

**Studien zur Beeinflussung Bindegewebe-abbauender Proteasen
durch Basidiomyceten-Extrakte und deren Inhaltsstoffe,
unter besonderer Berücksichtigung der Fraktion freier Fettsäuren**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt Universität zu Berlin

von

Diplom-Pharmazeutin Beate Rennert

geboren am 21.06.1973 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Th. J. Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. M.F. Melzig
 2. Prof. Dr. H.-H. Borchert
 3. Prof. Dr. G. Reznicek

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2005

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
EINLEITUNG	5
1. Bindegewebe-abbauende Proteasen.....	5
2. Basidiomyceten: Einfluss auf Serin- und Metalloendopeptidasen	13
3. Problemstellung	16
UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE	17
1. Vorversuche und Methodenoptimierung	17
1.1. Bestimmung der Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase	17
1.2. Bestimmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase.....	21
1.3. Bestimmung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9.....	24
1.4. Bestimmung der Zytotoxizität	27
2. Screening von Basidiomyceten-Extrakten: Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	30
3. <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref. und <i>Lactarius deterrimus</i> Grög.: Botanik, Inhaltsstoffe und Bedeutung	32
3.1. <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.....	32
3.2. <i>Lactarius deterrimus</i> Grög.....	34
4. Isolation und Charakterisierung von Verbindungen mit Wirkung auf die Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase.....	36
4.1. Einfluss der Extrakte auf die Enzymaktivität	36
4.2. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung der Dichlormethan-Extrakte.....	37
4.3. Bestimmung des Fettsäureanteils mittels GC-MS	42
5. Freie langkettige Fettsäuren: Einfluss auf die Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase.....	51
6. Beeinflussung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 durch ausgewählte freie langkettige Fettsäuren	55

7. Bestimmung der Zytotoxizität	56
7.1. Extrakte	56
7.2. Fettsäuren	57
8. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien und ihre Beeinflussung	59
8.1. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien	59
8.2. Einfluss von APMA	61
8.3. Einfluss von 1.10-Phenanthrolin, EDTA und γ -Linolensäure	62
DISKUSSION	64
1. Einfluss der Basidiomyceten-Extrakte auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	64
2. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung	66
3. Freie langkettige Fettsäuren	69
3.1. Einfluss auf die Aktivität der Enzyme	69
3.2. Physiologische und therapeutische Bedeutung	73
3.3. Erucasäure	75
4. Einfluss von Naturstoffen und Synthetika auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	78
5. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien	81
6. Ausblick	83
EXPERIMENTELLER TEIL	84
1. Geräte	84
2. Material	85
2.1. Enzyme	85
2.2. Drogenmaterial	86
2.3. Zelllinien	86
2.4. Fettsäuren	88
2.5. Chemikalien, Reagenzien und Zellmedien	89

3. Methoden	91
3.1. Bestimmung der Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase	91
3.1.1. Methode unter Verwendung des Pz-peptids	91
3.1.2. Methode unter Verwendung von Resorufin-markiertem Casein	91
3.2. Bestimmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	92
3.3. Bestimmung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9	92
3.4. Herstellung der Pilzextrakte	94
3.5. Isolation und Identifizierung der Fettsäuren	96
3.5.1. Dünnschichtchromatographie	96
3.5.2. Säulenchromatographie	97
3.5.3. Isolation der Fettsäuren – <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	98
3.5.4. Isolation der Fettsäuren – <i>Lactarius deterrimus</i> Grög	98
3.5.5. Gaschromatographie-Massenspektrometrie	99
3.6. Bestimmung der Zytotoxizität	100
3.7. Nachweis von Proteaseaktivität im Überstand der Zellen	100
3.8. Mathematische Berechnungen und statistische Methoden	101
ZUSAMMENFASSUNG	103
LITERATURVERZEICHNIS	105
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	113
TABELLENVERZEICHNIS	114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APMA	4-Aminophenylquecksilberacetat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
dc	dünnschichtchromatographisch
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC	<i>Enzyme Commission (of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elastase	humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37)
FM	Fließmittel
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
<i>H. annosum</i>	<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.
IC ₅₀	Konzentration bei 50% Hemmaktivität (<i>inhibitory concentration</i>)
k.H.	keine Hemmung
Kollagenase	<i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase (EC 3.4.24.3)
<i>L. deterrimus</i>	<i>Lactarius deterrimus</i> Grög.
<i>L. edodes</i>	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase 1 (EC 3.4.24.7)
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2 (EC 3.4.24.24)
MMP-3	Matrix-Metalloproteinase 3 (EC 3.4.24.17)
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9 (EC 3.4.24.35)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
PE	Petrolether
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pz-peptid	[[[4-(Phenylazo-)benzyl-]oxy]carbonyl]-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Pro-D-Arg
R	Spannweite (<i>range</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
T	Teil
TCA	Trichloressigsäure
TIC	Totalionenstrom (<i>total ion current</i>)
Tricin	[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymaktivität: 1U = 1µmol/min)
UV	ultraviolett

EINLEITUNG

1. Bindegewebe-abbauende Proteasen

Der Begriff „Invasivität“ beschreibt die Fähigkeit von Zellen anatomische Barrieren (z.B. die Basalmembran, das Bindegewebe) zu überwinden. Physiologisch spielt die Invasivität von Zellen bei der Einnistung der Blastozyste, bei der Angiogenese oder der Leukozytenwanderung bei der Entzündung eine Rolle. Die rheumatoide Arthritis und die Tumorbildung und -ausbreitung zählen zu den pathologischen Prozessen, die mit der Invasivität von Zellen verknüpft sind. Weiterhin müssen auch alle Mikroorganismen ein invasives Potential besitzen, um in den Wirtsorganismus zu gelangen. Eine Voraussetzung für die Invasion von Zellen ist der Abbau der extrazellulären Matrix. Dies geschieht in erheblichem Maße durch Proteasen, die dadurch zu einem interessanten Forschungsobjekt für die Entwicklung von Arzneistoffen werden.

Extrazelluläre Matrix

Der Raum zwischen den Zellen, das Interstitium, ist mit interstitieller Flüssigkeit und in vielen Geweben mit komplex zusammengesetzten Interzellulärsubstanzen ausgefüllt. Diese Interzellulärsubstanzen, die in ihrer Gesamtheit als extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) bezeichnet werden, nehmen in einigen Geweben nur einen kleinen Raum, in anderen Geweben einen sehr großen Raum ein. Besonders ausgeprägt ist die extrazelluläre Matrix im Binde- und Stützgewebe, wo sie auch der eigentliche Funktionsträger des Gewebes ist. Aufgaben der extrazellulären Matrix sind u.a. die Herstellung der mechanischen Verbindung zwischen den Zellen (Verschiebeschicht), die Wasserspeicherung, der Transport und Austausch von Stoffwechselprodukten sowie die Bewegung von mobilen Zellen. Der fixe zelluläre Anteil des lockeren Bindegewebes besteht hauptsächlich aus den Fibroblasten und Fibrozyten. Während die Fibrozyten zeitweise inaktive Bindegewebszellen darstellen, produzieren und sezernieren die Fibroblasten die makromolekularen Bestandteile des extrazellulären Raumes. Diese Moleküle lassen sich vier Prototypen zuordnen: Kollagene, Elastin, Proteoglykane und Strukturglykoproteine.

Kollagene sind Skleroproteine, die eine beträchtliche Zugfestigkeit aufweisen. Es werden aufgrund der Aminosäuresequenz der Einzelketten und der Zusammensetzung der einzelnen Ketten mindestens 14 Kollagen-Typen unterschieden (Typ I - XIV), die in die fibrillären und nichtfibrillären Kollagene unterteilt werden können. Ein charakteristisches Merkmal aller Kollagentypen ist, dass zumindest ein Teil des Moleküls aus drei (identischen oder nichtidentischen) Polypeptidketten besteht, die die sich wiederholende Tripeptid-Sequenz *Gly-X-Y* besitzen und in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind. Bei den am häufigsten vorkommenden Kollagentypen I, II und III sind alle drei Ketten über den gesamten Bereich in Form der Helix gewunden. Bei allen weiteren Kollagentypen werden neben den fibrillären auch globuläre Anteile gefunden. So ist die Tripelhelix des Kollagen IV, welches für die Basalmembran spezifisch ist, durch etwa 20 nichthelikale Abschnitte unterbrochen, in denen die Kette dann eine höhere Flexibilität aufweist. In den helikalen Abschnitten besitzen die Peptidketten aller Kollagene eine spezifische Zusammensetzung an Aminosäuren: *Gly-X-Y*. Glycin stellt jede dritte Aminosäure dar, in der X- und Y-Position findet man häufig die Aminosäuren Prolin, an der Y-Stelle können aber auch 4-Hydroxprolin (oft), 3-Hydroxprolin und 5-Hydroxylysin (seltener) vorkommen [Löffler 1998].

Elastin ist ein elastisches Skleroprotein. Man findet es z.B. in Geweben des Herzkreislaufsystems (z. B. Aorta, Pulmonalarterie), des Respirationstraktes (Lunge, Bronchien) und der Haut. Elastin besitzt ein Molekulargewicht von 68 kDa und polymerisiert nach oxidativer Desaminierung von Lysylresten (zu Aldehyden) zu Desmosinverbindungen (Kondensationsprodukt aus Lysin) zu langen verknäulten Polypeptidketten. Die Peptidketten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (vor allem Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin) und wiederum Glycin und Prolin aus [Löffler 1998].

Proteoglykane sind die quantitativ bedeutendsten, strukturell vielfältigsten und funktionell vielseitigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix. Sie sind sehr große Molekülkomplexe (bis über 2000 kDa), bestehend aus Kohlenhydraten (85-95%) und Proteinen (5-15%) und liegen im Gegensatz zu den geformten Fasern von Kollagen und Elastin als amorphe Substanz vor. Der Aufbau ist Bürsten-ähnlich: an ein Kernprotein (sog. *Core*-Protein) werden viele lange, unverzweigte Kohlenhydratketten kovalent

gebunden. Die Kohlenhydratketten bestehen aus meist sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten, die aus einem Aminozucker (meist Glucosamin oder Galactosamin) und einem Monosaccharid-Derivat (meist einer Uronsäure: Glucuronsäure oder Iduronsäure) bestehen. Sie werden deshalb auch als Glykosaminoglykane bezeichnet. Zusätzlich können die Disaccharide noch sulfatiert und acetyliert sein. Bedingt durch die Anwesenheit von Uronsäuren und Sulfaten haben die Proteoglykane der extrazellulären Matrix saure Eigenschaften. Bei physiologischem pH-Wert liegen als Gegenionen vor allem Natrium-, Kalium- und Calcium-Ionen vor. Aufgrund dessen und aufgrund ihrer molekularen Struktur sind die vorkommenden Proteoglykane in der Lage, viel Wasser (und Kationen) zu binden. Viele Proteoglykane bilden mit Hyaluronsäure große, nicht-kovalente Aggregate. Hier bildet Hyaluronsäure eine Grundachse, an die sich dann die *Core*-Proteine anlagern, die ihrerseits wieder die vielen Polysaccharid-Ketten tragen, so dass der Aufbau dann einer Flaschenbürste ähnelt [Löffler 1998, Hänsel 1999].

Die Strukturglykoproteine bestehen zum Großteil aus Protein, an welches Monosaccharidketten gebunden sind, mit Molekulargewichten zwischen 150 – 400 kDa. Zu den Strukturglykoproteinen gehören die adhäsiven Glykoproteine (oder Nektine) und die Laminine. Nektine (z.B. Fibronectin) vermitteln den Kontakt zu den im Bindegewebe eingelagerten Zellen. Über die Adhäsionsrezeptoren auf den Zellen stellen sie die Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zellinneren her. Laminine sind wesentlich am Aufbau der Basalmembran beteiligt [Löffler 1998].

