. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen gebildet werden. Dies stellt den eigentlichen Adsorptionsvorgang dar [27, 90].

An beiden Materialien wurde eine Stufengradientenelution durchgeführt, mit einer elutropen Reihe, die von Hexan über Diethylether, Ethanol, Methanol bis hin zum Wasser reichte. Das Vakuum wurde mittels einer Membranpumpe hergestellt. Die zu trennenden Substanzgemische wurden als Verreibung mit dem Sorbens in Pulverform auf die Säule aufgestreut; Teile der eluierten Fraktionen konnten direkt ohne Aufkonzentrierung zur Kontrolle auf die DC-Platten aufgetragen werden.

2.7 Molekularsiebchromatographie

Die einzige Anwendung der klassischen Säulenchromatographie bestand in einer hydrostatische Säulenchromatographie: der Gelchromatographie. Anders als bei der Verteilungschromatographie, die auf einem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten der zu trennenden Substanzen beruht, oder bei der Absorptionschromatographie, das auf Polaritätsdifferenzen basiert, tritt bei diesem dritten Trennprinzip keinerlei Wechselwirkungen

gen zu der stationären Phase auf. Vom physikalischen Standpunkt aus betrachtet ist eigentlich keine stationäre Phase vorhanden, obwohl die Säule mit einem porösen Feststoff gefüllt ist. Denn diese auch Ausschlusschromatographie genannte Methode trennt Moleküle nach ihrer Größe.

Die Gelchromatographie wurde von Jerker Porath und Per Flodin 1959 entwickelt [94]. Als Trennmaterial dienen polymere Gele, z.B. Dextrane oder andere Stoffe mit definierten Porengrößen. Der Name Sephadex entstand aus **S**eperation, **P**harmacia (pharmazeutischer Firmenname, Uppsala, Schweden), **D**extran.

Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Eindringmöglichkeit und -dauer von Probenmolekülen unterschiedlicher Größe in die Poren. So unterscheiden sich Moleküle, die in die Poren eindringen können, von Molekülen, die zu groß sind, um in die Poren einzudringen. Letztere Moleküle werden ausgeschlossen und treten als erste aus der Säule aus. Diejenigen Moleküle, die in die Poren des Gels eindringen, werden somit zeitweise aus dem Eluentenstrom entfernt und bewegen sich innerhalb der Poren nur mit Diffusionsgeschwindigkeit fort. Sie treten deshalb später aus der Säule aus als die ausgeschlossenen Moleküle. Je kleiner ein Molekül ist, desto tiefer kann es in die Poren eindringen. Aus diesem Grund ist innerhalb der nicht ausgeschlossenen Moleküle eine Klassifizierung nach Molekülgrößen möglich, weshalb man die Chromatographie als auf einem inversen Siebeffekt beruhend bezeichnet. Die sehr kleinen Moleküle des Elutionsmittels können den Träger vollständig durchdringen und treten somit als letzte Stoffgruppe aus der Säule aus. Ein Anbringen eines Vakuums ist bei diesem Träger jedoch nicht möglich, da dies sein Grundgerüst verändern würde und somit seine Trennleistung in Mitleidenschaft zöge. Daher ist seine Säulendimension von der Schwerkraft begrenzt.

Da sich in den beiden der Gelchromatographie vorgeschalteten Auftrennungsschritten die aktiven Fraktionen als im Spektrum der angewendeten Elutionsmittel relativ unpolaren Bereich befindlich herausgestellt hatten, wurde anstelle eines hydrophilen Dextrangels, wie Sephadex G oder anstelle von Polyacrylamid, ein organophiles Material gewählt, das so genannte Sephadex LH-20. Das genannte Material stellt ein gebrochenes Dextran-Epichlorhydrinderivat dar, das durch Hydroxypropylierung verethert wurde.

Das zu trennende Substanzgemisch wurde jeweils als hochkonzentrierte Fließmittellösung auf den Säulenkopf aufgebracht. Um die Molekularsiebeigenschaften des Materi-

als besonders auszunutzen, wurde eine Mischung aus Methanol zu Dichlormethan 50:50 v:v gewählt. Wasser enthaltende Fließmittel adsorbieren an das Gel leichter als Methanol und lassen so die Molekularsiebeigenschaften zugunsten von Verteilungsvorgängen in den Hintergrund treten. Noch weniger polare Lösungsmittel als polarere Komponente des Fließmittels wurden verworfen, da sich das Gemisch darin weniger gut löste. Es wurden Fraktionen zu jeweils 10 ml mit einem Endlosfraktionssammler aufgefangen. Die Kontrolle erfolgte wie beschrieben per DC.

2.8 Verteilungschromatographische Methoden: Flüssiggegenstromchromatographie

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Flüssigkeitsgegenstromchromatographieverfahren, die Tröpfchengegenstromchromatographie (droplet countercurrent chromatography: DCCC), und die Hochgeschwindigkeitsgegenstromchromatographie (high speed coil countercurrent chromatography: HSCCC), stellen rein verteilungschromatographische Methoden dar. Diese Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Verteilung von Substanzen zwischen zwei, oder in komplizierteren Fällen auch drei nicht mischbaren Phasen, wie es im einfachsten Fall beim Ausschütteln einer Substanz im Scheidetrichter vorliegt. Wenn eine Substanz in einer Flüssigkeit besser löslich ist als in der anderen, kommt eine Trennung dem Nernstschen Verteilungssatz folgend zustande:

$$K = \frac{C_{\text{Substanz in Phase I}}}{C_{\text{Substanz in Phase II}}} \quad \text{mit } K \text{ temperaturabhängig}$$

Das Ausmaß der Trennung hängt einzig davon ab, wie hoch der so genannte Trennfaktor ist, der angibt, um wie viel besser oder schlechter eine Substanz sich in einer Phase löst als eine andere. Ist der Trennfaktor zu klein, um mit einer oder mehreren Ausschüttelungen eine adäquate Separation zu erreichen, können die Ausschüttelvorgänge automatisiert werden. Es liegt dann eine Extraktion einer Substanz aus einer Phase in eine andere über viele Stufen vor.

Bei den in der vorliegenden Arbeit angewandten Verfahren handelt es sich um zwei Apparaturen zur Durchführung kontinuierlicher Verteilungschromatographien. In Vorversuchen wurden die für die gewünschten Zwecke idealen Zweiphasensysteme ermittelt. Sie sollten:

1. möglichst gleiche Anteile von Unter- und Oberphase ergeben, um bei einem zu großen Ungleichgewicht nicht zu viel Lösungsmittel zu verbrauchen;
2. sich nach dem Schütteln möglichst rasch wieder entmischen, um eine möglichst rasche Vorbereitung der Versuche zu ermöglichen;
3. möglichst wenig giftig sein,
4. und für die Trennungen noch komplexer Substanzgemische möglichst gleiche Anteile der Substanzen der Probe in Ober- und Unterphase lösen.

Dieser Punkt widerspricht auf den ersten Blick dem Prinzip der effektiven Trennung mit der vorliegenden Methode, da dem Anschein nach bei gleicher Löslichkeit in beiden Phasen keine Trennung erreicht wird. Allerdings waren zwei verschiedene Ausgangssituationen zu berücksichtigen:

1. Die Methode wurde als Feintrennungsmethode angewendet, bei der lediglich wenige Substanzen voneinander getrennt werden sollten, so wurde darauf geachtet, dass der Trennfaktor möglichst hoch war. Dies wurde per DC ermittelt.
2. Außerdem wurde die Methode angewendet, um noch relativ komplexe Gemische voneinander zu trennen. Hierbei sollten vor Beginn der Ausschüttelung gleich viel der Substanzen in Ober- und Unterphase gelöst sein, um nicht nur wenige Substanzen mit einem viel höheren bzw. niedrigeren Trennfaktor von der Hauptmasse abzutrennen, sondern alle Substanzen über eine möglichst große Strecke möglichst weit voneinander zu separieren.

Um den im letzten Punkt beschriebenen Effekt zu erreichen, wurden verschiedene Zweiphasensysteme hergestellt und die zu trennende Fraktion im Scheidetrichter in beiden Phasen gelöst. Die Einschätzung der Verteilung auf Unter- und Oberphase erfolgte anhand DC-Kontrollen. Es wurden folgende Fließmittel getestet:

- a) Dichlormethan/Methanol/n-Propanol/Wasser im Verhältnis von 9:12:1:8 v:v:v:v
- b) Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis von 5:5:7:2 v:v:v:v
- c) Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis von 5:5:7:2 v:v:v:v
- d) Hexan/Diethylether/n-Propanol/Ethanol/Wasser im Verhältnis von 4:8:3:5:4 v:v:v:v:v
- e) Hexan/Ethylacetat/n-Propanol/Ethanol/Wasser im Verhältnis von 4:8:3:5:4 v:v:v:v:v
- f) Hexan/Ethylacetat/Nitromethan/Methanol im Verhältnis von 8:2:2:3 v:v:v:v
- g) Heptan/Aceton/Methanol im Verhältnis von 5:1:4 v:v:v
- h) Heptan/Dichlormethan/Acetonitril im Verhältnis von 10:3:7 v:v:v

Letztlich verwendet wurden dann die folgenden Fließmittel (FM):

- FM A n-Heptan – Aceton – Methanol; 5:1:4
- FM B n-Heptan – Dichlormethan – Acetonitril; 10:3:7
- FM C Toluol – Methanol – Chloroform – Wasser; 5:7:5:2
- FM D Benzol – Chloroform – Methanol – Wasser; 5:5:7:2

Die beiden letztgenannten Fließmittel kamen trotz ihrer extrem hohen Toxizität in vier Fällen zum Einsatz, da sie im fraglichen Fall im Gegensatz zu den anderen getesteten Zweiphasensystemen nahezu ideale Trenneigenschaften boten.

2.8.1 Tröpfchengegenstromchromatographie

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, eine mobile, flüssige Phase durch eine mit stationärer flüssiger, mit der mobilen Phase nicht mischbaren Phase gefüllten Glassäule zu pumpen, ohne dass die in der Säule befindliche Phase vor der zu pumpenden Flüssigkeit hergeschoben wird. Dieser Effekt entsteht dadurch, dass sich innerhalb der Glassäule am Einlass kleine Tröpfchen bilden, die in der stationären Phase aufsteigen, wenn sie leichter als diese sind, oder herunterfallen, falls sie schwerer sind. Damit die mobile Phase also im erstgenannten Fall nicht auf der stationären bzw. im letztgenannten unterhalb der stationären Phase liegen bleibt, und nicht die stationäre Phase jeweils am anderen Ende, also entweder oben, oder unten, aus der Säule treibt, muss eine leichtere Phase von unten, und eine schwerere Phase von oben eingelassen werden. Auf diese Weise bleibt die stationäre Phase in der Säule, und die mobile Phase kann im erstgenannten Fall in Form von Tröpfchen wie viele kleine Ballons aufsteigen, im letztgenannten wie Regentropfen herabfallen. An der Oberfläche der Tröpfchen findet die Verteilung statt [62, 63, 86].

Im vorliegenden Fall wurden die Trennungen mit einem DCC Chromatographen 670 der Firma Büchi durchgeführt. Dieses Gerät ist mit 288 hintereinandergeschalteten vertikal angeordneten Borosilikat-Glasröhrchen, die in sechs Rahmen aufgehängt sind, ausgestattet. Das untere Ende einer Säule ist jeweils über einen Teflonschlauch mit dem oberen Ende der vorhergehenden Säule verbunden. Die Probenaufgabe erfolgte über ein 10 ml fassendes senkrecht schauendes Schaulrohr am Säulenbeginn, das um 180° gekippt werden kann. Diese Kippvorrichtung ermöglicht das Arbeiten im auf- oder absteigenden Mo-

aus. Im Falle des aufsteigenden Modus wurde das Schaulrohr so gekippt, dass der Ausgang nach oben zeigt und dieser zum unteren Ende der ersten Säule führte. Wurde im absteigenden Modus gearbeitet so wurde das Schaulrohr um 180° gekippt, der Ausgang erfolgte nun nach unten und führte zum oberen Ende der letzten Säule. Gleichfalls ermöglichte das Schaulrohr, dass schon vor Beginn der Chromatographie über eine Probenschleife die Probe auf die Säule gegeben werden konnte, ohne dass sie schon in die Säule transportiert wurde. Als Pumpe für den Transport der mobilen Phase durch das Gerät kam eine Knauer HPLC-Pumpe zum Einsatz; üblicherweise betrug das Fraktionsvolumen 4 ml, die Flussrate 0,4 ml/min.

2.8.2 Hochgeschwindigkeitsflüssiggegenstromchromatographie

Das Verfahren dieser Chromatographiemethode besteht wie bei der DCCC darin, eine flüssige mobile durch eine flüssige stationäre Phase zu pumpen, ohne dass diese ausgetrieben wird. Die Apparatur besteht aus zwei beweglichen Achsen, einer inneren und einer äußeren. Letztere ist über eine Stange mit der inneren verbunden. Die Säule ist dabei als Spule auf der äußeren Achse horizontal aufgewickelt, um die sie sich, über ein Planetengetriebe angetrieben, gegenläufig zu der Richtung dreht, in die sie sich insgesamt um die innere Achse dreht. Bild. Dies ist einfacher beschrieben eine Konstruktion, die mit einem Krakenkarussell vergleichbar ist. Die stationäre Phase verbleibt aufgrund der Einwirkung der Zentripetalkraft im Gerät, da sie immer wieder in der einzelnen Spulenwindung nach außen gedrängt wird. Dies gewährt ein Austarieren der Spule durch ein Gegengewicht. Durch die Drehung entstehen Momente, in denen Schwerelosigkeit auftritt, und die mobile mit der stationären Phase „vermischt“ wird; im nächsten Moment treten hohe Schwerkkräfte auf, die die beiden Phasen wieder „entmischen“ lassen, da die schwerere wie beschrieben in die Spulenwindung nach außen gedrückt wird, und die leichtere in Richtung der inneren Achse flotiirt. Da die mobile Phase in eine Richtung gepumpt wird, flotiirt sie im Stadium der „Entmischung“ bevorzugt in die andere Richtung, wo sie dann am Ausgang wieder fraktioniert aufgefangen wird. Aufgrund der Feinheit der Tröpfchen in der dünnen Trennsäule ist die Verteilungsoberfläche größer als bei der DCCC, weshalb mit dieser Methode effizientere Trennungen durchgeführt werden. Allerdings gilt auch hier, wie allgemein, je feiner die Trennleistung desto limitierte die Kapazität [101].

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Trennungen an einem Ito Multilayer Coil Separator-Extractor der Firma PC Incorporated, ausgestattet mit einer 300 ml fassenden Teflonsäule mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm. Die Trennungen wurden wiederum sowohl im aufsteigenden als auch im absteigenden Modus durchgeführt; als Pumpe kam eine HPLC-Pumpe der Firma Waters zum Einsatz. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min; üblicherweise wurden Fraktionen eines Volumens von 5 ml aufgefangen. Die Probenaufgabe erfolgte mit Hilfe der oben beschriebenen Probenschleife, nach Äquilibrieren des Gerätes durch Pumpen des dreifachen Säulenvolumens an mobiler Phase.

2.9 Adsorptionschromatographische Methoden

Als adsorptionschromatographische Methode wurde die Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) angewendet. Diese Form der Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase mittels Druck von 1 040 bar befördert wird, wurde vornehmlich als Adsorptionschromatographie, aber auch überlappt von Verteilungs- und Gelchromatographieeffekten eingesetzt. Sie kam ab der fünften Trennstufe zur Anwendung, teilweise abwechselnd mit gegenstromchromatographischen Methoden. Da die Trennleistung von der Trennstufenhöhe direkt abhängig ist, wurden, van Deemter folgend, die nach genannten Optimierungen vorgenommen.

Wie oben erwähnt, erfolgte die Probenaufgabe meist direkt in etwas Eluens gelöst auf den geöffneten Säulenkopf. Die Lösung wurde dann im Säulenkopf im Luftstrom abgedampft, bevor die Säule wieder geschlossen wurde. Auf diese Weise wurden wesentlich schmalere Banden erzielt als unter dem Einsatz der Probenschleife, da die Substanzen der Probe sich schon vor der Adsorptionschromatographie sukzessive ihrer Löslichkeit nach im über den Säulenkopf laufenden Eluensgradienten verteilten.

Als Sorbentien wurden wesentlich feinere und kleinporigere Materialien verwendet als bei den Vortrennungen in der VLC. Somit wird die Trennstufenhöhe vermindert und die Trennleistung erhöht. Um eine möglichst dichte Packung des Sorbens in der Säule zu erzielen, wurde es als Aufschlemmung, wie oben beschrieben, mit dem höchstmöglichen erreichbaren Druck in die Säule gepresst.

Vor dem endgültigen Einsatz der gepackten Säulen wurden jeweils Vorversuche durchgeführt, anhand derer die bei höchster zu erreichender Packungsdichte höchstmögliche

Füllhöhe ermittelt wurde, bei der unter den benötigten Bedingungen der MPLC noch gerade eine Elution des viskösesten der verwendeten Lösemittel möglich war. Die Longitudinaldiffusion der Teilchen, d.h. die Geschwindigkeitsvektoren der Partikel entlang der Längsachse, welche nach van Deemter zur unerwünschten Bandenverbreiterung beitragen, konnte aufgrund der vernachlässigbar geringen Länge der eingesetzten Säulen ignoriert werden. Im Gegenteil, obgleich eine Steigerung der Flussgeschwindigkeit diesen Faktor entscheidend zum Positiven verbessert, konnte sie so niedrig gewählt werden, wie es mit den zur Verfügung stehenden Geräten überhaupt möglich war.

Die niedrigen Fließgeschwindigkeiten wurden gewählt, um die Stagnation von zu trennenden Massen an den Oberflächen der mobilen Phase, und die Stagnation von Masse in den Poren des Materials, also durch den in diesem Falle unerwünschten Molekularsiebeffekt, möglichst gering zu halten. Die beiden hier genannten Effekte überwiegen bei kurzen Säulenlängen die negativen Auswirkungen der durch die niedrigen Fließgeschwindigkeiten erhöhten Longitudinaldiffusion.

Da die unterschiedlichen in der jeweiligen Fraktion vorhandenen Substanzen je nach Polarität und Löslichkeit meist unterschiedlich stark adsorbiert und desorbiert werden, können sie voneinander getrennt werden. Es wurde jeweils ein Fließmittel mit möglichst geringer Viskosität gewählt, um den schnellen Ablauf der Adsorptions- und Desorptionsvorgänge an das und von dem Material zu gewährleisten.

Es wurde sowohl isokratisch als auch mittels Gradienten eluiert. In den Fällen, in denen zunächst isokratisch gearbeitet wurde, schloss sich jedoch immer ein Gradient hin zu dem Elutionsmittel mit der höchsten Elutionskraft an, um sicherzustellen, dass kein Rückstand der Probe auf der Säule verblieb. Es kamen sowohl Normal- als auch Umkehrphasen zum Einsatz. Letztere besitzen durch ihre an der Kieselgeloberfläche gebundenen Alkylreste hydrophobe Eigenschaften. So wurden Gradienten von beispielsweise Hexan zu Isopropanol für die Normalphasenchromatographie und Gradienten von Wasser hin zu Diethylether bzw. Acetonitril für die Umkehrphasenchromatographie gebraucht. Anwendung fanden folgenden Sorbentien:

- Umkehrphase: LiChroprep RP-18, 15-25 μm
- Normalphase: LiChroprep Si 60, 15-25 μm , 60 \AA
- Cyanophase: LiChrospher CN 100, 10 μm

Hierbei kamen Umkehrphasen trotz ihrer im Vergleich zu Normalphasen geringeren Beladungskapazität zur groben Aufreinigung komplexerer Gemische auf der fünften Fraktionierungsebene zum Einsatz. Die Normalphasen wurden ab der siebten Trennstufe wieder verwendet. Bei LiChrospher CN 100 handelt es sich um durch Einführung von Cyanogruppen oberflächenmodifiziertes Kieselgel. Es stellte sich als das für die Feinauftrennung geeigneteste Material heraus und wurde, seinen im Vergleich zu Normal- und Umkehrphasen mittleren Polaritätsgrad berücksichtigend, jeweils wie eine Normalphase mit einem Gradienten von Hexan nach Isopropanol, in manchen Fällen weiter zum Methanol, eluiert. Obgleich sowohl Ethanol als auch Methanol in Bezug auf Viskosität und Elutionskraft geeigneter als Isopropanol gewesen wären, wurde auf Ethanol aus Kostengründen häufig verzichtet und Methanol deswegen nicht verwendet, weil es die meisten eingesetzten Trennphasen partiell selbst löste.

Als Pumpen kamen zwei HPLC-Pumpen der Bauart 510 von der Firma Waters zum Einsatz, die über einen Computer angesteuert wurden. Die Gradientenmischung erfolgte dabei auf der Hochdruckseite der Pumpen. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210$ nm mit einem Detektor der Firma Knauer die Aufzeichnung der Gradienten und der UV-Absorption mit einem 2-Kanal-Schreiber 7130 der Firma Hewlett Packard. Die Fraktionen wurden mit einem Endlosfraktionssammler aufgefangen; bei Bedarf erfolgte die Peaktrennung anhand der UV-Absorptionsdaten per Hand.

2.10 Spektroskopische Methoden

2.10.1 Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Die Gaschromatographie (GC)/Massenspektroskopie (MS) wurde ausschließlich bei der Strukturaufklärung der isolierten Substanzen verwendet. Aliquots der zu messenden Substanzen wurden, um sie säulengängig zu machen, silyliert. Diese Derivatisierung erfolgte, indem die im Exsiccator getrocknete Probe, üblicherweise 1 mg-5 mg, mit 90 μ l Bistrimethylsilyltrifluoressigsäureacetamid (BSTFA), 30 μ l TMCS und 30 μ l Pyridin zunächst vermischt, und dann für 30 Minuten bei 120°C erhitzt wurde.

Die Messungen wurden mit einem GC-Q Gerät der Firma Finnigan MAT 8230 mit einem vorgeschalteten GC-Gerät Varian 3400 ausgeführt. Dieses Gerät war mit einer Typ DB-5 GC-Säule ausgestattet. Die Probeneinführung erfolgte über die GC/MS Kopp-

lung, Trägergas war Helium; es wurde jeweils 1 μl der Probe ohne Split injiziert. Die Ionisation erfolgte mittels Elektrospraymethode; die Polarität der Ionen war positiv. Die Beschleunigungsspannung betrug 70 keV; Der Scanmodus war 100-1 000 m/z. Das Temperaturprogramm startete bei 100°C, blieb dort für eine Minute und steigerte die Temperatur in Schritten von 8°C bis zur Endtemperatur von 280°C, die für 20 Minuten gehalten wurde, um dann zur nächsten Probe überzugehen.

2.10.2 Kernresonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanz-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) wurde ebenfalls zur Strukturaufklärung der isolierten Fraktionen verwendet [41]. Zur Vorbereitung der Proben wurden die verwendeten Pasteurpipetten und NMR-Röhrchen zunächst mit etwas deuteriertem Lösungsmittel gespült und dann für zwei Tage im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Sofort nach Entnahme erfolgte die Aufbewahrung in einen Exsiccator. Ebenso wurde mit der Watte verfahren, durch die die Proben filtriert werden sollten. Die Proben selbst wurden, bevor sie in einen Exsiccator mit Blaugel unter Vakuum belassen wurden, unter einem Luftstrom abermals getrocknet. Nach Entnahme wurden die Proben in deuteriertem Methanol oder deuteriertem Chloroform gelöst, mit einer Pasteurpipette aufgenommen und durch die Watte zur Filtration in die 5 mm-NMR-Röhrchen gefüllt. Das Volumen betrug jeweils 0,4 ml. Die Angabe der chemischen Verschiebungen, der so genannten δ -Werte, erfolgt in der vorliegenden Arbeit in ppm und die Angabe der Kopplungskonstanten, der so genannten J-Werte, in Hertz, nach Anwendung der von [58] beschriebenen Methode der Verwendung der Lösemittelpeaks als internem Standard.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in der NMR-Abteilung des Institutes für Organische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität unter der Leitung von Dr. Bergander, an einem Bruker AM 360 Gerät, einem Bruker AMX 400 Gerät und einem Varian Unity 600 Gerät. Die ^1H -Spektren wurden bei 360 MHz und 600 MHz vermessen, die ^{13}C -Spektren bei 90 MHz und 150 MHz [16, 17, 70].

Zusätzlich wurden, falls erforderlich, noch zweidimensionale Spektren aufgenommen, um die Interpretation der eindimensionalen Daten zu erleichtern [11, 12, 77]. Die in Puls-Fourier-Transform-Technik [117] aufgezeichneten Signale und so erhaltenen Da-

ten über den Freien Induktionsabfall (Free Induction Decay, FID) wurden offline mit der entsprechenden Software ausgewertet.

2.11 Biologische Testmethoden und Zellkultur

2.11.1 Zellkultur

Die Testungen der antiproliferativen und zytotoxischen Aktivitäten der gewonnenen Fraktionen und Extrakte aus *Juglans regia* im Sinne der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung wurden an immortalen Zellen durchgeführt, die aus einem Adenokarzinom des Dickdarmes und einer Metastase eines malignen Melanoms gewonnen worden waren.

Die Anschaffung von humanen Kolon-Adenokarzinomzellen der Zelllinie CaCo-2 erfolgte über den Vertrieb der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ in Braunschweig. Das Auftauen, die Haltung und die Weiterzucht der Zellen geschahen gemäß deren Instruktionen. Die Zellen dieses Stammes wurden von einem Primärtumor des Kolons eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Abstammung 1974 gewonnen und als Zellkultur etabliert. Im Jahr 1983 hinterlegte Professor Bacher, TU München, als Erstbeschreiber, die Zellen für weitere Forschungen bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [8, 35, 91, 99].

Ebenfalls bezogen wir die Zellen der Zelllinie des malignen Melanoms MelHO von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“. Diese von einer Metastase eines malignen Melanoms stammende Zellkultur zeichnet sich durch ihre außerordentlich hohe Verdopplungsrate, und damit niedrige Verdopplungszeit aus. Die Zellen dieses Stammes wurden von einem Primärtumor des malignen Melanoms einer Frau 1976 gewonnen und exprimieren m-RNA des Onkogens c-myc [61]. Erstbeschreiber war Dr. H. W. L. Ziegler-Heitbrock, Institut der Immunologie, Universität München. Zum Auftauen und anschließender Anzucht der gelieferten Zellen wurden sie in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 800 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Zum Gefrieren der Zellen benötigte man DMSO. Durch wiederholtes Dekantieren des DMSO enthaltenden Überstandes wurde sichergestellt, dass die aufgetauten Zellen kein DMSO mehr enthielten. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation im Falle der Zellen des Dickdarmkarzinoms in 2 ml 10 000 IU / ml Penicillin, 10 000 µg Streptomycin und 20% fetales Kälberserum enthaltendem Medium 199, im Falle der Zellen des malignen

Melanoms MelHO in die gleichen Zusätze, allerdings nur 10% FKS, enthaltendem Medium RPMI 1699 suspendiert und jeweils in einem Schälchen mit einer Fläche von 9 cm² bis zur Konfluenz gezüchtet. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche, alle zwei bis drei Tage. Bei Erreichen von Konfluenz alle fünf bis sieben Tage folgte nach dem Ablösen der Zellen, der so genannten Trypsinierung mit einer 0.04-prozentigen Trypsin / EDTA-Lösung, die weitere Subkultivierung in Kulturflaschen. Die Haltung der Zellen geschah bei 37°C und 4% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Das Einfrieren einiger Zellkulturproben zu Beginn ermöglichte immer mit Zellen zu arbeiten, die sich zwischen der sechsten und etwa vierzigsten Generation befanden. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen nach Bedarf jeweils direkt auf 96-well Mikrotiterplatten, auf Platten mit 24 Vertiefungen und zur Zellzählung auch auf Schälchen von 9 cm² Flächeninhalt ausgesät.

2.11.2 Bestimmung der DNA-Syntheserate per Tritiumthymidin-Einbaumethode

Die Untersuchung der Proliferation anhand der Bestimmung der DNA-Syntheserate erfolgte nach Nemecek et al. [84]. Das Prinzip besteht darin, dass den Zellen während der Wachstumsphase [³H]-markierte Thymidinbasen zum Einbau in die DNA angeboten werden; dieser Einbau kann dann anhand der gemessenen Radioaktivität der Zellen quantifiziert werden. Die Strahlung ist bei diploiden Zellen der Zellteilungsrate, und damit der Vermehrungsrate der Tumorzellen, direkt proportional.

Ein dünnes Aussäen der Tumorzellen auf 96-well-Mikrotiterplatten gab den Zellen genügend Platz, um weiter wachsen zu können. Sie wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 4% CO₂ inkubiert.

Am folgenden Tag wird bei Versuchen, bei denen die Beeinflussung stimulierten Wachstums untersucht werden soll, das Vollmedium durch ein so genanntes serumfreies Hungermedium, Dulbecco's Minimal Essential Medium + HAM's F10 (1:1 v:v) ersetzt. Nach einer vierstündigen „Hunger“-Periode werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen stimuliert und für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für eine weitere, abschließende Periode von vier Stunden werden zwei µCi [³H]-markierter Thymidinbase pro well hinzugefügt.

Dieses Vorgehen wurde in der vorliegenden Arbeit insofern abgewandelt, als dass keine das Wachstum stimulierenden Substanzen untersucht werden sollten, sondern der Test zur Untersuchung der Wachstumshemmung Einsatz fand. Da die Zellen im vorliegenden Fall sowieso, ohne Stimulation, wie gewünscht, in starker Proliferation begriffen waren, wurden die zu untersuchenden Fraktionen und Extrakte direkt ohne vorheriges „Hungern“ der Zellen und nachfolgende Wachstumsstimulation appliziert. Somit konnte die Wachstumshemmung direkt untersucht werden, mit unstimuliertem Tumorwachstum zum Vergleich.

Die [³H]-Thymidineinbaureaktion wurde, wie bei Nemecek et al. [84] beschrieben, durch Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit

- Phosphatpuffer (PBS),
- Trichloressigsäure zur endgültigen Entfernung überschüssigen Tritiums und
- einem Ethanol/Ethergemisch (1:1 v:v) zur Fixierung beendet.

Die Lyse der Zellen und somit die Extraktion des in die DNA eingebauten [³H]-Thymidins erfolgte mit 250 µl 0.5 M NaOH pro Vertiefung. Zur Messung der [³H]-Thymidin-Einbauraten wurden 100 µl der NaOH-Lösung mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) gemischt und die Anzahl der radioaktiven Ereignisse pro Minute in einem Szintillationszähler bestimmt. Die [³H]-Thymidin-Einbauraten werden hier bezogen auf die Zellzahl als Standard angegeben.

2.11.3 Bestimmung der DNA-Syntheserate

mit Hilfe der Bromodeoxyuridineinbaumethode

(5-Bromo-2'-deoxyuridin)

Die Bromodeoxyuridineinbaumethode (BrdU) ist ein weiteres Testverfahren zur Quantifizierung der Zellproliferation. Dieses nicht-radioaktive Verfahren bestimmt die Zellteilungsrate, indem die Menge an BrdU, einem Pyrimidinanalogon des Thymidins, das anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird, mittels eines Antikörpers detektiert. Analog zur Bestimmung der Tritiumthymidin-Einbauraten gilt auch hier, dass mit der Methode nur dann ein genaues Ergebnis erzielbar ist, wenn die DNA-Syntheserate wie bei diploiden Zellen proportional zur Vermehrungsrate ist. Nach dem Vergleich dieser Methode mit der Zellzahlbestimmung im Vorversuch ließ sich die

vorgenannte Bedingung für die gesamte aktivitätsgeleitete Fraktionierung als gegeben annehmen.

Die BrdU-Einbaumethode, ein auf der Beschreibung von Porstmann et al. [95] beruhender und sukzessive optimierter [57, 64, 76, 80] Immunoassay der Firma Boehringer erlaubte in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der DNA-Syntheserate. Die Stimulation der Zellen erfolgte wie oben bereits beschrieben. Anschließend fand eine Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit 10 µl/well BrdU und eine Fixation statt. Schließlich markierte durch eine 90 minütige Inkubation ein monoklonaler peroxidasegekoppelter Maus-Anti-BrdU-Antikörper (Klon BMG 6 H 8) das bis zu diesem Zeitpunkt eingebaute BrdU. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit einem Waschpuffer wurde Tetramethylbenzidin als Substrat für die Peroxidase hinzugefügt, welches dann in einen blauen Farbstoff umgesetzt und mittels eines Elisa-Reader quantifiziert werden konnte. Die Menge des gebildeten Farbstoffes verhält sich proportional zur Proliferationsrate. Innerhalb der Vorversuche bewährte sich diese Methode, um sie als „Bioassay“ für die „Bioassay Guided Fractionation“ zu verwenden. Die Gründe hierfür werden im Teil Vier diskutiert.

2.11.4 Zytotoxizitätstestung

mit Hilfe des Laktatdehydrogenase-Freisetzungstests

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das unter physiologischen Bedingungen nahezu ausschließlich intrazellulär vorkommt. Bei einer Schädigung der Zellmembran gelangt es in die Umgebung. Tritt also ein Membranschaden durch die Einwirkung einer toxischen Substanz auf, wird die Konzentration der freigesetzten LDH als Korrelat für das Ausmaß der vorliegenden Schädigung herangezogen. Da das LDH in großen Mengen nur nach dem Tod einer Zelle freigesetzt wird, stellt es ein indirektes Maß für die Anzahl nekrotischer Zellen in einer abgeschlossenen Zellpopulation dar. Die Tumorzellen wurden hierzu auf 96-well-Mikrotiterplatten gleichmäßig ausgesät, über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 4% CO₂ belassen, das Medium ersetzt, mit den zu untersuchenden Substanzen stimuliert und für 19 Stunden inkubiert. Nach Mischen von 100 µl des nach sanftem Schütteln abgenommenen Überstandes mit 100 µl Farbstoffreagenz und einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz erfolgte die Quantifizierung des durch die Einwirkung der

LDH auf das zugegebene Tetrazolinsalz entstandenen roten Formazansalzes mittels Absorptionsmessung bei 490 nm gegen einen Referenzfilter bei 630 nm. Das Prinzip der Methode ist in der Abb. 2 dargestellt [102].

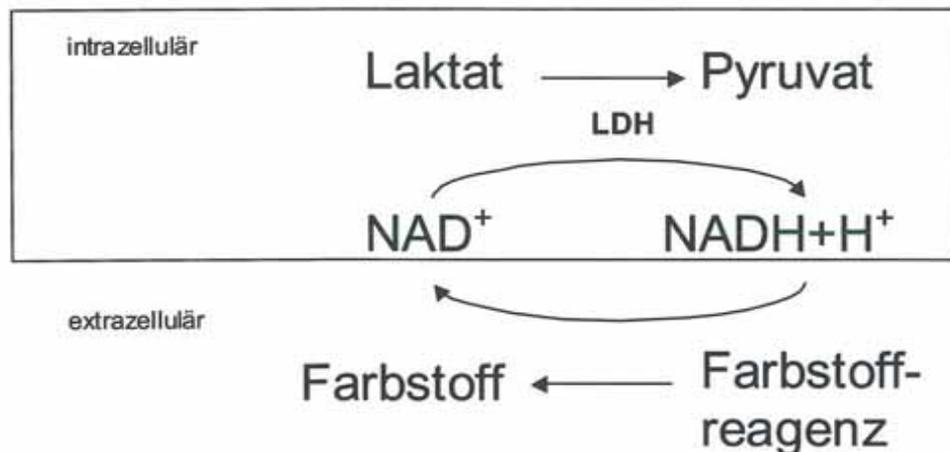


Abb. 2:

Veranschaulichung der Zytotoxizitätstestung mittels LDH-Freisetzungstests.

Die Angabe der Zytotoxizität erfolgt hier anhand folgender Formel:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{(\text{exp. Wert} - \text{negative Kontrolle})}{(\text{positive Kontrolle} - \text{negative Kontrolle})}$$

2.11.5 Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Methode

Das Prinzip der Tod- und Lebendzellzahlbestimmung mit dem Farbstoff Trypanblau beruht auf der Blaufärbung toter Zellen. Die nekrotischen Zellen können somit lichtmikroskopisch von den vitalen, gelblich erscheinenden Zellen unterschieden werden. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Diese Kammer ist wie folgt aufgebaut: sie ist 2 mm tief; ein Raster aus Quadraten erster Ordnung mit einer Kantenlänge von einem mm ist wiederum eingeteilt in 16 Quadrate zweiter Ordnung, und jedes davon in 16 Quadrate dritter Ordnung.

Die Stimulation der Zellen erfolgte auch bei dieser Methode wie oben beschrieben. Nach dem Ablösen der an den Boden der Mikrotiterplatten adhären Zellen durch Trypsinierung, Überführen derselben in Spitzröhrchen und Zentrifugation bei 1 500 g für 10 min wurde der Überstand dekantiert und die verbliebene Flüssigkeit ausgeschla-

gen. Exakt 100 µl Medium nahmen die Zellpellets auf. Kurz vor der Zählung der Zellen kamen 20 µl einer 0.5%-igen Trypanblau-Lösung hinzu. Die Zellzählung geschah mittels Auszählung von jeweils zwei Quadraten zweiter Ordnung in Dreifachbestimmung unter dem Mikroskop; teilweise fand eine Auswertung später anhand von Photos statt. Die Bestimmung der Zellzahl resultierte aus folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Zellzahl}^2 \cdot \frac{250\,000 \cdot 120}{16 \cdot 100}$$

Zellzahl/ml = Zellzahl (Quadrat zweiter Ordnung) x 250000 x 120 / 16 x 100

120 = eingesetztes Zellsuspensions-Volumen (100 µl) + Trypanblau-Volumen (20 µl)

16 = Anzahl der ausgezählten C-Felder

100 = eingesetztes Zellsuspensions-Volumen in µl

250000 = Konstante (Fuchs-Rosenthalzählkammer)

2.12 Verwendete Software und statistische Auswertung der Daten

Die entwickelten DC-Platten wurden mit der Hilfe eines Flachbrettscanners eingescannt, und mit Adobe Photoshop als Datei im tif-Format bzw. jpeg-Format archiviert. Übersichtsbildern entstanden mittels Microsoft Power Point, schematische Zeichnungen mit Hilfe von Corel Draw der Firma Corel. Die Auswertung der aus dem Plattenlesegerät direkt in Microsoft Excel eingegebenen Daten erfolgte per Diagrammerstellung mit Excel bzw. mit dem Programm Graph Pad Prism der Firma Graph Pad.

Die NMR-Daten-Auswertung gelang offline mit der NUTS NMR Data Processing Software der Firma Acorn NMR, Fremont, Kanada.

Die Beurteilung der massenspektroskopischen Daten resultierte aus der GCQ-Data Processing Software der Finnigan Corporation, Bremen. Die Daten wurden mit den Einträgen der NIST-Substanzbibliothek verglichen.

Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte, um das Vorliegen einer wachstumshemmenden Substanz in einer oder mehreren Fraktionen zu sichern per Durchführung des nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben. Als Kontrollstichprobe diente stets eine Serie unbehandelter Zellpopulationen. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen entstanden mit Hilfe der Graph Pad Prism Software der Firma Graph Pad, San Diego, USA.

Material

2.13 Extraktion

Ultra Turrax ^R	Janke und Kunkel KG Typ T 45 N (nach Prof. Willems)
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 120, Leitungswassergekühlt, Firma Büchi, Flawil, Schweiz
Vakuumpumpe	Vakuubrandt MZ 2 C/2.4, Vakuubrandt GmbH, Wertheim
Gefriertrocknungsanlage	Heraeus-Christ Alpha I-5 und Beta I-16, Osterode

2.14 Lösungsmittel/Chemikalien

Wasser	Wasserreinigungsanlage Water Purification System Milli-Q, Waters-Millipore, Eschborn
Ethanol 96%	AHK Handelskontor, Lippstadt
Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Hexan, Methanol,	Qualität „reinst“ von den Firmen Merck, Darmstadt und Riedel-de Haen, Seelze
Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, Heptan, Hexan, Isopropanol, Methanol	Qualität „für die HPLC“ (ChromAr® Qualität), Firma Promochem, Wesel
Acetonitril, Benzol, Nitromethan, Toluol	Qualität „für die HPLC“ Merck, Darmstadt
Anisaldehydschwefelsäurereagenz	Essigsäure:Anisaldehyd:rauchende Schwefelsäure im Verhältnis von 100:1:2
Anisaldehyd	4 Methoxybenzaldehyd Art.Nr. 822314, Firma Merck, Darmstadt

2.15 Dünnschichtchromatographie

DC Aluminiumfolien, 20 x 20 cm	Kieselgel 60 F 254, 0,2 mm Schichtdicke,
--------------------------------	--

	Art.Nr. 1.05554, Firma Merck, Darmstadt
DC-Platten-Entwicklungskammer	Firma Desaga, Heidelberg
UV-Lampe	Camg-UV-Lampe, Firma Camag, Berlin

2.16 Säulenmaterial/Glasmaterial

Säulenmaterial	Schott Röhren, in der Glasbläserei bearbeitet
Glasmaterialien	in verschiedenen Qualitäten und Stärken, Firma Schott, Mainz
Säulendimensionen: Innendurchmesser/Länge	50 mm/200 mm bzw. 300 mm; 60 mm/1 000 mm; 94 mm/300 mm; 140 mm/450 mm
MPLC-Säulen	8 mm/550 mm, 9 mm/260 mm bzw. 420 mm; 50 mm/500 mm
Teflonmaterialien	Firma CS-Chromatographie-Service
Rundkolben, Standzylinder	Schott Duran, Mainz
Rundfilter	S & S Rundfilter Typ 604, Firma Schleicher und Schüll, Dassel
Membranfilter	SM 13400, Firma Schleicher und Schüll, Dassel
Seesand	27-473-9 –50+70 mesh, Aldrich

2.17 Sorbentien

Mikrokristalline Cellulose	Avicel [®] PH-101, Fluka, Ulm
Kieselgel 60	Korngröße: 32-63 µm, 60 Å, Art.-Nr:02827, ICN Silica
Sephadex LH-20	25-100 µm, Art.-Nr: 84952, Fluka, Ulm
Normalphase	LiChroprep Si 60, 15-25 µm, 60 Å, Art.-Nr. 9390, Firma Merck
Umkehrphase	LiChroprep RP-18, 15-25 µm, Art.-Nr:

	13901, Firma Merck, Darmstadt
Cyanophase	LiChrospher CN 100, 10 µm, Cat.-Nr: 1.19631.0010, Firma Merck, Darmstadt
HSCCC	Ito Multilayer Coil Separator-Extractor, 300 ml Teflonsäule, Innendurchmesser 1,6 mm, P.C. Incorporated, Potomac, Maryland, USA,
DCCC	DCC-Chromatograph 670, Firma Büchi, Schweiz
Pumpen	HPLC-Pumpe 64, Knauer, Berlin, bei VLC: Membranpumpe Art.-Nr 16010, Vakuubrandt, Wertheim
MPLC	2 HPLC-Pumpen, Bauart 510, Firma Waters, angesteuert über Computer, Waters Solvent Delivery System
UV-Detektor	Firma Knauer, Berlin; die Aufzeichnung der Gradienten und der UV-Absorption: 2-Kanal-Schreiber 7130, Firma Hewlett Packard, USA
Vakuumentrockenschrank	TRIVAC, Typ D4B, Firma Heraeus-Christ, Osterode
Trockenschrank	Typ 1 5028, Heraeus, Osterode
Fraktionssammler	LKB SuperFrac, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fraktionssammler	Ultrovac II 2070, Firma LKB Biotech
Analysenwaagen	Sartorius MC I, Sartorius RC 250 S, Sartorius 2442, Mikrowaage Sartorius 4401, Firma Sartorius, Göttingen
Ultraschallbäder	Sonorex Super RK106 und RK255, Bandelin Elektronik, Berlin
Zentrifugen	UJ III E, Heraeus Christ, Osterode 5412, Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz,

	Hamburg
Gaschromatograph	GC-Q Gerät MAT 8230, GC-Gerät Varian 3400, ausgestattet mit einer Typ DB-5 GC-Säule, Firma Finnigan, Bremen
NMR	Bruker AM 360, Bruker AMX 400, Varian Unity 600, Firma Finnigan, Bremen
NMR-Röhrchen	5 mm-NMR-Röhrchen, XR-55 RB Thin-wall, Firma Norell, Mays Landing, NJ, USA

2.18 Biologische Testmethoden und Zellkultur

Membranfilter	Porengröße 22 µm, Millipore
Fetales Kälberserum, Streptomycin (10 000 IU/ml), Penicillin (10 000 IU/ml)	Boehringer Mannheim
Kulturgefäße, -flaschen, -schälchen, Zentrifugenröhrchen, Einmalpipetten	Nunc
Zellmedien	RPMI 1699, Medium 199, PBS-Puffer, Gibco
Zelllinien:	MelHO/CaCo 2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
Trypsin-EDTA Solution (1 X)	Cat-Nr. 45 300-27, Life Technologies, Gibco
BrDU-Kit, LDH-Kit	Boehringer, Mannheim
Trypanblau	Solution 0.4%, T-8154, Sigma
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche und ihre methodischen Konsequenzen für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes JR2

3.1.1 Zum Einfluss eines wässrigen Extraktes auf die Zahl humaner Melanom- und Dickdarmkarzinomzellen nach 48-stündigem Wachstum mittels der Trypanblau-Methode

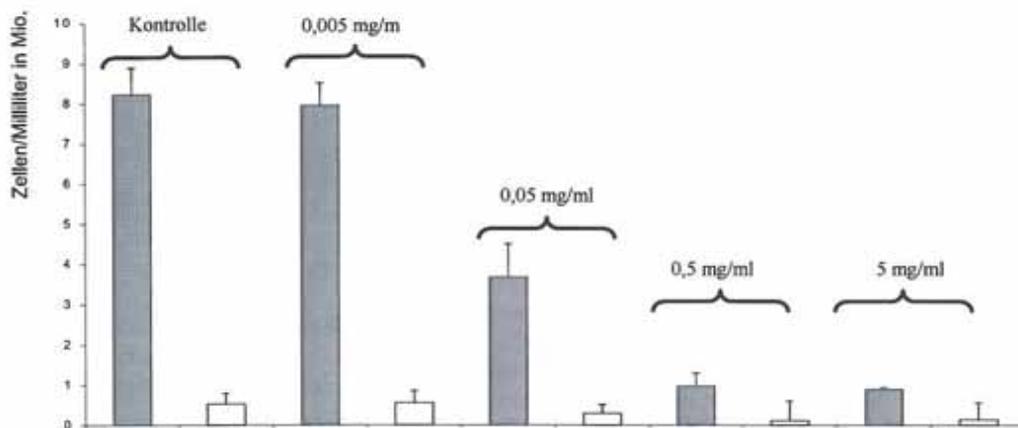


Diagramm 1:

Ergebnisse der Zählung mit verschiedenen Konzentrationen eines wässrigen Extraktes behandelter und mit Trypanblau gefärbter Zellen der Linie MelHO. Die Anzahl vitaler Zellen ist durch die gestrichelten Säulen, die der nekrotischen durch helle Balken dargestellt. Rechts neben denen der Kontrollexperimente sind die Ergebnisse für die Konzentrationen 0,005 mg /0,05 mg /0,5 mg und 5 mg Extrakt dargestellt. Zu sehen ist der wachstumshemmende Effekt des Extraktes, ohne Ansteigen der Zahl nekrotischer Zellen ($n = 11$).

Für diesen ersten Vorversuch im Herbst 1997 wurde zunächst eine kleine Menge eines wässrigen Extraktes aus den Blättern von *Juglans regia* hergestellt. Dieser Extrakt wurde mittels der Trypanblau-Methode an Zellen des malignen Melanoms, MelHO, und humanen Kolonkarzinoms, Caco-2, auf Zytotoxizität und wachstumshemmende Eigenschaften untersucht. Das Diagramm 1: zeigt die Anzahl der Zellen pro Milliliter Kulturmedium nach 48-stündiger Einwirkung von 0,005 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,5 mg/ml und 5 mg/ml des Extrakts im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

Die Anzahl der nekrotischen Zellen belief sich nach der Einwirkung aller untersuchten Konzentrationen, bezogen auf die Anzahl der vitalen Zellen, etwa gleich hoch wie die Zahl der nekrotischen Zellen in den Kontrollexperimenten (jeweils $p > 0,05$). Die leicht erhöhte Anzahl nekrotischer Zellen nach der Gabe von 5 mg/ml des Extraktes erwies sich im Vergleich zu den Kontrollexperimenten weder im Falle des malignen Melanoms noch im Falle des Kolonkarzinoms statistisch signifikant (jeweils $p > 0,05$), deutete aber dennoch auf die Möglichkeit einer zytotoxischen Wirkung hoher Dosierungen des Extraktes hin.

Der Extrakt in den drei höchsten Dosierungen hingegen hemmte das Tumorwachstum beider Zelllinien deutlich. Während bei der Linie MelHO nach der Einwirkung von 0,005 mg/ml des Extraktes noch $96,7 \pm 6,7\%$ der Zellen der Kontrollgruppe gezählt wurden, und somit kein Effekt auf das Proliferationsverhalten der Linie nachweisbar war ($p > 0,05$), wurden nach Einwirkung der drei höheren Dosierungen nur noch $44,7 \pm 10,1\%$, $11,8 \pm 3,9$ respektive $10,8 \pm 0,6\%$ der vitalen Zellen der Kontrollgruppe gezählt. Diese dosisabhängige Hemmung der Tumorpheriferation war jeweils mit einem p von $p = 0,0001$ für die drei Konzentrationen, verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe, statistisch signifikant. Sie war bei der Zelllinie MelHO ausgeprägter als bei der Linie Caco-2.

Aufgrund der günstigen antiproliferativen Wirkung des Extraktes schien eine Isolierung der wirksamen Komponente(n) aussichtsreich. Hierbei blieben sowohl die geeigneten biologischen Testmethoden zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung als auch das optimale Extraktionsmittel zur Gewinnung des Wirkprinzips aus dem Walnuss-Laub zu ermitteln.

3.1.2 Optimierung der Anwendung der Fraktionen

Der erste wässrige Extrakt, dessen Wirkung oben dargestellt wurde, war aus einer Reihe gleichartig hergestellter Extrakte ausgewählt worden, weil er nach einer Woche Lagerung weiterhin steril blieb. Da nicht steril extrahiert werden konnte, waren die meisten Extrakte und Fraktionen unsteril, und damit nicht in der Zellkultur anwendbar. Die Möglichkeiten der Sterilisation durch Sterilfiltration, Ultrazentrifugation oder Bestrahlung wurden verworfen. Umgangen wurde diese experimentelle Schwierigkeit schließlich, indem die Stimulationszeit auf 20 Stunden gesenkt wurde, die Zeit, in der eine

Bakterienkultur noch nicht in eine exponentielle Wachstumsphase eingetreten ist, und so noch keinen Effekt auf die Ergebnisse hat. Das genannte Vorgehen geschah auf Kosten der Sensitivität der Methoden, eine Wachstumshemmung zu detektieren.

Wie später gezeigt werden wird, war eine effektive Detektion der gesuchten Substanzen durch die biologischen Tests aufgrund ihrer hohen Wirkung dennoch möglich. Hinzu kam, dass im Vorfeld schon zwei Kulturen ausgewählt worden waren, die eine extrem hohe Zellteilungsrate aufwiesen.

3.1.3 Auswahl von Verfahren zur Messung von Zytotoxizität und Wachstumshemmung

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde die Zählung nekrotischer Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Methode und die Messung der aus nekrotischen Zellen freiwerdenden Laktatdehydrogenase im Überstand, zur Untersuchung der Wachstumshemmung die Bestimmung des [³H]-Thymidineinbaus in die DNA, die Bestimmung des BrdU-Einbaus in die DNA mittels photometrischer Detektion oder Durchflusszytometer und die Lebendzellzahlbestimmung mit Hilfe der Trypanblau-Methode in Betracht gezogen. Trotzdem die Anwendung des Durchflusszytometers simultan zur Toxizitäts- oder Proliferationstestung die Möglichkeit zur Durchführung erster mechanistischer Untersuchungen, wie z.B. der Untersuchung apoptotischer Vorgänge geboten hätte, wurde sie aus folgenden Gründen verworfen: Da sie neben der Durchführung der bei den anderen Verfahren ebenfalls notwendigen Färbeschritte Trypsinierungs- und Überführungsschritte erfordert hätte, war sie für die Bewältigung mehrerer hundert Tests an einem Tage ungeeignet. Aufgrund der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins verschiedener, und mechanistisch betrachtet sicher unterschiedlich wirkender Substanzen wurde generell auf die Berücksichtigung der Untersuchung zum Wirkmechanismus in der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung verzichtet. Sie hätten die Zahl der durchzuführenden Tests potenziert und so die eigentliche Arbeit unmöglich gemacht. Ebenso blieb die mögliche Beeinflussung von spezielleren Wachstumsvorgängen der Zellen durch die Extrakte oder Fraktionen außer acht, wie etwa die Beeinflussung von Kernteilungsraten oder die Proteinbiosynthese. Anhand der verbliebenen Methoden wurden nun verschiedene Extraktionsmittel auf ihre Fähigkeit zur Herauslösung des aktiven Prinzips und der oben

beschriebenen, bekannten toxischen Inhaltsstoffe der Walnuss aus dem Drogenmaterial hin untersucht.

3.1.4 Antiproliferativitätsprüfung der drei Extrakte mittels Zellzahlbestimmung durch die Trypanblau-Methode

Zur Herauslösung der aktiven Substanzen aus dem Drogenmaterial dienten erschöpfende Wirbelextraktionen mit DCM, Methanol und Wasser. Die Herstellung des methanolischen Extraktes sollte den Wasserextrakt ersetzen, da er erheblich leichter zu handhaben ist. DCM wurde als Standardextraktionsmittel auch für weniger polare Verbindungen eingesetzt.

Zum Vergleich der antiproliferativen Wirkung wurden alle drei Extrakte an beiden Zelllinien untersucht. Das Diagramm 2 zeigt die Effekte der Extrakte auf das maligne Melanom, MelHO.

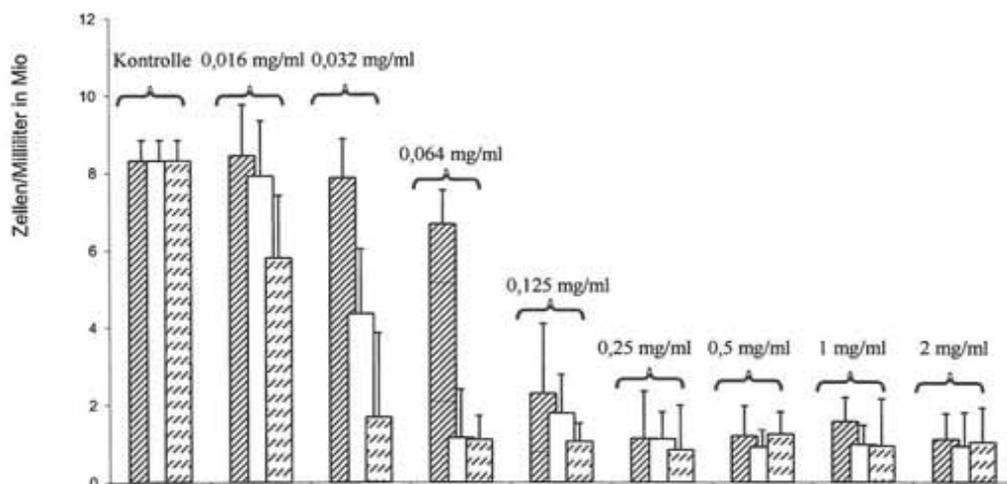


Diagramm 2:

Ergebnisse der Zählung mit verschiedenen Konzentrationen von wässrigen (gestrichelte Säulen), methanolischen (weiße Säulen) und DCM- (unterbrochen gestrichelte Säulen) behandelter und mit Trypanblau gefärbter Zellen der Linie MelHO. Darstellung der vitalen Zellen. Die Wirkpotenz nimmt vom wässrigen über den methanolischen zum dichlormethanolischen Extrakt hin zu, dosisabhängige Wirkung ($n = 9$).

Die Zellzahl nach zwanzigstündiger Extrakt-Exposition ist jeweils auf der Ordinate, die Extraktkonzentration auf der Abszisse aufgetragen. Im Falle der Zelllinie MelHO sind die IC_{50} -Werte für den Wasser-, Methanol- und DCM-Extrakt $98,2 \pm 12,2 \mu\text{g/ml}$,

33,6 ± 8 µg/ml respektive 20 ± 6,1 µg/ml. Somit erweist sich der DCM-Extrakt als wirksamer im Vergleich zum Methanolextrakt. Bei einer Konzentration von 0,064 mg/ml ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Jedoch weisen beide Extrakte eine erheblich höhere Wirksamkeit auf als der Wasserextrakt; diese Unterschiede sind für eine Konzentration von 0,064 mg/ml mit einem $p < 0,005$ statistisch signifikant.

Im Falle der Zelllinie Caco-2 beliefen sich die ermittelten IC_{50} -Werte für den Wasser-, Methanol- und DCM-Extrakt 142,8 ± 31,9 µg/ml, 55,9 ± 13,2 µg/ml respektive 48,2 ± 14,5 µg/ml. Auch hier erweist sich der DCM-Extrakt wirksamer als der Methanolextrakt; während dieser Unterschied bei einer Konzentration von 0,064 mg/ml ebenfalls statistisch nicht signifikant bleibt ($p > 0,05$), weisen jedoch beide Extrakte eine erheblich höhere antiproliferative Wirkung auf als der Wasserextrakt; diese Unterschiede zeigen mit einem p von jeweils $p < 0,005$ statistische Signifikanz.

Insgesamt erweisen sich die drei Extrakte auch in diesem Versuch am malignen Melanom wirksamer als an der Zelllinie des Kolonkarzinoms; die Unterschiede erreichen beim Vergleich der drei Gruppen der IC_{50} -Werte statistische Signifikanz ($p < 0,005$).

3.1.5 Zytotoxizitätsvergleich der drei Extrakte mittels Zellzahlbestimmung durch die Trypanblau-Methode

Die Zahl nekrotischer Zellen wurde analog zur Lebendzellzahl ermittelt. Das Diagramm 3 zeigt die Effekte aller drei Extrakte auf das maligne Melanom, MelHO. Die Zellzahl ist jeweils auf der Ordinate, die Konzentration der Extrakte auf der Abszisse aufgetragen. Bei niedrigen Konzentrationen aller drei Extrakte lag der Anteil der nekrotischen Zellen konstant bei etwa 5-15% aller Zellen. Wie in dem Experiment mit dem ursprünglichen Wasserextrakt nahm auch hier die Zahl der nekrotischen Zellen mit zunehmender Konzentration der Extrakte absolut ab, und stieg bei höheren Konzentrationen, mit Ausnahme des wässrigen Extraktes, wieder an Diagramm 3.

Dieser Effekt trat beim methanolischen Extrakt ab einer Konzentration von 0,25 mg/ml, beim DCM-Extrakt ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml deutlich hervor. Als Folge erhöhte sich der Anteil der nekrotischen Zellen an der Gesamtzahl der Zellen auf Werte bis zu 29%. Prozentual, bezogen auf die Anzahl der vitalen Zellen in der jeweiligen Probe war dieser Effekt sowohl im Falle des Methanolextraktes mit 28,6 ± 16,6% als auch im Falle des DCM-Extraktes mit 20,6 ± 15,8% im Mittel für die höchste Konzent-

ration, verglichen mit dem Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzahl von $4,7 \pm 3\%$ respektive $6,6 \pm 4,3\%$ im Mittel für die niedrigste Konzentration mit einem p von jeweils $p < 0,005$ statistisch signifikant. Bei den Kolonkarzinomzellen, Caco-2, lagen die Verhältnisse ähnlich.

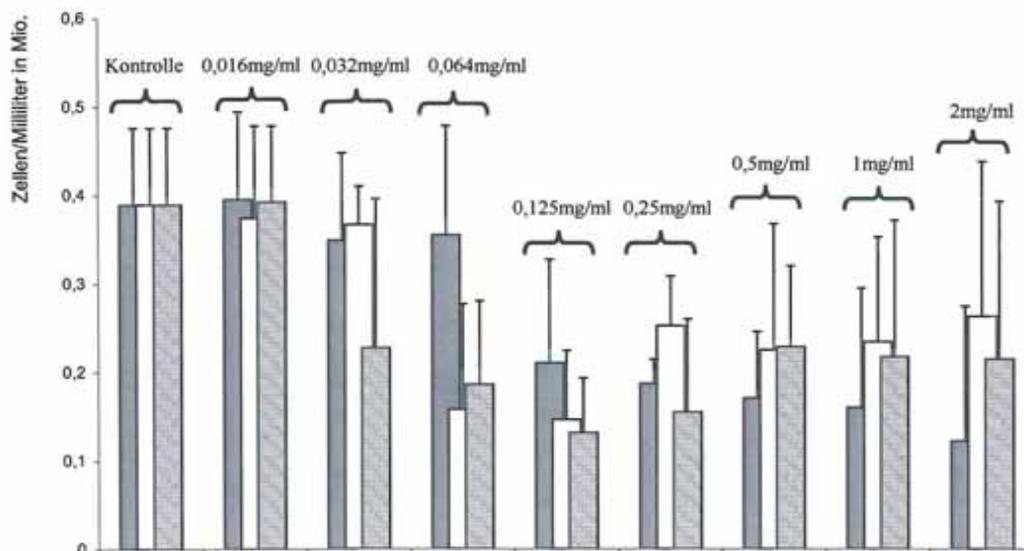


Diagramm 3:

Ergebnisse der Zählung mit verschiedenen Konzentrationen von wässrigen (gestrichelte Säulen), methanolischen (weiße Säulen) und DCM (unterbrochen gestrichelte Säulen) behandelter und mit Trypanblau gefärbter Zellen der Linie MelHO. **Darstellung der nekrotischen Zellen.** Die absolute Anzahl der nekrotischen Zellen nimmt insgesamt bei höheren Konzentrationen ab, jedoch weisen höhere Konzentrationen der methanolischen und DCM-Extrakte ansteigende Toxizität auf ($n = 9$).

Damit war nun deutlich, dass die wirksameren DCM- und Methanolextrakte in höheren als zur antiproliferativen Wirkung notwendigen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung aufwiesen. Der beschriebene Rückgang der absoluten Zahl nekrotischer Zellen mit zunehmender Konzentration der Extrakte wurde auf den Rückgang der absoluten Zellzahl zurückgeführt: Die „Mortalitätsrate“ blieb dabei konstant. Durch die relativ und auch absolut wieder ansteigende „Mortalitätsrate“, die durch Gabe höchster Konzentrationen der mit organischen Lösemitteln, ansatzweise auch mit Wasser gewonnenen Extrakte verursacht wurde, spiegeln sich zytotoxische Eigenschaften der Extrakte wieder.

3.1.6 Einfluss von DCM-, Methanol-, und Wasserextrakten auf die Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA der Tumorzelllinien

An beiden Zelllinien wurde der Einfluss der drei Extrakte auf das [³H]-Thymidininkorporationsverhalten untersucht. Im Gegensatz zu den schon beschriebenen Versuchen wurden aufgrund der hohen Sensitivität der Methode mit 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml geringere Dosierungen der Extrakte verwendet. Das Diagramm 4 zeigt die dosisabhängige Wirkung der drei Extrakte.

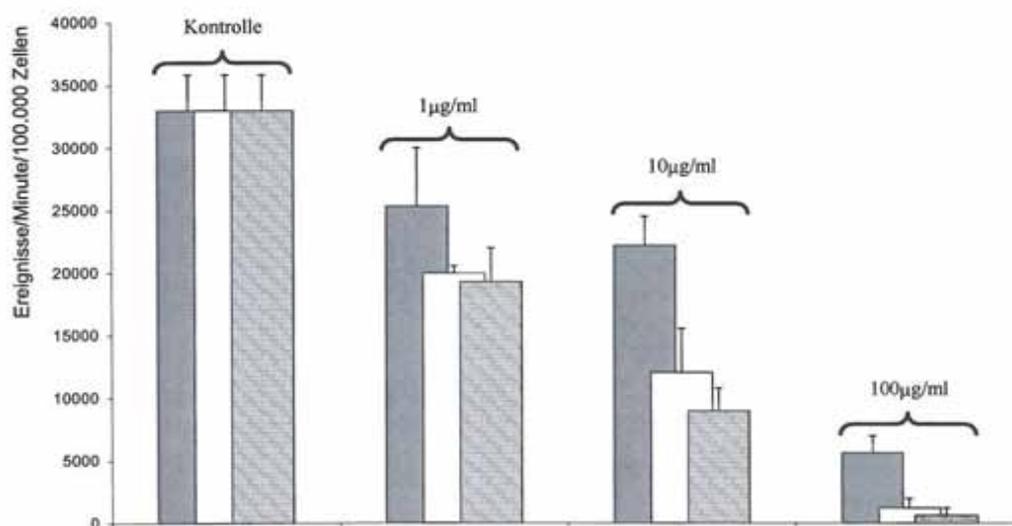


Diagramm 4:

[³H]-Thymidineinbau an Zellen der Linie MelHO, behandelt mit verschiedenen Konzentrationen von wässrigen (gestrichelte Säulen), methanolischen (weiße Säulen) und DCM- (unterbrochen gestrichelte Säulen) Extrakten. Rechts neben der Kontrolle sind die Ergebnisse für die Konzentrationen 1 µg, 10 µg und 100 µg Extrakt pro Milliliter aufgetragen. Deutliche Wirkungen der Extrakte schon bei Konzentrationen von 1 µg/ml (n = 12).

Auf der Abszisse sind jeweils die applizierten Extraktkonzentrationen in mg/ml angegeben, auf der Ordinate der [³H]-Thymidineinbau in Ereignissen pro Minute pro 100 000 eingesetzter Zellen. Die IC₅₀-Werte betragen im Falle der Zelllinie des malignen Melanoms für den Wasserextrakt 44,9 ± 7,2 µg/ml, für den Methanolextrakt 6,8 ± 1,5 µg/ml und für den DCM-Extrakt 4,0 ± 1,2 µg/ml; im Falle der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 betragen sie für den Wasserextrakt 48,3 ± 11,3 µg/ml, für den Methanolextrakt 11,1 ± 3,6 µg/ml und für den DCM-Extrakt 8,9 ± 2,4 µg/ml. Der wirksamste

Extrakt war somit der DCM-Extrakt, der wenig wirksamer war als der Methanolextrakt. Beide jedoch waren erheblich wirksamer als der wässrige Extrakt.

Im Falle des malignen Melanoms unterschieden sich die Wirkstärken des methanolischen und des DCM-Extraktes bei der Konzentration von 10 µg/ml statistisch mit einem $p > 0,05$ nicht signifikant, jedoch war sowohl die Wirkstärke des DCM-Extraktes, als auch die des Methanolextraktes jeweils mit einem $p < 0,05$ verglichen mit der Wirkstärke des Wasserextraktes statistisch signifikant größer. Die Ergebnisse bei der Zelllinie des Kolonkarzinoms, Caco-2, waren ähnlich.

3.1.7 Einfluss von DCM-, Methanol-, und Wasserextrakten auf die Inkorporation von Bromodesoxyuridin in die DNA der Tumorzelllinien

An beiden Zelllinien wurde, analog zu dem [³H]-Thymidin-Einbau, der Einfluss der drei Extrakte auf das BrdU-Inkorporationsverhalten untersucht. Das Diagramm 5 zeigt die dosisabhängige Wirkung der drei Extrakte. Auf der Ordinate ist der BrdU-Einbau als Funktion der Absorption des Lichtes bei 405 nm über der Abszisse aufgetragen, auf der rechts neben der Kontrolle die drei Konzentrationen angegeben sind. Die IC₅₀-Werte betragen im Falle der Zelllinie des malignen Melanoms für den Wasserextrakt $96,4 \pm 18,2$ µg/ml, für den Methanolextrakt $37 \pm 15,3$ µg/ml und für den DCM-Extrakt $35,9 \pm 12,2$ µg/ml. Im Falle des Kolonkarzinoms Caco-2 betragen die Werte für den Wasserextrakt $135,5 \pm 27,8$ µg/ml, für den Methanolextrakt $50,1 \pm 17,1$ µg/ml und für den DCM-Extrakt $44,2 \pm 10,3$ µg/ml. Auch in diesen Versuchen verhielt sich der DCM-Extrakt als der wirksamste Extrakt, der sich als etwas effektiver als der Methanolextrakt zeigte; beide jedoch die Wirkstärke des wässrigen Extraktes erheblich übertrafen. Die Ergebnisse der statistischen Tests zum Vergleich der Wirkstärken der Extrakte bei den Extraktkonzentrationen von 100 µg/ml entsprachen denen der Tests aus dem Tritiumthymidin-Einbauexperiment. Die Wirkstärken des Dichlormethan- und des Methanolextraktes unterschieden sich mit einem $p > 0,05$ nicht, übertrafen jedoch die des Wasserextraktes jeweils statistisch signifikant ($p < 0,05$).

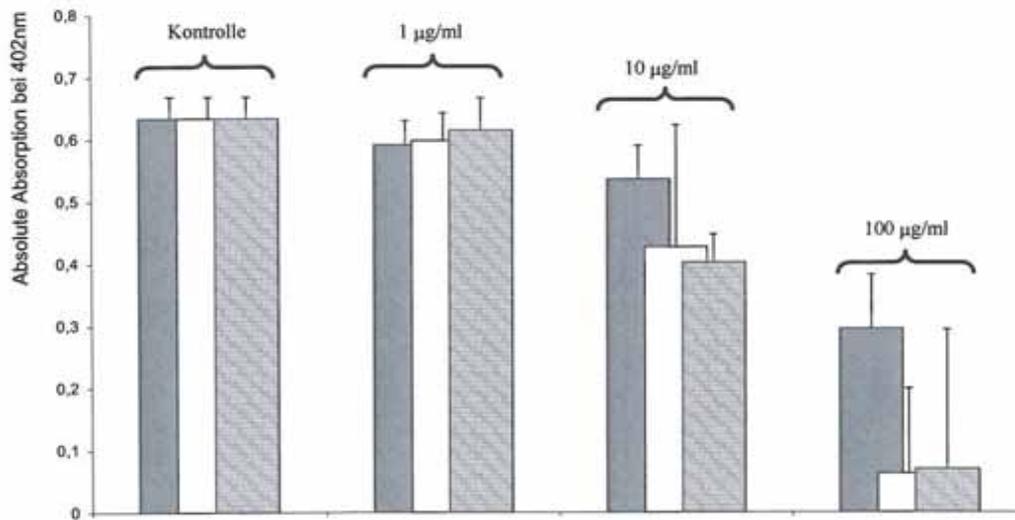


Diagramm 5:

Bromodesoxyuridineinbaustudie an Zellen der Linie MelHO, behandelt mit verschiedenen Konzentrationen von wässrigen (gestrichelte Säulen), methanolischen (weiße Säulen) und DCM- (unterbrochen gestrichelte Säulen) Extrakten. Rechts neben der Kontrolle sind die Ergebnisse für die Konzentrationen 1 µg, 10 µg und 100 µg Extrakt pro Milliliter aufgetragen. Im Vergleich zum Tritiumthymidinexperiment eine um den Faktor von etwa 10-20 geringere Sensitivität (n = 12)

3.1.8 Toxizitätsvergleich der drei Extrakte anhand des LDH-Freisetzungstests

Zur Beurteilung der zytotoxischen Eigenschaften der drei Extrakte wurde die Laktatdehydrogenasefreisetzung an beiden Zelllinien untersucht. Diagramm 6 zeigt die dosisabhängigen Effekte aller drei Extrakte auf die Linie MelHO. Die Freisetzung von LDH, ausgedrückt als relative Absorption des Lichtes, bezogen auf eine Kontrolle mit Tween 20 in Prozent nach zwanzigstündiger Exposition mit den Extrakten ist auf der Ordinate über den Konzentrationen der Extrakte auf der Abszisse aufgetragen.

Im Falle der Zelllinie MelHO war die Gabe niedriger Extraktkonzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml mit keinerlei Freisetzung von LDH verbunden. Lediglich für die höchsten Konzentrationen der mit organischen Phasen gewonnenen Extrakte von 100 µg/ml konnte eine Zytotoxizität beobachtet werden, die mit einer auf Tween bezogenen Freisetzung von $47,8 \pm 6,3\%$ beim methanolischen Extrakt höher war als die des DCM-Extraktes mit $27,1 \pm 21,1\%$. Diese Unterschiede waren mit einem p von jeweils $p < 0,05$ gegenüber den Ergebnissen der Kontrollen statistisch signifikant.

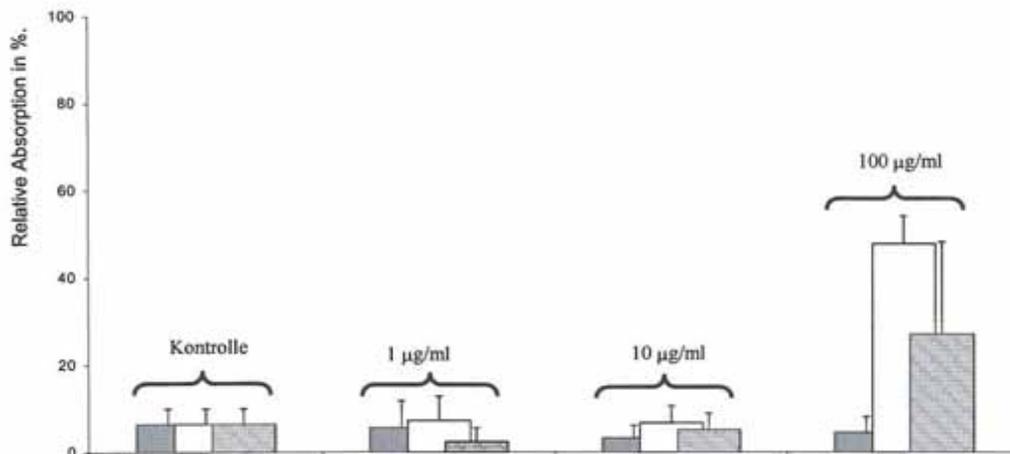


Diagramm 6:

LDH-Freisetzungstest an Zellen der Linie MelHO, behandelt mit verschiedenen Konzentrationen von wässrigen (gestrichelte Säulen), methanolischen (weiße Säulen) und DCM- (unterbrochen gestrichelte Säulen) Extrakten. Rechts neben der Kontrolle sind die Ergebnisse für die Konzentrationen 1 µg, 10 µg und 100 µg Extrakt pro Milliliter aufgetragen. Deutlich erkennbare Toxizität hoher Konzentrationen der mit Hilfe organischer Phasen gewonnenen Extrakte (n = 12).

Auch bei der Zelllinie Caco-2 konnte nur nach Applikation der höchsten Konzentrationen des DCM- und des Methanolextraktes von 100 µg/ml eine Zytotoxizität beobachtet werden, die ebenfalls mit einer auf Tween bezogenen Freisetzung von $42,3 \pm 16\%$ beim methanolischen Extrakt stärker ausgeprägt war als beim DCM-Extrakt mit $30,4 \pm 24,8\%$. Auch diese Unterschiede waren verglichen mit den Kontrollen statistisch signifikant.

3.1.9 Vergleich der antiproliferativen und zytotoxischen Aktivität des DCM-Extraktes mit der des bekannten Walnussinhaltsstoffes Juglon anhand der Zellzahlbestimmung nach Färbung mit Trypanblau.

Anhand der Zellzahlbestimmung nach Färbung mit Trypanblau wurden die proliferationshemmenden und zytotoxischen Eigenschaften des DCM-Extraktes, der der wirksamste Extrakt war, mit denen des bekannten, die allelopathischen Eigenschaften der Walnuss vermittelnden Juglons verglichen. Es fand sich bei der Konzentration von 20 µg/ml des Extraktes eine starke Hemmung der Proliferation sowohl von Melanom-, als auch von Kolonkarzinomzellen. So wurden im Vergleich zu den Kontrolleexperimenten nach 20-stündiger Exposition von Zellen der Linie MelHO mit der angegebenen

Konzentration des DCM-Extraktes nur $13,5 \pm 2,9\%$ der Zellen gezählt. Von diesen Zellen lag der Anteil vitaler Zellen bei $77,5 \pm 21,2\%$, der Anteil der nekrotischen Zellen bei $22,5 \pm 24,6\%$. Nach zwanzigstündiger Exposition mit $20 \mu\text{g/ml}$ Juglon betrug die Zellzahl insgesamt, vergleichbar mit dem Effekt des DCM-Extraktes, $13,2 \pm 9,8\%$ der Kontrolle, der Anteil nekrotischer Zellen lag aber bei $91,2 \pm 65,5\%$, und der der vitalen bei $8,8 \pm 26,2\%$. Den Vergleich der Wirkungen von jeweils $20 \mu\text{g/ml}$ DCM-Extrakt und Juglon zeigt das Diagramm 7 am Beispiel der Zelllinie MelHO:

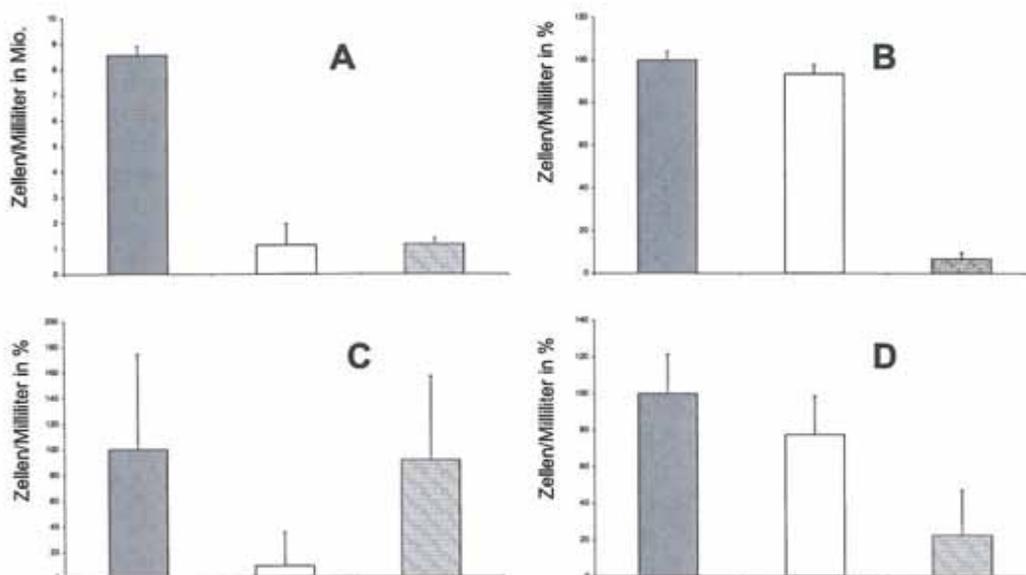


Diagramm 7:

Ergebnisse der Zellzahlbestimmung nach Färbung mit Trypanblau. Teil A: Anzahl der MelHO Zellen: Gestrichelte Säulen: Kontrolle, weiße Säulen: Zellen mit $20 \mu\text{g/ml}$ Juglon versetzt und unterbrochen gestrichelte Säulen: mit $20 \mu\text{g/ml}$ DCM-Extrakt versetzt. Teil B-D spiegelt den relativer Anteil der vitalen Zellen (weißer Balken) und der nekrotischen Zellen (unterbrochen gestrichelter Balken) an der Gesamtzahl der Zellen (gestrichelter Balken) wieder: Kontrolle = Teil B, Juglon = Teil C und DCM Extrakt = Teil D.

Teil A des Diagramms zeigt rechts neben der Kontrolle, dargestellt durch einen gestrichelten Balken, die Anzahl der Zellen nach Gabe von $20 \mu\text{g/ml}$ Juglon, dargestellt durch einen weißen Balken, und von $20 \mu\text{g/ml}$ DCM-Extrakt, dargestellt durch einen unterbrochen gestrichelten Balken. Teil B zeigt die relativen Anteile der vitalen (weißer Balken) und der nekrotischen (unterbrochen gestrichelter Balken) Zellen an den Zellen der Kontrolle, Teil C die relativen Anteile der vitalen (weißer Balken) und der nekrotischen (unterbrochen gestrichelter Balken) Zellen an den Zellen der mit Juglon behandelten

Kulturen, und Teil D die relativen Anteile der vitalen (weißer Balken) und der nekrotischen (unterbrochen gestrichelter Balken) Zellen an den Zellen der mit DCM-Extrakt behandelten Kulturen.

Aus dem Diagramm wird deutlich, dass der Inhaltsstoff der Walnuss Juglon zwar die Tumorphiliferation ebenfalls zu stoppen vermag, jedoch lediglich aufgrund seiner toxischen Effekte. Die gleiche Hemmung der Proliferation kann durch die Gabe eines DCM-Extraktes erreicht werden, jedoch sind die meisten der vorhandenen Zellen nach der Behandlung damit noch vital. Der statistische Vergleich der prozentualen Anteile der lebenden Zellen an der Gesamtzahl der Zellen nach Behandlung mit dem Extrakt oder der Substanz ergab mit einem p von $p < 0,05$ einen signifikanten Unterschied.

Noch augenfälliger ist dieser Unterschied in der Abb. 3 die das mikroskopische Bild von Zählkammern aus A einem Kontrollexperiment, B einem Experiment, in dem 50 $\mu\text{g/ml}$ Juglon und C einem Experiment, in dem 50 $\mu\text{g/ml}$ des DCM-Extraktes gegeben worden waren, zeigt.

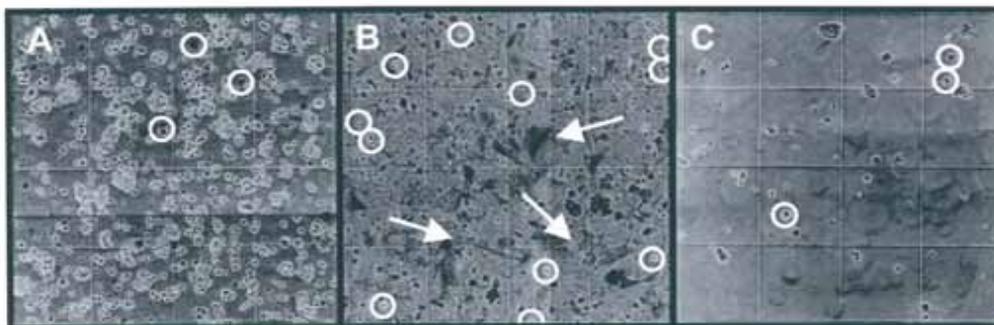


Abb. 3:

Illustration der Wirkung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Juglon (B) und von 50 $\mu\text{g/ml}$ DCM-Extrakt (C) im Vergleich zur Kontrolle (A) anhand der Abbildung dreier Zählkammern aus einem Zellzählungsexperiment. In A (Kontrolle) Markierung dreier nekrotischer Zellen, in B (Juglon) Markierung der 12 verbliebenen, noch vitalen, unter massenhaft nekrotischer Zellen, in C (DCM-Extrakt) Markierung der drei nekrotischen unter 34 vitalen Zellen. Extreme Zytotoxizität des Juglons. Durch das Juglon gebildete Polymere sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In A (Kontrolle) wurden beispielhaft drei nekrotische Zellen markiert, in B (Juglon) wurden die 11 unter massenhaft nekrotischen Zellen noch verbliebenen vitalen Zellen, und in C (DCM-Extrakt) wurden die drei nekrotischen unter 34 vitalen Zellen markiert. Zwar handelt es sich bei den Bildern natürlich um günstig abzubildende Beispiele - die extreme Zytotoxizität des Juglons tritt durch diese Auswahl jedoch sehr deutlich hervor. Durch das Juglon gebildete Polymere sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.1.10 Methodische Konsequenzen der bisher dargestellten Ergebnisse für die weiteren Vorversuche und die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes *JR2*

Bisher wurde gezeigt, dass die verschiedenen Extrakte proliferationshemmend aktiv, jedoch nicht in gleicher Stärke zytotoxisch sind. Der wirksamste Extrakt ist der DCM-Extrakt, der schwächste Extrakt der wässrige. In der Annahme, dass mit Methanol die gleichen Inhaltsstoffe extrahiert wurden wie durch Wasser, wurde für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung von *JR2* der wässrige Extrakt weggelassen.

Da im Hinblick auf das Ziel der Arbeit, nämlich die Aufreinigung wachstumshemmender Substanzen, an dieser Stelle hinreichend gezeigt worden ist, dass die proliferationshemmende Eigenschaft der Extrakte nicht auf bloßer Toxizität beruht, sind die Toxizitätstests für die weitere Isolierung nicht mehr angewendet worden. Der Einwand, die proliferationshemmende Aktivität der Extrakte beruhe auf der Aktivität von Juglon, konnte anhand des Vergleiches der Wirkung eines Extraktes mit derjenigen des Juglons eindrucksvoll widerlegt werden.

Auf die Sterilisation von Extrakt- bzw. Fraktionsproben wurde verzichtet; dafür wurde die Expositionszeit angepasst. Möglich war dies aufgrund der hohen Wirksamkeit der untersuchten Extrakte und Fraktionen.

Als Methode für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung wurde die BrdU-Einbaumethode gewählt. Sie bot im Vergleich zu der als höchst verlässlich angesehenen Tritiumthymidin-Einbaumethode die Vorteile des geringeren Aufwandes zur Erreichung reliabler Resultate, mit dem einzigen Nachteil einer relativ geringeren Sensitivität.

3.2 Fraktionierung *JR1WMD*

3.2.1 Fraktionierungsebene 1

3.2.1.1 Separierung an mikrokristalliner Cellulose durch VLC

Für die erste Auftrennung wurden zunächst die wässrigen, methanolischen und DCM-Extrakte vereinigt. Dieser Gesamtextrakt erhielt den Namen *JR1WMD*. *JR* für *Juglans regia*, 1 dafür, dass es sich um den ersten Extrakt aus dem Jahre 1997 handelte und *WMD* für die drei Extraktionsmittel Wasser, Methanol und DCM, deren Trockenrück-

stände vereinigt wurden. Die Trennung wurde auf Vakuumsäulen durchgeführt, gefüllt mit mikrokristalliner Cellulose.