Neben den im lockeren Bindegewebe vorkommenden fixen Zellen können andere Zellen in das Gewebe „einwandern“. Zu diesen mobilen Zellen gehören neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten aber auch eosinophile Granulozyten und Mastzellen. Sie übernehmen im Fall von infektiösen und allergischen Erkrankungen (bzw. Reaktionen) die Deaktivierung der Mikroorganismen bzw. pathogenen Faktoren. Der Abbau der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes kann entsprechend der Einzelbestandteile durch Hydrolasen, vor allem Peptidasen und Glycosidasen erfolgen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Peptidasen: *Clostridium histolyticum* Kollagenase, humane neutrophile Elastase und (humane) Matrix-Metalloproteinase 9.

Clostridium histolyticum Kollagenase (EC 3.4.24.3)

Kollagenasen sind proteolytische Enzyme, die Kollagen in niedermolekulare Peptide spalten. Die *Clostridium histolyticum* Kollagenase (EC 3.4.24.3) gehört zur Klasse der Metalloendopeptidasen (Hydrolasen, Peptidasen: EC 3.4.24.x). Sie ist ein Gemisch von Kollagenasen, die aus dem Überstand von *C. histolyticum* Kulturen gewonnen werden. Derzeit sind 6 (Sekundärliteratur spricht von 7 [van Wart 1998]) Kollagenasen aufgereinigt und charakterisiert worden [Bond 1984a]. Sie werden aufgrund ihrer Reaktivität gegenüber Kollagen und synthetischen Peptidsubstraten in Klasse I – Kollagenasen (α , β , γ) und Klasse II – Kollagenasen (δ , ϵ , ζ) eingeteilt [Bond 1984b, van Wart 1985]. Alle *Clostridium histolyticum* Kollagenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptid-Kette mit Molekulargewichten zwischen 68 kDa und 125 kDa (die Benennung der Kollagenasen nach ihrem Molekulargewicht scheint zu weniger Missverständnissen zu führen). Sie enthalten zwischen 2 und 5 Cystein-Resten pro Kette, allerdings ist nicht bekannt, ob sie Disulfidbrücken ausbilden. Die isoelektrischen Punkte liegen zwischen 5.35 und 6.20. Alle Kollagenasen enthalten etwa 1 Zink-Ion pro Kette. Dieses Zink-Ion ist essentiell für die Reaktivität der Enzyme und befindet sich vermutlich im aktiven Zentrum, welches als HEYTH (L-Histidin-L-Glutaminsäure-L-Tyrosin-L-Threonin-L-Histidin) beschrieben wird. Zur Stabilisierung der Struktur des Enzyms enthalten die Kollagenasen neben Zink Calcium-Ionen: 1.9 (α -Kollagenase) bis 6.8 (β -Kollagenase) Ionen pro Molekül [van Wart 1998]. Eine Kristallisation einzelner Kollagenasen ist bisher nicht publiziert worden, so dass kaum Aussagen zur Tertiärstruktur gemacht werden können.

Die *Clostridium histolyticum* Kollagenase kann sowohl natives wasserunlösliches als auch denaturiertes wasserlösliches Kollagen abbauen. Fast alle Kollagen-Typen werden angegriffen, wobei der Abbau von den helikalen Kollagenen Typ I, II und III sehr gut charakterisiert ist [Mookhtiar 1992, van Wart 1998].

Clostridium histolyticum ist ein grampositives, sporenbildendes Bakterium, das sich nur anaerob kultivieren läßt. Es gehört neben *Clostridium perfringens*, *C. novyi* und *C. septicum* zu den Erregern des Gasbrands / Gasödems. Das Bakterium nutzt die Kollagenasen, zum einen um in den Wirtsorganismus zu gelangen, zum anderen sind die aus dem Abbau des Kollagens entstandenen Peptide Nahrungsgrundlage. Ein alternativer Angriffspunkt hinsichtlich der Abwehr gegenüber infektiösen Organismen, könnte die

Verhinderung des Einwanderns der Mikroorganismen in den Wirt sein. Näher behandelt wird diese Angriffsmöglichkeit in der Übersicht von Travis *et al.* [Travis 2000].

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) wird in der Literatur auch immer wieder der Modellcharakter der *Clostridium histolyticum* Kollagenase betont [Scozzafava 2000]. Die *Clostridium histolyticum* Kollagenase und die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind multidomäne Zink-enthaltende Proteine, die zur Klasse der Metalloendopeptidasen (EC 3.4.24.x) gehören. Ihr Mechanismus zur Hydrolyse von Proteinen und synthetischen Substraten ist ähnlich und es existieren Inhibitoren (z.B. Hydroxamsäure-Derivate), die sowohl gegenüber der *Clostridium histolyticum* Kollagenase als auch gegenüber den MMPs aktiv sind [Scozzafava 2000, Kumar 2003]. Es zeigt sich jedoch immer mehr, dass die Unterschiede gegenüber den Gemeinsamkeiten überwiegen [Jung 1999], was allein bei der Vielfalt der MMPs nicht überrascht. Immerhin werden min. 25 Enzyme zur Gruppe der Matrix Metalloproteinasen gerechnet [Lauer-Fields 2002].

Humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37)

Die humane neutrophile Elastase gehört zur Klasse der Serin-Proteasen (Hydrolasen, Peptidasen: EC 3.4.21.x), hier zur Chymotrypsin Familie (S1). Ältere Bezeichnungen sind humane Leukozyten-Elastase, Granulozyten-Elastase oder Serin-Elastase. Die neutrophile Elastase ist ein 30 kDa Glycoprotein [Baugh 1976], bestehend aus einer einzelnen Peptidkette mit 218 Aminosäuren und 4 Disulfid-Brücken. Das aktive Zentrum setzt sich aus den His-, Asp- und Ser-Resten zusammen [Bode 1989].

Die humane neutrophile Elastase kommt hauptsächlich in den Azurgranula der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten vor. Sie wurde aber auch in der Membran des Zellkerns, im Golgi-Apparat, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen [Bieth 1998].

Neben Elastin baut die humane neutrophile Elastase weitere Skleroproteine ab, z.B. Kollagen Typ I, II, III, IV, VIII, IX, X und XI, Strukturglykoproteine wie Fibronectin und Laminin, sowie Proteoglykane. Weiterhin stimuliert die neutrophile Elastase den Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix auch indirekt. So wurde nachgewiesen, dass sie

die MMP-9 und MMP-3 in ihre aktive Form überführen kann [Okada 1989, Delclaux 1996, Ferry 1997]. Für die MMP-2 liegen diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse vor [Okada 1989, Rice 1995]. Weitere physiologische Angriffspunkte für die neutrophile Elastase sind das Immunsystem und das Blutgerinnungssystem [Bieth 1998].

Obwohl sehr umfangreiche Ergebnisse über das Enzym Elastase in der Literatur vorliegen, scheint seine biologische Funktion noch nicht vollständig klar zu sein. Die meisten Erkenntnisse weisen auf Zerstörungen von Gewebe hin. Eine Konzentration von etwa 5mM (!) Enzym in den Azurgranula der neutrophilen Granulozyten wurde geschätzt. Unter normalen Bedingungen werden davon weniger als 2% in den Extrazellularraum sekretiert. Neutrophile Granulozyten sind jedoch in der Lage 12% der Enzymmenge in den Zellmembranen zu lokalisieren, hier soll das Enzym dann auch aktiv aber relativ widerstandsfähig gegenüber Inhibitoren sein. Um eine Zerstörung des körpereigenen Bindegewebes zu verhindern, sind im Körper physiologische Gegenspieler der neutrophilen Elastase, wie das α_1 -Antitrypsin und das α_2 -Makroglobulin vorhanden. Das α_1 -Antitrypsin beispielsweise kommt in sehr großen Mengen im Extrazellularraum vor. Aufgrund der geringen Konzentration an Elastase im Extrazellularraum und der dagegen hohen Konzentration von α_1 -Antitrypsin könnte man vermuten, dass die bedeutende biologische Funktion der Elastase vor allem im Intrazellularraum ausgeübt wird. Das könnte auf eine antimikrobielle Aktivität hinweisen. Andererseits können große Mengen an Elastase von den Zellen während „*frustrated phagocytosis*“ und dem sich anschließenden Zelltod freigesetzt werden (falls die Zellen nicht von Makrophagen aufgenommen werden). Sollte die Menge an α_1 -Antitrypsin dann nicht ausreichen, könnte die Elastase zerstörerisch wirksam werden [Shapiro 2002]. Dies scheint beim Lungenemphysem der Fall zu sein: durch einen Infekt kann es zu einer erhöhten Elastase-Freisetzung kommen. Bei gleichzeitiger Vorschädigung des α_1 -Antitrypsins (z.B. durch Oxidation mittels Zigarettenrauch) führt dies zu einem Übergewicht an Elastase, die dann die Alveolarwände der Lunge durch Abbau der elastischen Fasern und anderer Matrix-Proteine ungehindert angreifen kann [Bieth 1998].

Weitere Erkrankungen, bei denen die neutrophile Elastase eine bedeutende Rolle zu spielen scheint, sind die Mukoviszidose (cystische Fibrose), die Schocklunge (ARDS: *adult respiratory distress syndrome*), die rheumatoide Arthritis und infektiöse

Erkrankungen [Bieth 1998].

Nicht zu verwechseln ist die hier besprochene und in der vorliegenden Arbeit verwendete humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37) mit der Pankreas-Elastase (EC 3.4.21.36) und der Metallo-Elastase (Makrophagen-Elastase, EC 3.4.24.65). Die Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich Aufbau und Substratspezifität. Da der verkürzte Name „Elastase“ bei allen drei Enzymen identisch ist, kommt es hier häufig zu Missverständnissen in der Literatur, die vor diesem Hintergrund kritisch auszuwerten ist.

Matrix Metalloproteinase 9 (EC 3.4.24.35)

Die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) gehört zur Gruppe der Matrix Metalloproteinasen. Die Matrix Metalloproteinasen werden der Klasse der Metalloendopeptidasen (Hydrolasen, Peptidasen: EC 3.4.24.x) zugeordnet, das Zentralion ist Zink (Zn^{2+}). Ältere Bezeichnungen für die MMP-9 sind Gelatinase B, Gelatinase 92kDa oder 92kDa Typ IV Kollagenase.

Die MMP-9 kann von Alveolarphagozyten (Makrophagen), neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Keratinozyten und Trophoblasten sezerniert werden [Lee 2001, Westermarck 1999]. Durch Abspaltung eines amino-terminalen Propeptides wird die inaktive 92kDa Proform in die aktive Form überführt. Diese Aktivierung kann durch Serin-Proteasen (z.B. Cathepsin G, Trypsin, humane neutrophile Elastase), durch andere MMPs (z.B. MMP-3) oder *in vitro* unter Ausschluss von Enzym durch Organo-Quecksilberverbindungen (z.B. APMA) erfolgen. Die entstandene aktive Form der MMP-9 scheint hinsichtlich der Molekülgröße nicht einheitlich zu sein. Die Angaben in der Literatur reichen von 71 bis 88kDa, auch in Abhängigkeit von der Art der Aktivierung [Delclaux 1996, Ferry 1997, Matrisian 1992, Westermarck 1999].

Aktiviert MMP-9 kann *in vitro* Elastin, Typ IV und Typ V Kollagen in helikalen Domänen und Gelatine (denaturiertes Typ I Kollagen) abbauen aber kein intaktes Typ I Kollagen [Hibbs 1987, Liotta 1979, Senior 1991]. Ein Nachweis für den Abbau *in vivo* steht jedoch noch aus [Westermarck 1999]. Physiologische Inhibitoren der MMP-9 sind TIMP-1 und TIMP-2 (TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinases*). Beide können an die aktivierte MMP-9 binden und das Enzym inhibieren. Zusätzlich ist TIMP-1 in der Lage an

die 92kDa Proenzym-Form zu binden, wobei die Aktivierung unterbunden wird. Dies hat zur Folge, dass trotz einer großen Anzahl von MMP-9 sekretierenden Zellkulturen, sich die Gewinnung von TIMP-1-freiem Proenzym schwierig gestaltet [Collier 1998].