Die 558,6 g des Extraktes wurden mit 175 g Cellulose verrieben und in diesem Vorversuch, im Gegensatz zu den Grundsätzen der später konsequent verfolgten Trennstrategie, auf zwei Parallelsäulen aufgetragen. Beide Säulen hatten einen Innendurchmesser von jeweils 50 mm, und eine Länge von 200 mm bzw. 300 mm. Auf die kleinere Säule entfielen 2/5 der Probenmasse, auf die größere 3/5. Die Elution erfolgte über Polaritätsgradienten, ausgeführt jeweils als Stufengradienten, von Hexan über Ethylacetat und Methanol hin zu Wasser. Beide Säulen wurden parallel nach demselben Schema eluiert, wodurch 37 Fraktionen gewonnen werden konnten. Die DC-Untersuchung der Fraktionen beider Säulen ergab, dass die Trennungen vom zeitlichen Ablauf her weitgehend miteinander übereinstimmten. Als Fließmittelsysteme kamen im hier gezeigten Fall bei den unpolaren Anfangsfraktionen, die mit Hexan oder Ethylacetat eluiert worden waren, ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 80:19:1 v:v:v, und für die Auftrennung der später mit Methanol oder Wasser eluierten Fraktionen ein Gemisch aus Ethylacetat, Methanol und Wasser im Verhältnis von 72:20:8 v:v:v zum Einsatz.

Anhand der Erfahrungen aus diesem Experiment wurde eine neue VLC-Säule für das Hauptexperiment, die Trennung des Extraktes aus dem Jahre 1998 angefertigt, die es erlaubte, eine Probe eines so hohen Gewichtes in einem Trenngang zu separieren. Das vorliegende Experiment zeigte, dass die Säulen zwar überladen, aber nicht überlastet gewesen sind: Es kamen trotz eines Verhältnisses von Extrakt zu Sorbens von 1 zu 2,1 (*JR1WMD*) und 1 zu 2,4 (*JR2MD*) scharfe Trennungen zustande.

Vor der Aktivitätstestung mit Hilfe des BrdU-Einbautests wurden die Fraktionen nach DC-Gesichtspunkten zu sechs Sammelfraktionen zusammengefasst: Es waren die Fraktionen 1-4, 5-10, 11-19, 20-26, 27-32 und 33-37. Die Aktivität fand sich in der Sammelfraktion 20-26 wieder. Dieses Material wurde weiterverarbeitet und aufgetrennt.

3.2.2 Fraktionierungsebene 2

3.2.2.1 Separierung an Kieselgel mittels VLC

Die im ersten Fraktionierungsschritt erhaltene, wirksame 155,6 g schwere Sammelfraktion 20-26 wurde mit 50 g Kieselgel einer Korngröße von 32-63 µm und einer Poren-

größe von 60 Å verrieben. Zur Chromatographie wurde eine Säule mit einem Innendurchmesser von 60 mm und einer Höhe von 300 mm verwendet, die 260 g Kieselgel als Sorbens enthielt. Die Elution erfolgte wieder über einen Polaritätsgradienten, ausgeführt als Stufengradient mit je 500 ml als Volumen; dieses Mal von Hexan über Ethylacetat, Ethanol und Methanol hin zu Wasser. Es wurden 39 Fraktionen gewonnen und zu Sammelfraktionen zusammengefasst. Anhand der Erfahrungen aus diesem Experiment konnte neben anderen Parametern nun die maximal mögliche Packungshöhe, der mindestens notwendige Säulendurchmesser, das minimale Eluenvolumen für die Bearbeitung des Hauptexperimentes, der Fraktionierung von *JR2*, abgeschätzt werden.

Auf eine Testung der Aktivität wurde im Hinblick auf die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes *JR2* verzichtet. Rein arbiträr wurde die Sammelfraktion 13-19 aus den 39 erhaltenen Fraktionen zur Weiterverarbeitung ausgewählt, um die HSCCC und die MPLC als Methoden zu etablieren. Um die Anzahl und das Durchschnittsgewicht der Substanzen im Extrakt und damit die zur Aufarbeitung benötigte Drogenmenge abschätzen zu können, musste darüber hinaus eine Fraktionierung in die Tiefe stattfinden. Dies war notwendig, um der Gefahr zu entgehen, von einer Substanz später zu wenig Masse für eine Strukturaufklärung zur Verfügung zu haben.

3.2.3 Fraktionierungsebene 3

3.2.3.1 Hochgeschwindigkeitsflüssiggegenstromchromatographie

Die arbiträr ausgewählte Sammelfraktion 13-19 aus der vorhergegangenen Vakuumchromatographie wurde per HSCCC weiterverarbeitet. Es mussten Erfahrungswerte gesammelt werden, unter welchen Bedingungen die Säule überladen oder überlastet werden konnte, um derartige Umstände im späteren Hauptexperiment zu vermeiden. Darüber hinaus wurden Fließmittelsysteme entwickelt, und ideale Rotationsgeschwindigkeiten sowie Flussraten austariert. Im vorliegenden Fall wurde zur Trennung von 1400 mg Material ein Fließmittelgemisch von DCM-Methanol-Isopropanol-Wasser im Verhältnis von 9–12–1–8 gewählt. Die Probe wurde in 6 ml Unter- und 1 ml Oberphase gelöst und dann unter Drehung im Uhrzeigersinn bei 830 U/min mit einer Pumpgeschwindigkeit der mobilen Oberphase von 1 ml/min getrennt. Die Fraktionierung fand im fünfminütigen Wechsel statt. Es wurden 230 Fraktionen gewonnen und anhand der DC-Kontrolle in 28 Sammelfraktionen unterteilt. Sechs dieser Sammelfraktionen wur-

den durch MPLC weiter aufgetrennt. Dabei handelte es sich um die Sammelfraktionen bestehend aus der Fraktion 4, den Fraktionen 11-13, 18-20, 23-25, 30-32 und 33-40.

3.2.4 Fraktionierungsebene 4

3.2.4.1 MPLC der Fraktion 4 aus der Fraktionierungsebene 3

In dieser ersten Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) wurde die Fraktion 4, die aus der Fraktionierungsebene 3 stammte, weiter aufgetrennt. Die mit 5,5 ml/min hohe Fließgeschwindigkeit war durch den Einsatz einer relativ kurzen Säule möglich, die eine Höhe von 26 cm hatte, und einen Innendurchmesser von 9 mm aufwies. Sie war mit 24 g RP-18 Material gefüllt. Mit einem Gradienten von Wasser zu Methanol, fraktionierte in zweiminütigen Schritten, wurde mit den Fraktionen 25-28 eine rötlich erscheinende Substanz eluiert. In deuteriertem Chloroform wurden damit ^1H - und ^{13}C -Experimente durchgeführt, die noch durch gCOSY, gHSQC und gQMBC-Experimente bei 600 MHz ergänzt wurden. Auf diese Weise konnten die 24,8 mg dieser Substanz als Procyanidin B 3 identifiziert werden.

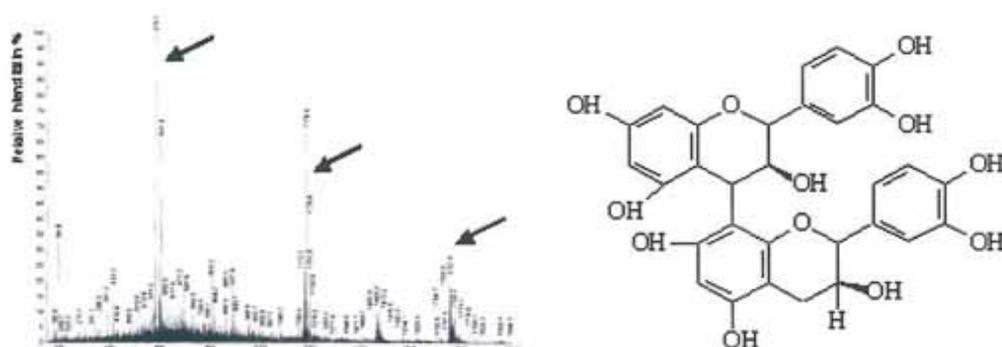


Abb. 4:

Strukturformel des isolierten *Procyanidin B3*, wie sie aus den NMR-Daten (nicht gezeigt) entwickelt wurde, neben dem Massenspektrogramm der Substanz. Auf der Ordinate ist die relative Intensität des Ionenstromes in Prozent, bezogen auf das Signal der Substanz (Basispeak) über der Masse (m) pro Radikal-Kation (z) für Werte zwischen 200 m/z und 2000 m/z auf der x-Achse aufgetragen. Die Pfeile markieren die charakteristischen Peaks für das Procyanidin-Monomer, das Dimer und das Trimer.

Abb. 4 zeigt ein Massenspektrum, aufgenommen zwischen 150 m/z und 2000 m/z , mit einem charakteristischen Molpeak bei 578 m/z , neben hohen Molpeaks für ein ebenfalls

vorhandenes Dimer, und ein Trimer dieser Substanz. Die ermittelte Struktur der Substanz ist ebenfalls der Abbildung zu entnehmen.

3.2.4.2 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 11-13

Die Sammelfraktion 11-13 aus der Fraktionierungsebene 3 wurde per MPLC unter ähnlichen wie den eben beschriebenen Bedingungen weiter aufgetrennt, lediglich die Flussgeschwindigkeit war mit 5 ml/min niedriger. In diesem Falle konnte als Hauptbestandteil 172 mg einer bräunlichroten Substanz isoliert werden, die sich als trans-Catechin identifizieren ließ. Hierzu wurden ebenfalls in deuteriertem Chloroform ^1H - und ^{13}C -Experimente, neben massenspektrometrischen Untersuchungen durchgeführt. Da die Substanz zwar keinen bisher bekannten Inhaltsstoff von *Juglans regia* darstellt, jedoch ubiquitär im Pflanzenreich vorkommt, und eher ihr Fehlen im Walnussbaum als Besonderheit anzunehmen wäre, wird nicht zuletzt mit Augenmerk auf die Fragestellung der Arbeit auf die Darstellung des Datenmaterials verzichtet.

3.2.4.3 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 18-20

Die Sammelfraktion 18-20 aus der Fraktionierungsebene 3 wurde mittels MPLC unter den obigen Bedingungen weiter aufgetrennt. Mittels ^1H - und ^{13}C -Experimenten sowie Massenspektrometrie wurde eine in den Fraktionen 34-38 befindliche Substanz mit einer ockergelben Farbe und einem Gewicht von 111 mg als ein Taxifolinarabinofuranosid identifiziert.

3.2.4.4 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Sammelfraktion 30-32

Die Sammelfraktion 30-32 aus der Fraktionierungsebene 3 wurde ebenfalls unter denselben Bedingungen weiter aufgetrennt. In den Unterfraktionen 44-47 befanden sich 12,9mg einer gelblich erscheinenden Substanz. In deuteriertem Chloroform wurden auch in diesem Falle ^1H - und ^{13}C -Experimente durchgeführt, die durch die Massenspektrometrie ergänzt wurden. Die Substanz konnte eindeutig als Quercetin benannt werden. Das charakteristische Massenspektrum mit m/z von 150 bis 2 000, gezeigt in Abb. 5, weist auch hier, wie im Falle des Procyanidin B 3, eindrucksvolle Peaks für das Dimere und das Trimere der Substanz auf.

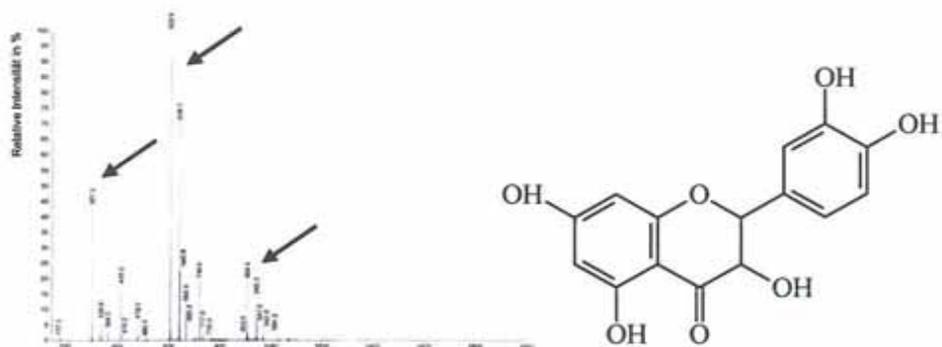


Abb. 5:

Strukturformel des isolierten *Quercetin*, wie sie aus den NMR-Daten (nicht gezeigt) entwickelt wurde, neben dem Massenspektrogramm der Substanz. Auf der Ordinate ist die relative Intensität des Ionenstromes in Prozent, bezogen auf das Signal der Substanz (Basispeak) über der Masse (m) pro Radikalkation (z) für Werte zwischen 200 m/z und 2000 m/z auf der x-Achse aufgetragen. Die Pfeile markieren die charakteristischen Peaks für das Quercetin-Monomer, das Dimer und das Trimer.

3.2.4.5 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie der Fraktion 33-40

Wiederum unter denselben Bedingungen, wurde in einer weiteren MPLC aus den Unterfraktionen 51-54 durch Eindampfen 2,2 mg einer orangefelben Substanz isoliert und als Aromadendrin identifiziert. Hierfür wurden neben der Massenspektrometrie eindimensionale ^1H und ^{13}C -Experimente durchgeführt.

3.2.5 Fraktionierungsebene 5

3.2.5.1 MPLC der Fraktion 41-50 aus der vorhergegangenen MPLC

In einer weiteren MPLC auf einer weiteren Ebene wurden aus den Fraktionen 41-50 der vorhergegangenen MPLC 4,1 mg einer violetten Substanz isoliert. Es wurde im Sinne der Fragestellung kein Versuch unternommen, diese Substanz weiter aufzuklären.

3.2.6 Abschätzung der Komplexität des Extraktes und der notwendigen Drogenmenge des Extraktes JR2

Die Abschätzung der Komplexität des Extraktes geschah, indem auf jeder Trennebene die Zahl der auf den DC-Kontrollen sichtbaren verschiedenen Substanzareale mit der Anzahl von Substanzen aus „Schwesterfraktionen“, die nicht weiter aufgetrennt wurden, multipliziert wurde, und dann die Ergebnisse für jede Trennebene zusammengezogen

wurden. Den Schwesterfraktionen wurde unterstellt, jeweils genauso viele Substanzen zu enthalten wie die aufgetrennten Fraktionen, deren Substanzzahl bekannt war. Der dadurch entstehende mögliche Fehler, dass eine Substanz vielleicht deswegen nicht detektiert wurde, weil sie in zu niedriger Konzentration vorhanden war, wurde ignoriert.

Konkret betrug die Anzahl der in der MPLC der Ebene 5 detektierten Substanzen sieben. Diese Fraktion hatte sieben Schwesterfraktionen in der Ebene 4, Jeder dieser Schwesterfraktionen wurde eine Anzahl von 7 enthaltenen Substanzen unterstellt. Damit war die Anzahl der enthaltenen Substanzen insgesamt 49.

Die Sammelfraktion 33-40 der Ebene 4 wiederum hatte, wie beschrieben, 27 Schwesterfraktionen, die aus der HSCCC eine Generation höher stammten. Jeder dieser Fraktionen eine Anzahl von 49 enthaltenen Substanzen unterstellt, betrug die Zahl der Substanzen somit geschätzte 1 323.

Die in der HSCCC verarbeitete Sammelfraktion 13-19 der Ebene 3, die aus der Kieselgelchromatographie der Ebene 2 stammte, hatte wiederum 11 Schwesterfraktionen, so dass sich die Anzahl der geschätzten Substanzen auf 14 553 summierte. Die in der Kieselgelchromatographie verarbeitete Fraktion wiederum hatte 5 Schwesterfraktionen, die verworfen worden waren. Somit ergibt sich eine geschätzte Anzahl von 72 765 enthaltenen Substanzen.

Bezogen auf das Extraktgewicht von 559 g ergab sich somit ein durchschnittlich zu erwartendes Substanzgewicht pro theoretisch zu isolierender Substanz von 7,6 mg. Unter der Annahme einer Normalverteilung der tatsächlichen Gewichte um das Gewicht 7,6 mg als Mittelpunkt, und Berücksichtigung der Tatsache, dass schon isolierte Substanzen, wie das Quercetin dieses Durchschnittsgewicht erheblich unterschritten, wurde das eingesetzte Extraktgewicht für *JR2* erhöht. Notwendig war dies, da für die Strukturklärung einer Substanz mindestens 1-2 mg benötigt werden. Auf den bei dieser Maßnahme limitierenden Faktor des Vorhandenseins von Grenzen für Säulendimensionen, die physikalisch nicht überschritten werden können wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

Alle gewonnenen Erfahrungen berücksichtigend, wurden nun im Hauptversuch 832 g Extrakt *JR2* streng aktivitätsgeleitet aufgetrennt.

3.3 Fraktionierung des Extraktes aus dem Jahre 1998, JR2MD

Das Hauptexperiment stellt die aktivitätsgeleitete Fraktionierung der vereinigten Methanol- und DCM-Extrakte aus dem Herbst des Jahres 1998 dar. Es wurde begonnen, nachdem anhand der Vorarbeiten sowohl die Mengen und Skalierungen von Extrakt und Gerätschaften festgelegt als auch die Chromatographiebedingungen und anzuwendenden Tests ausgewählt worden waren.

Obwohl die BrdU-Proliferationstests zum Zwecke der Reliabilitätsprüfung jeweils sowohl an Kolonkarzinom- als auch an Melanomzellen durchgeführt worden sind, werden der Übersichtlichkeit halber nur letztere Versuche gezeigt, da die Ergebnisse in keinem Fall voneinander abwichen.

Um einen guten Überblick zu ermöglichen, sind die einzelnen Trennschritte an mehreren Stellen als Flussdiagramm dargestellt. Diese sind, ausgehend von JR2MD, wie Stammbäume aufgebaut. Im Text sind alle Trennungen einer Trennstufe, wie bei der Beschreibung der Auftrennung von JR1, gemeinsam beschrieben.

Als Überblick über die im Folgenden dargestellten Trennungsstränge dienen die Abbildungen: Abb. 43, Abb. 44, Abb. 45, Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48 (Siehe Anhang, Seite 145 - 150), die die „Abstammungsverhältnisse“ in diesen Strängen auseinander hervorgegangener Fraktionen in Form von Stammbäumen erklären. Bei diesen Strängen, oder angelehnt an taxonomische Ausdrücke, bei diesen „Familien“ handelt es sich um die Familien 1 bis 5. Alle der einzelnen Familie zugehörigen Separationsgänge sind im Text hinter der Beschreibung des Fraktionsnamens an dem Vermerk „Familie“ zu erkennen.

3.3.1 Fraktionierungsebene 1

3.3.1.1 Separierung an mikrokristalliner Cellulose durch VLC

(Alle Familien)

Die durch Wirbelextraktion gewonnenen Methanol- und DCM-Extrakte wurden zunächst vereinigt: Folglich erhielt der Gesamtextrakt die Bezeichnung JR2 für *Juglans regia*, Ernte zwei aus dem Jahre 1998, und MD für die beiden Extraktionsmittel, deren Trockenrückstand vereinigt wurde. Das Gewicht von JR2MD betrug 831,8 g. Analog zum Vorgehen bei der Trennung des Extraktes JR1 wurde er zunächst mit 611,7 g Cel-

lulose in einem Mörser verrieben, und dann durch ein Sieb einer Porengröße von 0,8 mm auf eine Säule mit einem Innendurchmesser von 14 cm und einer Höhe von 38 cm aufgetragen, die zuvor mit 925 g Cellulose befüllt worden war; das Verhältnis von Sorbens zu Extrakt betrug somit 2,4 zu 1. Die Elution erfolgte über einen Polaritätsgradienten, ausgeführt als Stufengradient mit 67 Stufen, von Hexan über Ethylacetat, Ethanol, Methanol hin zu Wasser. Die genauen Volumina der verwendeten Lösemittel gibt die Tabelle 1 wieder.

Tabelle 1: Volumina der für die Elution der Säule gebrauchten Lösemittel Hexan, Ethylacetat, Ethanol, Methanol und Wasser in ml

Fraktion	Hexan	Ethylacetat	Ethanol	Methanol	Wasser
1	3500	0	0	0	0
2	1200	100	0	0	0
3	900	100	0	0	0
4	860	140	0	0	0
5	830	170	0	0	0
6	800	200	0	0	0
7	785	215	0	0	0
8	785	215	0	0	0
9	785	215	0	0	0
10	785	215	0	0	0
11	785	215	0	0	0
12	765	235	0	0	0
13	750	250	0	0	0
14	735	265	0	0	0
15	715	285	0	0	0
16	700	300	0	0	0
17	685	315	0	0	0
18	665	335	0	0	0
19	650	350	0	0	0
20	635	365	0	0	0
21	615	385	0	0	0
22	600	400	0	0	0
23	580	420	0	0	0
24	550	450	0	0	0
25	525	475	0	0	0
26	475	525	0	0	0
27	425	575	0	0	0
28	325	675	0	0	0
29	225	775	0	0	0
30	125	875	0	0	0
31	25	975	0	0	0
32	0	1000	0	0	0
33	0	950	50	0	0
34	0	900	100	0	0
35	0	850	150	0	0
36	0	800	200	0	0
37	0	780	220	0	0
38	0	760	240	0	0
39	0	740	260	0	0
40	0	720	280	0	0
41	0	700	300	0	0
42	0	670	330	0	0
43	0	620	330	0	0
44	0	520	380	0	0
45	0	300	480	0	0
46	0	0	700	0	0
47	0	0	1000	0	0
48	0	0	950	50	0
49	0	0	900	100	0
50	0	0	850	150	0
51	0	0	750	250	0
52	0	0	500	500	0
53	0	0	250	750	0
54	0	0	0	1000	0
55	0	0	0	900	100
56	0	0	0	800	200
57	0	0	0	700	300
58	0	0	0	600	400
59	0	0	0	500	500
60	0	0	0	400	600
61	0	0	0	300	700
62	0	0	0	200	800
63	0	0	0	100	900
64	0	0	0	0	1000
65	0	0	0	0	1000
66	0	0	0	0	1000
67	0	0	0	0	1000

Die DC-Untersuchungen der 67 gewonnenen Fraktionen sind in der Abb. 6 dargestellt:

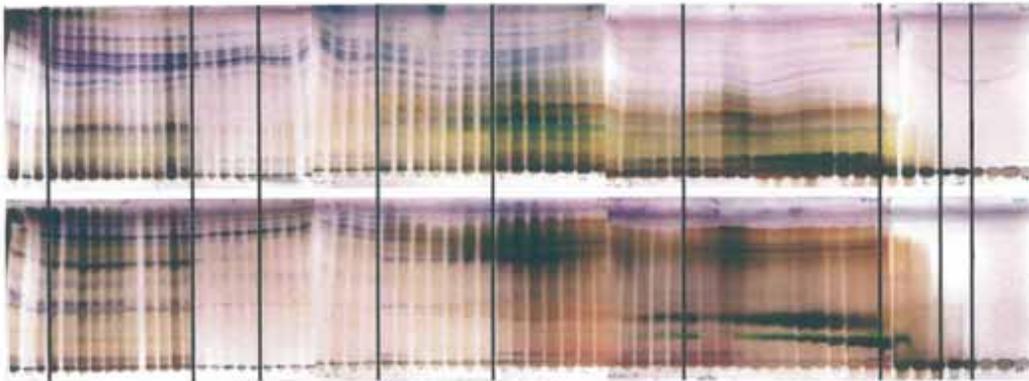


Abb. 6:

DC-Kontrolle der Fraktionen aus der VLC von *JR2MD*. Die zehn Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

Im oberen Teil der Abbildung finden sich aneinandergereiht die mit dem Fließmittel zur Auftrennung unpolarer Substanzen entwickelten Platten, im unteren Teil die mit dem Fließmittel zur Auftrennung polarer Substanzen entwickelten Platten. Als Fließmittelsysteme kam für eine optimale Trennung der unpolaren Anfangsfraktionen, die mit Hexan oder Ethylacetat eluiert worden waren, wie bei *JR1*, ein Gemisch von Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 80:19:1 v:v:v, und für eine optimale Auftrennung der später mit Methanol oder Wasser eluierten Fraktionen ein Gemisch aus Ethylacetat, Methanol und Wasser im Verhältnis von 72:20:8 v:v:v zum Einsatz. Am unteren Rand der einzelnen DC-Platten wurde, links auf der ersten Platte mit der ersten Fraktion beginnend, je eine 60 µl Probe der 67 Fraktionen aufgetragen, und dann eindimensional nach oben hin entwickelt. Somit repräsentiert eine Bahn jeweils eine Fraktion aus der VLC, ein weiteres Mal aufgetrennt. Die senkrechten Striche in der Abbildung zeigen die Grenzen der 10 Sammelfraktionen, den Gruppen, zu denen die 67 Fraktionen aufgrund DC-Ähnlichkeiten zusammengestellt wurden: Fraktionen 1-3, 4-14, 15-19, 20-27, 28-34, 35-46, 47-58, 59-61, 62-63 und 64-67. Aus jeder dieser Gruppen wurde eine Probe zur Untersuchung der antiproliferativen Aktivität mittels der BrdU-Einbaumethode genommen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt die Diagramm 8:

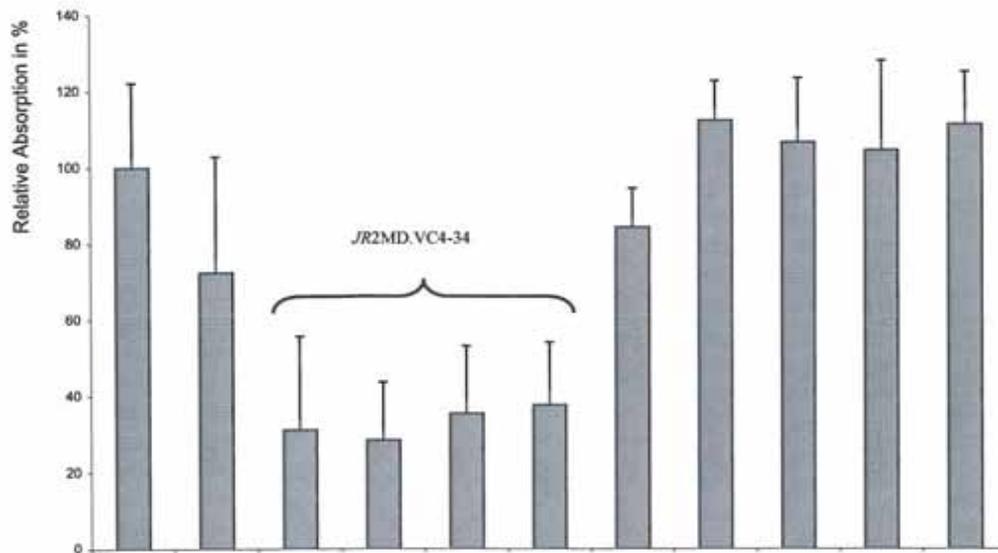


Diagramm 8:

BrdU-Einbaustudie zur Testung der antiproliferativen Aktivität der VLC-Fractionen aus *JR2MD*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen aufgetragen. Die Sammelfractionen 4-34 waren wirksam und wurden weiterverarbeitet.

Die Ordinate zeigt hierbei den Einbau von BrdU in die DNA der Melanomzellen als relative Absorption des Lichtes bei 402 nm während die Abszisse rechts neben der Kontrolle die einzelnen Fraktionen aufzeigt. Die Konzentration der Fraktionen betrug hierbei, -wie bei allen weiteren Proliferationstestungen- je 10 µg/ml. Verglichen mit der Kontrolle, deren Wert auf 100% Wachstum festgesetzt wurde, erreichten die mit den Sammelfractionen 4-14, 15-19, 20-27 und 28-34 behandelten Zellkulturen lediglich etwa ein Drittel bis ein Viertel der Proliferationsgeschwindigkeit. Diese Unterschiede waren mit p-Werten von $p < 0,0001$ ($n = 9$) statistisch jeweils signifikant. Die vier Sammelfractionen wurden zu einer Fraktionsgruppe 4-34 wiedervereignet, die zur Weiterverarbeitung vorbereitet wurde.

Der hier sehr eingehend beschriebene Ablauf von der Vorbereitung der Probe bis zur Entscheidung, welche Fraktionen zur Weiterverarbeitung verwendet wurden, gilt im Prinzip für jede Fraktionierung auf jeder Trennstufe.

3.3.2 Fraktionierungsebene 2

3.3.2.1 VLC-Trennung der Sammelfraktion VC4-34 an Kieselgel

(Alle Familien)

Die im ersten Fraktionierungsschritt erhaltene wirksame Sammelfraktion 4-34 wies ein Trockengewicht von 84,4 g auf. Sie wurde mit 30 g Kieselgel verrieben und durch ein Sieb auf eine Säule mit einem Innendurchmesser von ebenfalls 14 cm und einer Höhe von 38 cm aufgetragen. Diese Säule war zuvor mit 2200 g Kieselgel befüllt worden, so dass das Verhältnis Sorbens zu Extrakt 1 zu 27,5 betrug. Die Elution erfolgte über einen Polaritätsgradienten, ausgeführt als Stufengradient mit je einem Liter als Volumen, von Hexan über Diethylether und Methanol zu Wasser. Die genaue Zusammensetzung der für die einzelnen Fraktionen verwendeten Volumina geht aus der Tabelle 2 hervor.

Tabelle 2: Volumina der für die Elution der Säule gebrauchten Lösemittel Hexan, Diethylether, Methanol und Wasser in ml

Fraktion	Hexan	Diethylether	Methanol	Wasser
1	2000	0	0	0
2	980	100	0	0
3	970	100	0	0
4	960	140	0	0
5	940	170	0	0
6	920	200	0	0
7	900	215	0	0
8	890	100	10	0
9	870	120	10	0
10	860	130	10	0
11	850	140	10	0
12	830	160	10	0
13	810	180	10	0
14	790	200	10	0
15	770	220	10	0
16	750	240	10	0
17	730	260	10	0
18	710	270	20	0
19	690	290	20	0
20	670	310	20	0
21	650	330	20	0
22	630	340	30	0
23	610	360	30	0
24	590	380	30	0
25	570	400	30	0
26	560	410	30	0

Fraktion	Hexan	Diethylether	Methanol	Wasser
27	540	420	40	0
28	520	440	40	0
29	500	460	40	0
30	480	480	40	0
31	460	490	50	0
32	400	550	50	0
33	350	600	70	0
34	250	680	70	0
35	150	750	100	0
36	50	850	100	0
37	0	900	100	0
38	0	800	200	0
39	0	700	300	0
40	0	600	400	0
41	0	500	500	0
42	0	400	600	0
43	0	300	700	0
44	0	200	800	0
45	0	100	900	0
46	0	0	1000	0
47	0	0	1000	0
48	0	0	1000	0
49	0	0	0	1000
50	0	0	0	1000

Es wurden 50 Fraktionen gewonnen. Die DC-Kontrollen zeigt die Abb. 7: Um eine möglichst optimale Bandentrennung in den verschiedenen Polaritätsstufen zu gewährleisten, wurde für die apolaren Fraktionen 1-24, in der oberen Reihe dargestellt, als

Fließmittel ein Gemisch aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis von 80:20 v:v, für die apolaren Fraktionen 13-36, in der mittleren Reihe dargestellt, eines aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis von 60:40 v:v, und für die polaren Fraktionen > 25, in der unteren Reihe dargestellt, aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 80:19:1 v:v:v gewählt.

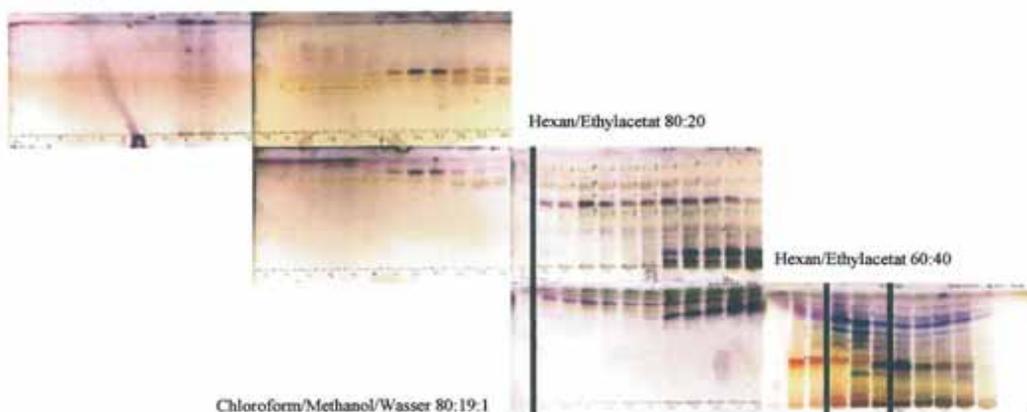


Abb. 7:

DC-Kontrolle der VLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34*. Die Grenzen der vier gebildeten Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

Die Ergebnisse der Proliferationstests sind in Diagramm 9: dargestellt: Auf der Ordinate ist der Einbau von BrdU in die DNA der Melanomzellen als relative Absorption des Lichtes bei 402 nm aufgetragen, auf der Abszisse stehen rechts neben der Kontrolle, deren Wert als 100% festgelegt wurde, die 50 Fraktionen als Balken. Wie aus dem Diagramm hervorgeht, erwiesen sich die Fraktionen 1-25 als unwirksam, die Fraktionen 26-39 als ausgesprochen wirksam, die Fraktionen 40-43 als diskret, und die Fraktionen 44-50 wieder als stärker wirksam. Die Unterschiede zwischen der Kontrolle und den einzelnen Fraktionen waren mit einem p von jeweils $p < 0,0001$ ($n = 12$) statistisch signifikant. Die wirksamen Fraktionen 26-39 wurden wiedervereinigt und gelchromatographisch weiter fraktioniert.

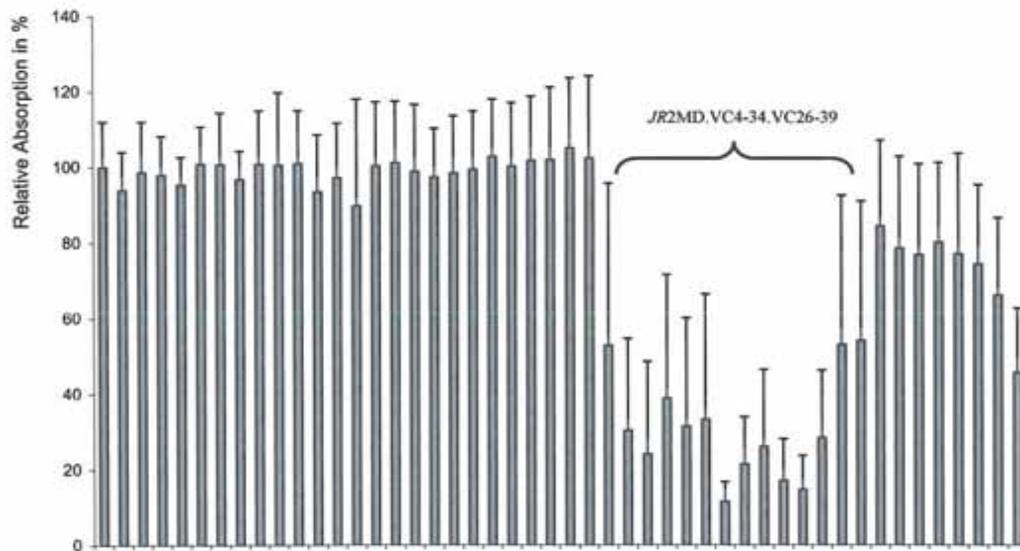


Diagramm 9:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der VLC-Fractionen aus *JR2MD.VC4-34*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen aufgetragen. Die Sammelfraktion 26-39 erwies sich als wirksam und wurde weiterverarbeitet.

3.3.3 Fraktionierungsebene 3

3.3.3.1 Molekularsiebchromatographie der Sammelfraktion 26-39 an Sephadex LH-20 (Alle Familien)

An dieser Stelle kam die Gelchromatographie zum Einsatz, eine Methode, die nicht Gegenstand der Vorversuche gewesen war. Zwar war zu diesem Zeitpunkt schon eine hervorragende Trennung nach Polaritätseigenschaften erfolgt, jedoch war zu erwarten, dass die erhaltene Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39* als Gemisch Substanzen enthielt, die noch das gesamte Spektrum von im Extrakt vorhandenen Molekülgrößen repräsentierten. Um nach den Molekülgrößen zu trennen, wurde die Methode unter Einhaltung der folgenden experimentellen Bedingungen gewählt.

Eine Säule mit einer Länge von 100 cm und einem Innendurchmesser von 6 cm wurde nach 24-stündigem Vorquellen des Materials mit 800 g Sephadex LH-20 gefüllt und über drei Tage mit dem Fließmittelgemisch aus DCM und Methanol im Verhältnis 1:1 v:v äquilibriert.

Zur Beladung der Säule wurde die in 25 ml des Fließmittelgemisches gelöste, 15 g schwere Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39* mit einer Pipette so auf die Säule aufgetropft, dass das Gelbett nicht beschädigt wurde. Während dieser Zeit wurde der Fluss für eine kurze Zeit unterbrochen, danach solange wiederhergestellt, bis der Flüssigkeitsmeniskus gerade in das Gelbett einsank. Sodann wurde etwas Lösemittelgemisch nachgefüllt, und das Lösemittelreservoir wieder aufgesetzt, das so beschaffen war, dass es automatisch den Flüssigkeitsspiegel über der Säule konstant auf einer Höhe hielt. Bei einer Flussrate von 1mm/min wurde in 15-minütigen Abständen fraktioniert, bis in den DC-Kontrollen der Fraktionen keine Substanz mehr detektiert wurde. Insgesamt wurden in einer Zeit von knapp fünf Tagen 338 Fraktionen gewonnen:

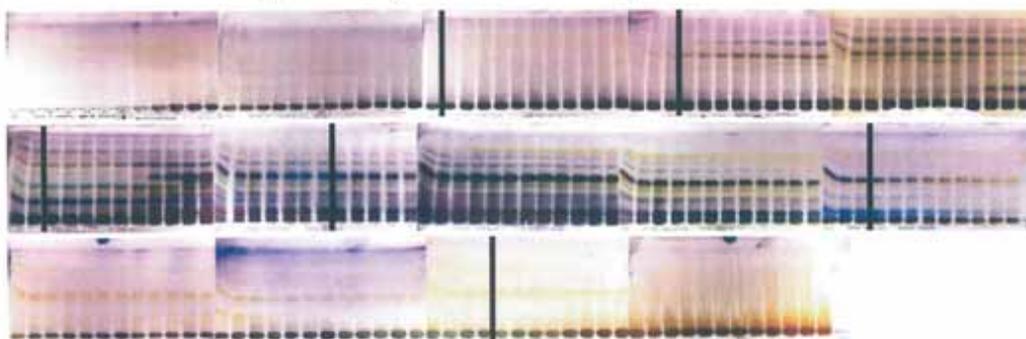


Abb. 8:

DC-Kontrolle der S-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39*: Die Grenzen der neun gebildeten Fraktionsgruppen sind, soweit sie abgebildet sind, durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

Abb. 8 zeigt die DC-Kontrolle der Fraktionen. Die Platten wurden jeweils mit einem Fließmittelgemisch aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis von 60:40 v:v entwickelt. Da die Fraktionen 1-35 das Totraumvolumen der Säule darstellten, ist die erste auf die Platten aufgetragene Fraktion die Fraktion 35. Folglich ist die erste Bahn in Zeile 1 die Auftrennung der Fraktion 35, die letzte Bahn in Zeile 3 unten rechts die Auftrennung der Fraktion 221; nicht dargestellt sind die leeren Fraktionen 267 bis 338, der so genannte Nachlauf.

Dementsprechend wurde bei der Untersuchung der antiproliferativen Aktivität nur in einem Kernbereich von der Fraktion 90 bis zur Fraktion 170 jede Fraktion getestet; davor und danach lediglich jede zweite bzw. jede dritte oder am Beginn und am Ende bei Fraktionen mit einer Positionszahl größer als 300 nur jede vierte. Das Ergebnis ist in Diagramm 10 in üblicher Weise dargestellt.

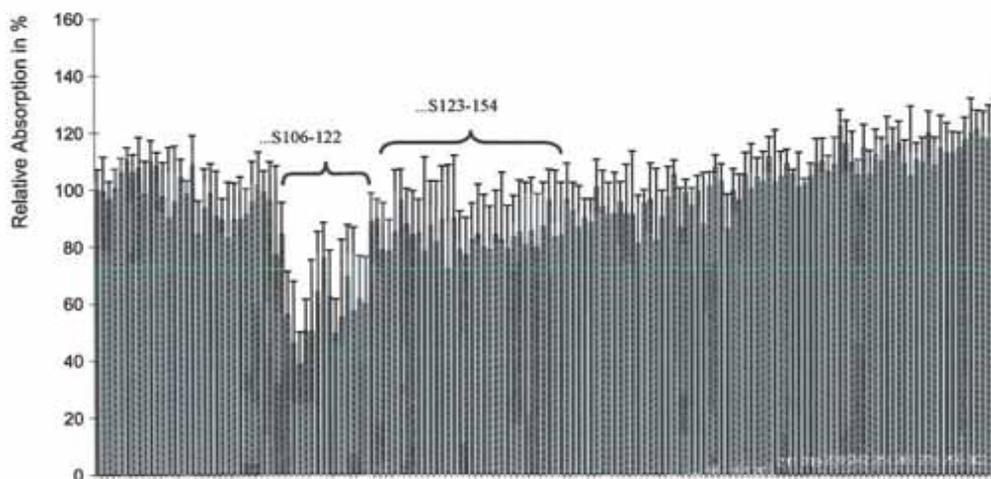


Diagramm 10:

BrdU-Testung der Proliferation der S-Fractionen aus *JR2MD.VC4-34.VC26-39*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen aufgetragen. Die markierten Fraktionsgruppen 106-122 und 123-154 wurden per Flüssiggegenstromchromatographie weiterverarbeitet.

Alle Fraktionen wurden jeweils in einem einzigen Durchgang getestet, um angesichts der großen Zahl von Proben zufällige Fehler durch Verwendung verschiedener Chargen von Reagenzien oder Zellkulturgenerationen zu vermeiden. Dieses Vorgehen bedingte aufgrund des Arbeitsaufwandes in diesem Fall eine sehr kurze Inkubationszeit von nur 12 Stunden und eine Drift zu immer höheren Werten bei späteren Fraktionen. Denn in der Zeitperiode, in der die mit den ersten Fraktionen behandelten Zellkulturen schon weiter bearbeitet wurden, hatten die weiter hinten gelegenen Zeit weiter zu proliferieren. Dennoch ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich die Aktivität in den Fraktionen 106-122 befand. Die Tatsache, dass dieser Effekt schon nach 12 Stunden detektierbar war, spricht für die außerordentlich hohe wachstumshemmende Potenz der in den Fraktionen 106-122 enthaltenden Substanz. So war das Resultat der Proliferationshemmung auf $38,5 \pm 11,3\%$ der Proliferation unbehandelter Kontrollen beispielsweise durch die Fraktion 111 mit einem $p = 0,0022$ statistisch signifikant; dies galt auch für die übrigen wirksamen Fraktionen.

Unter Berücksichtigung der DC-Ergebnisse wurden somit die Sammelfractionen 1-68, 69-82, 83-105, 106-122, 123-154, 155-191, 192-234, 235-337, und 338 gebildet. Da die Fraktionen 123-154 zwar keine antiproliferative Aktivität aufwiesen, jedoch die be-

schriebene Drift zu verhindern schienen, wurden sie ebenfalls, wie die Sammelfraktion 106-122, für die Weiterverarbeitung in der Flüssiggegenstromchromatographie vorbereitet.

3.3.4 Fraktionierungsebene 4

3.3.4.1 HSCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122*

(Familien 1, 2 und 3)

Aufgrund des hohen Gewichts der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122* von 7,84 g konnte sie weder auf dem vorhandenen DCCC - noch auf dem HSCCC-Gerät in einem Durchgang weiter aufgetrennt werden. Da es nicht sinnvoll war, die Molekularsiebchromatographie zu wiederholen, wurde entschieden, die Probe in drei Läufen auf der HSCCC zu trennen. Die alternative Recyclingchromatographie an Kieselgel wurde verworfen, da ein Polaritätsgradient zur Trennung schon zweimal zur Anwendung gekommen war.

Die hochwirksame Fraktion wurde in drei Chargen von jeweils etwa 2,5 g Gewicht aufgeteilt. Als Zweiphasensystem kam ein Gemisch aus n-Heptan, Dichlormethan und Acetonitril im Verhältnis von 10: 3: 7 v:v:v zum Einsatz. Die Probe wurde in jeweils 10 ml Oberphase, die als mobile Phase diente, gelöst, und nach Äquilibrierung des Zweiphasensystems im Gerät in die Säule injiziert.

Die Trennung fand unter Drehung im Uhrzeigersinn bei 830 U/min und einer Pumpgeschwindigkeit der mobilen Oberphase von zunächst 1 ml/min statt, die Fraktionierung im zweiminütigen Wechsel. Bei Fraktion 100 wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 1,3 ml/min erhöht und die Fraktionierung auf einen fünfminütigen Wechsel verlangsamt. Während im ersten Lauf 340 Fraktionen gewonnen wurden, fanden die beiden anderen Läufe bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Fraktionierung im fünfminütigen Wechsel statt, weshalb sich die Anzahl der Fraktionen in Lauf B auf 204, und in Lauf C auf 191 Fraktionen belief. Die DC-Kontrolle des Laufes A mit einem Fließmittelsystem aus Hexan und Ethylacetat 60:40 v:v. zeigt die Abb. 9:.

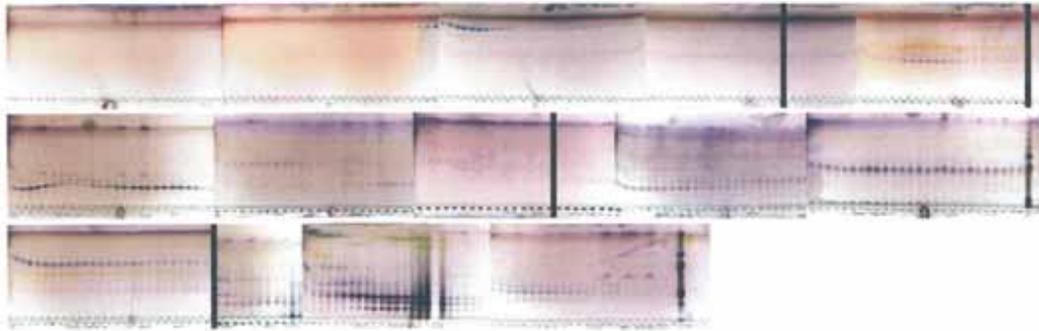


Abb. 9:

DC-Kontrolle der HSCCC-Fractionen (Lauf A) von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122*: senkrechte Striche kennzeichnen die Grenzen der fünf gebildeten Fraktionsgruppen. Näheres siehe Text.

Ebenfalls beispielhaft anhand der Darstellung der Ergebnisse des Laufes A, zeigt das Diagramm 11 die BrdU-Testung in der oben dargestellten Weise. Wie hier ersichtlich, fand sich eine starke antiproliferative Aktivität in den Fraktionen 101-130 und in den Fraktionen 287-340.

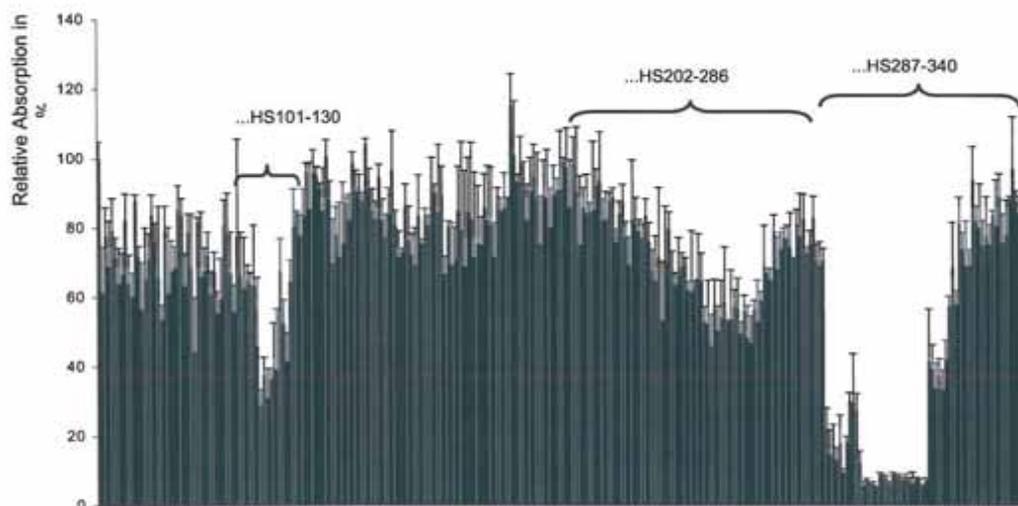


Diagramm 11:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der Fraktionen aus dem ersten Lauf der Trennungen *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen aufgetragen. Die Fraktionsgruppen 101-130, 202-286 und 287-340 waren wirksam und wurden, wie im Text beschrieben, weiterverarbeitet.

Bei den letztgenannten Fraktionen handelte es sich um die nach vollzogener Trennung aus der Säule gedrückte Unterphase. Die Unterschiede verglichen mit den Werten der

Kontrollen waren mit einem p von $p < 0,0001$ ($n = 9$) für die beispielhaft aus den Fraktionen 101-130 herausgegriffene Fraktion 120 beziehungsweise einem $p < 0,0001$ ($n = 9$) für die ebenfalls beispielhaft getestete Fraktion 300 jeweils statistisch signifikant.

Anhand dieser Ergebnisse wurden die fünf Sammelfraktionen 1-100, 101-130, 131-201, 202-286 und 287-340 gebildet. Die Morphologie der Verteilung der proliferationshemmenden Aktivitäten auf die Fraktionen der Läufe B und C ähnelte jeweils der des Laufes A, und sämtliche in den DC-Kontrollen gefundenen Banden konnten den entsprechenden Banden aus Lauf A zugeordnet werden. So wurden die Fraktionen der Läufe B und C ebenfalls in fünf Sammelfraktionen eingeteilt, die mit der jeweils korrespondierenden Sammelfraktion aus Lauf A wiedervereinigt wurden. Die fünf Sammelfraktionen wurden neu benannt, nämlich als HS für High Speed (Countercurrentchromatography) 1 bis 5. Die wirksamen Sammelfraktionen HS2 und die vereinigten abgepumpten Unterphasen, HS5 genannt, wurden in MPLC an Umkehrphase, HS4, in der eine schwache Aktivität weit über alle Fraktionen verschmiert zu sein erschien, in einer DCCC auf der Fraktionierungsebene 5 weiter aufgetrennt.

Bei diesem Experiment auf der Ebene 4 wurde erstmals die Aktivität selbst in mindestens zwei Entitäten, eine oberphasen- und eine unterphasenlösliche aufgeteilt. Daher war nun klar, dass es sich bei dem die antiproliferative Aktivität tragenden Substrat um mehrere verschiedene Substanzen oder Substanzgruppen handeln musste.

3.3.4.2 DCCC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154

(Familien 4 und 5)

Die Auftrennung dieser zweiten Sammelfraktion geschah mit Hilfe der DCCC. Es erfolgte eine Aufteilung der 4,12 g schweren Fraktion auf zwei Durchgänge, deren korrespondierende Fraktionen wie bei der HSCCC anhand der Ergebnisse der BrdU-Testungen und der DC-Kontrollen wieder zusammengefügt wurden. Als Zweiphasensystem wurde dieses Mal ein Gemisch aus n-Heptan, Aceton und Methanol in einem Verhältnis von 5:1:4 v:v:v gewählt. Die Unterphase diente als mobile Phase. Bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und einer Fraktionierungsfrequenz von 2 Glas pro Stunde wurden im ersten Lauf 152 und im zweiten Lauf 138 Fraktionen gewonnen.

Die in der Abb. 10: in der oberen Zeile aneinandergelegten DC-Platten zeigen die Fraktionskontrolle des Laufes A, die Platten in der unteren Zeile die Fraktionskontrolle des Laufes B. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 9:1 v:v.

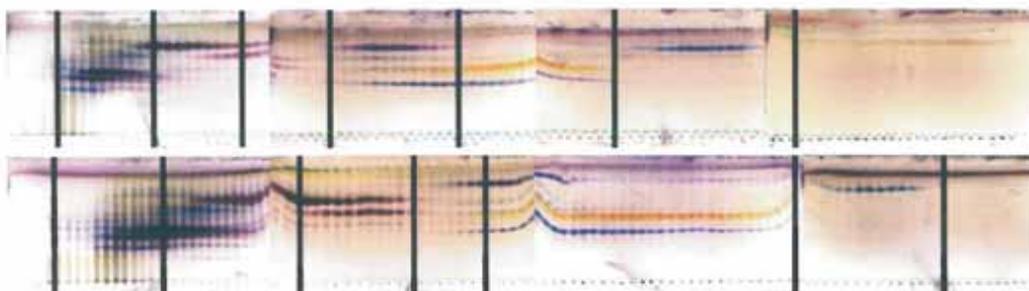


Abb. 10:

DC-Kontrolle der DCCC-Fractionen aus den beiden Läufen A und B von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154* (Lauf A ist oben, Lauf B unten abgebildet): Die Grenzen der jeweils acht korrespondierenden Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

Das Ergebnis der Untersuchung der antiproliferativen Aktivität der bei diesen beiden Läufen gewonnenen Fraktionen zeigt die Abbildung Diagramm 12:.

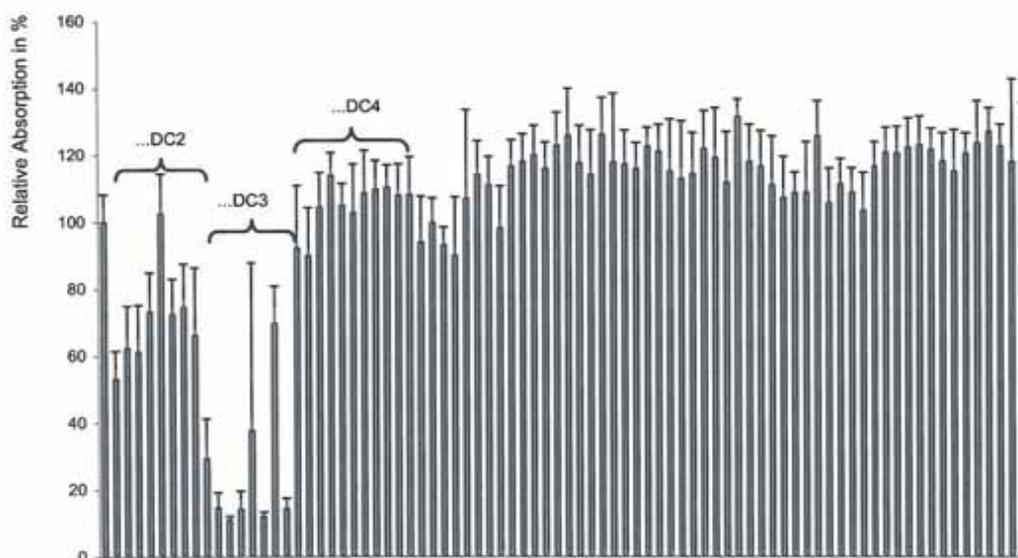


Diagramm 12:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der DCCC-Fractionen aus dem ersten Lauf von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen aufgetragen. Die Fraktionsgruppen 6-15 und 16-24 waren wirksam; aufgrund DC-Ähnlichkeiten wurde die Fraktion 25-33 ebenfalls weiterverarbeitet. Die Darstellung beginnt mit Fraktion 6 rechts neben der Kontrolle.

Der Übersichtlichkeit halber sind die Ergebnisse des Laufes B weggelassen worden. Die Aktivität fand sich in den ersten eluierten Fraktionen wieder. Aus den Fraktionen beider Läufe wurden jeweils acht Sammelfraktionen gebildet. Dies waren in Lauf A die Fraktionen 1-5, 6-15, 16-24, 25-33, 34-46, 47-68, 69-102 und 103-158, in Lauf B die Fraktionen 1-5, 6-16, 17-31, 32-43, 44-50, 51-80, 81-107 und 108-138. Sowohl alle Fraktionen der Sammelfraktionen zwei als auch drei jedes der beiden Läufe senkten die Proliferation von Zellen des malignen Melanoms im Vergleich zu der Kontrollgruppe statistisch signifikant (jeweils $n = 9$): wie in den folgenden vier Beispielen mit einem p von jeweils $p < 0,0001$ für Fraktionen 10 und 20 des ersten Laufes, respektive $p < 0,0001$ für Fraktionen 10 und 20 des zweiten Laufes auf $61,3 \pm 13,9\%$ und $12 \pm 1,4\%$ respektive $73,2 \pm 11,7$ und $14,2 \pm 15,5\%$ des Wachstums der Kontrollen gezeigt.

Hierbei wiesen die Fraktionen der jeweils zweiten Sammelfraktion eine schwächere Wirksamkeit auf als die der jeweils dritten Sammelfraktion. Dennoch folgte aufgrund der Ähnlichkeit der DC-Verläufe dieser beiden wirksamen Sammelfraktionen der Entschluss, eine Wiedervereinigung vorzunehmen und sie gemeinsam in einer weiteren DCCC zu verarbeiten. Die Fraktion vier wurde ebenfalls per DCCC weiter aufgetrennt, da zwar im BrdU-Test eine scharfe Grenze zwischen den Sammelfraktionen drei und vier vorlag, jedoch dünnschichtchromatographisch mehrere Substanzen, die in der Fraktion drei enthalten waren, sich ebenfalls in der Fraktion vier fanden.

3.3.5 Fraktionierungsebene 5

3.3.5.1 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2 (Familie 1)

In dieser ersten MPLC wurde die Sammelfraktion 2 aus der HSCCC der Fraktionierungsebene 4 mit einem Gewicht von 360 mg weiter aufgetrennt. Es kam eine Säule mit einem 0,9 cm Innendurchmesser und einer Höhe von 26 cm, gefüllt mit 24 g RP-18 Material zum Einsatz. Mit einem Gradienten von Wasser zu Methanol, fraktioniert in zweiminütigen Schritten, wurde die Probe in 144 Fraktionen eluiert.

Die in Abb. 11 gezeigte DC-Kontrolle erfolgte mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 90:10 v:v - die Proliferationsergebnisse zeigt das Diagramm 13:.

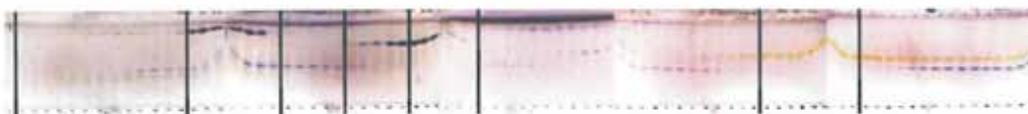


Abb. 11:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2*: Die Grenzen der gebildeten Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die erste Fraktionsgruppe links sowie die vier letzten sind zum Teil abgeschnitten. Näheres siehe Text.

Die Einteilung erfolgte bei den ersten neun Sammelfractionen per DC-Kriterien, bei den letzten drei anhand der für das Waschen der Säule nacheinander angewendeten Löse-mittel Ethanol, Hexan und 0,1%iger Trifluoressigsäure. Die Grenzen der Fraktionen 1-35, 36-48, 49-55, 55-60, 61-65, 66-71, 72-94, 95-103, 104-127, 128-141, 142, 143 und 144 sind als senkrechte Striche gekennzeichnet.

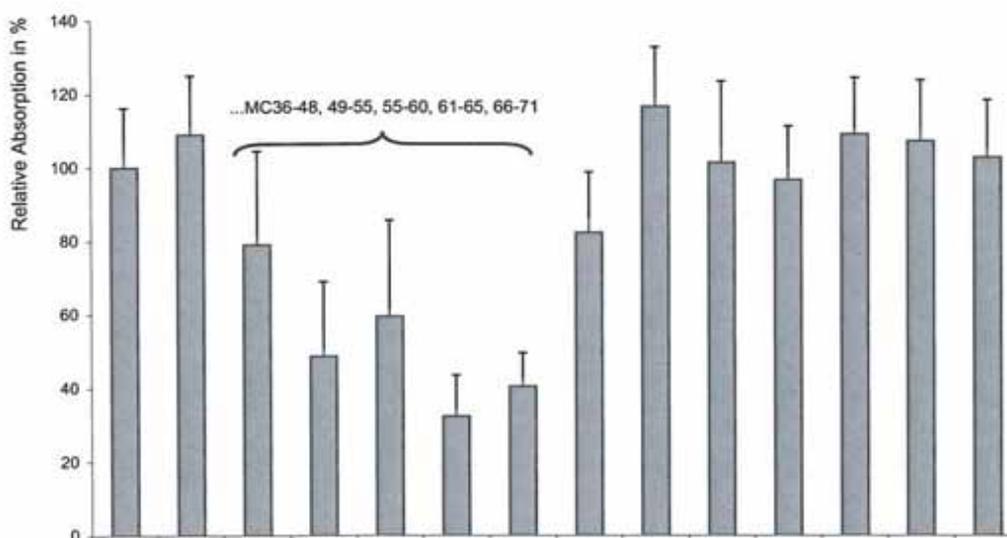


Diagramm 13:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der Fraktionen der MPLC-Trennung von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind rechts neben der Kontrolle die Fraktionen aufgetragen. Die Fraktionsgruppen 36-48, 49-55, 55-60, 61-65 und 66-71 waren mit einem p von jeweils $p < 0,0001$ ($n = 39$) wirksam. Näheres siehe Text.

In der 11,4 mg schweren Fraktion 66-71 fand sich ein Gemisch von **Ursolsäure**, einem Triterpen, und dem Weichmacher „**Kodaflex Fest**“. Der Übersichtlichkeit halber werden die aufgenommenen NMR-Spektren hier nicht gezeigt. Festzuhalten ist lediglich, dass diese wirksame Fraktion HS2 sowohl Triterpene, die im Prinzip antiproliferativ

wirksam sind, als auch Weichmacher enthalten. Die Weichmacher sind vermutlich als Verunreinigung über die Lösemittel eingeschleppt worden. Aufgrund der teilweise geringen Gewichte der Fraktionen und einem Überschneiden der enthaltenen Substanzen wurden die Fraktionen 36-65 schließlich wiedervereinigt, um die in ihnen enthaltenen vier Substanzen zunächst rein zu erhalten, dann in ihrer Struktur aufzuklären und schließlich auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen. Eine weitere Auftrennung erfolgte mittels HSCCC. Die Sammelfraktion 95-103 wurde per MPLC weiter aufgetrennt.

3.3.5.2 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4* (Familie 2)

Die Trennung dieser Sammelfraktion mit einem Gewicht von 134.9 mg erfolgte mittels DCCC in reiner Unterphase des Zweiphasensystems aus n-Heptan, Aceton und Methanol in einem Verhältnis von 5:1:4 v:v:v gelöst, auf die Säule gegeben und bei einer Geschwindigkeit von 0,3ml/min und einer halbstündigen Fraktionierungsfrequenz im absteigenden Modus getrennt. Anhand der DC-Kontrollen (Abb. 12) wurden die 104 gewonnenen Fraktionen in 12 Sammelfraktionen unterteilt.

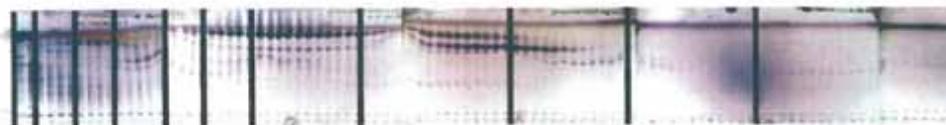


Abb. 12:

DC-Kontrolle der DCCC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4*: Die Grenzen der gebildeten Fraktionsgruppen 1-8, 9-11, 12-15, 16-19, 20-24, 25-28, 29-33, 34-44, 45-49, 60-71, 72-84 und 85-103 sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

Wie in das Diagramm 14: in der üblichen Weise dargestellt, erwiesen sich alle Fraktionen außer den Fraktionen eins und acht mit einem p von jeweils $p = 0,0011$ ($n = 6$) im Vergleich zu den Kontrollen wirksam. Sie wurden daher in MPLC an Normalphase weiter aufgetrennt.

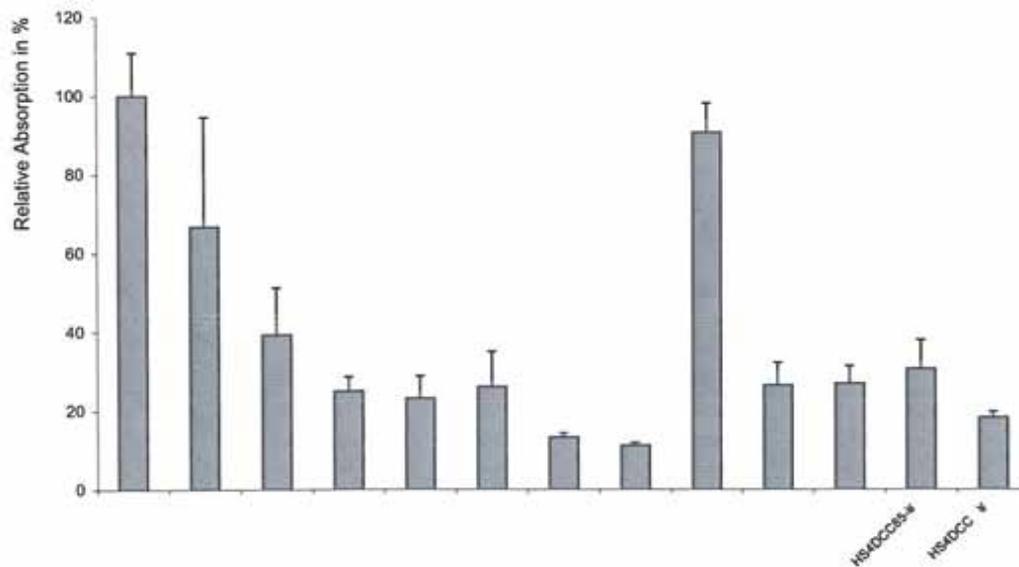


Diagramm 14:

BrdU-Testung der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind rechts neben der Kontrolle die Fraktionsgruppen aufgetragen. Aufgrund ihrer Wirksamkeit wurden alle bis auf die Gruppen eins und acht weiterverarbeitet.

3.3.5.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5* (Familie 3)

Diese 3516 mg schwere Fraktion wurde in einem Durchgang per MPLC an einer Umkehrphase getrennt. Die Säule mit einer Länge von 50 cm und einem Innendurchmesser von 5 cm enthielt 400 g RP-18 Material und wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min betrieben. Fraktioniert wurde in zweiminütigen Intervallen.

Mit einem Gradienten von Wasser zu Methanol und einem Nachlauf aus einem Liter Hexan, einem Liter Dichlormethan und anschließend einem halben Liter 0,5%iger Trifluoressigsäure in einem Gemisch aus Methanol und Dichlormethan, 1:1 v:v wurde die Probe in 629 Fraktionen getrennt:

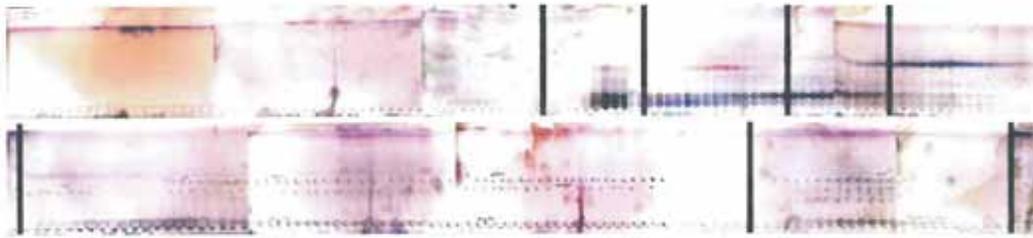


Abb. 13:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5*: Die Grenzen der Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Nur jede vierte Fraktion wurde auf die Platten aufgetragen. Näheres siehe Text.

Diese wurden aus Kapazitätsgründen nicht einzeln getestet, sondern zunächst, wie in der Abb. 13: der DC-Kontrolle gezeigt, in die Sammelfractionen 1-169, 170-202, 203-247, 248-280, 281-331, 332-551, 552-627, 628-629 und den Nachlauf eingeteilt. Als Fließmittel diente in der oberen Zeile ein Gemisch aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis von 6:4 v:v, und in der unteren Zeile ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 9:1 v:v.

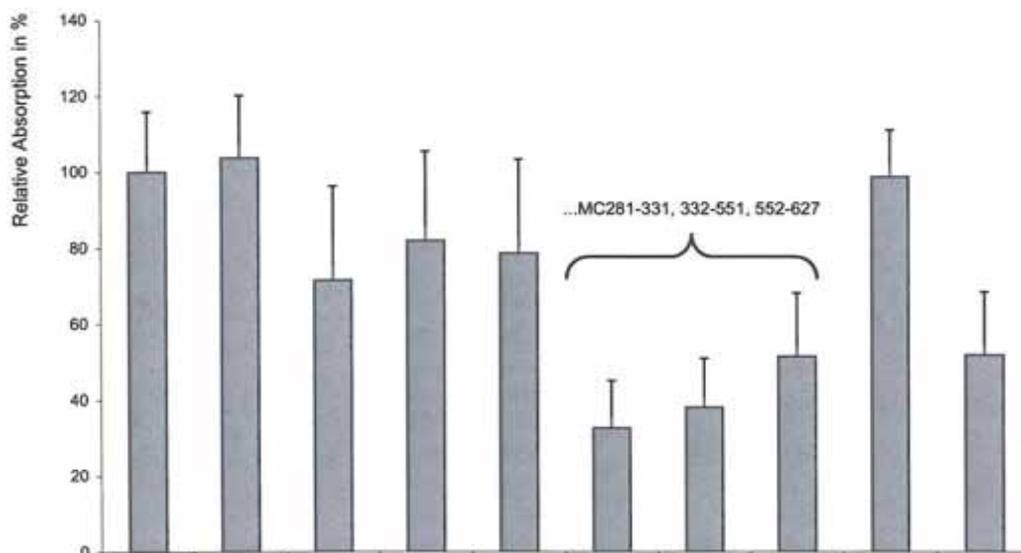


Diagramm 15:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionsgruppen rechts neben der Kontrolle aufgetragen.

Wie aus der Darstellung der Ergebnisse der BrdU-Einbaumethode im Diagramm 15: hervorgeht, wirkten die Sammelfractionen 281-331, 332-551 und 552-627 antiprolifera-

tiv; sie senkten die Proliferationsraten im Vergleich zur Kontrolle auf bis zu 20%. Diese Unterschiede erwiesen sich mit p-Werten von jeweils $p < 0,0001$ ($n = 39$) als statistisch signifikant. Die Fraktionen wurden in der sechsten Fraktionierungsebene jeweils per DCCC weiter getrennt.

3.3.5.4 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3* (Familie 4)

Die Trennung dieser wiederzusammengefügte Fraktion mit einem Gewicht von 3,512 g erfolgte mittels einer DCCC. Die Probe wurde zur Vorbereitung im absteigenden Modus in üblicher Weise in 10ml Unterphase des Zweiphasensystems aus Toluol, Methanol, Chloroform und Wasser im Mischungsverhältnis von 5:7:5:2 v:v:v:v gelöst, und sodann bei einer Flussrate von 0,3ml/min und einer Fraktionierungsfrequenz von einer Fraktion /45 min in 209 Fraktionen aufgetrennt, die, wie in der Abb. 14:, der Darstellung der DC-Kontrolle gezeigt, in die 16 Sammelfraktionen 1-2, 3-10, 11-17, 18-25, 26-37, 38-43, 44-54, 55-66, 67-76, 77-87, 88-98, 99-112, 113-132, 133-187, 188-208 und 209 eingeteilt wurden.

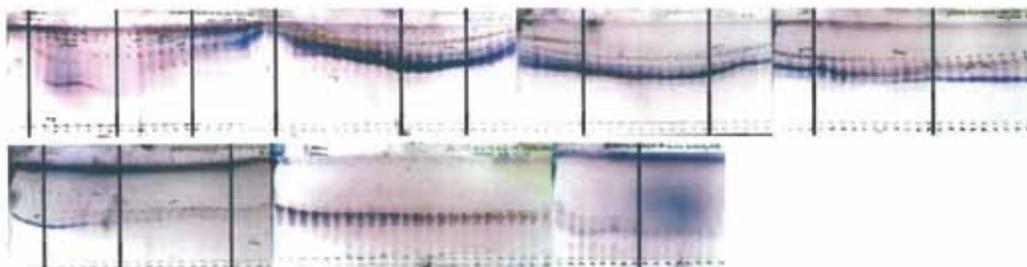


Abb. 14:

DC-Kontrolle der DCCC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3*: Die Grenzen der Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Nicht jede Fraktion wurde auf die Platten aufgetragen. Näheres siehe Text.

Wie im Diagramm 16: dargestellt, erwiesen sich alle aus den Fraktionen 1-76 gebildeten Fraktionsgruppen mit einer Hemmung des Wachstums der Melanomzellen auf bis zu 10% des Wachstums der Kontrollen als hochgradig aktiv:

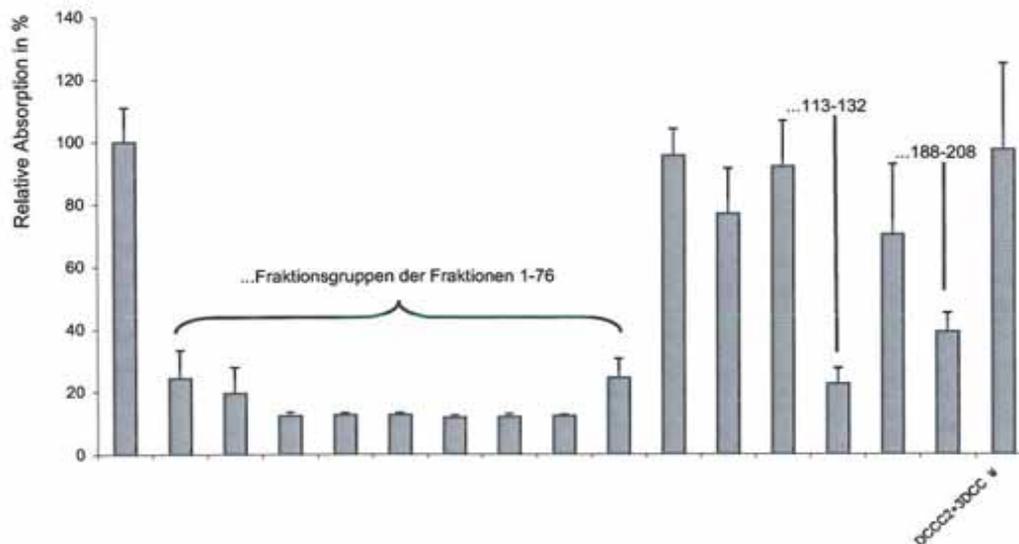


Diagramm 16:

BrdU-Testung der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind rechts neben der Kontrolle, auf der Abszisse sind rechts neben der Kontrolle die Fraktionen aufgetragen. Näheres siehe Text.

Diese Unterschiede zeigten sich mit einem p von jeweils $p = 0,0009$ ($n = 6$) als statistisch signifikant. Darüber hinaus hemmten die Sammelfractionen 113-132 das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant auf $22,5 \pm 5\%$ ($p = 0,0009$; $n = 6$) und 188-208 ebenfalls statistisch signifikant auf $39,1 \pm 6\%$ des Wachstums der Kontrolle ($p = 0092$; $n = 6$). In diesem Experiment konnte daher abermals eine Aufteilung der Aktivität auf verschiedene Fraktionen beobachtet werden. Aufgrund der Diversität der Banden in den DC und besonders der Unterschiede zwischen den einzelnen Sammelfractionen kamen die wirksamen Fraktionen auf der Trennebene sechs jeweils separat per MPLC zur Weiterverarbeitung.

3.3.5.5 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4* (Familie5)

Aufgrund der Verwandtschaft mit den eben behandelten Sammelfractionen 2 und 3 der Ebene 4 erfolgte die Trennung dieser unwirksamen, 954 mg schweren Sammelfraction analog zu der der Sammelfraction DC 2+3 in einer DCCC, die in 138 Fraktionen resultierte. Die Grenzen der 11 gebildeten Fraktionsgruppen 1-13, 14-19, 20-36, 37-43, 44-

48, 49-62, 63-85, 86-95, 96-101, 102-137 und 138 sind in der Abb. 15 der DC-Kontrollen des Laufes eingezeichnet.



Abb. 15:

DC-Kontrolle der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4*: Die Grenzen der gebildeten 11 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die beiden letzten Gruppen sind rechts abgeschnitten. Näheres siehe Text.

Obwohl die Gesamtfraktion sich als unwirksam herausstellte, zeigte sich in der Verteilung, ebenfalls analog zu den Eigenschaften der Unterfraktionen von DC2 + 3 (dargestellt in der Abb. 14), dass alle aus den Fraktionen 1-85 gebildeten Fraktionsgruppen mit einer Hemmung des Wachstums der Melanomzellen auf bis zu 10% des Wachstums der Kontrollen hochgradig aktiv waren (Diagramm 17): Diese Unterschiede waren mit einem p von jeweils $p = 0,0011$ ($n = 6$) statistisch signifikant. Darüber hinaus erwies sich die Sammelfraktion 138 mit einer im Vergleich zur Kontrolle mit einem $p = 0,0011$ ($n = 6$) statistisch signifikanten Hemmung des Wachstums auf $11,1 \pm 2,6\%$ des Wachstums der Kontrolle als außerordentlich aktiv.

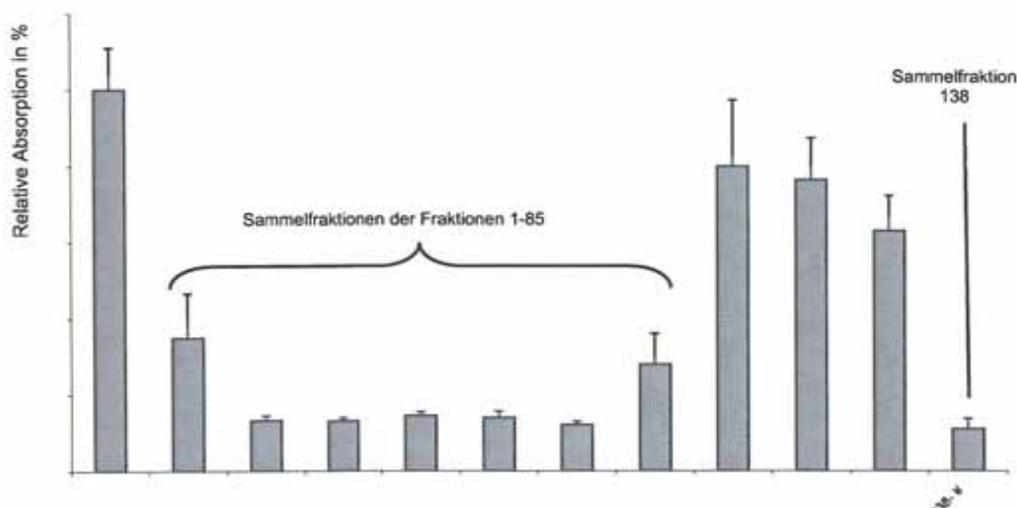


Diagramm 17:

BrdU-Testung der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe Text.

Es zeigte sich hier also abermals eine Aufteilung der Aktivität. Die wirksamen Fraktionen wurden jeweils separat per MPLC weiterverarbeitet.

3.3.6 Fraktionierungsebene 6

3.3.6.1 HSCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65*

(Familie 1)

Diese Sammelfraktion mit einem Gewicht von 13,8 mg wurde per HSCCC getrennt, um die vier Hauptkomponenten, die einander teilweise überlappten, voneinander zu separieren. Hierzu wurde die Probe in 5 ml Unterphase des Zweiphasensystems, bestehend aus Benzol, Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis von 5:5:7:2 v:v:v:v gelöst und nach Injektion bei einer Pumprate von 0,8 ml/min in fünfminütigen Abständen in 209 Fraktionen separiert.

Abb. 16 zeigt im unteren Teil die DC-Kontrolle, entwickelt mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 9:1 v:v. Die erhaltenen Substanzen sind mit Buchstaben benannt, die eine Zuordnung zu ihrer Position im Chromatogramm der vorhergegangenen MPLC, im oberen Teil der Abbildung zu sehen, erleichtern.

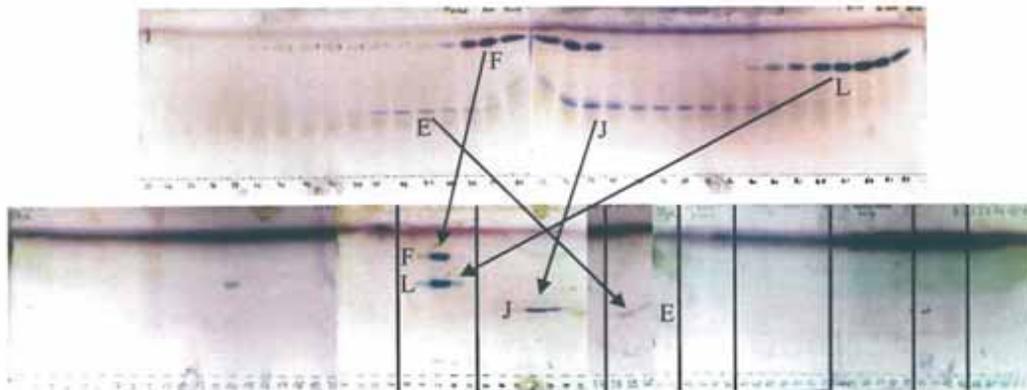


Abb. 16:

DC-Kontrolle der HSCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65*: Die Darstellungen der MPLC- in der oberen Zeile und der HSCCC-Kontrolle in der unteren sind jeweils rechts abgeschnitten. Die Neuverteilung der vier Hauptkomponenten, „E“, „F“, „J“ und „L“ ist durch Pfeile angedeutet. Näheres siehe Text.

Es fand zwar eine Trennung der beiden Hauptkomponenten E und J statt, beide von F und L getrennt, jedoch überschritten sich nun die beiden vormals separierten Komponenten F und L. Es wurden daher zunächst die 13 Sammelfractionen 1-24, 25-29, 30-37,

38-42, 43-46, 47-53, 54-59, 60-63, 64-67, 68-76, 77-82, 83-208 und 209 gebildet, um später die Sammelfractionen 1-24, 25-29, 30-37, 38-42 und 47-53 jeweils separat abermals einer MPLC zu unterziehen, und so insbesondere die schon auf Ebene 5 erreichte, aber wieder aufgehobene Trennung der Substanzen F und L erneut durch zu führen. Auf eine Testung wurde abermals im Sinne einer späteren Testung der vier Reinsubstanzen verzichtet; es sollte zunächst die gesamte vorhandene Masse der Substanzen für die Strukturaufklärung zur Verfügung stehen.

3.3.6.2 Aufarbeitung der DCCC-Fractionen aus

JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4. (Familie 2)

Jeder einzelne Trenngang aus der Gruppe der folgenden MPLC geschah an derselben Säule unter identischen Bedingungen. Es handelte sich um eine 55 cm lange Säule mit einem Innendurchmesser von 8 mm, gefüllt mit 22 g asphärischen Kieselgels einer Porengröße von 60 Å und einer Korngröße von 15-25 µm. Es wurde jeweils mit einem Gradienten von Hexan zu Isopropanol eluiert: Begonnen wurde mit reinem Hexan, um dann innerhalb von 655 Minuten jeweils ein Gemisch von 50:50 zu erreichen, und in einer Stufe auf reines Isopropanol umzustellen. Die Flussrate betrug 0,9 ml/min, die Fraktionierung erfolgte in 12 - minütigen Abständen, detektiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210$ nm. Die DC-Kontrollen wurden mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 96:4 v:v entwickelt. Die Zusammenstellung zu Sammelfractionen entstand rein nach DC-Gesichtspunkten; getestet wurde nur dann, wenn genügend Gewicht der Fraktion vorhanden war, anderenfalls verschob sich die Testung der Substanzen auf einen Zeitpunkt nach deren Strukturaufklärung.

Überblick über diese Familie 2 verschafft Abb. 44 (siehe Anhang, Seite 146)

3.3.6.2.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC12-15*

(Familie 2)

Die MPLC dieser Fraktion ergab 40 Fractionen, die zu 8 Sammelfractionen zusammengestellt wurden. Die DC-Kontrolle zeigt die Abb. 17:

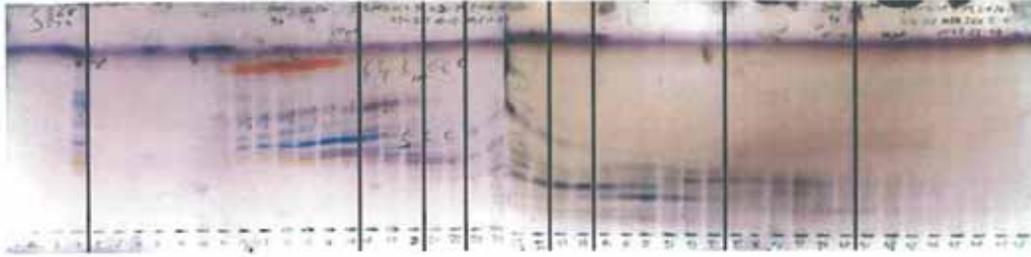


Abb. 17:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC12-15*: Die Grenzen der gebildeten 8 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Eine kleine Menge der Probe erschien an der Gradientenfront; ein Anzeichen für eine leichte Überlastung der Säule. Näheres siehe Text.

Lediglich die letzte Fraktion wurde einer Testung unterzogen; im Vergleich zur Kontrolle war die durch sie verursachte Senkung auf $59,2 \pm 4,2\%$ der Proliferation statistisch mit einem $p = 0,0022$ ($n = 6$) signifikant.

3.3.6.2.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC16-19*

(Familie 2)

Die MPLC dieser 17,7 mg schweren Fraktion ergab 52 Fraktionen, die zu den 11 Sammelfractionen 1-7, 8-14, 15-17, 18-20, 21-22, 23-25, 26-29, 30-32, 33-39, 40-51 und 52 zusammengestellt wurden. Die DC-Kontrolle zeigt die Abb. 18.

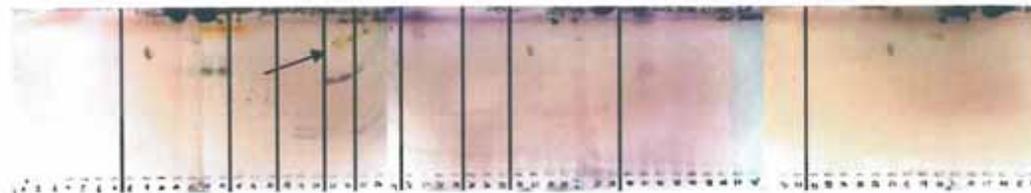


Abb. 18:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC16-19*: Die Grenzen der gebildeten 11 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Das gelb-orangene Substanzareal (schwarzer Pfeil) in der fünften Sammelfraktion stellt Progesteron dar. Näheres siehe Text.