Die Matrix Metalloproteinase 9 besteht aus mehreren strukturellen Domänen: an das N-terminale Propeptid schließt sich die katalytische Domäne an, in die eine Fibronektin-artige Sequenz inseriert ist. Der zweite Teil der katalytischen Domäne enthält die Zink-Bindungsstelle des aktiven Zentrums. An die katalytische Domäne schließt sich eine Kollagen-artige Domäne an und daran die C-terminale Hämpexin-artige Domäne. Die Fibronektin-artige Domäne ist für die Bindung zu Kollagen nötig, wohingegen die Hämpexin-artige Domäne für die Bildung des Komplexes des Proenzymes mit TIMP-1 erforderlich ist [Collier 1998, Matrisian 1992, Westermarck 1999].

Die physiologische und pathologische Bedeutung der MMP-9 wird intensiv untersucht, so kann das Enzym bei einer Vielzahl von Entzündungsreaktionen und Tumoren nachgewiesen werden [Collier 1998]. Wegen der Fähigkeit Typ IV Kollagen (der Hauptkomponente der Basalmembran) abzubauen, ist anzunehmen, dass die MMP-9 eine Rolle im Um- und Abbau der Basalmembran spielt. Durch die Basalmembran (ca. 1µm dick) ist das Epithelgewebe mit dem Bindegewebe verbunden und gleichzeitig voneinander abgegrenzt. Das ist insofern von Bedeutung, dass erst nach dem Durchbruch der Basalmembran für die Zellen (Leukozyten, Tumorzellen etc.) Anschluss an die Blut- und Lymphgefäße besteht. Ein kontrollierter Abbau der Basalmembran ist ein Schlüsselschritt bei vielen physiologischen Prozessen, wie z.B. bei der Entwicklung fötaler Gewebe, der Angiogenese, der Wundheilung, dem Knochenumbau oder der Wanderung von Makrophagen und Leukozyten. Einen „pathologischen Abbau“ hingegen findet man bei der Einwanderung von Tumorzellen und der Metastasierung. Das macht die MMP-9 zu einem interessanten Zielobjekt für die Suche nach therapeutischen Wirkstoffen.

2. Basidiomyceten: Einfluss auf Serin- und Metalloendopeptidasen

Höhere Pilze als potentielle Naturstoffproduzenten sind in den letzten zwei Jahrzehnten verstärkt in das Blickfeld der Forschung aufgenommen worden. Die Auswahl der Arten zur näheren Charakterisierung und pharmakologischen Prüfung erfolgte meist aufgrund der Anwendung entsprechender Pilze in der Volksmedizin, der Verbreitung und ökologischen Bedeutung der Pilze, z. T. aufgrund der Ergebnisse von Screening-Tests und der Übertragung dieser Resultate auf ähnliche physiologische und molekularbiologische Mechanismen. In der Volksmedizin werden und wurden Basidiomyceten bzw. deren Inhaltsstoffe vor allem im osteuropäischen und asiatischen Raum genutzt. Die bei Pilzen häufig gefundene antibakterielle, zytostatische und antivirale Wirksamkeit ist aufgrund der notwendigen Abwehrstrategien zur Sicherung der Existenz der Basidiomyceten nicht überraschend. Aber auch weitere pharmakologische Effekte, wie immunstimulierende, antiallergische und auch hypoglykämische, lipidsenkende und hypotensive Wirkungen zeigten, dass Extrakte bzw. isolierte Substanzen von Basidiomyceten eine potentielle Quelle für neue Arzneistoffe bzw. Leitstrukturen sein können [Lindequist 1990, Wasser 1999]. Häufig bezogen sich die Untersuchungen, meist in Anlehnung an die Volksmedizin, auf ausgewählte Basidiomyceten. Screening-Tests einer größeren Anzahl von Pilzen hinsichtlich einer Wirkung bzw. eines Wirkungsmodells lagen weniger vor bzw. waren nicht veröffentlicht. Dies stellte dann jedoch auch die Spezifität einer Wirkung einzelner Pilze in Frage.

Untersuchungen hinsichtlich einer Beeinflussung der humanen neutrophilen Elastase durch Basidiomyceten-Extrakte bzw. deren Inhaltsstoffe gab es in der Literatur bisher nicht. Hinweise zur Beeinflussung anderer Serin-Proteasen konnten jedoch gefunden werden.

Pilgrim *et al.* [Pilgrim 1992] beschrieben eine Hemmung der Aktivität von Trypsin durch wässrige Basidiomyceten-Extrakte. Von den untersuchten Extrakten von 46 Arten wurde bei 8 Extrakten eine hohe Inhibitoraktivität ($\geq 50\%$) bestimmt. Beim Vergleich der Dosis-Effekt-Kurve des wirksamsten Extraktes [*Laccaria proxima* (Boud.) Pat.] mit der eines unter gleichen Bedingungen hergestellten *Phaseolus vulgaris* L. Extraktes konnte festgestellt werden, dass die IC_{50} -Werte eine gleiche Größenordnung besitzen (*Laccaria proxima*: $IC_{50}=2.4\text{mg/ml}$, *Phaseolus vulgaris* $IC_{50}=1.4\text{mg/ml}$). Interessant ist die weitergehende Untersuchung der Pilz-Extraktlösungen hinsichtlich des Gerbstoff-Gehaltes.

Mit Ausnahme von zwei Extrakten trat keine positive Gerbstoffreaktion auf, es wurde das Vorhandensein von „echten“ Trypsin-Inhibitoren postuliert [Pilgrim 1992].

Doljak *et al.* [Doljak 2001] untersuchten den Einfluss polarer Extrakte (50% Methanol/Wasser) von Basidiomyceten auf die Aktivität von Thrombin und Trypsin. 3 von 95 getesteten Extrakten hemmten Thrombin unter den angegebenen Bedingungen stark ($\geq 50\%$) und 3 hatten eine hohe Inhibitoraktivität ($\geq 50\%$) gegenüber Trypsin. Bei beiden Enzymen war der aktivste Extrakt, der Extrakt von *Gleophyllum odoratum* (Wulf.:Fr.) Imazeki.

Zum Einfluss von Basidiomyceten-Extrakten auf Metalloendopeptidase-Aktivität lagen Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe vor. Melzig *et al.* [Melzig 1996] konnten einen hemmenden Effekt von wässrigen Extrakten von Basidiomyceten auf die Aktivität der Neutralen Endopeptidase (NEP) und des *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) nachweisen. 23 von 27 Extrakten hemmten die Aktivität der Metalloendopeptidase NEP, für 5 wurden IC_{50} -Werte von 40-55 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die Aktivität der Dipeptidylpeptidase ACE wurde von 6 (von 27) Extrakten gehemmt, die IC_{50} -Werte lagen hier zwischen 200-1500 $\mu\text{g/ml}$.

In der Diplomarbeit von Rennert [Rennert 1998] wurden wässrige und Dichlormethan-Extrakte von 21 Basidiomyceten auf eine Beeinflussung der Kollagenase-Aktivität getestet. In Konzentrationen von 2mg Extrakt pro ml Ansatz zeigten nur 3 der wässrigen Extrakte hemmende Effekte (unbedeutend mit max. 8 bis 14%). Die Dichlormethan-Extrakte hemmten die Aktivität der Kollagenase in Konzentrationen von 200 μg Extrakt pro ml Ansatz (mit Ausnahme eines Extraktes). Für 11 der lipophilen Extrakte konnte ein IC_{50} -Wert von unter 200 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Als wirksamste Extrakte erwiesen sich die von *Heterobasidion annosum* (Fr.)Bref., *Lactarius deterrimus* Grög. und *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler mit IC_{50} -Werten von 80-100 $\mu\text{g/ml}$. Eine Übersicht der Ergebnisse gibt Tab. 1. Die Auswertung der Ergebnisse der Diplomarbeit ließ auf ein Vorkommen von Kollagenase-Inhibitoren in den Dichlormethan-Extrakten schließen. Der Vergleich der erzielten Hemmaktivitäten mit Angaben aus der Literatur zu Kollagenase-hemmenden Verbindungen zeigte, dass die lipophilen Basidiomyceten-Extrakte eine potente Quelle für Kollagenase-Inhibitoren darstellen können [Rennert 1998].

Tab. 1: Einfluss der Dichlormethan-Extrakte von Basidiomyceten auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase

Name des Basidiomyceten	Hemmung der Kollagenase-Aktivität [%] durch DCM-Extrakte 200µg/ml
Agaricaceae Cohn	
<i>Macrolepiota rhadoces</i> (Vitt.) Sing.	74.1 $R=7.2$
Coriolaceae Sing.	
<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolt.:Fr.) Schroet.	43.6 $R=15.8$
<i>Fomes fomentarius</i> (L.:Fr.) Fr.	20.3 $R=1.8$
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sow.:Fr.) Karst.	27.5 $R=1.1$
<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	55.4 $R=12.5$
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Pil.	k.H.
Ganodermataceae Donk	
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.:S.F.Gray) Pat.	37.2 $R=1.4$
Geastraceae E.Fischer	
<i>Geastrum melanocephalum</i> Czern.	47.1 $R=2.6$
Hymenochaetaceae Donk	
<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.:Fr.) Karst.	72.5 $R=10.0$
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Pil.	k.H.
Pluteaceae Kotl. & Pouz.	
<i>Volvariella speciosa</i> (Fr.:Fr.) Sing.	68.4 $R=3.6$
Polyporaceae CDA.	
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	80.2 $R=6.9$
<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.:Fr.) Karst.	33.1 $R=0.5$
Russulaceae Roze	
<i>Lactarius deterrimus</i> Grög.	72.8 $R=5.3$
Scutigeraceae Bond.&Sing.	
<i>Meripilus giganteus</i> (Pers.:Fr.) Karst.	62.4 $R=8.8$
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat.	63.8 $R=13.3$
Strophariaceae Overeem: Sing & Smith	
<i>Pholiota squarrosa</i> (Pers.:Fr.) Kumm.	57.4 $R=10.1$
Tricholomataceae Roze: Overeem	
<i>Collybia dryophila</i> (Bull.:Fr.) Kumm.	28.9 $R=15.8$
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.) Karst.	24.9 $R=4.8$
<i>Tricholoma populinum</i> LGE.	60.4 $R=0.6$
<i>Tricholomopsis rutilans</i> (Schiff.:Fr.) Sing.	68.0 $R=1.3$

aus Rennert 1998: k.H. – keine Hemmung, R – Spannweite, $n \geq 3$

3. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss der wässrigen und Dichlormethan-Extrakte von Basidiomyceten auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase untersucht werden.

Nach Auswertung dieses Screenings und der Daten aus den bereits durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer Beeinflussung der Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase sollte durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung von in ihrer Aktivität auffälligen Extrakten der Versuch unternommen werden, die für diese Wirkung verantwortlichen Komponenten zu isolieren und zu identifizieren.

Sollten die für die Wirkung verantwortlichen Naturstoffgruppen identifiziert werden, könnten im Rahmen eines Screenings innerhalb dieser Naturstoffgruppen bestimmte für die Wirkung erforderliche Strukturen näher charakterisiert werden.

Um Aussagen über die Spezifität der Wirkung gegenüber den Enzymen treffen zu können, sollte eine weitere Bindegewebe-abbauende Protease (MMP-9) hinsichtlich einer Beeinflussung durch die identifizierte Naturstoffgruppe untersucht werden.

Studien zur Zytotoxizität der Basidiomyceten-Extrakte und der gefundenen Naturstoffe sollten erste Hinweise bezüglich einer möglichen therapeutischen Anwendung geben.

Um eine Übertragung der in den biochemischen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse auf Zellkultursysteme zu ermöglichen, sollten verschiedene Zelllinien hinsichtlich einer Sekretion von Proteasen und deren Aktivität getestet werden. Erste Versuche zur Hemmung sezernierter Proteasen sollten durchgeführt werden.

UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

1. Vorversuche und Methodenoptimierung

1.1. Bestimmung der Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase

Die Bestimmungen wurden entsprechend der Beschreibung unter Exp. Teil 3.1.2 durchgeführt. Es wurde jeweils der Parameter geändert, der aus den folgenden Absatzüberschriften hervorgeht.

Einfluss der Substratkonzentration

Es wurden Versuche mit Substratkonzentrationen von 1.06 μ M, 2.12 μ M, 3.18 μ M, 4.24 μ M, 6.36 μ M und 8.47 μ M im Reaktionsansatz (720mU Kollagenase, 60min Inkubation) durchgeführt. Bei Verwendung der 6.36 μ M bzw. 8.47 μ M Substratlösung erwies sich die Konzentration der entstandenen Fragmente als zu hoch für eine Fluoreszenzbestimmung. Mit 1.06 μ M, 2.12 μ M, 3.18 μ M und 4.24 μ M Lösungen konnten bei einer Enzymmenge, die 720mU entsprach, steigende Fluoreszenzeinheiten bestimmt werden, was auf einen Substratmangel hindeutete. In den folgenden Versuchen musste also die einzusetzende Enzymkonzentration noch gesenkt werden.

Einfluss der Enzymmenge

In Abb. 1 ist beispielhaft die Abhängigkeit der Konzentration der Reaktionsprodukte (dargestellt als Fluoreszenzeinheiten) von der Enzymaktivität im Versuchsansatz dargestellt. Bei Einsatz von 4.24 μ M Substratlösung und 60min Inkubationsdauer wurden Kollagenasemengen, die folgenden Enzymaktivitäten entsprachen, eingesetzt: 180mU, 360mU, 540mU, 720mU und 900mU. Dem Diagramm war zu entnehmen, dass mit steigender Enzymaktivität auch die Anzahl der Fluoreszenzeinheiten und damit die Konzentration der Reaktionsprodukte stieg. Der Verlauf war jedoch nicht linear, sondern entsprach einer Kurve. Bei höheren Enzymaktivitäten sank die Reaktionsgeschwindigkeit, vermutlich aufgrund eines eintretenden Substratmangels. Um einerseits ausreichend Fluoreszenz zu messen, andererseits aber nicht im Substratmangel zu arbeiten, wurde die anzustrebende Enzymaktivität in der vorliegenden Versuchsreihe auf 360mU festgelegt.

Aufgrund der unterschiedlichen Enzymaktivitäten der einzelnen Chargen mussten die einzusetzenden Kollagenasemengen jedoch regelmäßig neu bestimmt werden.

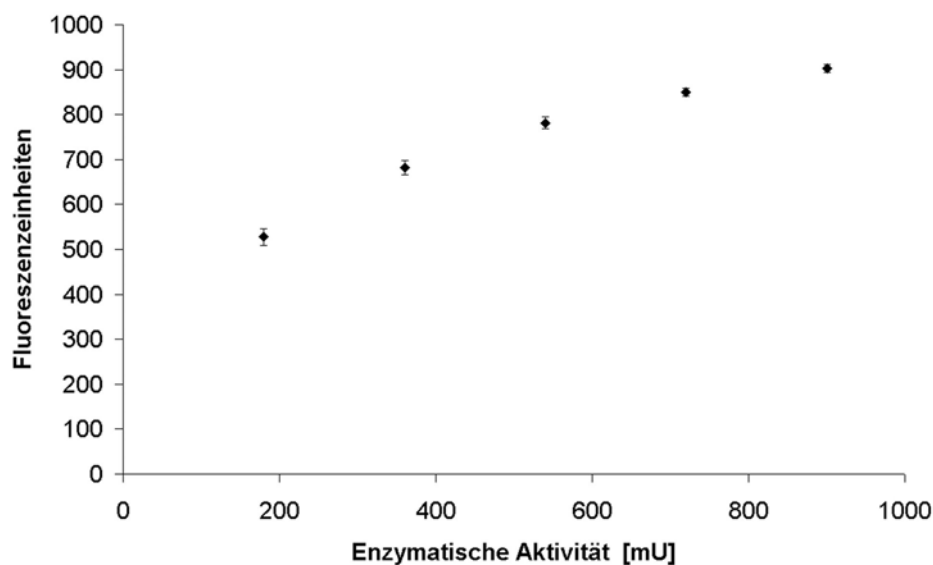


Abb. 1: Abhängigkeit der Zahl der Fluoreszenzeinheiten von der enzymatischen Aktivität im Kollagenase-Assay

$n \geq 3$, Mittelwert \pm SD, Methode s. Exp. Teil 3.1.2: $4.24\mu\text{M}$ Substrat, 60min Inkubation

Einfluss der Inkubationsdauer

Für die Ermittlung einer optimalen Versuchsdauer wurden die Proben 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180min inkubiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer (bis 120min) stieg die Fluoreszenz und somit auch die Konzentration der entstandenen Reaktionsprodukte (s. Abb. 2). Da die Darstellung der Werte im Diagramm einer Kurve entsprach, musste man annehmen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Inkubationszeit sank (wahrscheinlich aufgrund von Substratmangel). Um einerseits ausreichend messbare Konzentrationen des Reaktionsproduktes zu erhalten, andererseits jedoch nicht mit Substratmangel zu arbeiten, wurde die Inkubationsdauer auf 60min festgelegt.

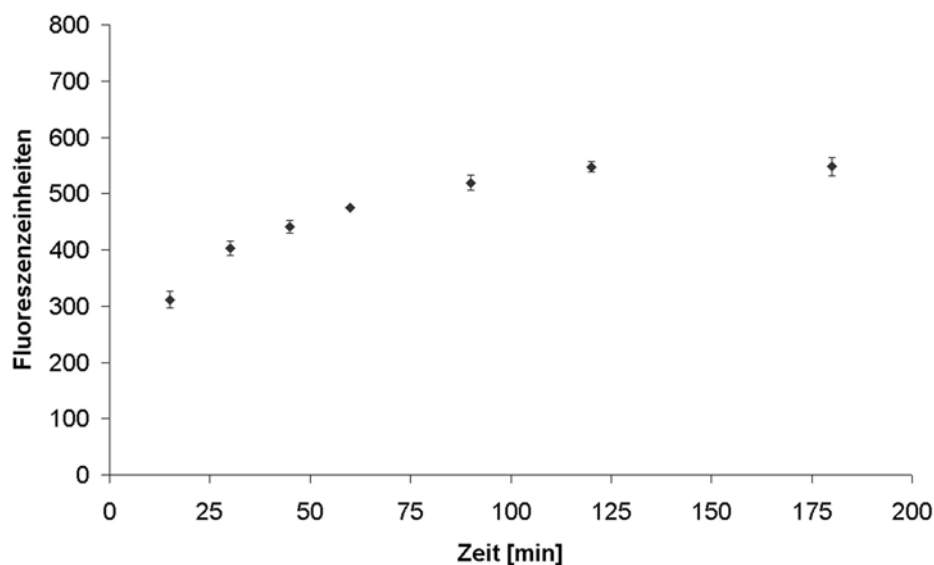


Abb. 2: Abhängigkeit der Zahl der Fluoreszenzeinheiten von der Inkubationsdauer im Kollagenase-Assay

$n \geq 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.1.2: $4.24\mu\text{M}$ Substrat, 360mU Kollagenase

Einfluss von EDTA und 1.10-Phenanthrolin

Als Positivkontrolle für die Kollagenase wurden die für Metalloendopeptidasen unspezifisch inhibitorisch wirksamen Verbindungen EDTA und 1.10-Phenanthrolin verwendet. Für EDTA wurde bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ eine 99.5%ige Hemmung bestimmt ($SD=1.53$, $n=4$), die IC_{50} lag bei $3.6\mu\text{M}$. Für 1.10-Phenanthrolin konnte bei einer Konzentration von 1mM eine 95.1%ige Hemmung ($SD=1.63$, $n=3$) errechnet werden, die IC_{50} lag bei $49.4\mu\text{M}$.

Einfluss von DMSO

Um den Großteil der getesteten Extrakte, Fraktionen und Substanzen in Lösung zu bringen, musste mit DMSO als Lösungsvermittler gearbeitet werden. Den Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität zeigt Tab. 2:

Tab. 2: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase

Konzentration DMSO [% (V/V)]	Relative Enzymaktivität [%]
0.0	100.0 <i>SD</i> =3.31
0.5	94.0 <i>SD</i> =1.79
1.0	90.7 <i>SD</i> =3.97
2.0	83.7 <i>SD</i> =8.14
5.0	62.2 <i>SD</i> =18.13

n = 3, Streuung - *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.1.2: 4.24µM Substrat, 360mU Kollagenase

DMSO beeinflusste die Aktivität der Kollagenase konzentrationsabhängig. Aufgrund der geringen Löslichkeit der untersuchten Substanzen musste jedoch mit (max.) 1%igen DMSO-Konzentrationen in den Versuchen gearbeitet werden. Eine Kontrolle für die jeweilige DMSO-Konzentration wurde in jeder Versuchsreihe mitgeführt.

Vergleich der Substrate

In der Diplomarbeit [Rennert 1998] wurde zur Bestimmung der Kollagenase-Aktivität mit einem synthetischen Peptid als Substrat gearbeitet. Da die Durchführung der Methode unter Verwendung des synthetischen Peptids erheblich aufwendiger war, als die Methode unter Verwendung des Resorufin-markierten Caseins, wurde die Bestimmung mit Hilfe des Caseins in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Ein weiteres Argument für die Verwendung des Caseins war die Tatsache, dass Casein als Substrat näher an die physiologischen Verhältnisse anknüpfte als ein synthetisches Peptid. Um Rückschlüsse auf eine Vergleichbarkeit beider Methoden ziehen zu können, wurden die in der Diplomarbeit hergestellten DCM-Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., *Lactarius deterrimus* Grög. und *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, sowie die Positivkontrolle EDTA auf eine Beeinflussung der Aktivität der Kollagenase mit Hilfe beider Bestimmungsmethoden (s. Exp. Teil 3.1.1 und Exp. Teil 3.1.2) getestet (Tab. 3):

Tab. 3: Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase

Konzentration Testsubstanz	Rel. Enzymaktivität (Pz-peptid)	Rel. Enzymaktivität (Casein)
1µM EDTA	95.6 $R=6.1, n=3$	90.4 $R=5.5, n=4$
10µM EDTA	90.5 $R=7.3, n=3$	-1.0 $R=4.4, n=4$
100µM EDTA	8.2 $R=0.9, n=3$	0.0 $R=0.4, n=2$
200µg/ml DCM-Extrakt <i>H. annosum</i>	55.4 $R=12.5, n=3$	21.6 $R=2.7, n=2$
200µg/ml DCM-Extrakt <i>L. deterrimus</i>	72.8 $R=5.3, n=3$	21.3 $R=0.1, n=2$
200µg/ml DCM-Extrakt <i>L. edodes</i>	80.2 $R=6.9, n=3$	71.7 $R=6.1, n=2$

Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.1.1 und 3.1.2

Es zeigte sich, dass qualitativ gleiche Ergebnisse mit beiden Bestimmungsmethoden erhalten wurden. Da es innerhalb der Bestimmungsmethoden zum Einsatz unterschiedlicher Mengen Kollagenase (Pz-peptid: 1.44U bzw. Casein: 0.36U) kam, waren die quantitativen Unterschiede in den Hemmaktivitäten jedoch zu erwarten.

1.2. Bestimmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Die Bestimmungen wurden entsprechend der Beschreibung unter Exp. Teil 3.2 durchgeführt. Es wurde jeweils der Parameter geändert, der aus den folgenden Absatzüberschriften hervorgeht.