Lediglich die Fraktion 8-14 kam zur Testung: Sie verursachte eine im Vergleich zur Kontrolle statistisch mit einem $p = 0,0022$ signifikante Senkung der Proliferationsrate des malignen Melanoms auf $22,2 \pm 2,1\%$. In Fraktion 21-22 befanden sich 2,6 mg einer im DC orange erscheinenden Substanz mit einem RF-Wert von 0,79. Nach Derivatisierung wurden GCMS-Experimente sowie in deuteriertem Chloroform verschiedene ^1H - und ^{13}C -NMR-Experimente zur Aufklärung der Struktur dieser Substanz durchgeführt.

Die gefundenen Kopplungskonstanten in Herz, die Multiplizitäten der ^1H -Signale, die Werte der chemischen Shifts im ^{13}C und ^1H Experiment sowie die Zuordnungen der Signale zu den einzelnen Atomen geht aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 3: Werte der chemischen Shifts im ^{13}C und ^1H Experiment sowie die Zuordnungen der Signale zu den einzelnen Atomen der im DC orange erscheinenden Substanz(en)

Position		Chemischer Shift ^a		Multiplizität	$J_{\text{H,C}}$ ^b (Kopplungskonstanten in Hertz)
^{13}C	^1H	^{13}C	^1H		
1	1a = eq	23.80	2.083 ^c	ND ^d	ND
	1b = ax	23.80	-1.72	ND	ND
2	2a = ax ^l	34.70	2.481	ddd	5.4 (1a), 14.7 (1b), 17.0 (2b)
	2b = eq ^l	34.70	2.289	dddd	1.1 (4), 3.2 (1a), 4.4 (1b), 17.0 (2a)
3	-	196.93	-	-	-
4	4	124.19	5.707	ddd/m ^f	0.6 (6b), 1.1 (2b), 1.9 (6a) ^f
5	-	175.09	-	-	-
6	6a = ax ^l	33.87	2.487	dddd	2.0 (4), 5.4 (7a), 13.9 (7b), 14.7 (6b)
	6b = eq ^l	33.87	2.307	dddd	0.5 (4), 2.5 (7a), 4.2 (7b), 14.7 (6a)
7	7a = eq	33.21	1.889	dddd	2.5 (6b), 3.6 (8), 5.4 (6a), 12.8 (7b)
	7b = ax	33.21	1.073	dddd	4.2 (6b), 11.7 (8), 12.8 (7a), 13.9 (6a)
8	8	36.82	1.637	dddd	3.6 (7eq), 10.7 (9), 11.7 (7b), 11.8 (14)
9	9	55.14	1.035	ddd	4.0 (11eq), 10.7 (8), 12.0 (11ax)
10	-	39.87	-	-	-
11	11a = eq	22.14	1.675 ^e	ND	ND
	11b = ax	22.14	1.499	dddd	1.6 (12a), 12.0 (9), 12.1 (12b), 13.1 (11a)
12	12a = eq	39.73	2.083 ^d	ND	ND
	12b = ax	39.73	1.524	ddd = dt	3.0 (11a), 12.1 (12a), 13.1 (11b)
13	-	45.08	-	-	-
14	14	57.20	1.235	ddd	6.7 (15a), 11.8 (8), 12.3 (15b)
15	15a = alph	25.31	1.739	dddd	0.3 (16a), 6.7 (14), 11.4 (16b), 11.4 (15b)
	15b = beta	25.31	1.287	dddd	5.8 (16b), 6.5 (16a), 11.4 (15a), 12.3 (14)
16	16a = beta	36.77	2.145	m (dddd)	0.3 (15a), 6.5 (15b), 9.2 (17), 11.7 (16b)
	16b = alph	36.77	1.675 ^e	m (dddd)	5.8 (15b), 9.0 (17), 11.4 (15a), 11.7 (16a)
17	17alpha	64.54	2.641	dddq	0.3 (21), 0.5 (18), 9.0 (16b), 9.2 (16a)
18	18	13.64	0.669	dd	0.5 (17), 0.5 (12a)
19	19	17.68	1.230	d	0.7 (4)
20	-	202.48	-	-	-
21	21	31.56	2.116	d	0.3 (17)

^a In bezug zu den Lösemittelsignalen bei 3.300 und 49.00 ppm

^b Beobachtet im 1D Spektrum und in einer Spektralsimulation angenähert

^c Überlappende Signale; H-16b erhalten durch 1D selektive TOCSY-Experimente

^d Isochrone Signale

^e ND: Nicht bestimmt

^f Die exakten J-Werte müssen dem Signalsplitting nach 0,63/1,07/1,88 Hertz betragen

Auf die Darstellung des eindimensionalen ^1H -Spektrums, aufgenommen bei 600 Mhz und des Massenspektrogrammes wurde hier verzichtet. Die ermittelte Stereochemie der Substanz zeigt die Abb. 19. Es handelt sich um Progesteron.



Abb. 19:

Veranschaulichung der Stereochemie des Progesterons aus *Juglans regia*. Komplette Trans-Konfiguration des B, C und D-Ringes im Lösemittel. Der Magnetisierungstransfer zum A-Ring durch die allylische Kopplung $^4J_{4,6a}$ ist bei $t_{max} = 15ms$ nahezu blockiert. Die komplette trans-diaxiale Konfiguration der Protonen H-6a(!)/7a/8/9/14 konnte so durch Doppelstrahlung der nahe beieinander Resonanz zeigenden Protonen H-7b and H-9 etabliert werden.

3.3.6.2.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC20-24* (Familie 2)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 17,4 mg wurde in sieben Sammelfractionen aufgeteilt wie aus der Abb. 20 der DC-Kontrolle hervorgeht. Die Sammelfraktion 26-30 war mittelstark, die Sammelfraktion 31-45 sehr stark, und die Fraktion 62 wieder nur mittelstark wirksam. Die Hemmung der Proliferationsrate auf $22,7 \pm 2,6\%$ der Kontrolle nach Applikation der Fraktion 31-45 war statistisch mit einem $p = 0,0022$ signifikant, die Hemmungen durch die weniger stark wirksamen Fraktionen waren ebenfalls mit einem von jeweils $p < 0,05$ statistisch signifikant.

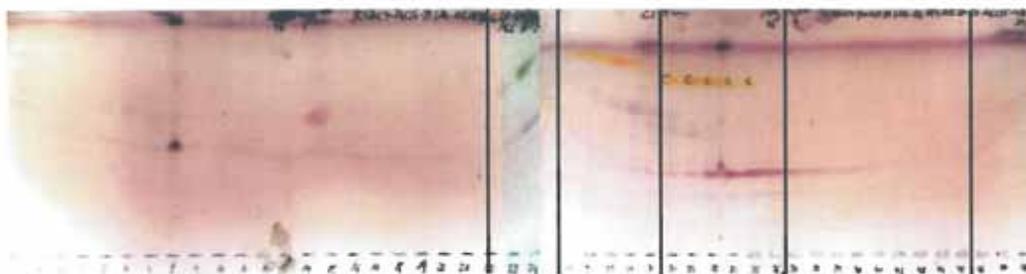


Abb. 20:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC20-24*: Die Grenzen der gebildeten 6 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe Text.

3.3.6.2.4 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC25-28* (Familie 2)

Die 9,7 mg dieser Fraktion wurden in 50 Fraktionen und schließlich acht Sammelfractionen unterteilt. Noch keine dieser Fraktionen wurde getestet.

3.3.6.2.5 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC29-33

(Familie 2)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 26,3 mg wurde in 55 Fraktionen und schließlich die neun Sammelfraktionen 1-12, 13-16, 17-18, 19-20, 21-24, 25-32, 33-38, 39-54 und 55 aufgeteilt (Abb. 21). Zwei dieser Fraktionen wurden bisher getestet; die Sammelfraktion 13-16, eine fast reine Substanz, verminderte das Wachstum des malignen Melanoms im Vergleich zur Kontrolle mit einem $p = 0,0022$ ($n = 6$) statistisch signifikant auf $12,5 \pm 0,4\%$ der unbeeinflussten Proliferation. Die Sammelfraktion neun war unwirksam.

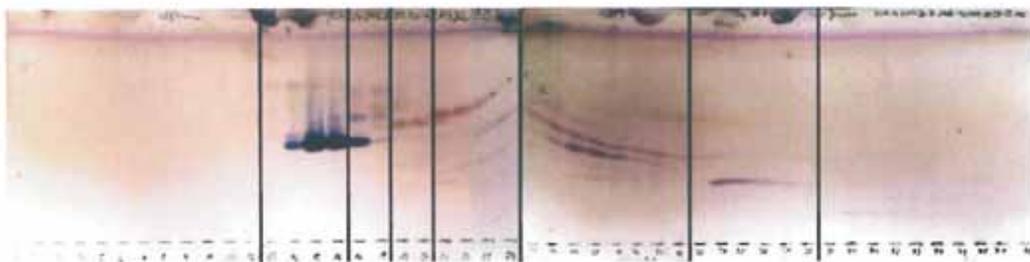


Abb. 21:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionen von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC29-33: Die Grenzen der gebildeten 8 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die beiden letzten Gruppen sind rechts abgeschnitten. Näheres siehe Text.

3.3.6.2.6 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC34-44

(Familie 2)

Die 61,4 mg dieser Fraktion wurden in 60 Fraktionen separiert und schließlich auf die Sammelfraktionen 1-2, 3-5, 6-7, 8-12, 13-14, 15-16, 17-20, 21-25, 26-31, 32-36, 37-45, 46-52, 53-58, 59 und 60 aufgeteilt. Die Fraktionen 3-5 und 37-45 waren unwirksam, während die anderen getesteten Fraktionen 6-7, 13-14, 17-20, 21-25, 26-31 und 32-36 teilweise außerordentlich stark antiproliferativ wirksam waren. Mit einem $p < 0,05$ wurden die Proliferationsraten der behandelten Melanomzelllinien im Vergleich zur Kontrolle jeweils statistisch signifikant auf Werte zwischen 14% und 51% der unbehandelten Kulturen gesenkt.

3.3.6.2.7 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC60-71

(Familie 2)

Diese 18,6 mg schwere Fraktion wurde zunächst in 51 Fraktionen aufgeteilt, die dann neun Sammelfraktionen zugeordnet wurden. Es handelte sich um die Fraktionen 1-12, 13-15, 16-22, 23-25, 26-28, 29-31, 32-36 und 37-51. Die Fraktionen 1-12, 13-15, 23-25, 32-36, und 37-51 wurden auf antiproliferative Aktivität getestet; die erste war nur wenig wirksam. Sie senkte die Proliferation des Melanomes mit einem $p = 0,1797$ statistisch nicht signifikant auf $72,8 \pm 29\%$ des Wertes der unbehandelten Kulturen. Die Fraktionen 13-15 und 23-25 hemmten die Proliferation nicht, während sowohl die Fraktion 32-36 mit einer Senkung der Proliferationsrate auf $22,2 \pm 12,1\%$ als auch die Fraktion 37-51 mit einer Senkung der Proliferationsrate auf $39,5 \pm 16,7\%$ der unbehandelten Kontrollkulturen im Vergleich statistisch mit einem p von jeweils $p = 0,0022$ signifikant aktiv waren.

3.3.6.2.8 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC72-84

(Familie 2)

Die 6,1 mg dieser Fraktion wurden in 49 Fraktionen aufgeteilt, die den sieben Sammelfraktionen 1-18, 19-20, 21-26, 27-30, 31-33, 34-48 und 49 zugeordnet wurden. Aus Gewichtsgründen wurden nur die beiden letzten Fraktionen getestet - sie waren inaktiv.

3.3.6.2.9 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC85

(Familie 2)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 25 mg wurde 66 Unterfraktionen und diese 11 Sammelfraktionen zugeteilt: 1-16, 17-19, 20-21, 22-25, 26-29, 30-36, 37-45, 46-49, 50-64, 65 und 66. Getestet wurden abermals nur drei Fraktionen; die Sammelfraktion 17-19 war unwirksam; die Sammelfraktion 50-64 senkte die Proliferationsrate des Melanoms im Vergleich zur unbehandelten Kulturen auf $19,7 \pm 4,5\%$, die Fraktion 65 auf $35,5 \pm 10\%$; dies waren im Vergleich zu den Werten der Kontrollkulturen mit p -Werten von jeweils $p = 0,0022$ ($n = 6$) statistisch signifikante Effekte.

Obwohl, wie besonders aus den Darstellungen der DC hervorgeht, einige Substanzen aus dieser Familie auf dieser Ebene schon rein waren, wurden sie, bis auf das Progesteron, noch nicht eingehender untersucht oder gar in der Struktur aufgeklärt.

3.3.6.3 DCCC der drei wirksamen Fraktionen aus der Trennung von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5*: MC281-331, 332-551, 552-627 (Familie 3)

In allen drei DCCC wurde ein Zweiphasensystem, bestehend aus einem Gemisch aus Benzol, Chloroform, Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 5:5:7:2 v:v:v:v, im absteigenden Modus, gewählt. Die Probe wurde jeweils nach Lösung in 10 ml Unterphase injiziert. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min, die Fraktionierungsfrequenz eine Fraktion pro 45 min. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte jeweils mit einem Gemisch aus Hexan und Ethylacetat in einem Verhältnis von 60:40 v:v. Überblick über diese Familie 3 verschafft Abb. 45 (siehe Anhang)

3.3.6.4 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331* (Familie 3)

Diese 311 mg schwere Fraktion wurde in 59 Fraktionen aufgetrennt. Die Grenzen der 7 gebildeten Fraktionsgruppen 1-9, 10-17, 18-29, 30-38, 39-54, 55-58 und 59 sind der Abb. 22 zu entnehmen.

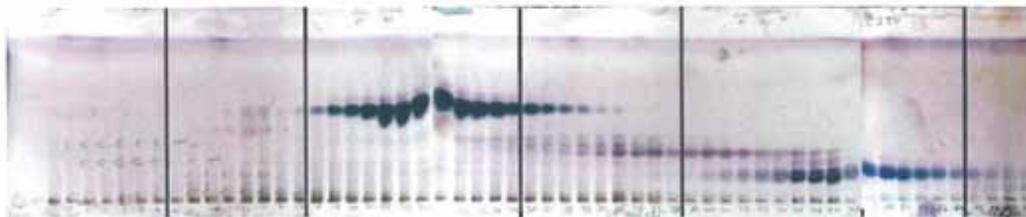


Abb. 22:

DC-Kontrolle der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5*. MC281-331: Die Grenzen der gebildeten 7 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die letzte Gruppe ist rechts abgeschnitten. Näheres siehe Text.

Die Ergebnisse der Untersuchung der proliferationshemmenden Aktivitäten der einzelnen Fraktionen sind im Diagramm 18 dargestellt; alle Fraktionen erwiesen sich als aktiv. Die Applikation der Fraktionsgruppen 18-29 und 39-54 senkte die Proliferation des malignen Melanoms sogar bis auf $12,9 \pm 1,1\%$ bzw. $13,5 \pm 13,2\%$ der Proliferationsrate der unbehandelten Kontrollen; verglichen mit letzteren waren die Unterschiede statistisch mit einem $p = 0,0011$ jeweils signifikant.

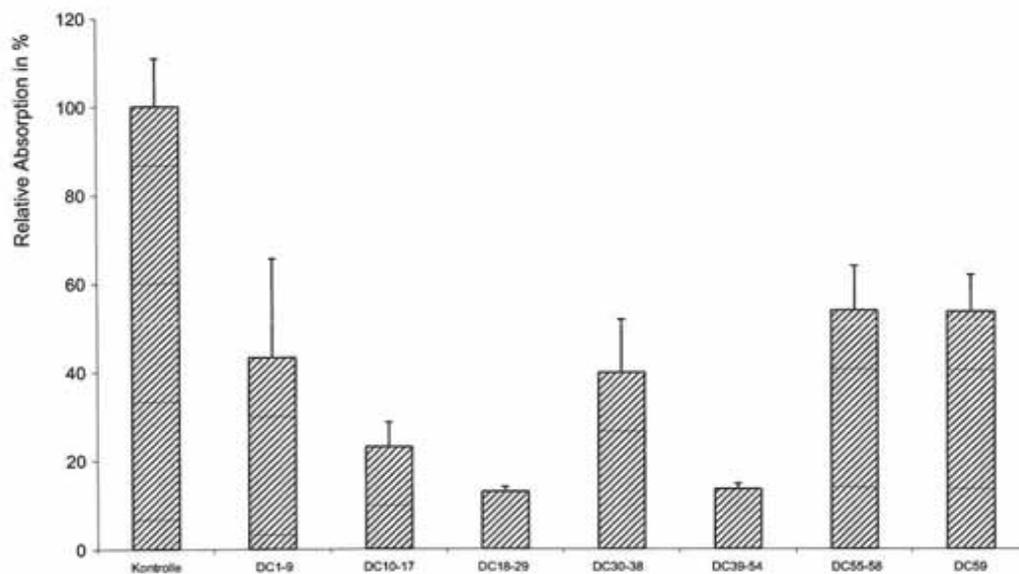


Diagramm 18:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MPLC5*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fractionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe Text.

Daher wurden alle Sammelfractionen separat per MPLC auf der siebten Fraktionierungsebene weiterverarbeitet.

3.3.6.4.1 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551* (Familie3)

Hier ist erwähnenswert, dass eine Probe der Fraction in einem Vorversuch das Zweiphasensystem aus n-Heptan, Methanol und Wasser vollständig entmischte, jedoch nicht das oben genannte Zweiphasensystem. Auf dieses Verhalten der Fraction wird bei der Beschreibung der Fraktionierungsebene 7 näher eingegangen.

Die Fraction MPLC332-551 mit einem Gesamtgewicht von 0,311 g wurde in 134 Fractionen aufgetrennt und in 12 Sammelfractionen 1-17, 18-27, 28-40, 41-47, 48-54, 55-58, 59-68, 69-72, 73-77, 78-90, 91-133 und 134 zusammengefasst- siehe Abb. 23.

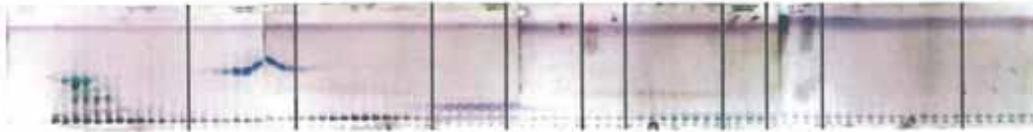


Abb. 23:

DC-Kontrolle der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5. MC332-551*: Die Grenzen der gebildeten 12 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die zwei letzten Gruppen sind rechts abgeschnitten. Näheres siehe Text.

Wie aus dem Diagramm 19 ersichtlich, erwiesen sich alle Fraktionsgruppen als zumindest mäßig aktiv. Außerdem war eine deutliche Zweiteilung der Stärke der Aktivität zu beobachten: Die ersten fünf Sammelfractionen senkten das Tumorstadium auf bis zu 20% des Wachstums der unbehandelten Kulturen, während die restlichen Fraktionen das Wachstum lediglich auf etwa 60% dessen der Kontrollkulturen senkte.

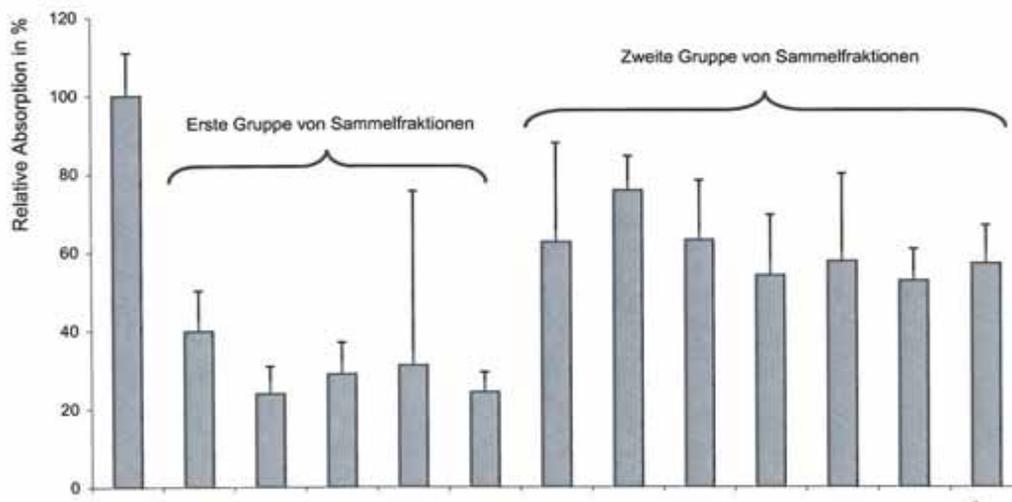


Diagramm 19:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34. VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402 nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe Text.

Der Effekt der beispielsweise durch die Fraktion 18-27 vermittelten Proliferationshemmung auf $24 \pm 6,9\%$ verglichen mit der der Kontrolle war statistisch mit einem $p = 0,0011$ signifikant; der Effekt der Proliferationshemmung der Fraktion 69-72 als Beispiel für eine weniger wirksame Fraktion auf $63,1 \pm 15,2\%$ war mit einem $p = 0,0011$ statistisch ebenso signifikant. Dies galt mit einem $p < 0,05$ für alle Fraktionen. Sie wur-

den aufgrund ihrer chromatographischen Unähnlichkeit ebenfalls separat per MPLC auf der siebten Fraktionierungsebene weiterverarbeitet.

3.3.6.4.2 DCCC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627* (Familie3)

Die 0,221 g schwere Sammelfraktion MC552-627 wurde in 104 Fraktionen und 5 Sammelfraktionen 1-20, 21-28, 29-45, 46-103 und 104 aufgetrennt, wie die Abb. 24 der DC-Kontrolle illustriert.



Abb. 24:

DC-Kontrolle der DCCC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5. MC552-627*: Die Grenzen der gebildeten 5 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die beiden letzten Gruppen sind am rechten Rand teilweise abgeschnitten. Näheres siehe Text.

Die Untersuchung der proliferationshemmenden Aktivitäten der einzelnen Fraktionsgruppen, dargestellt im Diagramm 20, zeigt, dass die Sammelfraktionen 1-20 und 104 unwirksam waren. Die Applikation der Sammelfraktion 21-28 senkte das Wachstum auf $29,6 \pm 10,8\%$, verglichen mit der Kontrolle mit einem $p = 0,0011$ ein statistisch signifikanter Effekt. Die Senkung der Proliferationsraten auf $40 \pm 12,7\%$ respektive $63,4 \pm 15,2\%$ durch die Sammelfraktionen 29-45 und 46-103 waren mit p -Werten von $p = 0,0011$ im ersten Fall statistisch signifikant, im zweiten mit einem $p = 0,2478$ jedoch nicht. Die drei genannten Sammelfraktionen wurden auf der siebten Fraktionierungsebene per MPLC weiter aufgetrennt.

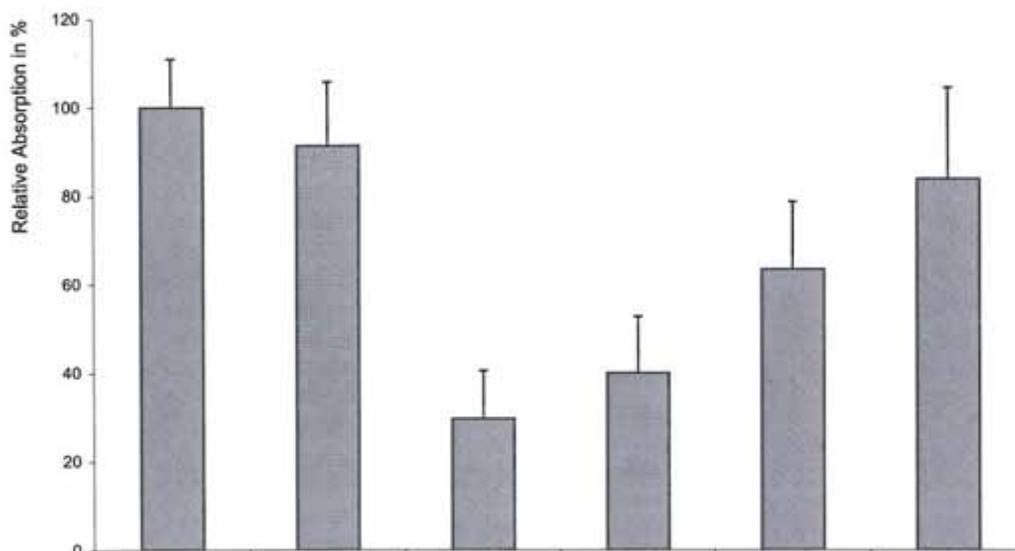


Diagramm 20:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der DCCC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fractionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe Text.

3.3.6.5 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3* (Familie 4)

Im Folgenden nun die Beschreibung der MPLC der in der DCCC der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2 + 3* erhaltenen Fractionen. Die Trennungen sowie jegliche nun folgenden MPLC-Trennungen fanden unter denselben Bedingungen wie diejenigen der Fractionen *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS4.DC* (siehe Seite 81) statt. Lediglich die Flussrate betrug 1 ml/min, die Fractionierung erfolgte in 12-minütigen Abständen. Die DC-Kontrollen wurden mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 97:3 v:v entwickelt.

Zur Zusammenstellung der Sammelfractionen wurden wiederum lediglich DC-Gesichtspunkte berücksichtigt, und eine Testung erfolgte nur dann, wenn genügend Gewicht der Fraktion vorhanden war; anderenfalls verschob sich die Testung der Substanzen auf einen Zeitpunkt nach deren Strukturaufklärung. Allerdings war das Gewicht oftmals so hoch, dass es eine Testung der Aktivität erlaubte. Aus Platzgründen wird auf die Darstellung der DC-Kontrollen verzichtet.

Überblick über diese Familie 4 verschafft Abb. 46 (siehe Anhang, Seite 148).

3.3.6.5.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC1-2*

(Familie4)

Die MPLC dieser 60,4 mg Fraktion ergab 133 Fraktionen, die zu den 8 Sammelfractionen 1-22, 23-29, 30-66, 67-73, 74-120, 121-131, 132 und 133, zusammengestellt wurden, wobei es sich bei den Fraktionen 132 und 133, wie generell bei den Endfraktionen, um das Waschelut der Säule mit verschiedenen Lösungsmitteln, im vorliegenden Fall mit 0,5%iger Trifluoressigsäure in Methanol handelte. Die Ergebnisse der Proliferationstests zeigt das Diagramm 21; alle Fraktionen waren mehr oder weniger aktiv; die Effekte waren jeweils mit p-Werten von $p = 0,0022$ statistisch signifikant.

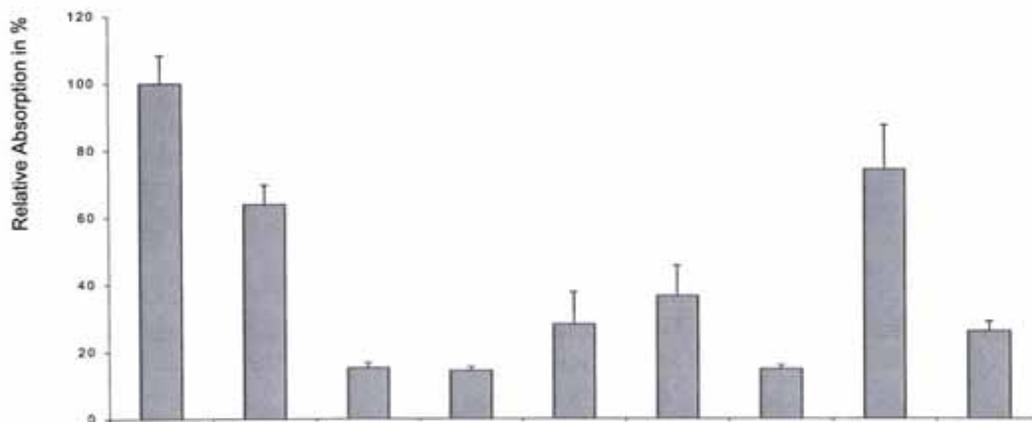


Diagramm 21:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC1-2*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe Text.

3.3.6.5.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC3-10*

(Familie 4)

Die MPLC dieser 738 mg Fraktion resultierte in 76 Fraktionen, die zu den 11 Fraktionsgruppen 1-13, 14-17, 18-20, 21-25, 26-34, 35-45, 46-51, 52-60, 61-66, 67-75 und 76 zusammengestellt wurden. Mit Senkungen der Proliferationsraten auf durchweg unter 20% der Proliferationsrate der Kontrolle wirkten alle getesteten Sammelfractionen außerordentlich stark antiproliferativ. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollkulturen waren diese wachstumshemmenden Effekte mit p-Werten von durchweg $p = 0,0022$ ($n = 6$) statistisch signifikant.

3.3.6.5.3 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC11-17

(Familie 4)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 50,7 mg wurde in 72 Fraktionen, und diese wiederum in vier Sammelfraktionen unterteilt. Während die Sammelfraktion 1-18 mit einer Senkung des Wachstums auf $57 \pm 16,4\%$ dessen der unbehandelten Kontrolle nur eine mäßige, mit einem $p = 0,0649$ ($n = 6$) statistisch nicht signifikante Hemmung bewirkte, wiesen die anderen drei Sammelfraktionen jeweils mit einem $p = 0,0022$ im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe einen statistisch signifikanten antiproliferativen Effekt auf das maligne Melanom auf; dabei handelte es sich um die Fraktion 19-37 mit einer Senkung auf des Wachstums auf $14,2 \pm 0,5\%$, die Fraktion 38-71 mit einer Senkung auf $13,5 \pm 0,6\%$ und die Fraktion 72 mit einer Senkung auf $14,4 \pm 1,5\%$ des Wachstums der unbehandelten Kontrollen.

3.3.6.5.4 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC18-25

(Familie 4)

Die 65 mg dieser Fraktion wurden in 63 Fraktionen und schließlich in acht Fraktionsgruppen 1-20, 21-30, 31-37, 38-41, 42-49, 50-53, 54-62 und 63 unterteilt. Alle Fraktionen bis auf die Sammelfraktionen 38-41, 50-53 und 54-62 wurden getestet; sie bewirkten jeweils einen außerordentlich starken antiproliferativen Effekt, indem sie die Proliferationsrate der mit ihnen behandelten Zellkulturen auf durchweg unter $18 \pm 1,2\%$ der der unbehandelten Zellkulturen senkten. Verglichen mit den Proliferationsraten der Kontrollgruppe waren diese Effekte mit einem p von jeweils $p = 0,0022$ statistisch signifikant.

3.3.6.5.5 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC26-37

(Familie 4)

Per MPLC wurde diese 300,7 mg Fraktion in 88 Fraktionen, und schließlich in sechs Sammelfraktionen aufgeteilt. Bis auf die erste Sammelfraktion 1-20, die die Wachstumsrate des malignen Melanoms lediglich auf $81,3 \pm 35,8\%$ senkte, waren die übrigen Sammelfraktionen 21-28, 29-32, 33-56, 57-87 und 88 jeweils mit einer Senkung der Proliferationsrate auf unter 15% der der unbehandelten Kontrollgruppe außerordentlich aktiv. Während der Effekt der Sammelfraktion 1-20 statistisch im Vergleich zu den un-

behandelten Kontrollen nicht signifikant war, waren die beobachteten Aktivitäten der anderen Fraktionen jeweils mit einem $p = 0.0022$ statistisch signifikant.

3.3.6.5.6 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC38-43

(Familie 4)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 271 mg wurde mittels MPLC in 86 Fraktionen aufgetrennt. Analog zu denen aus der vorhergegangenen Trennung waren die gebildeten sechs Sammelfraktionen, bis auf die erste Sammelfraktion 1-28, die die Wachstumsrate des malignen Melanoms lediglich auf $78,6 \pm 24,8\%$ senkte, jeweils mit einer Senkung der Proliferationsrate auf etwa 14% der der unbehandelten Kontrollgruppe außerordentlich aktiv. Es handelte sich dabei um die Sammelfraktionen 29-40, 41-42, 43-47, 48-61 und 62-86. Während der Effekt der Sammelfraktion 1-20 statistisch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht signifikant war, waren die beobachteten Aktivitäten der anderen Fraktionen jeweils mit einem $p = 0.0022$ statistisch signifikant.

3.3.6.5.7 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC44-54

(Familie 4)

Diese 245,7 mg Fraktion wurde in 51 Fraktionen aufgeteilt. Von den gebildeten sieben Sammelfraktionen waren die Anfangsfraktion 1-21 und die Endfraktionen 32-49, 50 und 51 mit Wachstumssenkungen nicht unter 49% nur mäßig wirksam; verglichen mit denen der Kontrolle waren diese Effekte statistisch mit p-Werten von $p = 0,0931$ für die Anfangsfraktion, $p = 0,0649$ respektive $p = 3939$ und $p = 2403$ (jeweils $n = 6$) für die drei letzteren Fraktionen statistisch nicht signifikant. Die drei mittleren Fraktionen 22, 23 und 24-31 bewirkten jedoch eine Wachstumssenkung auf $34 \pm 26,4\%$ respektive $13 \pm 0,9\%$ und $16,1 \pm 1,6\%$ des Wachstums der unbehandelten Kontrollen; verglichen mit ihnen waren die Unterschiede mit p-Werten von $p = 0,0931$ respektive $p = 0,0022$ und $p = 0,0152$ (jeweils $n = 6$) im ersten Fall nicht, in den zwei letzteren jedoch statistisch jeweils signifikant.

3.3.6.5.8 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC55-66*

(Familie 4)

Die 405,8 mg dieser Fraktion wurden in 103 Fraktionen, und diese wiederum in acht Sammelfractionen unterteilt (siehe Abb. 25). Die erste Sammelfraction 1-20 bewirkte eine Steigerung des Wachstums auf $109,9 \pm 13,3\%$ des spontanen Tumorwachstums des malignen Melanoms, verglichen mit den unbehandelten Kontrollgruppen mit einem $p = 0,5887$ statistisch jedoch nicht signifikant. Während die letzte der Sammelfractionen, die Fraktion 103, keinen Effekt hatte, senkten die übrigen Fraktionen 21-30, 31-37, 38-50, 51-58, 59-71 und 72-102 die Proliferationsrate jeweils bis auf etwa 20% der spontanen Tumorphiliferation, Effekte, die verglichen mit den Kontrollwerten jeweils statistisch mit einem $p = 0,0022$ statistisch signifikant waren.



Abb. 25:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC55-66*: Die Grenzen der Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe im Text.

3.3.6.5.9 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC67-76*

(Familie 4)

Diese Fraktion mit einem Gewicht von 495,1 mg wurde per MPLC in 74 Fraktionen aufgetrennt und zu den sechs Fraktionsgruppen 1-33, 34-40, 41-47, 48-50, 51-72 und 73-74 zusammengestellt (Abb. 26).



Abb. 26:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC67-76*: Die Grenzen der gebildeten 6 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Sammelfraction 73-74 stellt den anfangs noch zur Sicherheit fraktionierten Nachlauf dar. Näheres siehe im Text.

Die Effekte dieser Fraktionen sind im folgendem Diagramm dargestellt:

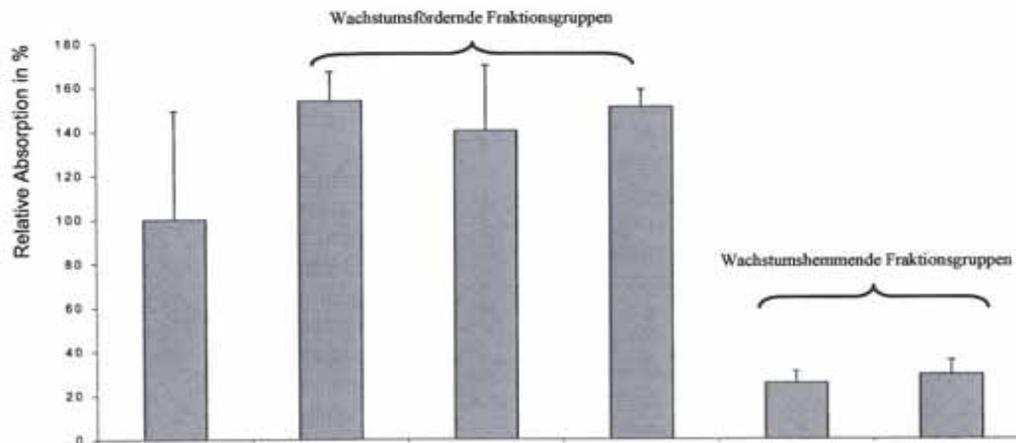


Diagramm 22:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC67-76*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fraktionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Trotz der insgesamt hemmenden Eigenschaften der Gesamtfraktion sind wachstumsfördernde Fraktionsgruppen enthalten.

Wie erwartet, fand sich eine starke antiproliferative Aktivität mit Wachstumssenkungen auf $25,4 \pm 5,4\%$ respektive $29,2 \pm 6,5\%$ durch die Anwendung der Fraktionen 51-72 und 73-74, verglichen mit den Kontrollen mit einem $p = 0,0411$ beziehungsweise einem $p = 0,0152$ statistisch jeweils signifikant. Die drei ersten Sammelfractionen bewirkten jedoch eine Steigerung des Tumorwachstums auf $153,8 \pm 13,2\%$, $140,2 \pm 29,5\%$ und $150,8 \pm 7,9\%$ dessen der unbehandelten Kontrollen; verglichen mit diesen waren die Unterschiede mit p -Werten von $p = 0,0411$ respektive $p = 0,0043$ und $p = 0,0152$ statistisch ebenfalls signifikant. Die Sammelfraction 48-50 wurde aus Gewichtsgründen nicht untersucht. Diese Beobachtung eines stark gesteigerten Tumorwachstums bildet eine Parallele zum Effekt der Trennung der Fraction *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC55-66*, die das Wachstum ebenfalls steigerte. Da die beiden Sammelfractionen, deren Subfractionen das Wachstum steigerten, als benachbarte Geschwisterfractionen eng verwandt sind, ist anzunehmen, dass sich in den das Wachstum steigernden Subfractionen als vermittelnder Wirkträger ein und dieselbe Substanz befindet. Insgesamt überwog die antiproliferative Komponente der Sammelfractionen DC55-66 und 67-76, so dass in der Gesamtschau lediglich eine relativ schwache Wachstumshemmung zu beobachten war.

3.3.6.5.10 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC113-132* (Familie 4)

Diese 40,3 mg Fraktion wurde in 47 Fraktionen aufgetrennt. Die sechs Sammelfraktionen waren die Fraktionen 1-15, 16-21, 22-29, 30-37, 38-46 und 47. Die drei letzteren wurden getestet; während die Fraktion 30-37 keinen Effekt aufwies, senkten die Fraktionen 38-46 und 47 im Vergleich zur Kontrolle das Wachstum mit einem $p = 0,0649$ im ersten Fall statistisch nicht, mit einem $p = 0,0411$ im zweiten jedoch statistisch signifikant auf $46,2 \pm 20,8\%$ und $31,5 \pm 8,2\%$ dessen der Kontrollen.

3.3.6.5.11 MPLC der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC2+3.DC188-208* (Familie 4)

Die 49,2 mg dieser Fraktion wurden in 116 Fraktionen aufgetrennt. Die fünf Sammelfraktionen waren die Fraktionen 1-35, 36-56, 57-84, 85-115 und 116. Während die beiden ersten Sammelfraktionen unwirksam waren, hemmten die Sammelfraktionen 57-84 und 85-115 das Tumorwachstum auf $35,2 \pm 4,4\%$ beziehungsweise $61,8 \pm 30,4\%$ dessen der Kontrollkulturen. Dies war mit einem $p = 0,3939$ respektive $p = 0,0649$ jeweils statistisch jedoch nicht signifikant. Die Fraktion 116, der Nachlauf der Säule, steigerte die Proliferationsrate des malignen Melanoms auf $114,9 \pm 38,8\%$ der unbehandelten Kontrollen; im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit einem $p = 0,1797$ jedoch ebenfalls statistisch kein signifikanter Effekt.

3.3.6.6 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC* (Familie 5)

Im Folgenden nun die Beschreibung der MPLC der in der DCCC der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4* erhaltenen Fraktionen. Es wurde dieselbe Säule unter denselben Bedingungen wie bei der Auftrennung der Fraktionen *DC2+3.DC* verwendet (siehe Seite 91). Es gelten dieselben Vorbemerkungen; auch die Gewichte dieser Fraktionen waren meist für eine Testung ausreichend. Überblick über diese Familie 5 verschafft Abb. 47 (siehe Anhang, Seite 149).

3.3.6.6.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC1-13*

(Familie 5)

Die Chromatographie dieser 31 mg Fraktion ergab 74 Fraktionen, die zu den 6 Sammelfraktionen 1-21, 22-28, 29-43, 44-64, 65-72 und 73-74 zusammengestellt wurden, die alle die Tumorproliferation auf etwa 20% der der unbehandelten Kontrollkulturen senkten. Verglichen mit diesen waren die Effekte der Fraktionen jeweils mit einem $p = 0,0022$ (jeweils $n = 6$) statistisch signifikant.

3.3.6.6.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19*

(Familie 5)

Durch die Auftrennung dieser Fraktion eines Gewichtes von 66,4 mg ergaben sich 62 Fraktionen, die zu den 7 Fraktionsgruppen 1-23, 24-28, 29-33, 34-40, 41-56, 57-61 und 62 zusammengefasst wurden (siehe Abb. 27).

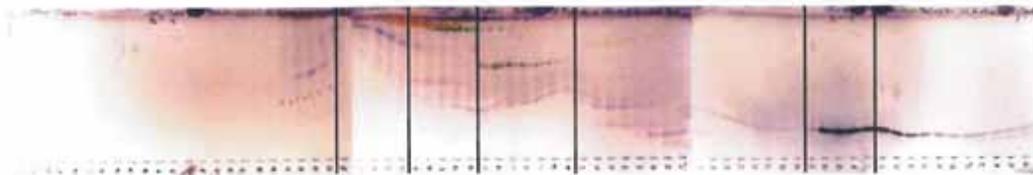


Abb. 27:

DC Kontrolle der MPLC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19*: Die Grenzen der gebildeten 7 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Sammelfraktion 62 stellt den fraktionierten Nachlauf dar. Näheres siehe im Text.

Auch diese Fraktionen waren sämtlich aktiv und hemmten die Tumorproliferation auf durchweg unter 15% der der unbehandelten Kontrollkulturen. Verglichen mit diesen waren die Effekte der Fraktionen jeweils mit einem $p = 0,0022$ statistisch signifikant. Lediglich die Fraktionen 57-61 und 62 wiesen mit einer Proliferationshemmung auf $61,3 \pm 14,9\%$ beziehungsweise $62,5 \pm 7,1\%$ des Ausgangswertes schwächere Aktivitäten auf. Jedoch waren auch diese mit einem p von jeweils $p = 0,0022$ statistisch signifikant.

3.3.6.6.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC20-36*

(Familie 5)

Der Versuch dieser Auftrennung mit einem Gewicht von 372,8 mg scheiterte, da sich auch bei geringsten Flussraten wesentlich zu hohe Pumpdrücke aufbauten.

3.3.6.6.4 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43

(Familie 5)

Diese 139,8 mg Fraktion wurde in 50 Fraktionen und schließlich sieben Sammelfraktionen, nämlich die Fraktionen 1-18, 19-22, 23-31, 32-37, 38-48, 49 und 50 aufgeteilt. Während die letzte Fraktion unwirksam war, senkte die erste Fraktion die Tumorphroliferation auf $54,2 \pm 4,4\%$ der der Kontrollen, was mit einem $p = 0,0022$ einen statistisch signifikanten Effekt darstellte. Die anderen Sammelfraktionen bewirkten jeweils einen sehr starken antiproliferativen Effekt: Sie senkten die Proliferationsrate der mit ihnen behandelten Zellkulturen auf durchwegs unter 15% der der unbehandelten Zellkulturen. Diese Effekte waren mit einem p von jeweils $p = 0,0022$ (jeweils $n = 6$) statistisch signifikant.