Einfluss der Substratkonzentration

Folgende Substratkonzentrationen wurden getestet: 58.3µM, 116.7µM, 233.3µM, 291.7µM und 583.3µM. Bei der Darstellung der Werte der Substratkonzentration gegen die Werte der Absorption erhielt man eine Kurve (Abb. 3). In niedrigen Substratkonzentrationen (58.3µM, 116.7µM und u.U. auch 233.3µM Substratlösung) war die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratmenge abhängig, der Umsatz zu *p*-Nitroanilin war proportional zur Substratmenge. Erst ab Substratkonzentrationen von über 233.3µM Substratlösung war eine weitere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit nicht

mehr festzustellen, das Enzym schien mit Substrat gesättigt, die Kurve flachte ab. Es wurde in allen weiteren Versuchen mit einer Substratkonzentration von 291.7 μ M gearbeitet.

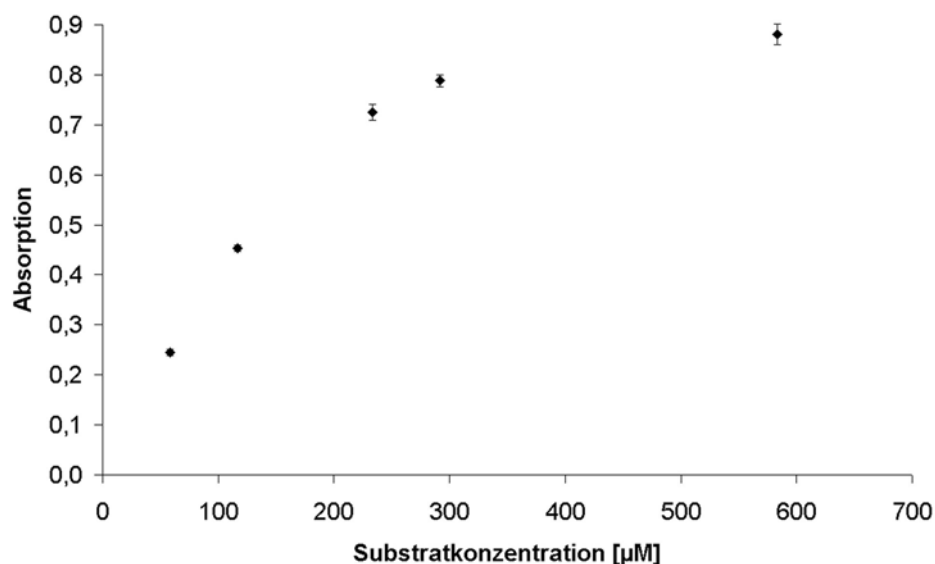


Abb. 3: Abhängigkeit der Absorption von der Substratkonzentration im Elastase-Assay

$n \geq 3$, Mittelwert \pm SD, Methode s. Exp. Teil 3.2: 2.5mU Elastase, 60min Inkubation

Einfluss der Enzymmenge

Die einzusetzende Enzymmenge musste für jede Charge des Enzyms neu bestimmt werden. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der Elastasemenge (dargestellt als enzymatische Aktivität) von der umgesetzten Substratmenge (dargestellt als Absorption) beispielhaft gezeigt:

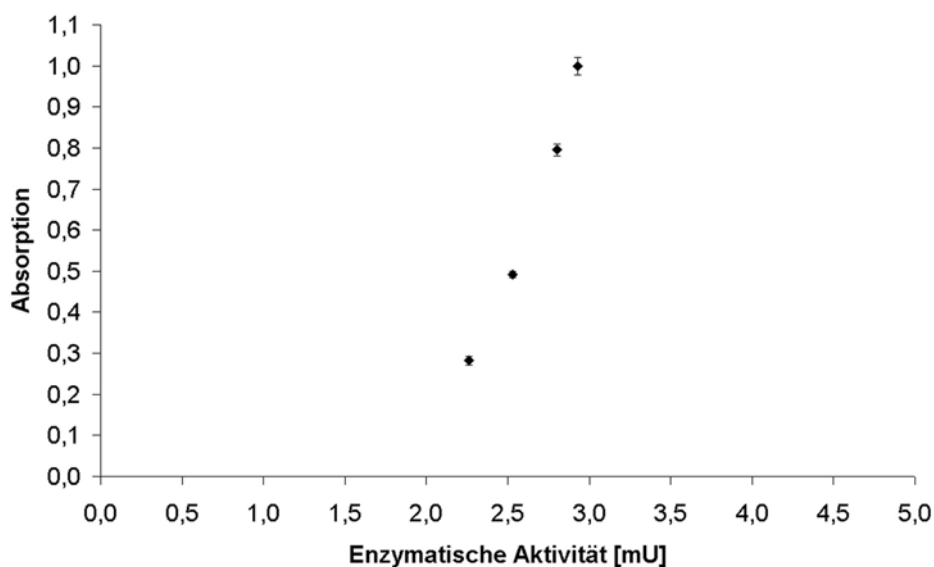


Abb. 4: Abhängigkeit der Absorption von der enzymatischen Aktivität im Elastase-Assay
 $n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.2: 291.7 μ M Substrat, 60min Inkubation

Der Abbildung war zu entnehmen, dass mit steigender Enzymmenge die Menge freigesetztes *p*-Nitroanilin stieg. Es schien kein Substratmangel bei den eingesetzten Enzymmengen vorzuliegen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde bei dieser Enzym-Charge die Enzymmenge gewählt, die 2.5mU Aktivität entsprach.

Einfluss von Elastatinal

Elastatinal als spezifischer (wenn auch wenig potenter) Inhibitor der humanen neutrophilen Elastase wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet. In Konzentrationen von 970 μ M wurde eine Hemmung von 63.1% bestimmt ($SD=2.04$, $n=3$).

Einfluss von DMSO

Es wurden folgende Konzentrationen von DMSO im Reaktionsansatz getestet (Tab. 4):

Tab. 4: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Konzentration DMSO [% (V/V)]	Relative Enzymaktivität [%]
0.0	100.0 <i>SD</i> =3.22
0.5	93.0 <i>SD</i> =1.99
1.0	100.0 <i>SD</i> =1.27
2.0	96.3 <i>SD</i> =5.19
5.0	84.0 <i>SD</i> =13.48

n = 3, Streuung - *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.2: 291.7 μ M Substrat, 2.5mU Elastase

Um den Großteil der getesteten Extrakte und Substanzen in Lösung zu bringen, wurde DMSO verwendet. In Konzentrationen von max. 1% war der Einfluss des DMSO auf die Elastase-Aktivität vernachlässigbar (s. rel. Enzymaktivität und *SD*), so dass diese Menge als Lösungsvermittler eingesetzt werden konnte. Auch hier wurden jedoch bei allen Versuchsreihen DMSO-Kontrollen mitgeführt.

1.3. Bestimmung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9

Die Bestimmungen wurden entsprechend der Beschreibung unter Exp. Teil 3.3 durchgeführt. Es wurde jeweils der Parameter geändert, der aus den folgenden Absatzüberschriften hervorgeht.

Überprüfung des Enzyms auf weitere Proteasenaktivität

Da das Enzym ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde, es sich beim verwendeten Substrat aber um ein unspezifisches Proteasensubstrat handelte, musste ein Abbau des Substrates durch andere Proteasen ausgeschlossen werden. Ohne Zusatz von APMA bzw. von Trypsin war keine Protease-Aktivität nachzuweisen, d.h. in der Enzymlösung waren keine das Ergebnis beeinflussenden Proteasen vorhanden, die ohne Aktivierung durch APMA bzw. Trypsin das Substrat abbauen konnten.

Bestimmung der einzusetzenden Enzymmenge

Es wurden 2.5µl (250µU) und 5µl (500µU) Enzymlösung mit APMA für jeweils 30min versetzt. Nach der Aktivierung wurde die Enzymlösung für 4h mit dem Substrat inkubiert. Bei der anschließenden Messung der Fluoreszenzeinheiten konnte festgestellt werden, dass unter Einsatz von 500µU MMP-9 mehr Substrat umgesetzt wurde als unter Einsatz von 250µU. Da der Substratabbau unter 250µU Enzym jedoch ausreichend stark war (d.h. ausreichend Fluoreszenzeinheiten - 200 - bestimmbar waren), wurde mit Blick auf die Kosten in den folgenden Versuchen immer mit 250µU MMP-9 gearbeitet. Die Bestimmung ist in Tab. 5 zusammengefasst:

Tab. 5: Einfluss unterschiedlicher Enzymaktivitäten auf die Bestimmungsmethode der MMP-9

Enzymaktivität [µU]	Relative Fluoreszenz [%]
250	100.0 $R=2.4$
500	154.0 $R=3.2$

$n = 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.3: 4.24µM Substrat, 4h Inkubation

Aktivierung von MMP-9 durch APMA

Um zu gewährleisten, dass die Dauer der MMP-9-Aktivierung durch APMA ausreichend war, wurde für 30 und 60min mit APMA inkubiert. Es war kein Unterschied in der Enzymaktivität bezüglich der Inkubationsdauer festzustellen, so dass die Aktivierungsdauer auf 30min festgelegt wurde (Tab. 6):

Tab. 6: Einfluss der Aktivierungsdauer (APMA) auf die MMP-9-Aktivität

Aktivierungsdauer [min]	Relative Enzymaktivität [%]
30	100.0 $R=2.4$
60	98.9 $R=4.4$

$n = 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.3: 4.24µM Substrat, 250µU MMP-9, 4h Inkubation

Aktivierung von MMP-9 durch Trypsin

Aufgrund der von der Firma vorgeschlagenen Bestimmungsmethode für die Aktivität der MMP-9 [Roche 1999], wurde als möglicher enzymatischer Aktivator auch die Serinprotease Trypsin (EC 3.4.21.4) untersucht. Da in der vorliegenden Arbeit mit einem universell einsetzbaren (und damit abbaubaren) Proteasensubstrat gearbeitet wurde, musste

die Trypsinaktivität nach der Aktivierung des Enzyms gehemmt werden. Dazu wurde der Trypsin-Inhibitor verwendet (s. auch Exp. Teil 3.2). Nach Aktivierung der MMP-9 mit APMA konnte eine größere Enzymaktivität bestimmt werden als unter Verwendung des Trypsins (Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich der Aktivierung der MMP-9 durch APMA und Trypsin

Aktivator	Relative Enzymaktivität
APMA	100.0 $R=7.4$
Trypsin	65.8 $R=5.8$

$n = 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.3: 4.24 μ M Substrat, 250 μ U MMP-9, 4h Inkubation

Da die Verwendung eines zweiten Enzyms innerhalb der Bestimmungsmethode nicht als günstig angesehen wurde und die MMP-9-Aktivität unter APMA-Behandlung größer war, wurde die Aktivierung mit APMA der Aktivierung mit Trypsin vorgezogen.

Einfluss von DMSO

Folgende Konzentrationen DMSO im Reaktionsansatz wurden getestet (Tab. 8):

Tab. 8: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9

Konzentration DMSO [% (V/V)]	Relative Enzymaktivität [%]
0.0	100.0 $R=11.4$
0.1	99.5 $R=0.9$
0.5	85.2 $R=3.7$
1.0	77.2 $R=4.7$

$n = 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.3: 4.24 μ M Substrat, 250 μ U MMP-9, 4h Inkubation

DMSO als Lösungsmittel hemmte die Enzymaktivität konzentrationsabhängig. Bei Konzentrationen von 1% DMSO wurde eine Beeinflussung der MMP-9-Aktivität von 20-25% bestimmt. Erst in Konzentrationen von unter 0.5% konnte von einer geringen Beeinflussung der Enzymaktivität ausgegangen werden. Dies war für die weitergehenden Versuche problematisch, da die zu testenden Substanzen sich begrenzt in DMSO lösten und durch eine Verdünnung auf 0.5% die einsetzbaren Konzentrationen limitiert wurden. Auch hier wurden entsprechende DMSO-Kontrollen bei allen Versuchsreihen mitgeführt.

1.4. Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde der MTT-Test verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der Beschreibung unter Exp. Teil 3.6 unter Einsatz der für die Zytotoxizitätsuntersuchungen genutzten ECV-304 – Zellen. Es wurde jeweils der Parameter geändert, der aus den folgenden Absatzüberschriften hervorgeht.