3.3.6.6.5 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC44-48

(Familie 5)

Durch MPLC wurde diese Fraktion mit einem Gewicht von 85,4 mg in 73 Fraktionen und schließlich in die acht Fraktionsgruppen 1-11, 12-16, 17-21, 22-25, 26-35, 36-51, 52-72 und 73 aufgeteilt. Lediglich die Fraktionen 22-25, 26-35, 36-51, 52-72 wurden getestet; die erste senkte das Tumorwachstum auf $31,8 \pm 13,2\%$ dessen der Kontrollkulturen, die drei letzteren sogar bis auf $13,6 \pm 2,2\%$, $14 \pm 0,9\%$ und $14,4 \pm 1,6\%$ dessen der Kontrollkulturen. Diese Effekte waren mit p -Werten von jeweils $p = 0,0022$ statistisch signifikant.

3.3.6.6.6 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC49-62

(Familie 5)

Diese 101,8 mg Fraktion wurde in 78 Fraktionen aufgetrennt. Beispielhaft für diese Serie von MPLC sind die Aktivitäten der gebildeten Sammelfraktionen im Diagramm 23 dargestellt. Während die zwei ersten Sammelfraktionen wie auch die letzte mit p -Werten von $p = 0,0411$ respektive $p = 0,0022$ und $p = 0,0022$ statistisch zwar signifikante, doch lediglich geringe Effekte verursachten, waren die übrigen Fraktionen jeweils mit einem $p = 0,0022$ (jeweils $n = 6$) verglichen mit den Kontrollkulturen statistisch signifikant stark antiproliferativ wirksam.

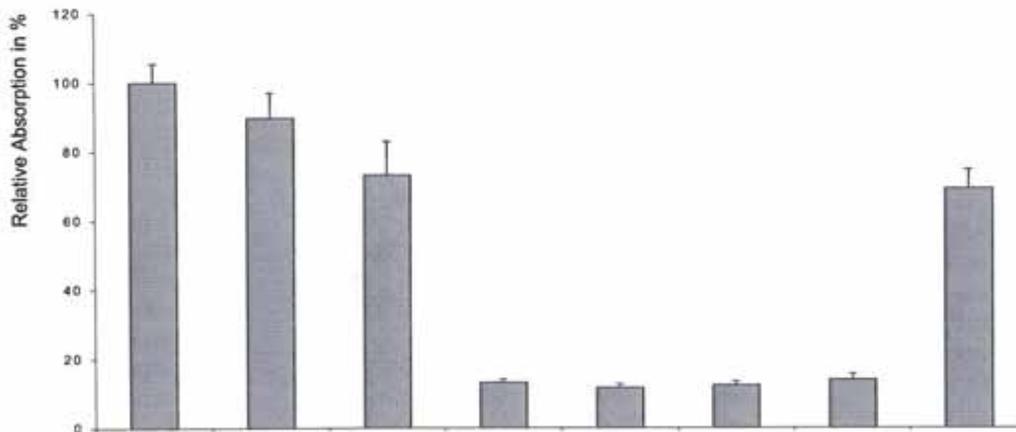


Diagramm 23:

BrdU-Testung der antiproliferativen Aktivität der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC49-62*: Auf der Ordinate ist die relative Absorption bei 402nm in Prozent der Kontrolle, auf der Abszisse sind die Fractionen rechts neben der Kontrolle aufgetragen. Näheres siehe im Text.

3.3.6.6.7 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC63-85* (Familie 5)

Die obige Fraktion mit einem Gewicht 198 mg wurde in 65 Fractionen aufgeteilt. Beispielhaft für diese Serie von MPLC zeigt die Abb. 28 die DC-Kontrolle der Fractionen:



Abb. 28:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC63-85*: Die Grenzen der gebildeten 11 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Sowohl Sammelfraktion 9 als auch 10 enthalten relativ reine Substanzen. Näheres siehe im Text.

Es sind auf den Platten nach der Detektion noch etwa 15 Substanzareale zu sehen, die 15 enthaltenen Substanzen in den 11 Gruppen 1-14, 15+16, 17-22, 23-25, 26-28, 29-32, 33-35, 36-38, 39-46, 47-64 und 65 zuzuordnen sind. Bis zu sechs dieser Substanzen befinden sich in einer Sammelfraktion, deren Grenzen anhand der senkrechten Markierungen auszumachen sind; die meisten Fractionen sind jedoch nur noch geringergradig komplex, und Fraktion 39-46 scheint eine relativ reine Substanz zu beinhalten. Getestet wurden lediglich die Sammelfractionen 29-32 und 33-35; sie senkten die Tumorphilife-

rationsraten auf $91,4 \pm 5,5\%$ beziehungsweise $73,6 \pm 7,2\%$ derer der unbehandelten Kontrollen; diese geringfügigen Effekte waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.3.6.6.8 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC138

(Familie 5)

Die 22,6 mg dieser Fraktion wurden in 61 Subfraktionen, und schließlich in die neun Sammelfraktionen 1-16, 17-21, 22-26, 27-34, 35-38, 39-43, 44-51, 52-60 und 61 unterteilt. Lediglich die Fraktionen 17-21 und 27-34 wurden getestet.

Während erstere das Tumorwachstum außerordentlich stark auf $9\% \pm 0,7$ dessen der unbehandelte Kulturen senkte, wurde es durch die zweite auf $38\% \pm 1,6$ des Wachstums der unbehandelten Kontrollen gesenkt. Diese Effekte waren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem p von jeweils $p = 0,0022$ ($n = 6$) statistisch signifikant.

Obwohl auch in dieser Familie 5 von miteinander verwandten Fraktionen und Substanzen schon auf dieser Trennebene Reinsubstanzen erhalten wurden, wurden sie in ihrer Struktur ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Einige der hochwirksamen, wenig komplexen Gemische wurden auf den Fraktionierungsebenen sieben, acht und neun weiter bearbeitet. Dazu wurden zueinandergehörige Fraktionen sinnvoll so wiedervereinigt, dass zunächst über mehrere Sammelfraktionen verteilte Substanzanteile wieder zusammengefügt wurden. Dies wird weiter unten vorgestellt.

3.3.7 Fraktionierungsebene 7

Es folgt nun die Beschreibung der MPLC der in der HSCCC der Fraktion JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65 (Familie 1) gewonnenen Fraktionen. Es wurde abermals dieselbe Säule unter den üblichen Bedingungen genutzt. Es gelten dieselben Vorbemerkungen; jedoch wurde noch keine der in diesen Trennungsgängen erhaltenen Reinsubstanzen auf antiproliferative Aktivität getestet. Abb. 43 zeigt den Stammbaum der Familie 1 (siehe Anhang, Seite 145).

3.3.7.1.1 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.

HS1-24 (Familie 1)

Diese dünn-schichtchromatographisch nur noch zwei Substanzen enthaltende Sammelfraktion mit einem Gewicht von 5,6 mg wurde in 23 Fraktionen aufgeteilt, die später in

vier Sammelfractionen zusammengefasst wurden: 1-12, 13-18, 19-22 und der Nachlauf, die Fraktion 23 (Abb. 29). Die beiden gesuchten Substanzen konnten voneinander separiert werden; die erste war in der Sammelfraktion 13-18, die zweite in der Sammelfraktion 19-22 enthalten.

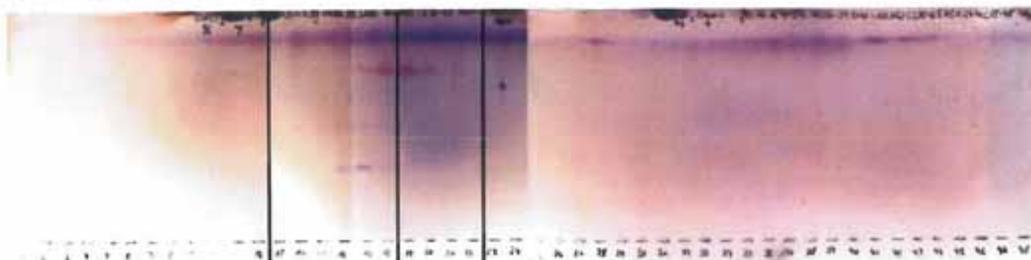


Abb. 29:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS1-24*: Die Grenzen der gebildeten 4 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe im Text.

3.3.7.1.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS25-29 (Familie1)*

Diese, dünnschichtchromatographisch die beiden als „F“ und „L“ bezeichneten Substanzen enthaltende Fraktion mit einem Gewicht von 6,7 mg wurde in 20 Fraktionen aufgeteilt, die später in die Sammelfractionen 1-14, 15-19 und 20 eingeteilt wurden.

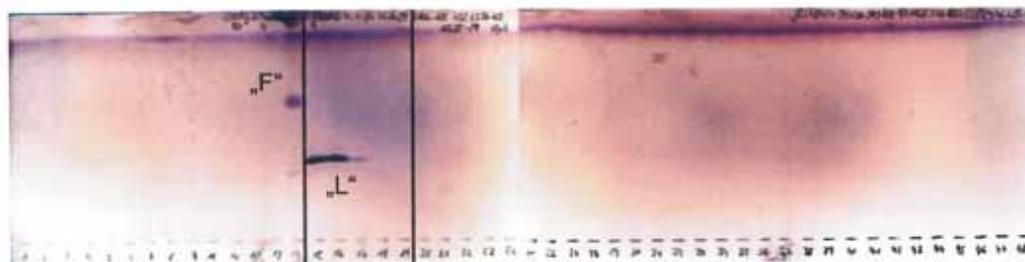


Abb. 30:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS25-29*: Die Grenzen der gebildeten 3 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Vollständige Separierung der Substanzen „F“ und „L“. Näheres siehe Text.

. Die erste Sammelfraktion enthielt die Substanz F, die zweite Sammelfraktion die Substanz L. Die Substanz F stellte sich, untersucht durch GCMS und $^1\text{H-NMR}$ als **Dibutylphthalat** heraus; vermutlich abermals, wie in *JR1* eine Verunreinigung aus den Lösemitteln. Die Substanz L, die als einer der Wirkträger der Fraktion HS2 der vierten Trennebene angesehen werden kann, wurde noch keiner eingehenderen Untersuchung

unterzogen. Zur Demonstration der Reinheit der Substanz ist die DC-Kontrolle des Laufes hier in Abb. 30 dargestellt.

3.3.7.1.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS30-37* (Familie 1)

Die in der HSCCC der Fraktion MC36-65 erhaltene Fraktion HS30-37 enthielt die mit „J“ und „H“ bezeichneten Stoffe. Die 11,7 mg wiegende Fraktion wurde in 47 Unterfraktionen aufgeteilt. Es wurden fünf Sammelfraktionen gebildet: 1-19, 20-27, 28-35, 36-46 und 47 (Abb. 31). Die Substanz „J“ war in der Sammelfraktion 28-35, die Substanz „H“ in der Sammelfraktion 20-27 enthalten. Da sich beide Substanzen aber noch überlappten, werden beide noch weiter aufgereinigt werden müssen. Als besonders geeignet scheint hierfür die Recyclingchromatographie am selben System zu sein, da schon eine partielle Trennung erreicht werden konnte. Vermutlich werden nach zwei bis drei Wiederholungsschritten beide Substanzen voneinander getrennt in Reinform vorliegen.



Abb. 31:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS30-37*: Die Grenzen der gebildeten 5 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe im Text.

3.3.7.1.4 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS2.MC36-65.HS38-42* (Familie 1)

Diese 8 mg Fraktion wurde in 42 Fraktionen getrennt. Sie wurden in vier Sammelfraktionen aufgeteilt: 1-16, 17-40, 41 und 42. Die Fraktion 41 enthielt 2,5 mg der Substanz „E“ in Reinform.

3.3.7.2 Keine Fraktionierungsebene 7 der Familie 2

Die Fraktionierungsebene 7 entfiel bei der Familie 2, da eine Strukturaufklärung bei zu geringem Gewicht der einzelnen Fraktionen nicht möglich war.

3.3.7.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-627.DC* (Familie 3)

Bei den MPLC der in der DCCC der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*, *MC332-551* und *MC552-627* gewonnenen Fraktionen wurde nochmals dieselbe Säule unter den üblichen Bedingungen verwendet. Aus Gewichtsgründen wurden mit Blick auf die oben genannten Ziele der Erhaltung einer möglichst großen Masse nur relativ wenige Testungen durchgeführt. Trotz eines relativ geringen Gewichtes sind die erhaltenen Fraktionen noch relativ komplex. Überblick über folgenden Strang gibt Abb. 45 (siehe Anhang).

3.3.7.3.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*. *DC10-17* (Familie 3)

In dieser MPLC der 32,9 mg wiegenden Sammelfraktion wurden 72 Fraktionen erhalten und auf die 13 Fraktionsgruppen 1-17, 18+19, 20-22, 23+24, 25-27, 28-32, 33+34, 35-38, 39-44, 45-50, 51-56, 57-64 und 65-72 aufgeteilt (Abb. 32). Die Fraktionen wurden noch nicht weiter getestet; sie sind noch relativ komplex; einzig die Sammelfraktion 23+24 stellt ein Zweiergemisch dar.

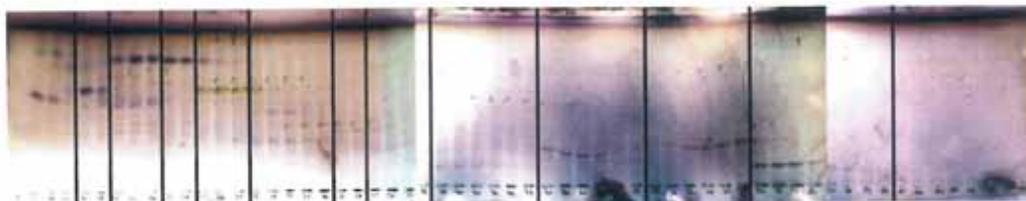


Abb. 32:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331.DC10-17*: Die Grenzen der gebildeten 13 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Näheres siehe im Text.

3.3.7.3.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*. DC18-29 (Familie 3)

Die 130,7 mg dieser Fraktion wurden in 77 Subfraktionen, und diese in 11 Sammelfraktionen 1-17, 18+19, 20-23, 24-26, 27+28, 29-33, 34-38, 39-48, 49-57, 58-75 und 76+77 aufgeteilt, die antiproliferativ wirkten; lediglich die Fraktionen 18+19 und 27+28 wurden aufgrund des geringen Gewichtes, und die Fraktion 76+77 aufgrund von Lösungsproblemen nicht getestet. Die Inhibitionen der Proliferation des malignen Melanoms auf bis zu 10% der Proliferationsraten der Kontrollkulturen waren jeweils mit einem $p = 0,0022$ (jeweils $n = 6$) beziehungsweise $p = 0,0043$ bei der Fraktion 58-75 statistisch signifikant. In dieser Fraktionierung verteilte sich eine Substanz über alle Fraktionen; dies mag daran gelegen haben, dass sie in sehr großer Menge vorhanden ist.

3.3.7.3.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*. DC30-38 (Familie 3)

In diesem Trenngang verteilte sich wieder eine Substanz über einige Fraktionen, offenbar dieselbe wie in dem vorher beschriebenen Trenngang. Nunmehr konnte die Substanz in der Sammelfraktion 13 + 14 jedoch rein gewonnen werden. Die 38,6 mg der oben genannten Fraktion wurden in 60 Fraktionen und diese wiederum in die 10 Fraktionsgruppen 1-10, 11+12, 13+14, 15-17, 18-26, 27-31, 32-46, 47-50, 51-58 und 59+60 unterteilt.

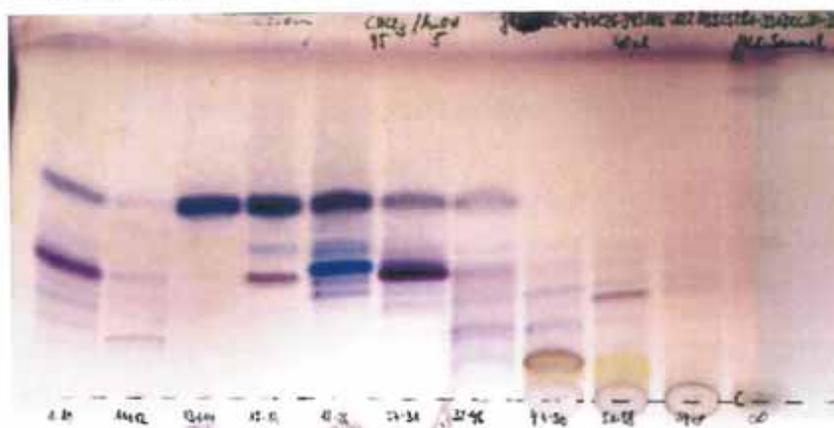


Abb. 33:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionsgruppen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*. DC30-38: Jede Bahn stellt eine Fraktionsgruppe dar. In Fraktionsgruppe 3 eine Reinsubstanz. Näheres siehe im Text.

Abb. 33 zeigt die DC-Kontrolle der Sammelfraktionen; das verwendete Fließmittel zur Entwicklung der Platten war ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 95:5 v:v. Am wenigsten komplex war die Fraktion 13 + 14, in der die gewonnene Reinsubstanz enthalten war. Am höchsten komplex waren mit jeweils fünf enthaltenen Substanzen die Fraktionen 18-26, 32-46 und 47-50. Die Fraktionen 18-26 und 27-31 waren antiproliferativ aktiv; die übrigen Fraktionen wurden noch nicht getestet.

Obige DC verdeutlicht, dass einerseits aus dieser Fraktionsgruppe schon Reinsubstanzen gewonnen wurden; andererseits jedoch weisen insgesamt die erhaltenen Fraktionen bei einer noch relativ hohen Komplexität ein geringes Gewicht auf, so dass es nicht wahrscheinlich erscheint, alle in dieser Gruppe vorhandenen wirksamen Substanzen in ihrer chemischen Struktur aufklären zu können.

3.3.7.3.4 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC281-331*. DC39-54 (Familie 3)

Die 66,9 mg dieser Fraktion wurden in 70 Subfraktionen, und diese in 9 Sammelfraktionen 1-18, 19-21, 22-24, 25+26, 27-32, 33+34, 35-42, 43-69 und den Nachlauf, Nummer 70, aufgeteilt.

Die erste Sammelfraktion war wirkte nicht proliferationshemmend; die Fraktionen 27-32, 33+34 und 35-42 senkten die Tumorphiliferationsrate auf $13,7 \pm 0,9\%$, $14,2 \pm 1,1\%$ und $13 \pm 0,6\%$ der der Kontrollkulturen; diese Effekte waren mit p-Werten von jeweils $p = 0,0022$ (jeweils $n = 6$) statistisch signifikant. Die restlichen Sammelfraktionen wurden nicht getestet.

3.3.7.3.5 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5*. MC332-551.DC1-17 (Familie 3)

Der Versuch, diese Fraktion mit einem Gewicht von 44,2 mg in einer HSCCC mit dem Zweiphasensystem bestehend aus Toluol, Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis von 5:5:7:2 v:v:v:v im absteigenden Modus weiter aufzutrennen, misslang aufgrund der Thixotropie der Fraktion. Vor dem Neustart des Geräts verstopfte sie die Säule. Sie wurde wieder gewonnen, und in einer MPLC in 63 Fraktionen aufgeteilt. Diese Subfraktionen wurden den Sammelfraktionen 1-15, 16+17, 18+19, 20-22, 23, 24-27, 28-53, 54-61 und 62+63 zugeteilt. Getestet wurden die Fraktionen 16+17, 20-22, 23,

28-53 und 62+63. Bis auf die Fraktion 20-22, die unwirksam war, wirkten alle getesteten Fraktionen mittelstark antiproliferativ. Die Proliferationshemmungen des Tumors auf Werte zwischen $35,4 \pm 9,8\%$ und $83,5 \pm 6,6\%$ der Proliferation der unbehandelten Kontrollgruppen waren jeweils mit einem $p < 0,05$ ($n = 6$) statistisch signifikant. Zwei Substanzen waren rein.

3.3.7.3.6 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551.

DC18-27 (Familie3)

Die 30,8 mg dieser Fraktion wurden in 68 Subfraktionen, und diese in 10 Sammelfraktionen 1-4, 5-11, 12-21, 22-33, 34-37, 38-41, 42-45, 46-53, 54-66 und 67+68 aufgeteilt. In Fraktion 22-33 lag eine Reinsubstanz vor, deren Aktivität mit einer Wachstumshemmung der Melanomkultur auf $13,9 \pm 0,8\%$ der Proliferationsrate der Kontrollkulturen mit einem $p = 0,0022$ statistisch signifikant war. Die letzten beiden Fraktionen wirkten ebenfalls stark proliferationshemmend: Sie senkten die Proliferationsraten verglichen mit der Kontrolle auf $22 \pm 2,3\%$ respektive $18,4 \pm 1,7\%$; Effekte, die mit einem p-Wert von jeweils $p = 0,0022$, statistisch ebenfalls signifikant waren. Die übrigen Fraktionen wurden nicht untersucht.

3.3.7.3.7 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551.

DC28-40 (Familie3)

In dieser MPLC der 25,5 mg wiegenden Sammelfraktion wurden 65 Fraktionen gewonnen und auf die neun Sammelfraktionen 1-6, 7-11, 12-17, 18-22, 23-27, 28-34, 35-45, 46-64 und 65 aufgeteilt. Lediglich die letzten beiden Fraktionen wurden bis jetzt getestet: Sie waren mittelstark bis schwach proliferationshemmend wirksam, indem sie die Proliferationsraten verglichen mit den Kontrollkulturen auf $53,9 \pm 22\%$ respektive $75,9 \pm 14,1\%$ senkten ($p = 0,0043$ bzw. $p = 0,0152$). Die übrigen Fraktionen wurden noch nicht weiter getestet.

3.3.7.3.8 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC332-551.

DC41-54 (Familie3)

Per MPLC wurde diese 20,2 mg schwere Fraktion in 54 Fraktionen aufgetrennt. Sie wurden in fünf Sammelfraktionen 1-18, 19-27, 28-37, 38-52 und 53+54 zusammenge-

fasst. Die Fraktion 28-37 bewirkte eine Proliferationshemmung auf $12,9 \pm 0,7$ % der Proliferation unbehandelter Kontrollen, ein mit einem $p = 0,0022$ ($n = 6$) statistisch signifikanter Effekt. Sie beinhaltet eine relativ reine Substanz mit einem Gewicht von 16,2 mg. Die übrigen Fraktionen wurden bisher noch nicht getestet.

3.3.7.3.9 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5.MC552-627. DC21-28 (Familie3)

Durch MPLC wurde diese Fraktion mit einem Gewicht von 16,9 mg in 56 Fraktionen, und schließlich in acht Sammelfraktionen aufgeteilt: 1-13, 14-21, 22-32, 33-38, 39-45, 46-51, 52-54 und 55+56. Eine Substanz konnte in Fraktion 52-54 rein gewonnen werden. Eine Testung der Aktivitäten fand noch nicht statt.

3.3.7.3.10 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5. MC552-627. DC29-45 (Familie3)

Diese 7,1 mg Fraktion wurde in 68 Fraktionen, und diese wiederum in fünf Sammelfraktionen aufgeteilt. Es waren die Sammelfraktionen 1-16, 17-21, 22-45, 46-67 und 68. Keine der Fraktionen wurde bisher getestet.

3.3.7.3.11 MPLC von JR2MD.VC4-34.VC26-39.S106-122.HS5. MC552-627. DC46-103 (Familie3)

Diese 19,2 mg wiegende Fraktion wurde in 32 Fraktionen separiert. Es gab folgende Sammelfraktionen: 1-10, 11-22, 23-30 und 31+32. Die Fraktionen 1-10 und 31-32 wurden auf Aktivität hin untersucht: Während erstere mit einer Senkung der Tumorphiliferation auf $78,8 \pm 8,3\%$ der der Kontrollkulturen eher schwach wirkte, zeigte die letztere mit einer Senkung der Proliferationsrate auf $19,1 \pm 1,5\%$ eine starke Aktivität. Beide Effekte waren mit einem p von jeweils $p = 0,001$ statistisch signifikant.

3.3.7.4 Keine Fraktionierungsebene 7 der Familie 4

Die Fraktionsebene 7 entfiel bei der Familie 4, da eine Strukturaufklärung bei zu geringem Gewicht der einzelnen Fraktionen nicht möglich war.

3.3.7.5 Fraktionierungsebene 7 der Familie 5

In diesen MPLC wurde nicht nur eine Separation nach den Kriterien angestrebt, die unter Material und Methoden schon beschrieben worden sind, sondern es sollten direkt Substanzen isoliert werden, die vorher anhand der DC festgelegt wurden. Ein besonderer Aspekt dabei war es, durch Zusammenfügen von gleichen, aber in benachbarten Fraktionen sich befindenden Substanzen ein möglichst hohes Gewicht der Isolate zu erreichen. Alle Trennungen fanden an einer 42 cm langen, 0,9 cm durchmessenden Säule statt, die mit 15 g der beschriebenen Cyanophase gefüllt war; sie wurde wie eine Normalphasensäule eluiert. Keine dieser Fraktionen wurde bisher *in vitro* getestet. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen diesen nur noch wenig komplexen Fraktionen sind hochgradig komplex. Ein Überblick verschafft folgende Abb. 48 (siehe Anhang).

3.3.7.5.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28* (Familie 5)

Diese MPLC wurde durchgeführt, um den Hauptbestandteil der hochwirksamen und nur noch wenig komplexen Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28* zu isolieren. Dazu wurden 29 Fraktionen in die vier Sammelfraktionen 1-19, 20, 21-28 und 29 aufgeteilt.



Abb. 34:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28*: Die Grenzen der gebildeten 4 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Gruppe 29 stellt den rechts abgebildeten fraktionierten Nachlauf dar. Der sich schlecht abbildende orangeleuchtende Hauptbestandteil ist gekennzeichnet. Näheres siehe im Text.

Entsprechend der Abb. 34 der DC-Kontrolle enthielt die Fraktion 20 den Hauptbestandteil, in der DC orangeleuchtend, rein; die Fraktion 21-28 ebenfalls, allerdings nicht in

sauberer Form. Die Fraktion 1-19 enthielt einen anderen Stoff, der sich über drei Fraktionen erstreckt.

Fraktion 1-19 wurde mit der Fraktion MC1-17 aus der Aufarbeitung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33* vereinigt und soll per MPLC weiter getrennt werden.

In den parallel getrennten „Schwester“-Fraktionen fand sich ebenfalls die im DC orangeleuchtende Substanz. Daher wurde Fraktion 20 mit der Fraktion MC18 aus der Aufarbeitung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33*, der Fraktion 1-25 aus der Aufarbeitung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28.MC21-28* und der Fraktion 1-24 aus der Aufarbeitung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC19-26* vereinigt (Die vier Fraktionen sind in der Abb. 48 des Anhangs zusätzlich mit einem Kreis gekennzeichnet). Diese Mischfraktion „Orange“ wurde auf der Fraktionierungsebene 9 per MPLC weiter aufgereinigt.

Die Fraktion 21-28 wurde direkt weiter getrennt (8.Ebene). Alle Trennungen fanden abermals an derselben Säule unter denselben Bedingungen statt.

3.3.7.5.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33* (Familie 5)

In dieser MPLC sollte der Hauptbestandteil der oben genannten Fraktion gewonnen werden. Es resultierten 60 Fraktionen, die wiederum zu den Sammelfraktionen 1-17, 18, 19-26, 27-33, 34-41, 42-44, 45-59 und 60 wiedervereinigt wurden.

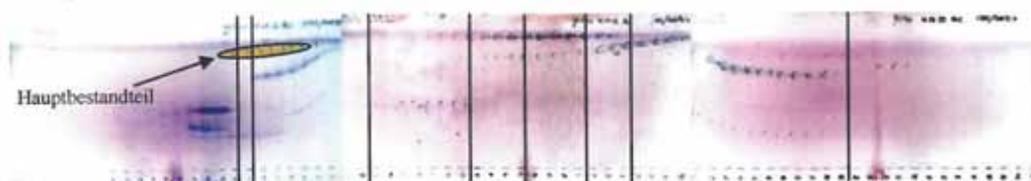


Abb. 35:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33*: Die Grenzen der gebildeten 8 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Gruppe 60 stellt den rechts abgebildeten fraktionierten Nachlauf dar. Zu beachten ist die deutliche Ähnlichkeit mit der Fraktion MC24-28. Näheres siehe im Text.

Die obige Abbildung (Abb. 35) der DC-Kontrolle der erhaltenen Sammelfraktionen aus dieser eng mit der vorher beschriebenen Fraktion MC24-28 verwandten Fraktion ergab

eine ähnliche Situation: Die Fraktion 18 enthielt den in der DC orangeleuchtenden Hauptbestandteil, denselben wie in der Fraktion 20 aus der Fraktion MC24-28, rein. Fraktion 19-26 enthielt ihn ebenfalls, allerdings nicht in reiner Form. Die Fraktion 1-17 enthielt einen anderen Hauptbestandteil, der in der Abbildung schwach erkennbar ist, nämlich den gleichen, der in der Fraktion 1-19 der MC24-28 enthalten war. Dementsprechend wurden wie oben detailliert beschrieben wiedervereinigt.

3.3.7.5.3 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.* MC34-40 (Familie 5)

Diese Fraktion wurde 53 Subfraktionen, und diese wiederum den Sammelfraktionen 1-29, 30-34, 35-41, 42-45, 46-52 und 53 zugeordnet. Die Fraktion 35-41 enthielt die gesuchte Hauptsubstanz in Reinform.

3.3.7.5.4 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.* MC41-56 (Familie 5)

Diese Fraktion wurde in 45 Subfraktionen aufgeteilt, und diese wiederum den Sammelfraktionen 1-28, 29-31, 32+33, 34, 35-39, 40-44 und 45 zugeordnet. Die Fraktion 35-39 enthielt die gesuchte Hauptsubstanz, jedoch durch eine zweite Substanz verunreinigt. Die Hauptsubstanz scheint nicht dieselbe zu sein wie die in der Fraktion MC35-41 aus der vorher beschriebenen Trennung.

3.3.7.5.5 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.* MC1-18 (Familie 5)

Diese Fraktion konnte mit dem beschriebenen System nicht getrennt werden.

3.3.7.5.6 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.* MC19-22 (Familie 5)

Die Trennung dieser Fraktion ergab 37 Subfraktionen, die den neun Sammelfraktionen 1-6, 7-11, 12-14, 15+16, 17+18, 19-22, 23-27, 28-36 und 37 zugeteilt wurden:

Die Fraktion 23-27 enthielt eine der gesuchten Substanzen rein. Fraktion 15+16 enthielt zwei der gesuchten Substanzen, weshalb diese Fraktion einer weiteren MPLC unterzogen wurde; ebenso wurde mit der Fraktion 17-18 verfahren, die drei Substanzen ent-

hielt. Zur Reingewinnung einer in der Fraktion 28-36 enthaltenen „gelben“ Substanz, die durch eine weitere verunreinigt war, wurde die Fraktion zunächst mit der Subfraktion 34 aus der Auftrennung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC32-37* und der Sammelfraktion *MC47-68* aus der Auftrennung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC23-31* wiedervereinigt, um per MPLC diese gelbe Substanz weiter aufzureinigen.

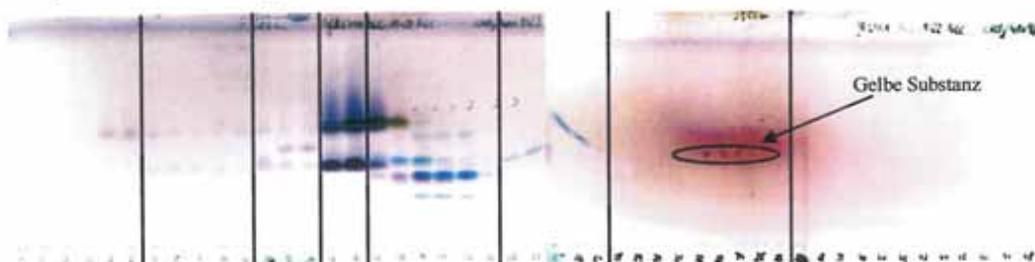


Abb. 36:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC19-22*: Die Grenzen Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Der fraktionierte Nachlauf ist rechts abgeschnitten. Näheres siehe im Text.

3.3.7.5.7 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC23-31* (Familie 5)

Die MPLC dieser Fraktion ergab 69 Fraktionen, die in die sieben Sammelfractionen 1-13, 14-28, 29-33, 34-38, 39-46, 47-68 und 69 eingeteilt wurden. Abermals konnte eine Substanz rein gewonnen werden. Die oben erwähnte gelbe Substanz war in der Fraktion 47-68 enthalten; daher wurde sie, wie oben beschrieben, mit zwei anderen diese Substanz enthaltenden Fraktionen zusammengeführt und gemeinsam einer weiteren Trennung unterzogen.

3.3.7.5.8 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC32-37* (Familie 5)

Diese Sammelfraktion wurde in 34 Subfraktionen und schließlich in die Sammelfractionen 1-19, 20-24, 25-33 und 34 eingeteilt (siehe Abb. 37). Die Sammelfraktion 34 war ebenfalls eine derjenigen, die zur weiteren Aufreinigung der gesuchten gelben Substanz herangezogen wurden. Fraktion 1-19 enthielt ein Zweiergemisch von Substanzen, welches sich auch in der Sammelfraktion *MC15-20* aus der im Folgenden beschriebenen Auftrennung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC38-*

48 befand. Daher wurden die beiden Fraktionen vereinigt und für eine weitere MPLC vorbereitet, um beide potentiell hochwirksamen Substanzen rein zu gewinnen.

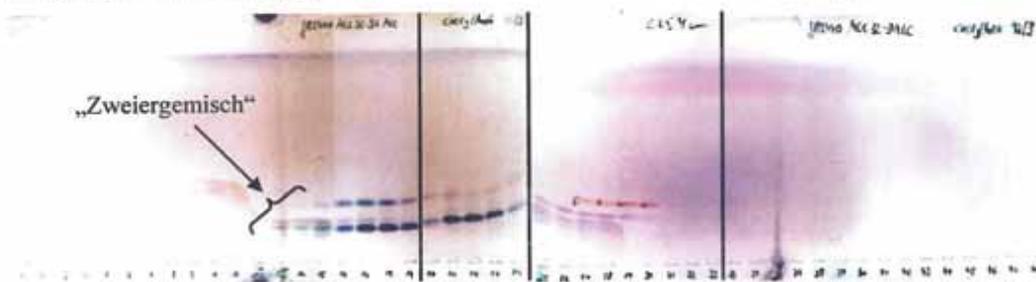


Abb. 37:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC32-37*: Die Grenzen der gebildeten 4 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Gruppe 34, der fraktionierten Nachlauf, enthielt Spuren der schon erwähnten „gelben Substanz“ aus der MC 19-22. Näheres siehe im Text.

3.3.7.5.9 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC38-48* (Familie 5)

In diesem Trennungsgang wurden aus der obigen Fraktion 42 Subfraktionen und schließlich die sechs Sammelfractionen 1-11, 12-14, 15-20, 21-35, 36-41 und 42 gewonnen (siehe Abb. 38). Die Sammelfraktion 15-20 enthielt das beschriebene Zweiergemisch der gesuchten Stoffe, welches mit der Fraktion MC1-19 aus dem vorher beschriebenen Trennungsgang wiedervereinigt wurde.

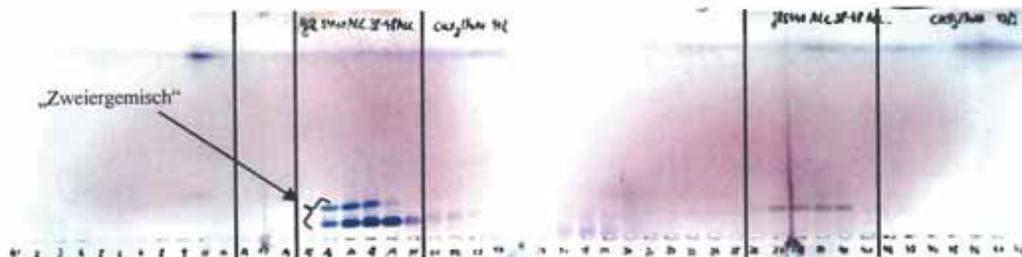


Abb. 38:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC38-48*: Die Grenzen der gebildeten 6 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Gruppe 42 stellt den rechts abgebildeten fraktionierten Nachlauf dar. Näheres siehe im Text.

3.3.7.5.10 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC49* (Familie 5)

Diese Fraktion wurde in 46 Subfraktionen und anschließend in die acht Sammelfractionen 1-5, 6-15, 16-25, 26-30, 31-33, 34-38, 39-45 und 46 eingeteilt.

3.3.8 Fraktionierungsebene 8

Weitere Auftrennung der in der Fraktionierungsebene 7 separierten Fraktionen und wiedervereinigten Gemische der „Familie 5“

3.3.8.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28.MC21-28* (Familie 5)

In dieser Trennung wurden 29 Fraktionen gewonnen und zu den drei Sammelfraktionen 1-25, 26-28 und 29 wieder zusammengefügt (siehe Abb. 39). Die Sammelfraktion 1-25 wurde der Mischfraktion „Orange“ hinzugefügt (siehe Abb. 48 im Anhang; zusätzlich mit einem Kreis unterlegt). Die beiden letzten Sammelfraktionen wurden der Sammelfraktion MC25-30 aus der im Folgenden beschriebenen Trennung der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC19-26* hinzugefügt.



Abb. 39:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28.MC21-28*: Die Grenzen der gebildeten 3 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Gruppe 29 stellt den rechts abgebildeten fraktionierten Nachlauf dar. Näheres siehe im Text.

3.3.8.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC19-26* (Familie 5)

Die in dieser Trennung gewonnenen 31 Subfraktionen wurden in die drei Sammelfraktionen 1-24, 25-30 und 31 aufgeteilt (DC siehe Abb. 40). Die Sammelfraktion 25-30 wurde wie beim vorherigen Trennungsgang beschrieben mit zwei von dort stammenden Fraktionen wiedervereinigt (in Abb. 48 im Anhang mit einem Rechteck markiert), die

Sammelfraktion 1-24 der Mischfraktion „Orange“ beigefügt (in Abb. 48 im Anhang mit einem Kreis markiert).

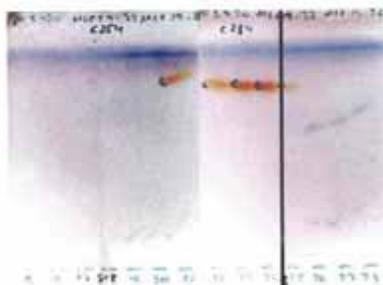


Abb. 40:

DC-Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC19-26*: Die Grenzen der Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Der fraktionierte Nachlauf, die Fraktion 31 ist nicht dargestellt. Näheres siehe im Text.

3.3.8.2.1 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC19-22.MC15+16* (Familie 5)

Diese Fraktion wurde in 74 Subfraktionen aufgetrennt, die schließlich acht Sammelfractionen zugeordnet wurden. Die beiden gesuchten Substanzen konnten rein gewonnen werden.

3.3.8.2.2 MPLC von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC19-22.MC17+18* (Familie 5)

Aus dieser Fraktion wurden 49 Unterfraktionen gewonnen, die acht Sammelfractionen zugeteilt wurden. Die DC-Kontrolle der Fraktionen, dargestellt in der Abb. 41, zeigt beispielhaft für diese Fraktionierungsebene, dass alle drei zu isolierenden Substanzen weitgehend voneinander getrennt werden konnten.

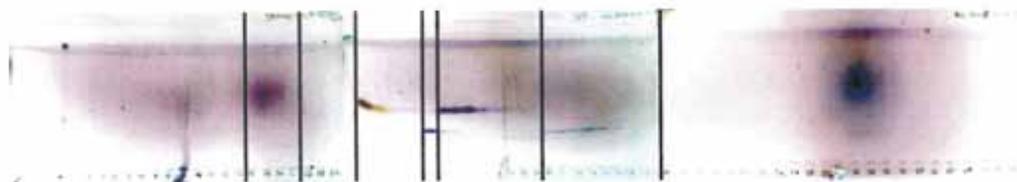


Abb. 41:

DC- Kontrolle der MPLC-Fractionen von *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC19-22.MC17+18*: Die Grenzen der gebildeten 8 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Substanzen konnten weitgehend voneinander separiert werden. Näheres siehe im Text.

3.3.8.3 MPLC des aus den Fraktionen *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC37-43.MC32-37.MC1-19* und *.MC38-48.MC15-20* zusammengesetzten Gemisches (Familie 5)

Diese Trennung erfolgte um das Zweiergemisch dieser beiden Fraktionen zu separieren (siehe Abb. 48 im Anhang; zusätzlich gekennzeichnet durch ein Sechseck). Es wurden 116 Fraktionen gewonnen, die auf die sieben Sammelfraktionen 1-7, 8-11, 12-17, 18-99, 100-110, 111-115 und 116 aufgeteilt wurden. Die beiden gesuchten Substanzen konnten rein gewonnen werden.

3.3.9 Fraktionierungsebene 9 (Familie 5)

Weitere MPLC-Auftrennung der Mischfraktion, genannt „Orange“ bestehend aus den vier Fraktionen (in der Abb. 48 im Anhang zusätzlich mit einem Kreis markiert):

JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28.MC20,

JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC18,

JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC24-28.MC21-28.MC1-25,

JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19.MC29-33.MC19-26.MC1-24

In der MPLC dieses Gemisches wurden 86 Fraktionen erhalten, die anschließend 12 Sammelfraktionen zugeteilt wurden: 1-11, 12-17, 18-66, 67-70, 71, 72, 73, 74-77, 78+79, 80, 81-85 und 86. Wie aus der Abb. 42 der DC-Kontrolle hervorgeht, befand sich die gesuchte Substanz in der Fraktion 81-85, separiert von den beiden Verunreinigungen, die in den Fraktionen 72 respektive 78-79 ebenfalls als Reinsubstanzen gewonnen wurden. Die Substanz wurde bisher weder getestet noch in ihrer Struktur aufgeklärt.

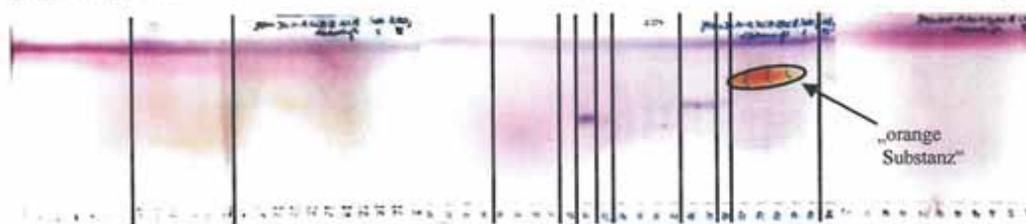


Abb. 42:

DC-Kontrolle der MPLC-Fraktionen der Mischfraktion „orange“ zur Isolierung der gesuchten orangenen Substanz: Die Grenzen der gebildeten 12 Fraktionsgruppen sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Die Substanz konnte rein gewonnen werden. Die Fraktion 18-66 ist gestaucht dargestellt Näheres siehe im Text.