Einfluss der Inkubationsdauer von MTT

Um zu gewährleisten, dass einerseits die Zeit für eine Umsetzung des MTT ausreichend, andererseits das eingesetzte MTT selbst aber noch nicht toxisch bzw. proliferationshemmend auf die Zellen wirkte, wurden Versuche hinsichtlich des Einflusses der Inkubationsdauer des MTT mit den Zellen durchgeführt. Dazu wurden 100µg MTT [entsprechend 20µl einer MTT-Lösung (5mg/ml PBS-Puffer, m/V)] pro Kavität eingesetzt und es wurde für 1, 2, 3 und 4 Stunden mit MTT inkubiert. Die Absorption nach 2 Stunden wurde 100% gesetzt und daraus die relativen Absorptionen nach 1, 3 bzw. 4 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt:

Tab. 9: Vergleich der Inkubationsdauer von MTT im Zytotoxizitätstest

Inkubationsdauer MTT [h]	Relative Absorptionen [%]
1	72.4 <i>SD</i> =4.58
2	100.0 <i>SD</i> =6.27
3	109.2 <i>SD</i> =9.49
4	107.7 <i>SD</i> =4.13

n = 4, Streuung - *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.6: 100µg MTT / 220µl Medium

Es zeigte sich, dass die Absorption nach 3 und 4 Stunden Inkubationsdauer gegenüber 2 Stunden nicht signifikant zunahm. Das konnte einerseits bedeuten, dass nach 2 Stunden sich das Gleichgewicht zwischen MTT und Formazan eingestellt hatte, andererseits konnte es aber auch auf einen Substratmangel an MTT hinweisen. Aufgrund dieser Überlegung wurde anschließend mit unterschiedlichen Mengen MTT inkubiert.

Einfluss der MTT-Konzentration

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Bestimmung des Einflusses der Inkubationsdauer von MTT. Es wurden hier 50, 100 bzw. 150µg MTT [entsprechend 10, 20 bzw. 30µl einer MTT-Lösung (5mg/ml PBS-Puffer, m/V)] pro Kavität zugegeben und wieder die Absorption nach 1, 2, 3 und 4 Stunden bestimmt. In Tab. 10 wurden die relativen Absorptionen von 50 und 150µg MTT gegenüber der Absorption bei Inkubation mit 100µg MTT (diese Absorption wurde 100% gesetzt) betrachtet:

Tab. 10: Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Mengen MTT im Zytotoxizitätstest

Inkubationsdauer MTT [h]	Relative Absorption [%] gegenüber 100µg MTT bei	
	50 µg MTT	150 µg MTT
1	67.0 <i>R=5.6, n=3</i>	103.3 <i>R=5.4, n=2</i>
2	82.4 <i>R=5.0, n=3</i>	102.2 <i>R=4.1, n=2</i>
3	84.4 <i>R=3.2, n=4</i>	101.3 <i>R=2.5, n=2</i>
4	87.2 <i>R=15.2, n=4</i>	103.5 <i>R=3.1, n=2</i>

Streuung - *R*, Methode s. Exp. Teil 3.6

Beim Einsatz von 50µg MTT wurde eine signifikant geringere Absorption gemessen als beim Einsatz von 100µg. Beim Vergleich der Inkubationszeiten (50µg MTT) fiel auf, dass es nach 2 Stunden zu keiner signifikanten Zunahme der Absorptionen kam (wenn es auch einen leichten Trend gab). Das entsprach dem Ergebnis der unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 100µg MTT. Beim Einsatz von 150µg MTT wurde keine Zunahme der Absorption gegenüber 100µg MTT bestimmt.

Man konnte davon ausgehen, dass der Einsatz von 150µg MTT keinen Vorteil gegenüber dem Einsatz von 100µg hat. Als Nachteil muss jedoch der größere MTT-Verbrauch genannt werden. Für den Einsatz von 50µg MTT spräche der geringe Materialverbrauch, allerdings konnte mit diesen Versuche nicht gezeigt werden, ob die Nicht-Zunahme der Absorption nach 3 bzw. 4 Stunden gegenüber 2 Stunden auf einem Substratmangel beruhte oder nicht. Die absoluten Absorptionswerte nach 1 Stunde Inkubation mit 50µg erschienen gering, so dass für alle folgenden Zytotoxizitätsuntersuchungen mit einer Menge von 100µg MTT [entsprechend 20µl MTT-Lösung (5mg/ml PBS-Puffer, m/V)] und einer Inkubationszeit mit MTT von 2 Stunden gearbeitet wurde.

Auf weitere Vorversuche wurde verzichtet, da es sich hier um eine etablierte Bestimmungsmethode handelte.

Einfluss von DMSO

Da der Großteil der zu untersuchenden Substanzen sehr unpolar und somit nicht im wässrigen Medium in ausreichender Menge löslich war, wurde als Lösungsvermittler DMSO eingesetzt. Um zytotoxische bzw. proliferationshemmende Effekte des Lösungsmittels von denen der Substanzen abgrenzen zu können, wurde der alleinige Einfluss von DMSO auf die Zellen getestet. Es wurde auch hier unter Verwendung von ECV-304 – Zellen gearbeitet, die Bestimmung wurde entsprechend Exp. Teil: 3.6 durchgeführt.

Tab. 11: Einfluss von DMSO auf die Zellzahl (MTT-Test)

Konzentration DMSO [% (V/V)]	Relative Zellzahl [%]
0.00	100.0 <i>SD</i> =10.03
0.10	95.5 <i>SD</i> =2.50
0.50	77.9 <i>SD</i> =3.33
0.75	66.4 <i>SD</i> =3.48
1.00	52.8 <i>SD</i> =4.89

n = 3, Streuung - *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.6: 100µg MTT / 220µl Medium, 2h Inkubation

Bei Endkonzentrationen von 0.5% DMSO traten bereits nachweisbare zytotoxische bzw. proliferationshemmende Effekte auf. Die Zellzahl verringerte sich um 20-25% gegenüber der Kontrolle, die kein DMSO enthielt. Erst bei Konzentrationen von 0.1% DMSO konnte man von geringen Schädigungen ausgehen. Dies stellte im Vergleich zu den Enzymassays (Kollagenase, Elastase: hier waren DMSO-Konzentrationen von 1% tolerierbar) ein Problem dar, da durch den begrenzten Einsatz des DMSO auch die Löslichkeit der Substanzen und damit deren einsetzbare Konzentrationen eingeschränkt wurden.

2. Screening von Basidiomyceten-Extrakten: Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Die wässrigen und Dichlormethan-Extrakte von 15 Basidiomyceten aus 7 Familien wurden hinsichtlich einer Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase getestet. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung des isolierten Enzyms und eines synthetischen Peptids als Substrat (s. Exp. Teil: 3.2.).

Alle wässrigen Extrakte hemmten die Elastase-Aktivität in Konzentrationen von 200µg/ml um 40-90%. Fünf der Extrakte wiesen einen IC₅₀-Wert zwischen 2-20µg/ml auf.

11 der Dichlormethan-Extrakte hemmten in Konzentrationen von 2µg/ml die Enzymaktivität um 40-97%. Bei sechs dieser Extrakte konnten auch bei Konzentrationen von 200ng/ml Elastase-Hemmungen im Bereich von 20-55% nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die Dosis-Effekt-Kurve beim Großteil der Dichlormethan-Extrakte sehr steil zu verlaufen schien: so fand man bei Konzentrationen von 2µg/ml 90%ige Hemmung, bei 200ng/ml jedoch keine Aktivitätsbeeinflussung mehr.

Es war festzustellen, dass die Dichlormethan-Extrakte in geringeren Konzentrationen als die wässrigen Extrakte die Aktivität der Elastase hemmten. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenings vom Basidiomyceten-Extrakten hinsichtlich einer Beeinflussung der Elastase-Aktivität gibt Tab. 12.

Für die Isolierung des wirksamen Prinzips sowohl der Kollagenase- als auch der Elastase-Hemmung wurden die Dichlormethan-Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. ausgewählt. Beide Extrakte zeigten sowohl eine starke Kollagenase- (s. Tab. 1) als auch eine starke Elastase-Beeinflussung (s. Tab. 12).

Tab. 12: Einfluss der Basidiomyceten-Extrakte auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

	Hemmung der Elastase-Aktivität [%] durch				
	DCM-Extrakte		Wässrige Extrakte		
	2µg/ml	200ng/ml	200µg/ml	20µg/ml	2µg/ml
Coriolaceae Sing.					
<i>Fomes fomentarius</i> (L.:Fr.) Fr.	56.4 <i>R</i> =21.7	24.9 <i>R</i> =5.4	83.6 <i>R</i> =0.9	62.9 <i>R</i> =0.3	k.H.
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sow.:Fr.) Karst.	96.9 <i>R</i> =0.1	k.H.	63.9 <i>R</i> =7.9	33.7 <i>R</i> =20.2	
<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	95.2 <i>R</i> =2.9	55.9 <i>R</i> =30.0	80.4 <i>R</i> =3.8	37.3 <i>R</i> =22.9	
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Pil.	89.1 <i>R</i> =3.9	k.H.	46.0 <i>R</i> =17.5	55.5 <i>R</i> =6.1	39.0 <i>R</i> =8.7
Ganodermataceae Donk					
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.:S.F.Gray) Pat.	86.0 <i>R</i> =6.7	k.H.	42.2 <i>R</i> =21.0	21.4 <i>R</i> =9.7	
Hymenochaetaceae Donk					
<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.:Fr.) Karst.	92.0 <i>R</i> =5.9	32.2 <i>R</i> =23.2	53.6 <i>R</i> =11.2	19.8 <i>R</i> =1.0	
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Pil.	84.3 <i>R</i> =9.3	22.5 <i>R</i> =1.9	52.9 <i>R</i> =7.8	49.0 <i>R</i> =21.3	29.4 <i>R</i> =12.5
Polyporaceae CDA.					
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	k.H.	k.H.	41.5 <i>R</i> =3.1	k.H.	
<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.:Fr.) Karst.	96.3 <i>R</i> =2.5	39.2 <i>R</i> =17.9	61.5 <i>R</i> =3.4	k.H.	
Russulaceae Roze					
<i>Lactarius deterrimus</i> Grög.	93.8 <i>R</i> =4.0	35.2 <i>R</i> =0.1	84.2 <i>R</i> =2.6	46.5 <i>R</i> =17.0	
Scutigeraceae Bond.&Sing.					
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat.	42.5 <i>R</i> =2.7	k.H.	44.6 <i>R</i> =8.6	k.H.	
Tricholomataceae Roze: Overeem					
<i>Collybia dryophila</i> (Bull.:Fr.) Kumm.	k.H.	k.H.	85.5 <i>R</i> =3.1	59.7 <i>R</i> =13.1	
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.) Karst.	k.H.	k.H.	65.3 <i>R</i> =3.3	30.7 <i>R</i> =0.7	
<i>Tricholoma populinum</i> Lge.	91.1 <i>R</i> =1.4	k.H.	86.7 <i>R</i> =4.6	58.2 <i>R</i> =23.8	k.H.
<i>Tricholomopsis rutilans</i> (Schiff.:Fr.) Sing.	k.H.	k.H.	90.1 <i>R</i> =2.6	64.7 <i>R</i> =4.7	27.9 <i>R</i> =1.0

k.H. – keine Hemmung, *R* – Spannweite, *n* ≥ 3, Methode s. Exp. Teil 3.2

3. *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög.: Botanik, Inhaltsstoffe und Bedeutung

3.1. *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.



Abb. 5: *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. [Mykonet 2003]

Wissenschaftlicher Name:	<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.
Früherer wissenschaftlicher Name:	<i>Fomes annosus</i> (Fr.) Cooke, <i>Fomitopsis annosa</i> (Fr.) Karst.
Deutsche Bezeichnung:	Wurzelschwamm, Rotfäule der Fichte
Familie:	<i>Coriolaceae</i> Sing.
Ordnung:	<i>Poriales</i> Loqu.
Unterklasse:	<i>Hymenomycetidae</i> (Fr.) Kreisel
Klasse:	<i>Basidiomycetes</i> Sachs: Winter

[Rothmaler 1984]

Heterobasidion annosum (Fr.) Bref. ist ein Fäulnis verursachender Pilz. Er kommt hauptsächlich in Fichtenbeständen [*Picea abies* (L.) Karst.] aber auch an anderen Nadelbäumen, sehr selten auch an Laubbäumen vor. Man findet ihn ganzjährig und er ist in Mitteleuropa weit verbreitet. *H. annosum* lebt parasitisch in den Wurzeln (deutsche Bezeichnung: „Wurzelschwamm“) und im unteren Stammbereich lebender Bäume, man findet ihn aber auch an toten Stämmen und Stubben. Er ist ein holzerstörender Pilz, der das Holz durch Weißfäule abbaut. Die Weißfäule ist gekennzeichnet durch den Abbau von Lignin und Cellulose. Meist erscheint das Holz dann hell, durch den Abbau und die Abgabe von Sekundärstoffen kann es jedoch auch eine rotbraune Färbung annehmen. Durch die Fäule wird die Festigkeit des Holzes stark beeinträchtigt, es kann bis zur vollständigen Verwertung des Holzes kommen. Aufgrund seiner intensiven Weißfäuleaktivität und des damit verbundenen beträchtlichen wirtschaftlichen Schadens ist der Pilz im Forst gefürchtet [Rothmaler 1984, Maifeld 1998].

Untersuchungen von *Heterobasidion annosum* standen meist unter dem forstpathologischen Blickpunkt: Isolierung von für den Abbau verantwortlichen Enzymen, biologische Behandlung von Stümpfe und Wurzeln zur Verhinderung des Eindringens von *H. annosum* usw. Als Inhaltsstoffe wurden aus Monokulturen (z.T. auch aus Dualkulturen) das Sesquiterpen Fomannosin [Kepler 1967], Dihydrobenzofurane [Hirotani 1977, Donnelly 1988], z.B. Fomannoxin, und Benzofurane [Donnelly 1988] sowie Cyclopentabenzopyrane [Donnelly 1982, Sonnenbichler 1983], z.B. Fomajorin D und Fomajorin S isoliert. Fomannoxin konnte auch in von *H. annosum* natürlich befallenem Fichten-Kernholz nachgewiesen werden [Heslin 1983]. Weiterhin lagen Untersuchungen zum Fettsäure- und Sterolprofil vor [Müller 1994]. Ein Hinweis auf eine medizinische Verwendung des *H. annosum* konnte nicht gefunden werden.

3.2. *Lactarius deterrimus* Grög.



Abb. 6: *Lactarius deterrimus* Grög. [Mykonet 2003]

Wissenschaftlicher Name:	<i>Lactarius deterrimus</i> Grög.
Frühere wissenschaftliche Namen:	<i>Lactarius deliciosus</i> var. <i>piceae</i> Vassilk.
Deutsche Bezeichnung:	Fichten-Milchling
Familie:	<i>Russulaceae</i> Roze
Ordnung:	<i>Russulales</i> Kreisel
Unterklasse:	<i>Hymenomycetidae</i> (Fr.) Kreisel
Klasse:	<i>Basidiomycetes</i> Sachs: Winter

[Rothmaler 1984]

Lactarius deterrimus Grög. ist ein in Fichtenwäldern [*Picea abies* (L.) Karst.], besonders auf kalkhaltigen Böden vorkommender Milchling. Er ist nicht selten und die Fruchtkörper können vor allem von August bis Oktober gefunden werden. Da er als kaum genießbar gilt, wird er auch dementsprechend wenig verwendet. Die Unterscheidung von anderen Milchlingen [*L. sanguifluus* (Paulet ex Fr.) Fr., *L. semisanguifluus* Heim & Lecl. sens. Grög., *L. deliciosus* (L. ex Fr.) S.F. Gray, *L. salmonicolor* Heim & Lecl.] ist nicht einfach,

neben der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung wird hier der Standort (obligat: unter Fichten) sowie das Aussehen und der Geschmack des Milchsaftes (Aussehen: nach Anschneiden karottenrot, nach 2-3 Stunden weinrot, Geschmack: bitter bis schwach brennend) herangezogen [Rothmaler 1984].

Zu *L. deterrimus* lagen wenige phytochemische Untersuchungen vor. So wurden Sesquiterpene vom Guajan-Typ [Anke 1989, Bergendorff 1988], ein Azulen-Derivat (11,12-Dihydrolactaroviolin) [Koul 1985] und ein Lektin [Giollant 1993] isoliert. In Kultur konnten Indolderivate nachgewiesen werden [Kohlmunzer 2000]. Weitergehende Untersuchungen zum Vorkommen von Sesquiterpenen, freien Fettsäuren und Estern von Sesquiterpenen und Fettsäuren zeigten, dass bei nicht bzw. wenig zerstörten Fruchtkörpern Ester isoliert werden konnten. Bei Zerkleinerung der Fruchtkörper hingegen wurden diese Ester abgebaut und es waren strukturell veränderte Sesquiterpene und freie Fettsäuren nachweisbar [Bergendorff 1988].

Hinweise auf medizinische oder volksmedizinische Anwendungen für *L. deterrimus* und allgemein Lactarius-Arten konnten nicht gefunden werden. *In vitro* Untersuchungen von in *Lactarius*-Arten häufig gefundenen Sesquiterpen-Derivaten hinsichtlich mutagener, antimikrobieller und zytotoxischer Effekte lagen jedoch vor [Anke 1989, Anke 1991].

4. Isolation und Charakterisierung von Verbindungen mit Wirkung auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase

4.1. Einfluss der Extrakte auf die Enzymaktivität

Die hergestellten Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. wurden vor Beginn einer weiteren Aufarbeitung hinsichtlich einer Beeinflussung der Kollagenase- und Elastase-Aktivität getestet (Tab. 13).

Tab. 13: Einfluss der Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase

	Kollagenase-Hemmung [%]		Elastase-Hemmung [%]	
	200µg/ml	20µg/ml	20µg/ml	2µg/ml
<i>Heterobasidion annosum</i>				
PE-Extrakt	91.8 <i>R</i> =0.1	70.5 <i>R</i> =1.9	91.2 <i>R</i> =1.7	70.2 <i>R</i> =2.8
DCM-Extrakt	79.1 <i>R</i> =8.1	k.H.	97.3 <i>R</i> =0.6	87.5 <i>R</i> =1.9
DCM-H ₂ O-Extrakt	k.H.			24.9 <i>R</i> =16.0
H ₂ O-Extrakt	k.H.			24.0 <i>R</i> =12.5
<i>Lactarius deterrimus</i>				
PE-Extrakt	91.5 <i>R</i> =1.0	48.2 <i>R</i> =7.2	92.0 <i>R</i> =7.2	19.9 <i>R</i> =13.4
DCM-Extrakt	70.7 <i>R</i> =4.9	k.H.	96.8 <i>R</i> =1.4	46.7 <i>R</i> =5.5
DCM-H ₂ O-Extrakt	k.H.		56.5 <i>R</i> =8.1	k.H.
MetOH-Extrakt	k.H.		55.0 <i>R</i> =2.3	k.H.
H ₂ O-Extrakt	k.H.		k.H.	

k.H. – keine Hemmung, $n \geq 2$, Streuung – *R*, Methode s. Exp. Teil 3.1.2, Exp. Teil 3.2

Als aktivster Extrakt für die Kollagenase erwies sich bei beiden Pilzen der Petrolether-Extrakt. Die Aktivität der Elastase wurde durch die Dichlormethan-Extrakte (beider Pilze) am stärksten gehemmt. Da der Dichlormethan-Extrakt beider Pilze sowohl eine inhibitorisch starke Wirkung gegenüber der Kollagenase als auch gegenüber der Elastase hatte, wurde dieser Extrakt bei beiden Pilzen weiter aufgearbeitet.

4.2. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung der Dichlormethan-Extrakte

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung der zu untersuchenden Extrakte war, wick die Auftrennung der Extrakte von der klassischen Separation ab. Die Eignung eines Trennsystems zeigte sich darin, dass bei dessen Verwendung eine möglichst große Zahl an Banden bei DC-Untersuchungen und Probesäulen sichtbar wurde (UV 254nm bzw. UV 366nm) bzw. detektierbar (Schwefelsäure 10%) war. Nach der Trennung wurden Fraktionen mit gleichen phytochemischen Eigenschaften wieder vereinigt und die so erhaltenen Fraktionen hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber Kollagenase und Elastase getestet.

Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.

Der Dichlormethan-Extrakt von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. wurde an silanisiertem Kieselgel mit dem FM A chromatographiert. Die Chromatographie ergab 13 Fraktionen (Fraktionen A-M). Kollagenase-hemmende Effekte konnten in den Fraktionen E-H nachgewiesen werden, wobei der stärkste Effekt (Hemmung von 93 bzw. 89% bei Konzentrationen von 200µg / ml Ansatz) in den Fraktionen E und F auftrat (s. Abb. 7). Bei der Testung auf die Aktivität der Elastase musste festgestellt werden, dass ein Hemmeffekt in den Fraktionen B-M auftrat, wobei die stärksten Effekte (Hemmung von 84 bis 93% in Konzentrationen von 2µg / ml Ansatz) in den Fraktionen G-L auftraten (s. Abb. 8).

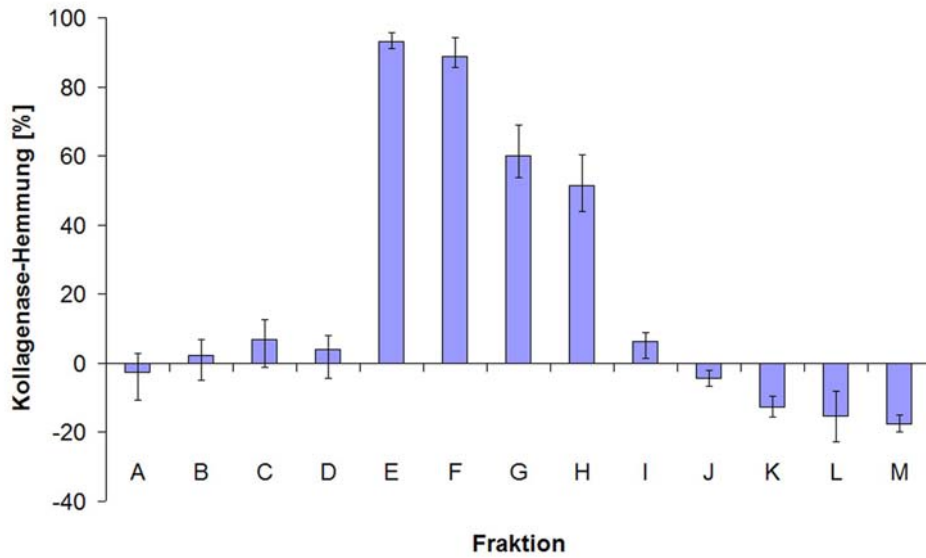


Abb. 7: *Clostridium histolyticum* Kollagenase: Einfluss der Fraktionen A-M (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von *H. annosum* (Konzentration: 200µg/ml)