Die Hochrechnung der Komplexität des Gemisches aus *JR1* wird durch die hier gezeigte Diversität von Substanzen bis auf die neunte Trennebene in ihrer Größenordnung in Frage gestellt. Vermutlich ist eine wesentlich höhere Zahl von verschiedenen Substanzen vorhanden als hochgerechnet.

Insgesamt wurden bei dieser Fraktionierung in die Tiefe der Fraktion *JR2MD.VC4-34.VC26-39.S123-154.DC4.DC14-19*, deren „Nachkommenschaft“ mit ihren Verwandtschaftsverhältnissen in der Abb. 48 (siehe Anhang, Seite 150) dargestellt ist, etwa 12 Reinsubstanzen gewonnen, die aufgrund verschiedener DC-Eigenschaften zwei voneinander distinkten Substanzklassen angehören werden. Einige werden sich der Aufklärung entziehen, aber bei vielen wird sie möglich sein. Wie nun diskutiert werden wird, erweckt die hohe Diversität wirksamer Substanzen im Walnussextrakt ganz besondere Hoffnung darauf, dass sich darunter einige finden, die klinisch anwendbar sein könnten.

4 Diskussion

4.1 Experimentelle Vorgehensweise und Ergebnisdarstellung.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit behandelt eine Übertragung der Allelopathie bei der einheimischen Walnuss, *Juglans regia*, eine vom wissenschaftlichen Standpunkt aus betrachtet in das Gebiet der Botanik einzuordnenden Beobachtung, in das Gebiet der Biologie, speziell in das Gebiet der Tumorbologie.

Dieser der Definition nach rein induktive Ansatz beinhaltet folgende Hypothesen:

1. Der allelopathische Charakter sei von Substanzen getragen, die aufgrund der biologischen Ähnlichkeit von Zellen aus Tier- und Pflanzenreich, die biologisch als Eukaryonten zusammengefasst werden, auch auf Zellen beider Gruppen gleichermaßen wirken;
2. Diese Substanzen seien aufgrund dieser Eigenschaft isolierbar und möglicherweise in der Behandlung von Tumorerkrankungen einsetzbar und
3. Die Tatsache, dass eine Pflanze sich allelopathisch verhalte, rechtfertige generell den Versuch einer Isolierung der antiproliferativ wirkenden Substanzen aus diesen „Kandidatenpflanzen“ vor dem Hintergrund ihrer möglichen Verwendung in der antineoplastischen Chemotherapie.

Der Gedanke der gleichartigen antiproliferativen Wirkung der Substanzen aus *Juglans regia* sowohl auf Pflanzen wie auch auf Zellen tierischer Herkunft wurde von Medizinern geradezu euphorisch aufgenommen, von Phytochemikern aber mit Hinweisen auf bekannte, toxische Inhaltsstoffe wie z.B. Juglon, sowie auf den enormen Arbeitsaufwand relativiert; jedoch überzeugte besonders, dass ein mit einfachsten Mitteln hergestellter Auszug aus frischen Blättern an Tumorzellen verschiedener Zelllinien zwar tatsächlich in vitro antiproliferative Eigenschaften aufwies, im Gegensatz zu anderen tumorhemmenden Stoffen – wie z.B. Juglon – keinerlei toxische Wirkung zeigte. Dieser wachstumshemmende Effekt konnte somit nicht ursächlich auf das Juglon bezogen werden, da Juglon zytotoxisch wirkt, der wässrige Auszug allerdings lediglich antiproliferativ.

Der Umfang der zu erwartenden Experimente führte schon im Planungsstadium dazu, sich zunächst im Sinne einer aktivitätsgeleiteten Isolierung nur mit dem Allelopathen

Juglans regia zu befassen. Dieses Vorhaben wurde mit aller Konsequenz verfolgt. Daher wurden auch, unüblich für die phytochemische Forschung, die 30 bis 40 rein isolierten Substanzen, die aber in der Testung keinerlei Effekte aufwiesen, bezüglich ihrer Struktur nicht weiter untersucht.

Es wird im Folgenden zunächst kurz auf die Vorversuche eingegangen, anhand derer die Bedingungen und Skalierungen für die eigentliche aktivitätsgeleitete Chromatographie ermittelt wurden, und sodann auf den eigentlichen Hauptversuch. Dabei standen in dieser Arbeit die phytochemischen Aspekte sehr im Hintergrund, da die Experimente aus der Sicht eines Mediziners mit dem Ziel der Wirkstofffindung durchgeführt worden sind.

4.2 Versuchsbedingungen: chromatographische Aspekte.

Für die Vorversuche wurden 560 g Extrakt, gewonnen aus 4 kg Droge der *Juglans regia*-Ernte Oktober 1997, verwendet. Zunächst konnte hier gezeigt werden, dass ein DCM-Auszug eine höhere antiproliferative Wirksamkeit im Bezug auf humane Tumorzellen aufwies als der MeOH-Extrakt; dieser wiederum besaß eine stärkere Wirksamkeit als der Wasserextrakt. Alle drei Extrakte wiesen die gesuchten antiproliferativen Eigenschaften auf humane Tumorzellen auf, ohne jedoch zytotoxisch zu wirken. Anhand der Ergebnisse der drei gewählten Extraktformen, wurde entschieden, die zweite Ernte 1998 nur noch mit Methanol und mit Dichlormethan erschöpfend zu extrahieren. Die Gründe hierfür waren:

1. Die im Vergleich zum wässrigen Extrakt wesentlich höhere Wirkstärke des methanolischen und DCM-Extraktes
2. Der MeOH-Extrakt gewährleistete einer sehr hohen Polarität
3. Die schwierige und zeitaufwendige Handhabung des Wasserextraktes sowohl in Form des Vorgangs des Gefriertrocknens als auch des Aufschäumens beim Abrotieren

Anhand einer nicht-aktivitätsgeleiteten Fraktionierung der vereinigten Wasser/Methanol/DCM-Auszüge in die Tiefe bis auf die fünfte Ebene ließ sich durch Multiplikation der detektierten Substanzen mit den erhaltenen Fraktionen und Übertragung auf die durchlaufenen Ebenen abschätzen, dass sich in dem Ausgangsgemisch größenordnungsmäßig sicher mehr als 100 000 Substanzen befanden, wahrscheinlich sogar

wesentlich mehr. Orientierend an diesen Werten wurde die neue Blätterernte 1998 geplant.

Um der Hochrechnung nach zur Aufklärung der wirksamen Substanzen eine wenigstens einigermaßen hinreichende Durchschnittsmasse von 1-2 mg pro Einzelsubstanz zu gewährleisten, musste das Anfangsgewicht des auf die erste Cellulosesäule aufgetragenen Materials erhöht werden. Hierbei besteht folgendes Dilemma: einerseits musste das Anfangsgewicht groß genug gewählt werden, um zuletzt genügend Material der Einzelsubstanzen zu gewinnen und damit die Strukturaufklärung zu bewerkstelligen, andererseits ist die Kapazität der Trennmethoden limitiert- gepaart mit dem Wunsch jede Trennebene in nur einem Schritt zu erreichen. Denn im Falle einer aus Kapazitätsgründen aufzuteilenden Fraktion gestaltet sich das Schneiden und nachträgliche Zuordnen der einzelnen Fraktionen schwierig und ungenau. Hiermit wird also die gerade durch eine Chromatographie gewonnene Auftrennung wieder abgeschwächt. Um die Anfangsgewichte trotzdem groß genug wählen zu können, wurde entschieden, zuerst mit älteren Trennmethoden zu beginnen und nach diesen Vortrennungen moderne Trennmethoden - wie MPLC, HSCCC, DCCC- deren Kapazität stärker limitiert ist, anzuwenden. So wurde das Anfangsgewicht des auf die erste Cellulosesäule aufgetragenen Materials auf 830 g erhöht.

Die Größe bzw. Höhe der konstruierten VLC-Säule wurde allein dadurch begrenzt, dass das angelegte Vakuum noch einen ausreichenden Fluss erzielen musste. Die Kontrolle der erhaltenen Fraktionen erfolgte jeweils mittels Dünnschichtchromatographie. Die verwendeten Fließmittel wurden anhand empirischer Erfahrung je nach Polarität der darzustellenden Fraktionen variiert. Die chromatographisch erhaltenen Fraktionen wurden zwar hauptsächlich anhand der gewonnenen Testdaten aus den BrdU-, LDH- und Tritiumthymidin-Einbaumethoden ermittelt, jedoch wurden in die Überlegungen, welche Fraktion noch in die Weiterverarbeitung mit einzubeziehen sei, auch DC-Aspekte berücksichtigt. War eine wirksame Fraktion dünnschichtchromatographisch entweder unter Ultraviolettlicht in der Eigenschaft der Auslöschung oder Fluoreszenzanregung bzw. nach Entwicklung mit Anisaldehydschwefelsäurereagenz, einer oder mehreren ihrer Nachbarfraktionen sehr ähnlich, wurde sie mit diesen Fraktionen ungeachtet der festgestellten Wirkung wiedervereinigt. Dies geschah, um keine Spuren des in diesen Nachbarfraktionen womöglich ebenfalls enthaltenen Wirkstoffes zu verlieren. Zur Ver-

einfachung wurde diese Methode der Wiedervereinigung dünnschichtchromatographisch ähnlicher Fraktionen später auch vor der eigentlichen Testung der Wirkung der Fraktionen angewendet.

Dies hatte folgende Vorteile:

1. Es war weniger wahrscheinlich, etwas von dem Wirkstoff durch zu enges Schneiden der Fraktionen zu verlieren.
2. Die Anzahl der zu bearbeitenden Fraktionen sowohl bei ihrer Trocknung, bei der Zubereitung der Proben für die Testung, bei der Testung selbst, als auch bei der Weiterverarbeitung konnten so gering gehalten werden.
3. Chemisch ähnliche, oder sogar gleiche Substanzen verteilten sich so nicht auf zwei Fraktionen, was die weitere Fraktionierung im Sinne der schnellstmöglichen Reduzierung der in den wirksamen Fraktionen enthaltenen Anzahl von Substanzen in Mitleidenschaft gezogen hätte.

Mit dieser Strategie der Wiedervereinigung chemisch oder der Wirksamkeit nach zueinander gehörender Fraktionen konnten erst die im Laufe der Arbeit angefallenen circa 25 000 verschiedenen Fraktionen sowie ihrer für eine statistische Auswertung in ausreichender Anzahl durchgeführten Testungen in angemessener Zeit bewältigt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass die Statistik eine Mindestanzahl von sechs Versuchen pro Test erfordert, und somit die Vorbereitung und Durchführung von mehr als 150 000 Tests vonnöten war.

Die Auswahl der chromatographischen Methoden erfolgte anhand verschiedener Kriterien. Wie oben erwähnt, sollte nach Möglichkeit jede chromatographische Stufe in nur einem Schritt erreicht werden. Der Vorteil dieses Vorgehens bestand darin, die erhaltenen, ähnlichen, aber nie ganz gleichen zusammengehörigen Fraktionen aus einer mit Hilfe mehrerer chromatographischer Läufe weiter getrennten Probe nicht wiedervereinigen zu müssen. Dies hätte zwangsläufig zu Unsauberkeiten bei der Schnittführung, also bei der Einteilung der einzelnen Fraktionen und ihrer gegenseitigen Zuordnung, geführt. Auf diese Weise wurde jeweils die Ausnutzung der maximalen Trennschärfe einer Methode gewährleistet, während die Anzahl der zu bewältigenden Fraktionen nicht zu sehr ausuferte. Daher wurden zu Anfang, Reichstein und Butenandt folgend, große Kieselgel- und Cellulosesäulen eingesetzt, um Proben im Kilogramm-Maßstab in einem Trenngang verarbeiten zu können. Im ersten Schritt wurde Cellulose als Sorbens

gewählt, da es als relativ grobkörniges Material eine erste Grobtrennung des Extraktes erlaubte. Da es sich bei der wirksamen Sammelfraktion um die Nr. 2-5 von 10 handelte, konnten sowohl extrem apolare, als auch extrem polare Stoffe mit dieser Methode ausgeschlossen werden. Analog verhielt es sich bei der nachfolgenden Kieselgelchromatographie. Generell war geplant, die zur Verfügung stehenden Methoden einzusetzen, mit dem Ziel, die Trennkraft einer neuen, noch nicht auf das Gemisch angewendeten Methode im Sinne der schnellstmöglichen Reduzierung der Komplexität der Fraktionen einzusetzen. Daher wurde im jeweils folgenden Trennschritt eine neue Methode der Wiederholung der alten bevorzugt. Im weiteren Verlauf der Hauptexperimente wurden deshalb die Molekularsiebchromatographie, die Flüssiggegenstromchromatographien DCCC und HSCCC mit verschiedenen Zweiphasensystemen, unterbrochen von MPL-Chromatographien mit verschiedenen mobilen Phasen, sowohl auf Normal- als auch auf Umkehrmaterial, eingesetzt. War eine angestrebte Trennung zweier Substanzen mit einer Methode nicht zu erreichen, wurden beide wiedervereinigt und mit einer anderen getrennt. Dieses Vorgehen führte vor allem unter Abwechslung von HSCCC und MPLC zu ausgezeichneten Trennungen. Das Prinzip, eine Probe innerhalb eines Arbeitsganges zu trennen, wurde lediglich auf der vierten Fraktionierungsebene durchbrochen. Für die HSCCC stand leider keine großvolumigere Säule als 330 ml zur Verfügung; im Falle der DCCC war das Schaulrohr auf 10 ml limitiert. Daher wurde in diesem Fall die Probe in drei Arbeitsgängen getrennt. Anschließend wurden alle drei Läufe getrennt getestet, und wie beschrieben mit Hilfe von DC-Kriterien und der Testergebnisse wiedervereinigt.

Allgemein wurden für die Trennungen hochreine Lösemittel pro analysi verwendet. Die Glasmaterialien wurden in einer speziell vorgesehenen Spülmaschine mit deionisiertem Wasser und besonderem Spülmittel unter nachfolgender Neutralisation gewaschen; danach wurden alle Materialien mit Methanol ausgespült. Dennoch stellte sich ein Isolat als eine erhebliche Menge eines Plastikweichmachers **Kodaflex DOP** heraus, der vornehmlich in der Fotoindustrie Verwendung findet. Günstigerweise war es relativ problemlos möglich, diesen Weichmacher, der sich auch noch in anderen Fraktionen als Verunreinigung fand, jeweils wieder abzutrennen. Er stammt wahrscheinlich aus den Lösemitteln. Das Nutzen der 25l-Gebinde Lösemittel scheint daher zwar eine gewisse

Verunreinigung mit sich zu bringen aber eine mögliche Alternative wie z.B. generell Lösemittel mit HPLC-Qualität zu verwenden scheiterte an den Kosten.

4.3 Vorhandensein von Juglon in den Extrakten

Obwohl Juglon in den DC-Untersuchungen als Kontrolle mitlief, fand sich nie eine entsprechende Bande mit dem korrespondierenden Rf-Wert und der korrespondierenden Farbe. Zu Beginn der Versuche war zwar mit Wasser extrahiert worden, worin sich das Juglon nur wenig lösen lässt [4, 73], aber im DCM-Extrakt wäre es zu erwarten gewesen. Die Tatsache, dass es sich nicht auffand, lässt den Schluss zu, dass das Juglon in den getesteten Extrakten bzw. Fraktionen nicht vorhanden gewesen ist. Mögliche Gründe dafür sind:

1. dass aus dem System Hydrojuglonglukosid → Hydrojuglon → Juglon, charakteristisch für die meisten Juglandaceen, hauptsächlich die glykosidischen Vorstufen extrahiert wurden. Je nach Entwicklungsstand, der Vorbehandlung des Materials und den verwendeten Isolationsmethoden werden überwiegend Hydrojuglonglukosid, Hydrojuglon bzw. Juglon beim Verarbeiten des pflanzlichen Materials erhalten [29, 32]
2. dass das Juglon durch eine Oxidationsreaktion zerstört worden ist oder, dass es als leicht flüchtige Substanz im Rotationsverdampfer abgezogen wurde [4]
3. freies Juglon ist instabil und polymerisiert leicht zu braunen und schwarzen Pigmenten, weshalb es in älteren Blättern und in der Droge nur in Spuren vorkommt [1].

4.4 Testbezogene Aspekte

Nach der Feststellung der antiproliferativen Eigenschaften eines wässrigen Blätterextraktes wurde eines der Ziele der Arbeit näher eingegrenzt: Es sollten antiproliferative Substanzen isoliert werden, die gleichzeitig nicht toxisch wirkten. Um mit der momentan bestmöglichen Methode, der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung, an dieses Ziel zu gelangen, wurden möglichst einfache Tests zur Untersuchung dieser Eigenschaften ausgewählt. Hierzu gehörten zunächst zur Bestimmung der Zellproliferation die Zellzählung in einer Zählkammer, die Tritiumthymidin-Einbaumethode und die 5-Bromo-2'-

deoxyuridin-Einbaumethode (BrdU). Zur Bestimmung der Toxizität wurden die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) [102] sowie der Zellzählung mittels Färbung nekrotischer Zellen mit Trypanblau in der Zählkammer eingesetzt. Der gleichzeitige Einsatz von entweder BrdU oder [³H]-Thymidin-Einbaumethode, der Zellzählung mit Trypanblau, und des LDH-Tests hätte es zugelassen, nach den Eigenschaften „nicht toxisch“ und „antiproliferativ“ aktivitätsgeleitet zu chromatographieren. Letztlich wurde dann nach den Vorversuchen zur Untersuchung der Aktivität lediglich noch die BrdU-Einbaumethode angewendet. Die Gründe hierfür waren vielfältig:

Im Vergleich zur Methode der Zellzählung

1. Die Anzucht von genügend Zellen für die Zellzählung, auch bei der extrem hohen Teilungsfrequenz der verwendeten Tumorzelllinien, war weder logistisch noch finanziell möglich.
2. Die notwendige nicht-automatische Auszählung vieler tausend Zählkammern war ebenfalls logistisch nicht zu bewältigen und zudem nicht effizient.
3. Der Versuch, die Methode anhand des Einsatzes konventioneller Fototechnik zu automatisieren ist ebenfalls nicht kosteneffizient.
4. Der Versuch, die Methode anhand des Einsatzes automatischer Datenverarbeitung zu automatisieren, scheiterte an dem für den Anfall von Datenmengen zu geringen Plattenspeicherkapazitäten.
5. Die durchgängige Anwendung der Methode mittels Durchflusszytometrie hätte bei der Menge an notwendiger Testsubstanz zur Behandlung einer für eine Statistik ausreichenden Anzahl von Zellen zu viel Material verbraucht, und auf diese Weise das oberste Ziel der Strukturaufklärung der Substanzen zu Nichte gemacht.

Im Vergleich zur [³H]-Thymidin-Einbaumethode

1. Nach den Angaben des Herstellers stand die BrdU-Methode der [³H]-Thymidin-Einbaumethode an Empfindlichkeit nicht mehr nach, wie dies früher der Fall gewesen ist [100, 118]. Da sich beide Methoden also nicht mehr im Sinne einer groben Testung mittels BrdU-Einbaumethode, und einer genauen Ermittlung der wirklichen Aktivität der Probe mittels [³H]-Thymidineinbau ergänzten, wurde die [³H]-Methode fallengelassen.

2. Gleichfalls konnte so auf eine auf Radioaktivität basierende Methode verzichtet werden.

Im Vergleich zum LDH-Freisetzungstest

1. Die Vorversuche zeigten, dass die Fraktionen, die das Zellwachstum hemmen, keine zytotoxischen Eigenschaften besitzen. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, die gesuchten Substanzen seien nicht zytotoxisch. Folglich konnte dieser Toxizitätstest auch nicht zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung eingesetzt werden.
2. Die durchgängige Anwendung des LDH-Tests hätte eine Verdopplung der benötigten Testsubstanz bedeutet, mit der oben schon erklärten Gefährdung der Strukturaufklärung.
3. Die logistische wie finanzielle Bewältigung der Arbeit wäre ebenfalls wiederum in Frage gestellt worden.

Wie sich herausstellte, waren die gefällten Entscheidungen richtig, da zahlreiche Substanzen aufgereinigt werden konnten, die in vitro antiproliferativ wirksam sind.

4.5 Zubereitung der Proben

Bei der Zubereitung der Proben für die Testungen musste einerseits beachtet werden, nicht zuviel Substanz zu verlieren, um die Aufklärung der wirksamen Stoffe nicht zu gefährden, andererseits war es von größter Bedeutung, nicht zu wenig davon zu haben, und zwar in zweierlei Hinsicht:

1. War eine Substanz nicht auf Anhieb in Wasser löslich, musste sie mit anderen Mitteln applizierbar gemacht werden. Dies aber bedeutete zunächst einmal den Verlust einer Probe, und die Notwendigkeit des Vorhandenseins einer Ersatzprobe.
2. Es war bei keiner Probe bekannt, in welcher Konzentration sie anzuwenden war. Dies erschwerte die Untersuchungen ganz erheblich, da im Falle des Nichtwiederfindens der Aktivität nicht klar war, ob nur zu niedrig dosiert worden war, ob die Aktivität noch an das Sorbens gebunden und lediglich noch nicht eluiert worden war oder ob die Substanz bei der Chromatographie zerstört worden war.

Zu 1.) Waren die zu testenden Proben anfangs noch alle relativ leicht in Wasser löslich, traten mit zunehmender Chromatographietiefe zunächst Schwierigkeiten mit der Applikation von vom apolaren Ende des durch die Chromatographie gewonnenen Spektrums von Fraktionen abstammenden Proben auf, und schließlich, nach der dritten Stufe, mit sämtlichen Proben. Konnten diese Schwierigkeiten zunächst mit Ultraschall behoben werden, wurde später als Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentrationen von bis zu 2,5% eingesetzt. Um eine DMSO-Eigenwirkung auszuschließen wurde auch die Kontrolle mit DMSO in gleicher Konzentration behandelt. War damit immer noch keine ausreichende Löslichkeit zu erzielen, wurde die Probe als wässrige Suspension appliziert.

Zu 2.) Um eine Vorstellung davon zu bekommen, in welcher Konzentrationsgrößenordnung die Fraktionen zu applizieren waren, wurde zunächst mit allen drei Extrakten, dem wässrigen, methanolischen und dem dichlormethanolischen eine Verdünnungsreihe durchgeführt, und IC_{50} Werte ermittelt. Diese Werte lagen bei allen drei Extrakten innerhalb der vom National Cancer Institute geforderten halbmaximalen Wirkkonzentration eines Extraktes von $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ [38]. Daher wurde festgesetzt, dass für die vorliegende Untersuchung Stoffe irrelevant sein sollten, die eine halbmaximale Wirkkonzentration von mehr als $10 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen. Mit dem Fortgang der chromatographischen Fraktionierung war hierbei auf der einen Seite zu erwarten, dass die Wirkstärke der Fraktionen zunahm, da der relative Anteil an wirksamer Substanz in den einzelnen Fraktionen im Zuge der erreichten Aufreinigung erhöht werden würde. Auf der anderen Seite konnte dieser Effekt dadurch wieder relativiert werden, dass eine wirksame Substanz womöglich über Hunderte von Fraktionen verschmiert sein konnte, und so ihre hohe Wirksamkeit als zu niedrig eingeschätzt werden würde, um mit ihr weiterzuarbeiten. Daher wurde bei der Wiedervereinigung von Fraktionen, der Bildung von Sammelfraktionen, darauf geachtet, sowohl die absolute Wirkstärke einer Fraktion, als auch die Anzahl der Fraktionen nebeneinander in angemessener Form zu berücksichtigen. War eine Fraktion sehr stark wachstumshemmend wirksam folgte eine weitere Aufarbeitung. Gab es aber eine Serie von z.B. 50 Fraktionen hintereinander, die lediglich eine zwanzigprozentige Wachstumshemmung aufwiesen, wurden sie unter der Annahme, hier sei eine hochwirksame Substanz über viele Fraktionen verschmiert, ebenfalls weiterverarbeitet. Eine weitere Überlegung war es, diese wirksamen Fraktionen großzügig aus dem

Fraktionsspektrum auszuschneiden, um nicht rechts und links davon mit abgeschnittenen Fraktionen wertvolle wirksame Substanz zu verwerfen. Dies geschah jeweils unter der Annahme einer gaußschen Symmetrie der Stoffverteilung innerhalb des Spektrums der erhaltenen Fraktionen in der Chromatographie und Beachtung des Tailingphänomens bei der Festphasenchromatographie. Durch diese Überlegungen wird klar, dass sich erst nach der Fertigstellung der Aufreinigung und Vereinzelung die absolute Wirkstärke einer Substanz angeben lässt, und es während der Aufreinigung allenfalls eine empirische Schätzmöglichkeit der Wirkstärke gibt. Daher erschien es auch nicht sinnvoll, eine positive Kontrolle in Form einer bekannten Wirksubstanz mitzuführen, wie dies anfangs mit Taxol noch geschah.

4.6 Wirkstärke der gesuchten Substanz(en)

Die ursprüngliche Annahme war es, dass nur eine Substanz enthalten sein würde, die das Trägersubstrat für die antiproliferative Eigenschaft der Blätter des Walnussbaumes darstellte. Von diesem Stoff stellte sich entgegen der allgemeinen Annahme in der vorliegenden Arbeit heraus, dass es sich keinesfalls um Juglon handeln würde. Neben dieser Annahme, es sei ein einzelner Stoff verantwortlich, existierte die Überlegung, die Wirkung sei durch einen Synergismus vieler enthaltener Stoffe hervorgerufen, die für sich allein nicht genügend stark wirksam und daher auch nicht isolierbar seien. Wie sich herausstellte, existiert ein solcher Synergismus tatsächlich, jedoch war es nicht der Fall, dass diese Substanzen nicht isolierbar waren. Im Gegenteil, einige dieser Stoffe stellten sich als außerordentlich potent heraus, was die Isolation ausgesprochen vereinfachte. Die gefundene Diversität der Wirkträger des Extraktes führte dazu, dass die Konzentration der Fraktionen in den Testungen nicht im Laufe des Erreichens höherer Ebenen der Chromatographie, wie oben theoretisch diskutiert, herabgesetzt werden konnte. Vielmehr wurde aufgrund dieser Gegebenheiten die anfangs gewählte Konzentration von 10 µg/ml beibehalten.

4.7 Sterilisierung der Proben oder Modifikation der Methoden als Voraussetzung für die Testung der Fraktionen

Um mit Hilfe der oben genannten Methoden überhaupt einen Wachstumseffekt eines Wirkstoffes detektieren zu können, ist es notwendig, eine genügend lange Wachstumszeit zu beobachten. Von Vorteil ist hierbei eine hohe Zellteilungsrate, die bei der Zelllinie des malignen Melanoms gegeben ist, und unter anderen einen Grund für die Auswahl dieser Zelllinie darstellte. Je länger die Einwirkzeit des Wirkstoffes ist, desto empfindlicher ist der Test. Diese Periode ist lediglich durch die Zeit limitiert, nach der das Nährmedium der Kultur aufgebraucht ist. Im vorliegenden Fall jedoch war dieser Zeitraum zusätzlich limitiert, da die zu testenden Proben der Fraktionen unsteril waren. Dies hatte zur Folge, dass die Einwirkzeit 24 Stunden nicht wesentlich überschreiten durfte, da danach ein Bakterienwachstum im exponentiellen Stadium in der Zellkultur aufgetreten wäre. Ein Bakterienwachstum aber hätte durch Zerstörung der Zellen die zu detektierenden Effekte verfälscht. Zu Beginn der Vorversuche wurden deshalb mehrere Strategien dagegen probiert:

- Die Sterilisierung fand mittels des Einsatzes von Sterilfiltern mit Teflon und Cellulosemembranen für Flüssigkeiten mit und ohne Anteile organischer Lösungsmittel. Diese Methode wurde verworfen, da der Verlust an Testsubstanz aufgrund des hohen Totvolumens dieser Filtereinheiten sich als wesentlich zu hoch herausstellte.
- Es wurde daher versucht, mittels Ultrazentrifugation die Bakterienpartikel abzutrennen. Diese wirkungsvolle Methode war angesichts tausender Testproben zu zeitaufwendig.
- Die Sterilisierung mittels Bestrahlung kam nicht in Frage, da aufgrund der unbekanntem Wirkstoffe auch deren Verhalten unter Strahleneinwirkung nicht abschätzbar war.

Schließlich wurde das Vorhaben der Sterilisierung der Proben verworfen. Stattdessen wurde die Inkubationszeit der Zellkulturen auf 20 Stunden reduziert. Aufgrund der hohen Wirkpotenz der proliferationshemmenden Substanzen konnte ihre An- oder Abwesenheit in den Fraktionen dennoch wirkungsvoll detektiert werden.

4.8 Aus den Vorversuchen stammende Isolate

Isoliert werden konnten im Zuge der nicht-aktivitätsgeleiteten Fraktionierung von *JR1* zur Abschätzung der Anzahl der im Extrakt enthaltenen Stoffe die folgenden Naturstoffe: Das Procyanidin B3, das trans-Catechin, ein 3-O Arabinofuranosidderivat des Taxifolins, das Quercetin und das Aromadendrin.

Das Proanthocyanidin Procyanidin B3 gehört zur Gruppe der kondensierten Tannine [18], den Flavonoiden in Pflanzen, die die Vorläufer der blauviolettten und der roten Pigmente darstellen. Diese Substanzen machen ebenfalls einen bemerkenswerten Anteil an der Färbung und dem Geschmack des Rotweins aus [34]. Diese Moleküle haben neben einer antioxidativen Aktivität eine Funktion als Radikalfänger [25, 37, 81, 85]. Über antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische, antiallergische wie auch vasodilatatorische Eigenschaften ist berichtet worden [9, 10]. Der therapeutische Einsatz beschränkt sich allerdings auf die Behandlung der venösen Insuffizienz, Beinvenenvarikose, und ganz besonders mikrovaskulärer Probleme wie der Retinopathie [81]. Trotz der bekannten antiproliferativen Wirkung ist es in der vorliegenden Arbeit nicht durch eine wachstumshemmende Eigenschaft aufgefallen oder gar gefunden worden.

Das **trans-Catechin**, auch Cianidanol-Catechin, stellt ebenfalls einen polyphenolischen Naturstoff aus der Gruppe der Flavan-3-ole dar. Im Vordergrund bei der Untersuchung des Catechins stand die Erforschung der kardioprotektiven Effekte von Grüntee catechinen. Es gibt ebenfalls Berichte über gerinnungshemmende, antioxidative, kardiovaskuläre inklusive kardioprotektiver, aber auch nicht zuletzt tumorhemmende Effekte. So wurde ein Bericht über die erfolgreiche Verhinderung von Krebsentstehung durch die Einwirkung von Katechinen in einer Funktion als vermeintlich antimutativen Substanzen veröffentlicht.

Ebenfalls zur Gruppe der Bioflavonoide gehört das **Aromadendrin**, auch bekannt als Dihydrokaempferol. Von diesem Naturstoff wird ebenfalls antihistaminische, antiinflammatorische, antioxidative, gerinnungshemmende und antiproliferative Wirkung angenommen [81].

Taxifolin-arabinofuranosid, oder chemisch das 3-O Arabinofuranosid des 3',4'-dihydroflavonols Dihydroquercetin, ebenfalls zur Gruppe der Flavonoide gehörig, weist vielfältigste Wirkungen auf. Darunter finden sich für das Gebiet der Herzkreislaufkrankungen sowohl auf direkte Mechanismen beruhende Effekt, durch antio-

oxidative Eigenschaften [108], als auch auf indirekte durch Absenkung der Low Density Lipoproteine (LDL) [59]. Es wurden inhibitorische Effekte auf Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase [26] beschrieben, welches ein Ziel für eine antivirale Chemotherapy darstellt. Ebenfalls ist ein antiproliferativer Effekt auf das menschliche Plattenepithelkarzinom und das Gliosarkom bekannt [72].

Auch in Bezug auf das Polyphenol **Quercetin**, dem 3,3',4',5-7-pentahydroxyflavon, sind analog zum Aromadendrin, antihistaminische, antioxidative [69], antiinflammatorische, gerinnungshemmende, antineoplastische und vaskuläre Effekte bekannt. Es findet Anwendung beim ex- und intrinsischen Asthma bronchiale und bei der Nesselsucht. Dies ist durch die bemerkenswerte strukturchemische Ähnlichkeit des Moleküls mit Dinatriumchromoglycinsäure, das generell als Antiallergikum eingesetzt wird, erklärbar. Durch die Besetzung der so genannten Östrogen-Typ II Bindungsstelle wirkt auch diese Substanz antiproliferativ.

Vergegenwärtigt man sich an dieser Stelle den Gegenstand der vorliegenden Arbeit, nämlich die Isolierung antiproliferativer Inhaltsstoffe aus Blättern der einheimischen Walnuss, fällt auf, dass die Hauptaktivität der beschriebenen Isolate eine Proliferationshemmung verschiedener Tumorzelllinien darstellt. In diesem Zusammenhang sticht besonders hervor, dass, wie oben schon erwähnt, jedoch keine einzige dieser Substanzen nach dieser Eigenschaft in der vorliegenden Arbeit aktivitätsgeleitet isoliert worden ist. Im Gegenteil, die Auswahl der isolierten Substanzen erfolgte als Nebenprodukt der eigentlichen Arbeit aufgrund der Hauptbandenbildung dieser Substanzen auf dem mit Anisaldehydschwefelsäurereagenz entwickelten DC; entstanden aus einem Vorversuch zur Abschätzung der Diversität der in den Extrakten enthaltenen Substanzen. Mit anderen Worten: Mitnichten war erwartet worden, dass auch nur eine der in diesem Arbeitsgang gefundenen Inhaltsstoffe antiproliferative Eigenschaften aufweisen würde. Diese Feststellung führt zu mehreren Schlussfolgerungen hin:

- Die Hypothese, der Effekt der Extrakte aus *Juglans regia* sei womöglich ein additiver Stapeleffekt der Wirkungen mehrerer Substanzen, kann schon nach diesen Vorversuchen eindeutig mit ihrer Bestätigung abgehandelt werden.
- Trotz der beschriebenen Eigenarten der gefundenen Inhaltsstoffe, die durchaus mit den Zielen der vorliegenden Arbeit vereinbar sind, handelt es sich doch um ubiquitär im gesamten Pflanzenreich vorkommende Stoffe. Daraus folgt, dass

sie mit der besonderen Eigenschaft der Allelopathie dieses Baumes, die hier erst den Anstoß zu dieser Arbeit gegeben hat, nichts zu tun hat.

- Da die Aktivität der Isolate nicht mit den angewendeten Tests detektiert worden ist, ist sie im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit gesuchten Substanzen deutlich geringer.

4.9 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung

Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung im Hauptexperiment wurde teilweise bis auf die neunte chromatographische Ebene geführt. Im Zuge dieser Experimente wurden zahlreiche Substanzen isoliert, obwohl sie nicht primär im Fokus der Arbeit standen. Der Grund dafür ist, dass bei der Trennung von zum Schluss nicht mehr hochkomplexen Gemischen sowohl die wirksamen, als auch unwirksamen, oder wenig wirksamen Substanzen vereinzelt worden sind. Bis auf eine Substanz wurden diese wenig wirksamen oder unwirksamen Stoffe archiviert und nicht weiter untersucht. In diesem einen Fall wurde eine Substanz untersucht, die sich rein zwischen Fraktionen fand, die sehr stark antiproliferative Substanzen enthielten. Bei dieser Substanz handelte es sich um **Progesteron**, dessen Struktur aus den Spektren durch den Vergleich mit der Literatur hergeleitet wurde.

4.10 Ausrichtung der Isolationsstrategie auf nur in Spuren vorhandene Stoffe wie Progesteron

Mit der gewonnenen Menge an Progesteron von ca. 2,6 mg liegt diese Menge, bezogen auf die eingesetzte Menge an Droge, im Bereich zwischen einem und 0.1 ppm. Dies ist ein Bereich, der trotz, oder gerade aufgrund der Anwendung moderner Methoden in der präparativen Analytik heute üblicherweise nicht mehr erreicht wird. Eine Aussage, die auf den ersten Blick verwundern mag. Die gewählte Trennstrategie allerdings wurde speziell auf die Isolierung von kleinsten Spuren von Substanzen, wie dies unter anderem bei Hormonen zu erwarten ist, ausgerichtet. Zu bedenken war dabei, dass der Quotient zwischen Masse des Isolates und Ausgangsmasse in der Literatur häufig stagniert bzw. sogar abgenommen hat. Zwar gibt es ein Beispiel aus den letzten zwei Jahrzehnten, in

dem in ähnliche Größenordnungen vorgedrungen wurde; die Isolierung von Bryostatinen aus der Spezies *Bugula Neritina* [71], einem Tiefseeschwamm.

Insgesamt jedoch war es notwendig für das Ziel der Isolation von Substanzspuren auf die Methoden zurückzugreifen, die Butenandt, Tscherning, Reichstein und andere bei der Isolierung der heute bekannten lipoiden Körperhormone in den dreißiger, vierziger und fünfziger Jahren angewendet und entwickelt haben. Diese Methoden zeichneten sich durch verschiedenerlei Besonderheiten, verglichen mit modernen Methoden, aus:

- Es wurden sehr große Mengen an Ausgangsmaterial gewählt. Androsteron wurde z.B. von Butenandt und Tscherning 1931 aus 200 Litern Männerurin als Ausgangsmaterial gewonnen; sie waren in der Lage, 40 mg des Stoffes daraus aufzureinigen [20, 21]. Aus den Corpora Lutea von nicht weniger als 50 000 Sauen wurden 20 mg Progesteron kristallisiert [22], und Östron wurde aus 200 Litern Schwangerenurin isoliert, in dem es nur in einer Konzentration von 0,3 mg/l enthalten ist [6, 111]. Für diese Arbeiten erhielt Butenandt 1939 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Gemeinsam ist diesen Arbeiten, dass sie eine Ausbeute von jeweils weniger von 1 ppm aufwiesen.
- Es wurden sehr große Säulen verwendet, um die großen Mengen an Ausgangsmaterial bewältigen zu können. Derartiges Säulenmaterial wurde für die vorliegende Arbeit nachgebaut.
- An Sorbentien wurden grobkörnige Materialien verwendet wie Cellulose und Kieselgel. Unter Einhaltung der oben vorgestellten Trennstrategie wäre ein feinkörnigeres Material nicht verwendbar gewesen, da, wie allgemein gültig, eine größere Trennleistung mit einer geringeren Kapazität einhergeht. Daher hätte man entweder mit geringeren Anfangsmassen arbeiten müssen, was die Strukturaufklärung der zu suchenden Substanzen gefährdet hätte, oder die Anfangstrennschritte auf mehrere Durchläufe aufteilen müssen. Dies hätte zu einer geringeren Trennschärfe geführt und zu einem wesentlich größeren Zeitaufwand. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit feinkörnigeres Material auch erst später in den MPLC verwendet.
- Wegen ihrer überlegenen Trennleistungen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht auf den Einsatz von DCCC und HSCCC, den heute üblichen Flüssiggegenstromverfahren, sowie der MPLC verzichtet.

Im Gegensatz dazu werden in der gegenwärtigen Literatur häufig Drogenausgangsgewichte von unter einem Kilogramm berichtet. Das liegt zum einen, dass heute wesentlich weniger Material benötigt wird, um die Struktur einer Substanz z.B. mit Hilfe von GCMS oder NMR-Techniken aufzuklären, zum anderen dass moderne Verfahren eine optimale Beladung von im Falle der HPLC 1:200 Probe zu Sorbens erfordern. Daher ist es allein aufgrund der Größenverhältnisse nicht möglich, große Mengen an Probe in einem Schritt aufzutrennen. Besonders aber die Reduktion der zur Strukturaufklärung notwendigen molekülmasseabhängig ca. 10^{-5} mol bedingt die Herabsetzung der Skalierung der Chromatographie, die heute zu beobachten ist. Mit der Vergrößerung des Verhältnisses Probe zu Sorbens werden aber auch die Mengen an eingesetztem Fließmittel relativ erhöht. Ist in der vorliegenden Arbeit in der MPLC beispielsweise bei der Trennung zweier Substanzen von insgesamt 10 mg Gewicht ein Volumen von mehr als 500 ml Lösungsmittel eingesetzt worden, so waren es bei den 800 g getrockneten Anfangsextrakt lediglich 50 Liter. Das wiederum bedeutet auch eine drastische Verschiebung hin zum Einsatz relativ größerer Lösemittelmengen, und wesentlich höhere Anforderungen an die Detektionstechniken, um wenig Stoff in sehr großen Eluatvolumina wieder aufzufinden. Zusammenfassend betrachtet, weisen beide Gruppen von Vorgehensweisen, die moderne, und die konventionelle ungefähr die gleiche Potenz auf, Gemische voneinander zu trennen. Dabei ist es die Besonderheit der moderneren Methoden, größere Trennleistungen bei geringerer Kapazität vorbringen zu können und die Besonderheit der älteren Methoden, eine größere Kapazität bei geringerer Trennleistung allerdings auch zu geringeren Kosten aufzuweisen. Es kommt vielmehr darauf an, die heute vorhandenen Methoden sinnvoll miteinander zu kombinieren.

4.11 Isolierung antiproliferativer Inhaltsstoffe unter Kombination klassischer und moderner Methoden der Chromatographie

Um nicht den Fehler zu begehen, Hauptinhaltsstoffe, die einfacher zu isolieren sind, wie das in den Vorversuchen schon geschehen war, als für den beobachteten antiproliferativen Effekt verantwortlich zu bezeichnen, wurde strikt die Methode der aktivitätsgeleit-

ten Isolierung angewendet. Wesentlich ist hierbei, einen einfachen, funktionierenden Test zu benutzen.

Um den hochkomplexen Extrakt möglichst schnell zu vereinfachen, wurde entschieden, nur noch die methanolischen und dichlormethanolischen Extrakte zu verwenden; zumal der wässrige Extrakt die Hauptaktivität nicht enthielt. Es wurden, den Vorversuchen folgend, Trennungen mit überladenen großskaligen Säulen auf Cellulose und Kieselgel durchgeführt. Nach dieser Aufreinigung des Extraktes, durch die mehr als 98% des Gewichtes abgetrennt werden konnten, folgte eine Molekularsiebchromatographie an quervernetztem Agarosegel Sephadex LH-20. Ein Bereich von Fraktionen, in dem sich die Hauptaktivität sehr eng beieinander liegend wieder fand, wurde ausgeschnitten; darüber hinaus wurde eine zweite Aktivität über mehrere Fraktionen verteilt, und, da es sich aufgrund des großen Abstandes zwischen den beiden wirksamen Fraktionsgruppen nicht um ähnliche Stoffklassen handeln konnte, separat weiter aufgetrennt. Die beiden Sammelfraktionen wurden unterschiedlich flüssiggegenstromchromatographisch getrennt, da sie eine unterschiedlich Masse aufwiesen und somit unterschiedlich große Kapazitäten der Auftrennungsmethode verlangten; die Fraktion mit der Hauptaktivität in einer HSCCC-Trennung, die Fraktion mit der „geringeren“, breiter verschmierten Aktivität, in einer DCCC-Trennung. In dem HSCCC-Trennungsgang separierte sich nun die Aktivität. Es fanden sich ein kleinerer Bereich von Fraktionen in der Oberphase, und ein großer Bereich von wirksamen Fraktionen in der Unterphase. Nun war klar, dass es sich bei dem die Aktivität tragenden Stoff nicht um eine einzelne Substanz handeln würde. Im Zuge der darauf folgenden Trennungen bis auf die neunte Trennstufe konnten letztlich etwa 60 geringergradig komplexe Fraktionen mit einer starken antiproliferativen Aktivität dargestellt werden. Inmitten dieser Gruppen von wirksamen Fraktionen mit verschiedensten Inhaltsstoffen fand sich das schon beschriebene Progesteron.

4.12 Auswahl geeigneter Testmodelle zur Isolation antiproliferativer Inhaltsstoffe

Da es das Ziel war, auf Tumore wirkende Wachstumshemmer zu isolieren, wurden Tumorzelllinien für die Untersuchungen ausgewählt. Um in diesem Modell möglichst große Nähe zu humanen Tumorerkrankungen zu gewährleisten wurden humane Zelllinien ausgesucht. Die Zellen sollten relativ einfach zu züchten sein, und mindestens eine Zell-

linie sollte eine sehr hohe Mitoserate aufweisen, um mit ihrer Hilfe unter Berücksichtigung der oben erwähnten, verkürzten Testzeit, auch kleinere Effekte detektieren zu können. Dies beruht darauf, dass ein wachstumshemmender Effekt eines Stoffes theoretisch nur dann entdeckt werden kann, wenn man den Stoff auch tatsächlich in der Zellteilung befindlichen Zellen aussetzt. Auf die gleichzeitige Erfassung der Effekte auf gesunde Zellen wurde aus logistischen Gründen abgesehen. Folgende Zelllinien wurden ausgewählt:

1. Die Adenokarzinomzelllinie des Colon Caco-2 wurde als Beispiel eines epithelialen Tumors ausgewählt, weil das Adenocarcinom des Kolons eine der häufigsten Krebsarten darstellt. Bei Frauen ist der Darmkrebs - hierunter werden Krebserkrankungen des Kolons und des Rektums zusammengefasst - mit 16,7% die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern mit 16,1% die dritthäufigste. Insgesamt ist der Darmkrebs mit einer Inzidenz von 70 Fällen pro 100 000 Einwohner pro Jahr die zweithäufigste Ursache aller Krebssterbefälle. Die Neuerkrankungsraten in Deutschland verzeichneten bei beiden Geschlechtern bis in die Mitte der Achtziger Jahre einen steten Anstieg und verblieben seitdem auf diesem Niveau. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 48%, für Frauen bei 51% und bewirkt so einen Verlust an Lebenserwartung beide Geschlechter von 6 Jahren [2, 3].
2. Die Zelllinie des malignen Melanoms Mel-HO wurde als Vertreter eines Tumors mit ausgesprochen hoher Mitoserate ausgewählt. Die meisten malignen Melanome entstehen als bösartige Neubildung der Pigmentzellen im Bereich der Haut. Es kommen darüber hinaus auch maligne Melanome an den Schleimhäuten, zum Beispiel des Darms und der Netzhaut des Auges vor. Jährlich erkranken in Deutschland 6300 Menschen an einem malignen Melanom der Haut, mit einer zunehmenden Inzidenz von 10 Fällen pro 100 000 Einwohner/Jahr, einer weltweiten Tendenz entsprechend [88]. Damit macht dieser Hautkrebs in Deutschland etwa 2% aller bösartigen Neubildungen aus und verursacht etwa 1% aller Krebstodesfälle. Die Krankheit kann bereits bei Patienten etwa ab dem 20. Lebensjahr beobachtet werden. Durch die Lokalisation auf der Körperoberfläche erscheint das maligne Melanom der Haut besonders zur Früherkennung geeignet. Sowohl die erhöhte Aufklärung der Bevölkerung als auch die Sensibi-

lität der Ärzteschaft könnten die Ursachen dafür sein, dass in den letzten Jahren zahlreiche Erkrankungen in einem prognostisch günstigen Stadium, bei noch geringer Tumordicke diagnostiziert wurden. Leider trifft dies für ältere Patienten nicht zu, so dass die Sterberaten der über 70jährigen in letzter Zeit angestiegen sind. Bei beiden Geschlechtern wurde in Deutschland in den letzten Jahren ein deutlicher Anstieg der Neuerkrankungsrate beobachtet – so stieg sie in den letzten drei Jahrzehnten auf das vierfache-, während sich die Mortalität am malignen Melanom der Haut seit der 70er Jahre kaum verändert hat. Für Frauen liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 80%, während sie für Männer 69% beträgt. Bei bereits eingetretener Metastasierung sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit rapide auf unter 10%. Dabei gehen erkrankten Frauen durchschnittlich 3 Jahre ihrer weiteren Lebenserwartung verloren, Männern etwa 5 Jahre. Weitere Gründe für die Zunahme der Inzidenz könnten veränderte Verhaltensweisen in Form steigender Sonnenexposition sein, aber auch klimatische Veränderungen mit dem Verlust des atmosphärischen Schutzes vor UVA- Strahlung könnten dazu beitragen [30, 78, 88].

4.13 Spekulationen über die Beschaffenheit der antiproliferativen Substanzen

Die Tatsache, dass sich inmitten der antiproliferativ wirksamen Fraktionen Progesteron fand, sollte in diesem Zusammenhang näher untersucht werden. Progesteron hat in Bezug auf das Wachstum verschiedener Gewebe teils starke Wirkungen. Es wirkt selbst, obwohl es als anaboles Hormon gilt, auf das östrogenstimulierte Endometrium antiproliferativ. Damit ist dies der Grund für die Anwendung von Progestinen in der Hormonersatztherapie bei nicht hysterektomierten Frauen. In Brustkrebszellen der Linie T47-D hemmt Progesteron in einer Konzentration von 10 μ M das Zellwachstum und stimuliert indirekt die Induktion von Apoptose durch eine Vermehrung der Expression von p53 sowie einer Verminderung der Expression von Bcl-2, Survivin und verschiedenen CD44v7-v10-Antigenen, die in die Regulation der Apoptose involviert sind [36]. Dies geschieht auch schon in sehr geringen Dosierungen über den Androgenrezeptor [42]. Während es auch an anderen Geweben wie Z.B. Lymphozytenpopulationen, einen wachstumsstimulierenden Effekt von Sexualhormonen in geringer Dosierung gibt,

schlägt dieser Effekt bei hoher Dosierung um in eine antiproliferative Qualität. Bekannt ist dies auch für die vom Progesteron abgeleiteten Lizaroide. Es wäre durchaus denkbar, dass sich in den fraglichen Fraktionen neuartige Steroidhormonderivate finden werden, die die antiproliferative Wirkung vermitteln könnten.

4.14 Ausblick

Auch wenn es bis jetzt noch unbekannt ist, welche Reinsubstanzen sich hinter der antiproliferativen Aktivität von Walnussblattextrakten verbergen, besteht große Hoffnung auf deren Isolierung. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt etwa 60 Fraktionen gewonnen, die zu einem Teil schon auf einer Stufe einer sehr geringen Komplexität, bis herab zu Einzelsubstanzen innerhalb einer Fraktion, aufgereinigt werden konnten. Aufgrund der großen Diversität der erhaltenen Fraktionen ist es zu erwarten, dass ausgehend von dieser Arbeit wahrscheinlich neuartige antiproliferative Substanzen erhalten werden könnten. Diese Substanzen müssen sodann in ihrer Struktur aufgeklärt und auf, nach weiteren Studien über angemessene Applikationsformen ihre spezifische Toxizität untersucht werden. In dem Falle, dass man sie wird effektiv und preiswert genug darstellen können, könnten dann Versuche an Praeklinischen Tumormodellen folgen, nach deren erfolgreichem Durchlaufen vielleicht einmal eine in dieser Arbeit isolierte Substanz zu einem Einsatz in Therapie von Krebserkrankungen gelangen könnte.

5 Zusammenfassung

Eine der auffälligsten Eigenschaften des Walnussbaums *Juglans regia* ist die Allelopathie – die Fähigkeit der Pflanze das Wachstum höherer Pflanzen zu unterdrücken. Würden *Juglans regia* Blätter auch eine Wirkung auf humanoide Tumorzellen zeigen? Daher wurde untersucht, ob a) ein juglonfreier Extrakt der Walnussblätter auch eine wachstumshemmende Eigenschaft an humanen Tumorzellen aufweist, b) es sich hierbei um eine zytostatische oder zytotoxische Eigenschaft handelt, c) diese Eigenschaft auf eine oder mehrere Substanzen zurückgeht und d) diese chromatographisch isoliert werden können.

832g Extrakt, gewonnen aus 23,8kg Walnussblättern wurde hierfür mittels Zellzahlbestimmung anhand der Trypanblau-Methode, Tritiumthymidin-Einbaumethodetests, Bromodeoxyuridin-einbaumethode und Laktatdehydrogenase-Freisetzungstests *in vitro* an immortalen Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig) eines Adenokarzinom des Dickdarmes (CaCo2), und einer Metastase eines malignen Melanoms (MelHO) auf Zytotoxizität und Wachstumshemmung getestet. Chromatographische Verfahren trennten die jeweils wirksamen Fraktionen des Extrakts bis auf die 9. Ebene.

Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des *Juglans regia* Extraktes hat gezeigt, dass a) ein juglonfreier Extrakt eine wachstumshemmende Eigenschaft an humanen Tumorzellen besitzt, welcher b) nicht zytotoxisch ist und c) auf mehrere, chemisch unterschiedliche Substanzen und Substanzgruppen zurückgeht. Chromatographisch konnten so wachstumsfördernde Fraktionen von wachstumshemmenden getrennt werden. Hierdurch gelang es aus den größenordnungs-mäßig mehr als 100 000 Substanzen der *Juglans regia* Blätter ca. 60 Substanzgruppen niedriger Komplexität zu isolieren, welche *in vitro* das Wachstum von Melanomzellen in einer Konzentration von 10 µg/ml hochsignifikant um 80% des Wachstums der Kontrollgruppe senkten ($p < 0,01$), wovon 31 Substanzgruppen das Wachstum sogar um 85% senkten ($p < 0,01$).

Referenzen:

1. (2001) Deutscher Arzneimittel-Codex. Govi-Verl., Pharmazeut. Verl. [u.a.], Eschborn
2. (2005) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit Robert Koch Institut, Saarbrücken
3. (1999) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit Robert Koch Institut, Saarbrücken
4. (1999) Römpf Lexikon der Chemie. Thieme
5. Aizenberg VL, Gvozdo AV, Lisinger FA (1972) Antifungal activity of juglone compounds. *Zh. Biol. Khim., C.A.* 78, 106417
6. Allen E, Doisy EA (1923) An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*:819-821
7. Aynehchi Y, Dehpour AR, Mahmoodian M (1973) Juglone: Ecthiotoxic principle of *Pterocarya fraxinifolia*. *Phytochemistry* 12:3001-3002
8. Bacher A, Griehl K, Mackamul S, Mitreiter R, Muckter H, Ben-Shaul Y (1992) Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines. *Exp Cell Res* 200:97-104
9. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ (1998) Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol* 30:771-776
10. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ (1997) Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95:179-189
11. Bax A, Freeman R (1981) Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two dimensional NMR. *J Magn Res* 44:542-561
12. Berger F (1949) *Handbuch der Drogenkunde*. Mandrich, Wilhelm, Wien
13. Bernthsen, Semper (1887) Juglon. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*:934-935
14. Bhargava UC, Westfall BA (1968) Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extractives. *J Pharm Sci* 57:1674-1677
15. Bhargava UC, Westfall BA, Siehr DJ (1968) Preliminary pharmacology of ellagic acid from *Juglans nigra* (black walnut). *J Pharm Sci* 57:1728-1732
16. Blunt J, Stothers J (1977) ¹³C-nmr spectra of steroids- A survey and commentary. *Org Magn Res* 9:439-464
17. Bock K, Pedersen C (1983) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Monosaccharides. *Adv Carbohyd Chem* 41:27-66
18. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-333
19. Brondegaard VJ (1973) Contraceptive plant drugs. *Planta Med* 23:167-172
20. Butenandt A (1932) Über die Isolierung und Reindarstellung des männlichen Sexualhormons (Testikelhormons). *Forschungen und Fortschritte*. 8:60
21. Butenandt A, Tscherning K (1934) *Z. physiol. Chem.*:167

22. Butenandt A, Westphal U (1934) Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpus-luteum Hormons. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.*:1440-1442
23. Buttery RG, al e (1986) *J. Agric. Food Chem.* 34:820
24. Carnat Aea (1993) *Plantes. Méd Phytothér* 26:332-339
25. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* 79:157-163
26. Chu S-C, Hsieh Y-S, Lin J-Y (1992) Inhibitory Effects of Flavonoids on Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Activity. *J Nat Prod* 55:179-183
27. Coll JC, Bowden BF (1986) The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* 49:934-936
28. Cordell GA, Beecher CW, Pezzuto JM (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J Ethnopharmacol* 32:117-133
29. Daglish C (1950) Isolation and identification of a hydrojugloneglycoside occurring in the walnut. *J Biochem*:452-457
30. Donawho C, Wolf P (1996) Sunburn, sunscreen, and melanoma. *Curr Opin Oncol* 8:159-166
31. Dragendorff G (1898) *Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten.* Ferdinand Enke, Stuttgart
32. Duroux L, Delmotte FM, Lancelin JM, Keravis G, Jay-Allemand C (1998) Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. *Biochem J* 333 (Pt 2):275-283
33. Eber (um 1500 v. Chr.) *Papyrus Ebers.* In, Univ.-Bibliothek, Leipzig
34. Fine AM (2000) Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev* 5:144-151
35. Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58:209-214
36. Formby B, Wiley TS (1999) Bcl-2, survivin and variant CD44 v7-v10 are down-regulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 202:53-61
37. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341:454-457
38. Geran R, Mitarbeiter (1972) Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 3:1-63.
39. Gırzu M, al e (1998) Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. *Pharmacol* 36:280-286
40. Guarrera PM (1999) Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol* 68:183-192
41. Günther H (1992) *NMR-Spektroskopie: Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie.* Thieme, Stuttgart
42. Hackenberg R, Turgetto I, Filmer A, Schulz KD (1993) Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3

- beta,17 beta-diol in human mammary cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:597-603
43. Hartwell J (1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34:310-361
 44. Hartwell JL (1970) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 33:97-194
 45. Hartwell JL (1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34:386-425
 46. Hartwell JL (1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34:204-255
 47. Hartwell JL (1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 34:103-160
 48. Hartwell JL (1969) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 32:247-296
 49. Hartwell JL (1969) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 32:153-205
 50. Hartwell JL (1969) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 32:78-107
 51. Hartwell JL (1970) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 33:288-392
 52. Hartwell JL (1967/1968/1969/1970/1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 30:379/31:71/32:79, 153, 247/33:98, 288/34:103, 204, 310, 386
 53. Hartwell JL, Schrecker AW (1958) The chemistry of Podophyllum. *Fortschr Chem Org Naturst* 15:83-166
 54. Hartwell JL, Schrecker AW (1951) Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. *J Am Chem Soc* 73:2909-2916
 55. Haslam E (1986) Hydroxybenzoicacids and the enigma of gallic acid. *Recent Adv Phytochem* 20:163-200
 56. Hayes NT, RH (1955) Structure of hydrojuglone glucoside. *J Chem Soc*:904-907
 57. Heil J, Reifferscheid G (1992) Detection of mammalian carcinogens with an immunological DNA synthesis-inhibition test. *Carcinogenesis* 13:2389-2394
 58. Hesse M, Meier H, Zeeh B (1995) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart
 59. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47:357-362
 60. Hock EE (1988) *Pflanzentoxikologie. Schadwirkungen auf Pflanzen-Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*. Mannheim Wien Zürich
 61. Holzmann B, Lehmann JM, Ziegler-Heitbrock HW, Funke I, Riethmuller G, Johnson JP (1988) Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant melanoma, is a novel leukocyte activation antigen. *Int J Cancer* 41:542-547
 62. Hostettmann K (1980) Droplet counter-current chromatography and its application to the preparative scale separation of natural products. *Planta med* 39:1-23
 63. Hostettmann K (1983) New chromatography. *Technics for the isolation and separation of natural products. Naturwissenschaften Apr* 70:186-189
 64. Huong PL, Kolk AH, Eggelte TA, Verstijnen CP, Gilis H, Hendriks JT (1991) Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. *J Immunol Methods* 140:243-248
 65. Hutchens AR (1991) *Indian herbarology of North America*. Shambhala, Boston London
 66. Ikekawa. T, al e (1967) Isolation and identification of the antifungal active substance in walnuts. *Chem Pharm Bull* 15:242-245
 67. Jones E, Hughes RE (1984) A note on the ascorbic acid content of some trees and woody shrubs. *Phytochemistry* 23:2366-2367

68. Jork H, Mitarbeiter (1989) *Dünnschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
69. Kahraman A, Inal ME (2002) Protective effects of quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat. *J Appl Toxicol* 22:303-309
70. Kalinowski HO, Berger S, Braun S (1984) *¹³C-NMR-Spektroskopie*. Thieme, Stuttgart
71. Kamano Y, Zhang HP, Hino A, Yoshida M, Pettit GR, Herald CL, Itokawa H (1995) An improved source of bryostatin 10, *Bugula neritina* from the Gulf of Aomori, Japan. *J Nat Prod* 58:1868-1875
72. Kandaswami C, Perkins E, Drzewiecki G, Soloniuk DS, Middleton E, Jr. (1992) Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. *Anticancer Drugs* 3:525-530
73. Lagrange E (1954) [Bactericidal action of extract of the leaves of the walnut, *Juglans regia* L.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 148:2097-2098
74. Lee KC, Campbell RW (1969) Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. *HortScience* 4:297-298
75. Luczak S, Swiatek F, Ryszard R (1989) *Acta Pol. Pharm* 46:494-499
76. Magaud JP, Sargent I, Mason DY (1988) Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 106:95-100
77. Martin G, Crouch R (1991) Inverse-detected two-dimensional NMR methods: applications in natural products chemistry. *J Nat Prod* 54:1-70
78. McPhail G (1997) There's no such thing as a healthy glow: cutaneous malignant melanoma--the case against suntanning. *Eur J Cancer Care (Engl)* 6:147-153
79. Mueller C (1970) Phytotoxins as plant habitat variables. *Recent Advanc Phytochem*:106-121
80. Muir D, Varon S, Manthorpe M (1990) An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem* 185:377-382
81. Murray MT, Pizzorno JE (2005) *Textbook of natural medicine*. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh
82. Nahrstedt A, Vetter U, Hammerschmidt FJ (1981) [Composition of the steam distillation product from the leaves of *Juglans regia* (author's transl)]. *Planta Med* 42:313-332
83. Naumann M, Hamm H (2002) Treatment of axillary hyperhidrosis. *Br J Surg* 89:259-261
84. Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskowitz MA (1986) Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:674-678
85. Nuttall SL, Kendall MJ, Bombardelli E, Morazzoni P (1998) An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect. *J Clin Pharm Ther* 23:385-389
86. Oka H, Harada K, Ito Y, Ito Y (1998) Separation of antibiotics by counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 812:35-52
87. Okada TA, Roberts E, Brodie AF (1967) Mitotic abnormalities produced by juglone in Ehrlich ascites tumor cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:583-588

88. Oubre DN (2001) Current practice and future trends in malignant melanoma. *J La State Med Soc* 153:191-197
89. Pabst G (1991) Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea Germanica, Austriaca, Belgica, Danica, Helvetica, Hungarica, Rossica, Suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. Ed. "Libri Rari" im Verl. Schäfer, Hannover
90. Pelletier SW, Chokshi HP, Desai HK (1986) Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. *J. Nat. Prod.* 45:892-900
91. Pinto M, Robini-leon S, Appay MD (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330
92. Plinius (23/24-79) *Naturalis historiae liber XVIII.*
93. Plinius (23/24-79) *Naturalis historiae liber XVIII.*
94. Porath J, Flodin P (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 183:1657-1659
95. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S (1985) Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82:169-179
96. Prasad RBN, Gülz P-G (1990) Surface waxes from leaves and fruits of walnut. *Phytochemistry* 29:2097-2099
97. Rabitzsch G, Tambor U (1969) [Method for quantitative determination of cardiac glycosides and genins of cardenolide type with 2,4,2',4'-tetranitrodiphenyl]. *Pharmazie* 24:262-269
98. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Eisner MP, Horner MJ, Howlader N, Hayat M, B.F. H, Edwards BK (2006) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. In: National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2005 SEER data submission, posted to the SEER web site http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/
99. Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-1040
100. Rußmann E, Mitarbeiter (1993) Colloquium Boehringer Mannheim. *Biochemica* 4:1-4
101. Schaufelberger DE (1991) Applications of analytical high-speed counter-current chromatography in natural products chemistry. *J Chromatogr* 538:45-57
102. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48:4827-4833
103. Soderquist CJ (1973) Juglone and allelopathy. *J Chem Educ* 50:782-783
104. Spencer GF, Tjarks LW, England RE, Seest EP (1986) The Effect on Naturally Occurring Naphthoquinones on Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Germination. *J. Nat. Prod.* 49:530 - 533
105. Stahl E (1967) *Dünnschichtchromatographie- Ein Laboratoriumshandbuch.* Springer, Berlin Heidelberg New York

106. Suffness M, Douros J (1982) Current status of the NCI plant and animal product program. *J Nat Prod* 45:1-14
107. Sugie S, Okamoto K, Rahman KM, Tanaka T, Kawai K, Yamahara J, Mori H (1998) Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 127:177-183
108. Teselkin YO, Babenkova IV, Kolhir VK, Baginskaya AI, Tjukavkina NA, Kolesnik YA, Selivanova IA, Eichholz AA (2000) Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. *Phytother Res* 14:160-162
109. Tunmann O (1912) Microchemical detection and localization of juglone. *Pharm Zentralhalle*:1005
110. Varro rer. *Rust. I.*
111. Veler CD, Thayer S, Doisy EA (1930) The Preparation of the Crystalline Follicular Ovarian Hormone: Theelin. *J. Biol. Chem.*:357-371
112. Vogel A, Reischauer C (1856) Nucine und Juglone des Walnußbaums (*Juglans regia* L.). *Büchner Neues Rep. für Pharm.* 5:106
113. Westfall BA, Russell RL, Auyong TK (1961) Depressant agent from walnut hulls. *Science* 134:1617
114. Wichtl M (2002) Teedrogen und Phytopharmaka: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft., Stuttgart*
115. Wieditz C HM (1990) *Praxis der Naturwissenschaften (Biologie)*, 39(4):27-31.
116. Wojcik E (1984) Spectrophotometric determination of juglone in walnut leaves. *Farm Pol* 40:523-525
117. Wray V, Lang S (1975) Fourier transform ¹³C nuclear magnetic resonance studies of steroids-II. *Tetrahedron* 31:2815-2819
118. Zatterstrom UK, Johansson M, Kallen A, Baldetorp B, Oredsson S, Wennerberg J, Killander D (1992) Comparison of BrdUrd and [³H]TdR incorporation to estimate cell proliferation, cell loss, and potential doubling time in tumor xenografts. *Cytometry* 13:872-879

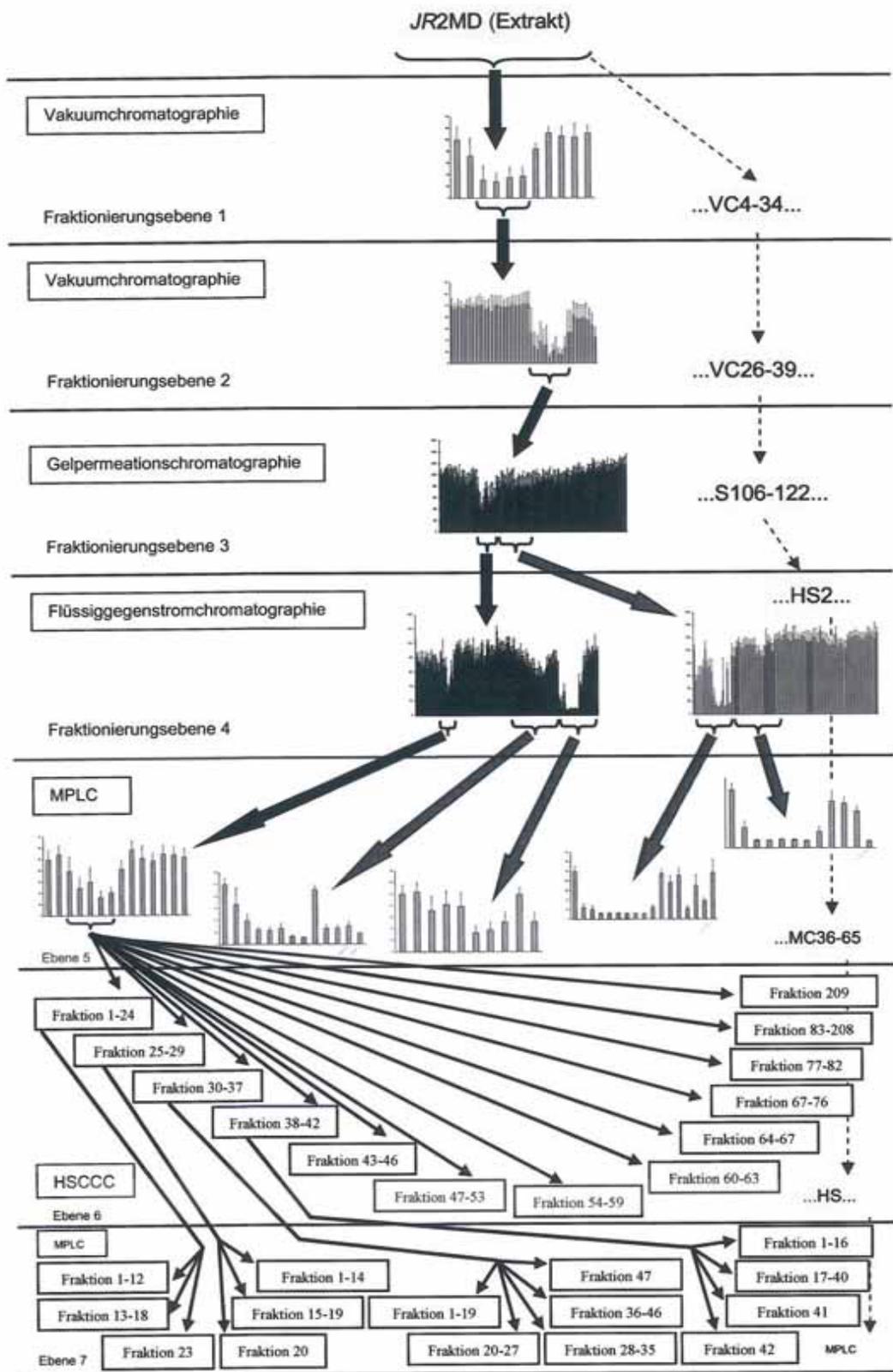


Abb. 43: Stammbaum der „Familie 1“. Näheres siehe im Text.

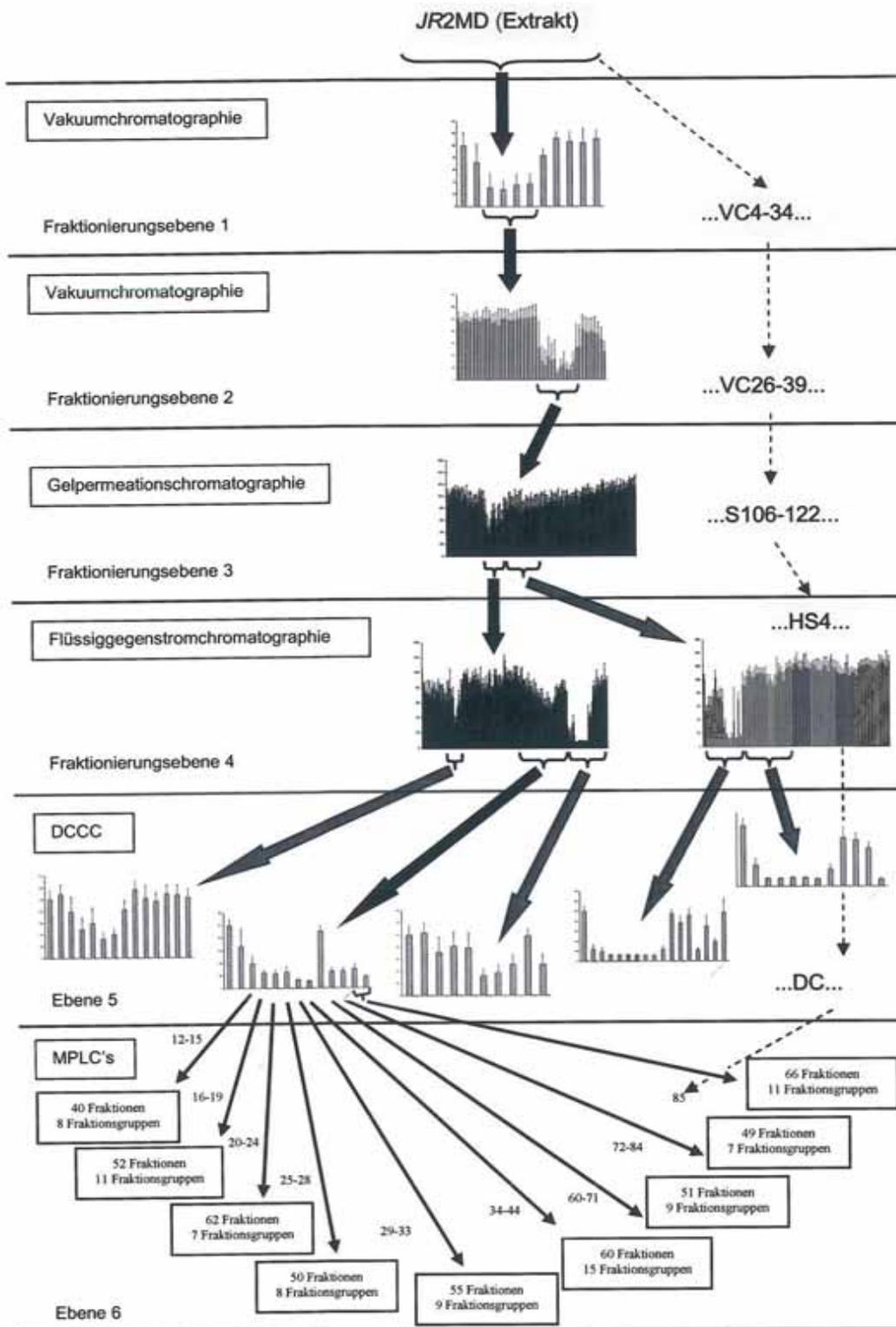


Abb. 44:

Stammbaum der „Familie 2“. Näheres siehe im Text.

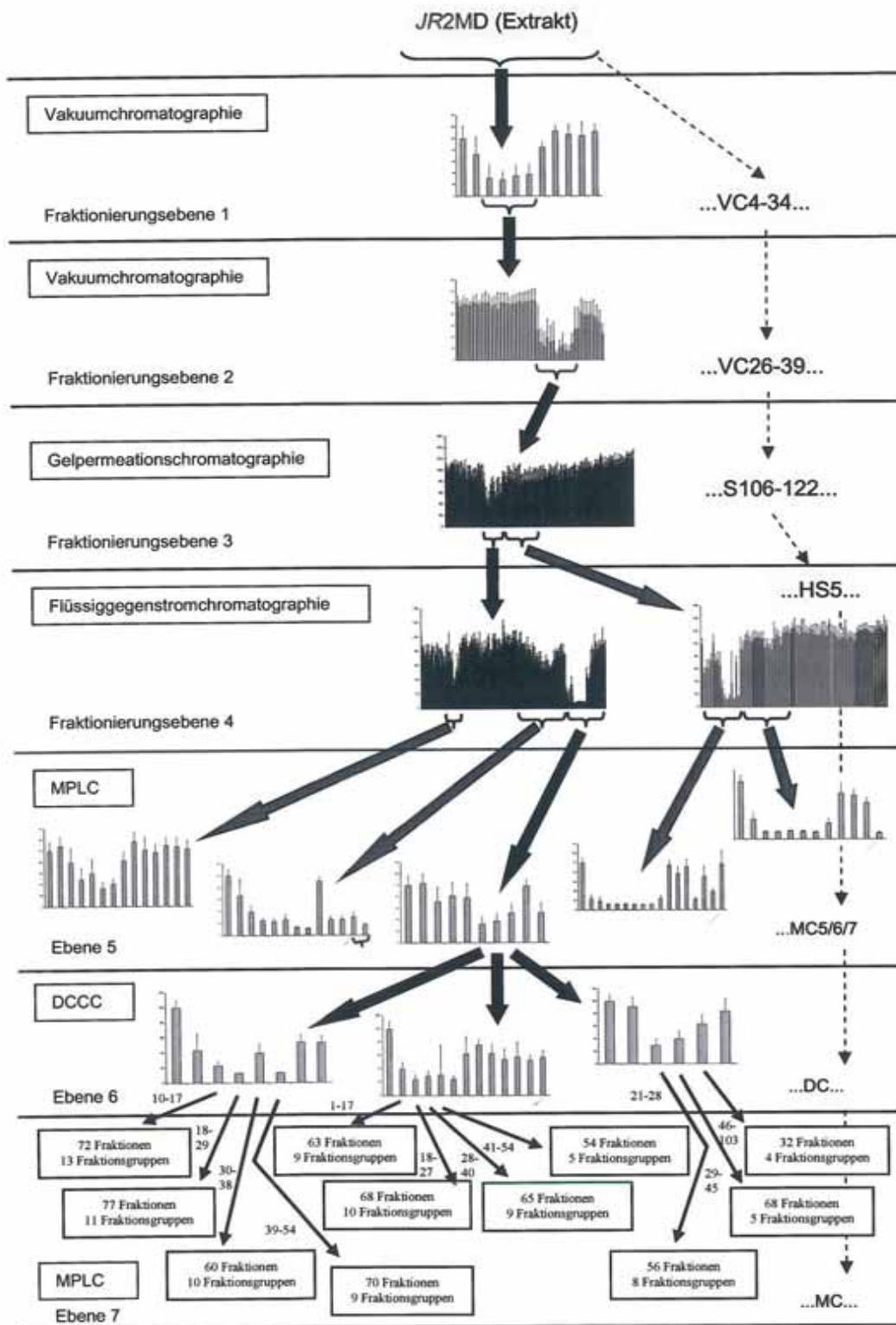


Abb. 45:

Stammbaum der „Familie 3“. Näheres siehe im Text.

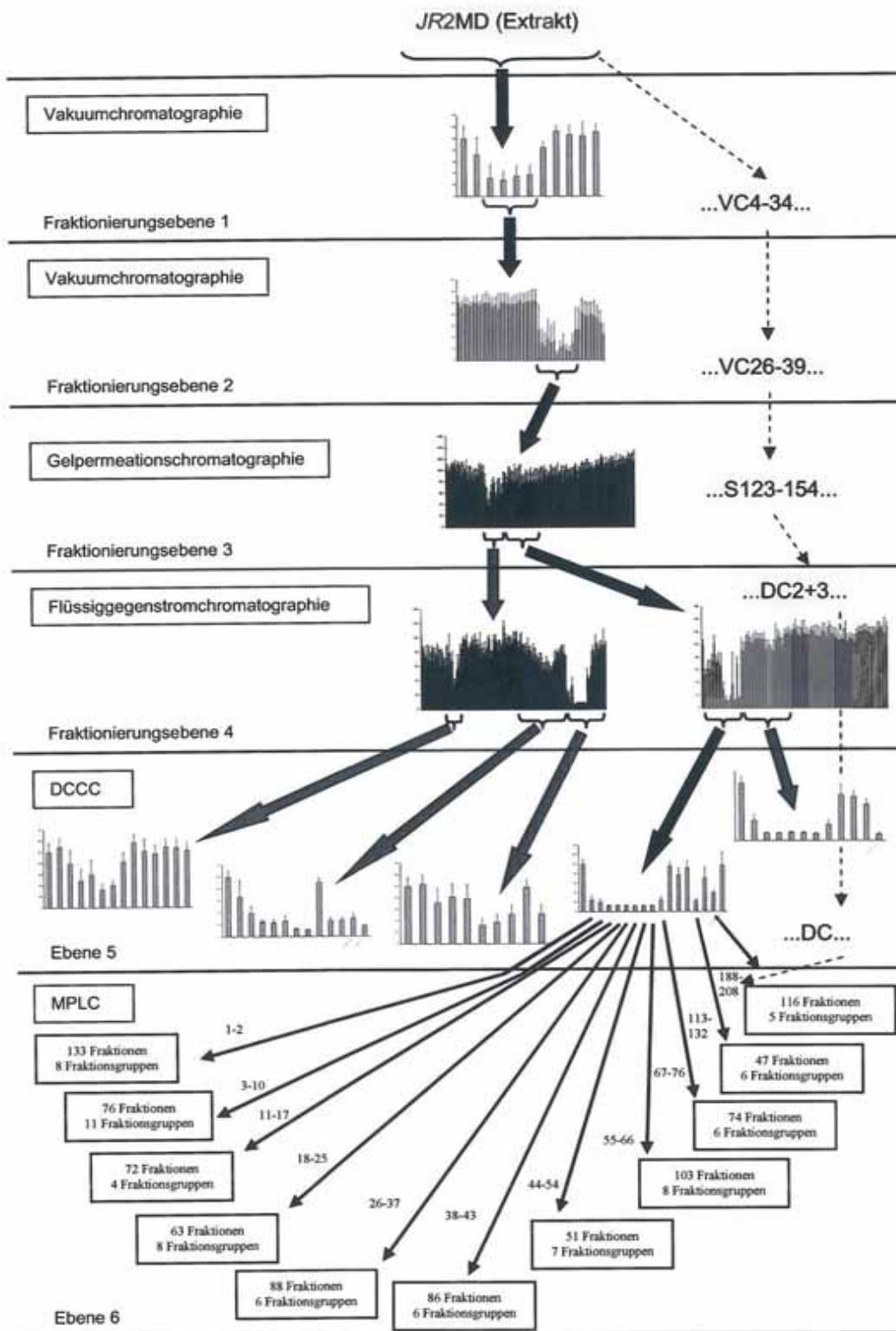


Abb. 46:

Stammbaum der „Familie 4“. Näheres siehe im Text.




Abb. 47:

Stammbaum der „Familie 5“. Fortsetzung siehe Abb. 48. Näheres siehe im Text.




Abb. 48:

Fortsetzung des Stammbaumes der „Familie 5“. Die komplexen Verwandtschaftsverhältnisse werden in der Darstellung deutlich. Nähere Erläuterungen finden sich im Text

CHRISTIANE GEWALTIG

16.09.2011

Persönliche Information

Geburtsdatum 05. Oktober 1975
Geburtsort Wattenscheid, jetzt Bochum

Berufliche Tätigkeit

Seit Feb 2003: Assistenzärztin, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Neuroradiologie, Universitätsklinikum Essen (AIP: 01.02.2003-31.07.04)
Seit Okt 2011: Fachärztin für Radiologie, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Neuroradiologie, Universitätsklinikum Essen

Dissertation

Dissertationsthema: „Walnuss gegen Krebs:
Antiproliferative in vitro Aktivität von *Juglans regia*
Extrakten auf humane Tumorzelllinien “

Studium

1995 – 2000: Westfälische-Wilhelms Universität, Münster:
Humanmedizin:
September 1997: Physikum
September 1998: 1. Staatsexamen
September 2000: 2. Staatsexamen
2001 – 2002 Universität GH Essen, PJ (Wahlfach: Radiologie)
Oktober 2002: 3. Staatsexamen

Tätigkeiten neben dem Studium

1995-1997 Aushilfe im Pflegedienst des Sankt Marien Hospitals,
Gelsenkirchen-Buer

1997 – 2000	EKM-Tutorin, Einführung in die klinische Medizin für Studierende des 1.Semesters
1998 – 1999	Studentische Hilfskraft im Forschungslabor der Chirurgie der WWU, Aufgaben: Organisation, Anleitung der technischen Assistentinnen (Zellkultur von Tumorzellen, ELISA, BrdU-Einbaumethode, LDH-Freisetzungstest)
2001	5 monatiges Praktikum als Unterassistentin im Forschungslabor von Prof. Dr. W. Vetter, Universitätsklinik, Zürich, Schweiz: Aufgaben: Grundlagenforschung: Organkammer-versuche an Aorta/Carotis von Mäusen und Ratten

Spezielle Qualifikationen und Zusatzkurse

WS96/97	English Conversation (Ergänzungskurs) an der WWU mit Abschlussprüfung)
SS97	Communication skills for Medicine (UNICERT III-Kurs an der WWU, mit Abschlussprüfung)
WS99/00	Kursus der Versuchstierkunde
2004	Fachkunde im Strahlenschutz: Gesamtbereich der Notfalldiagnostik

Weitere Aktivitäten

WS95/96-WS99/00	aktives Mitglied der Fachschaft Medizin der WWU
1997 - 1999	Finanzreferentin
WS98/99-SS99	Mitglied des Finanz- und Darlehensausschusses des Studentenparlamentes
Seit Dez 2004	Assistentensprecherin am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Neuroradiologie

Schule

1985-1995 Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Gelsenkirchen-Buer Juni 1995: Abitur
 1992-1993 Queenswood School, Hertfordshire, GB

Sprachkenntnisse

Englisch fließend
 Französisch Schulkenntnisse

PC-Kenntnisse Sehr gute Arbeitskenntnisse der MS Office-
Programme
Statistikprogramm (Graph Pad Prism)

Vorträge und Publikationen

1998 2. wissenschaftlicher Workshop der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie der WWU; Vortrag: „Antiproliferative Wirkung von Extrakten aus *Juglans regia* auf Kolonkarzinomzellen

1998 Meeting of the American Society of Pharmacologists, Florida, USA Vortrag: "Walnut against cancer?"

1999 3. wissenschaftlicher Workshop der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie der WWU; Vortrag: „Antiproliferative Wirkung von Extrakten aus *Juglans regia*“

2004 Experimentelle Radiologie 2004 – Techniken, Trends und Visionen: Vorträge:
1.)Echtzeit-MRT zur nicht-invasiven Bewertung gastraler Motilität
2.) MR-Kolonographie (MRK) ohne Darmreinigung

2004 The Fifth International Symposium on Virtual Colonoscopy (Boston): Vortrag: Value of MR-colonography (MRC) in patients with incomplete conventional colonoscopy

2004 DRG: Vortrag: Stellenwert Multiplanarer Rekonstruktionen zur Bewertung der Sondenlage bei PET/CT-gesteuerter Thermoablation von malignen Lebertumoren

2004 ESGAR: Vortrag: MR colonography - a practical alternative to CT colonography?

2004 ISMRM: Vorträge:
1.)MR Colonography Without Bowel Cleansing
2.) Combined MRI of Small and Large Bowel – a Feasibility Study

2005 Kuehle CA et al. Contrast-enhanced dark lumen

- PET/CT and MR colonography in a rodent polyp model: initial results with histopathologic correlation. *AJR*. 2005 Oct;185(4):1045-7.
- 2005 Lauenstein TC, Ajaj W, Kuehle CA. Virtual colonoscopy by MRI: state-of-the-art and future directions. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2005 Oct;15(4):797-811. Review.
- 2006 DRG: Vortrag: "Fecal tagging"-MR-Kolonographie: Ergebnisse einer prospektiven Studie an 315 Patienten
- 2006 Kuehle CA et al. Hydro-MRI of the small bowel: effect of contrast volume, timing of contrast administration, and data acquisition on bowel distention. *AJR*. 2006 Oct;187(4):W375-85.
- 2007 Kuehle CA et al. MR colonography without bowel cleansing - a prospective cross-sectional study in a screening population. *Gut*. 2007 Mar 6; [Epub ahead of print]