$n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.1.2

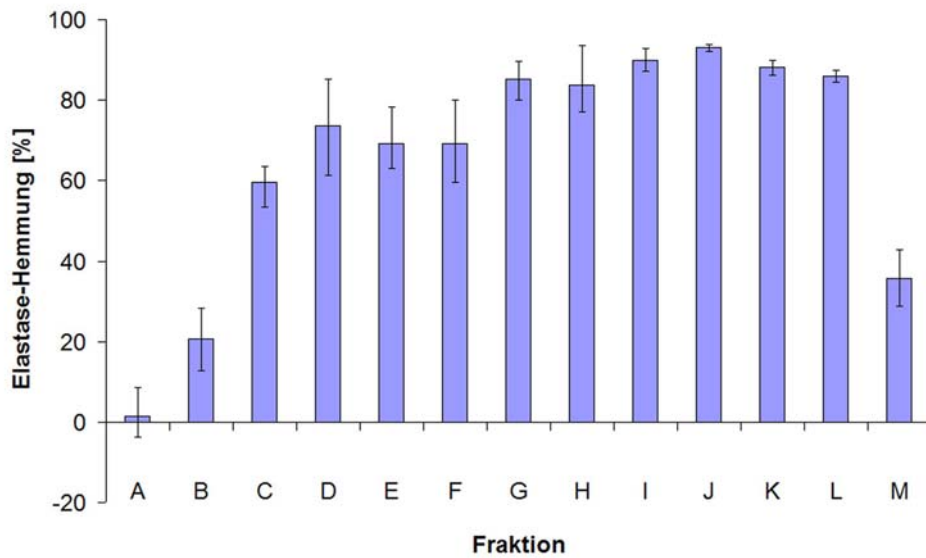


Abb. 8: Humane neutrophile Elastase: Einfluss der Fraktionen A-M (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von *H. annosum* (Konzentration: 2µg/ml)

$n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.2

Die Separation von Elastase-hemmenden Verbindungen war mit dieser Chromatographie nicht gelungen, der Großteil der erhaltenen Fraktionen hemmte die Aktivität des Enzyms in gleichen Konzentrationen. Eine Weiterbearbeitung bezüglich des biologischen Testsystems „Elastase“ fand nicht statt, da an dieser Stelle nicht klar war, ob die Hemmung der Elastase eine unspezifische Hemmung durch allgemein apolare Verbindungen war, ob es keine Trennung der Elastase-hemmenden Verbindungen gab (da das Trennsystem ungeeignet war), oder ob in den einzelnen Fraktionen jeweils unterschiedliche Verbindungen vorlagen, die in ihrer Gesamtheit (entweder Wirkstärke, vorliegende Konzentration bzw. die Kombination aus beiden) gleiche Elastase-beeinflussende Eigenschaften hatten. Eine Einzelbetrachtung und Auftrennung jeder Fraktion wäre auch aufgrund der vorhandenen Substanzmengen nur sehr eingeschränkt möglich gewesen. Für die weitere aktivitätsgeleitete Fraktionierung wurde als biologisches Testsystem nur noch die Kollagenase-Beeinflussung gewählt.

Die Fraktionen E und F der Säule 1 wurden (nach Vereinigung) an einer weiteren mit silanisiertem Kieselgel gefüllten Säule mit dem FM B chromatographiert. Es wurden 8 Fraktionen (E1-E8) erhalten, wobei Kollagenase-hemmende Effekte in den Fraktionen E2-E4 nachweisbar waren: E2, E3: Hemmungen von 96 bzw. 95% (jeweils $R = 1$), E4: Hemmung von 39% ($R = 15$) in Konzentrationen von 200 μg / ml Ansatz.

Die aktivste Fraktion E3 wurde weiters an Sephadex LH-20 mit dem FM C chromatographiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden zu 9 Fraktionen (E3.1.-E3.9) zusammengefasst. Die anschließende Kollagenase-Testung zeigte, dass eine Kollagenase-hemmende Wirkung in den Fraktionen E3.4-E3.7 nachgewiesen werden konnte, die aktiven Substanzen lagen vor allem in den Fraktionen E3.5 und E3.6 vor (Hemmungen von 79 bzw. 81% in Konzentrationen von 50 μg / ml, s. Abb. 9).

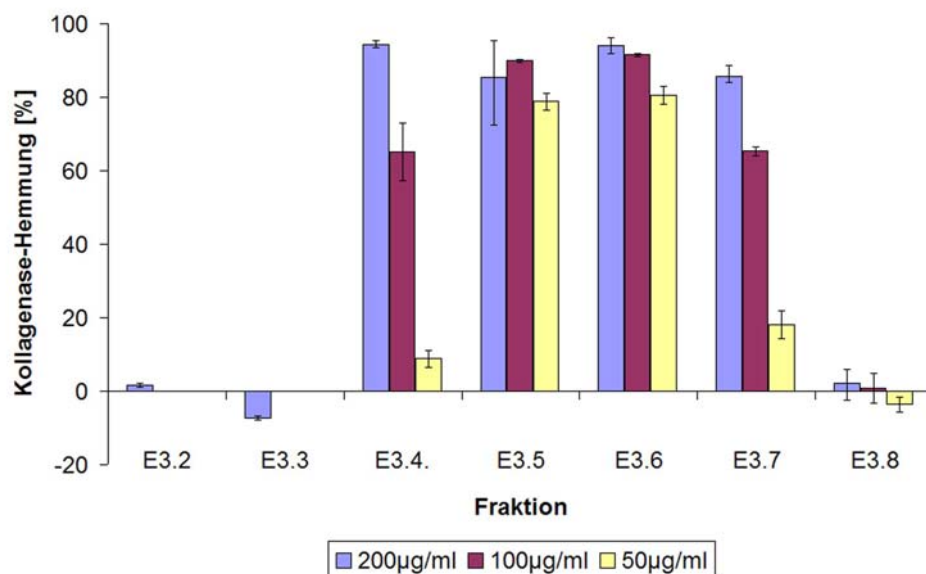


Abb. 9: *Clostridium histolyticum* Kollagenase: Einfluss der Fraktionen E3.2-E3.8 (Säule 3) aus dem DCM-Extrakt von *H. annosum* (Konzentrationen: 200/100/50µg/ml)

$n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.1.2

Die anschließende dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktionen wies aufgrund der Detektierbarkeit von Substanzen in den aktiven Fraktionen mittels UV 254nm, UV 366nm, Schwefelsäure 10%, Wasser und Rhodamin B auf ein Vorkommen von freien Fettsäuren hin. Dies konnte durch eine erste GC-MS-Untersuchung bestätigt werden. Da die Fettsäuren (aufgrund von Substanzmangel) nicht in der für die Strukturaufklärung erforderlichen Reinheit gewonnen werden konnten, schloss sich eine genauere GC-MS-Untersuchung an (s. Untersuchungen und Ergebnisse 4.3).

Lactarius deterrimus Grög.

Der Dichlormethan-Extrakt von *Lactarius deterrimus* Grög. wurde an einer Kieselgel-Säule mit dem FM D chromatographiert. Die Chromatographie ergab 14 Fraktionen (Fraktionen A-N). Die stärksten Kollagenase-hemmenden Effekte konnten in den Fraktionen I-J nachgewiesen werden (Hemmung von 94 bzw. 89% in Konzentrationen von 200µg/ml, s. Abb. 10). Bei der Testung auf die Aktivität der Elastase musste erneut festgestellt werden, dass ein Hemmeffekt in fast allen Fraktionen auftrat (s. Abb. 11). Die Fraktionen A, D und E wurden aufgrund zu geringer Mengen nicht in den Test einbezogen.

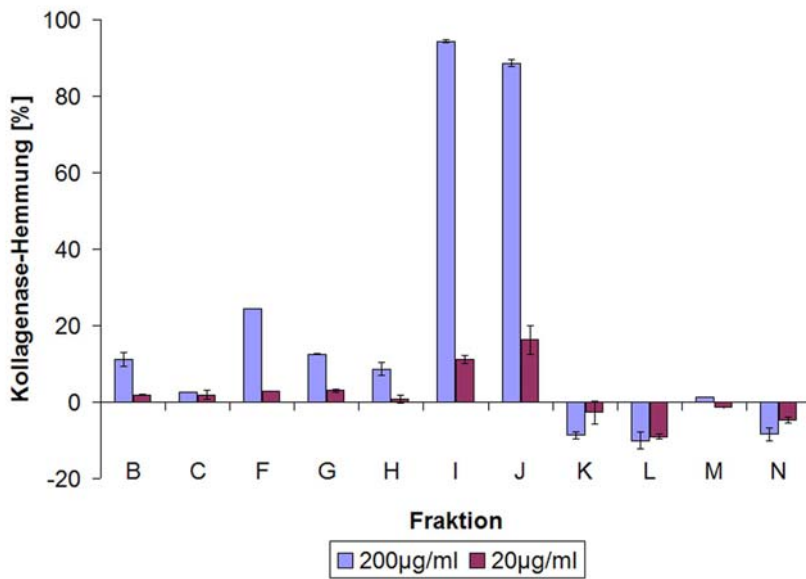


Abb. 10: *Clostridium histolyticum* Kollagenase: Einfluss der Fraktionen B-N (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von *L. deterrimus* (Konzentrationen: 200/20µg/ml)

$n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.1.2

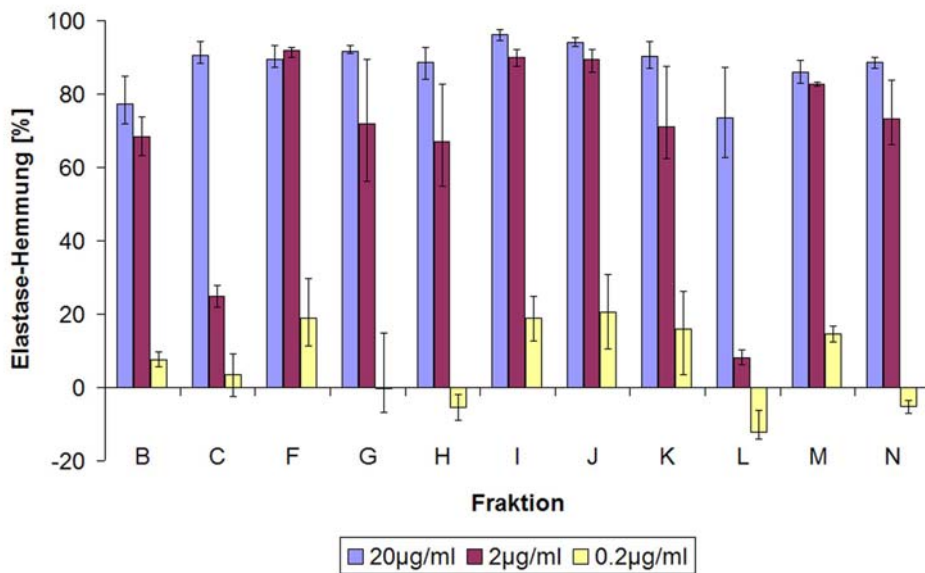


Abb. 11: Humane neutrophile Elastase: Einfluss der Fraktionen B-N (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von *L. deterrimus* (Konzentrationen: 20/2/0.2µg/ml)

$n \geq 2$, Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.2

Auch hier wies die Dünnschichtchromatographie der Fraktionen unter Verwendung von Detektionsmitteln (Schwefelsäure 10%, Wasser und Rhodamin B) und Referenzsubstanzen (Palmitinsäure, Stearinsäure) auf das Vorkommen von freien Fettsäuren hin. Es wurde hier deshalb gleich im Anschluss (ohne weitere Auftrennung der aktivsten Fraktionen) eine GC-MS-Untersuchung vorgenommen.

4.3. Bestimmung des Fettsäureanteils mittels GC-MS

Optimierung der Methode zur chromatographischen Trennung

Die Methodenoptimierung orientierte sich an einer vollständigen Grundlinien-Trennung der Peaks der vorhandenen Fettsäuremethylester und einer vertretbaren Dauer der einzelnen Analysen (16min pro Analyse).

Bestimmung der Retentionszeiten von vorhandenen Fettsäuremethylestern

Die relativen Retentionszeiten der Methylester der gesättigten (C12:0, C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0, C20:0, C22:0) und der ungesättigten Fettsäuren (C18:1, C22:1) als Einzelverbindungen und im Gemisch wurden bestimmt. Die Peaks der Fettsäuremethylester trennten sich vollständig voneinander. Laurinsäuremethylester wurde unter der gewählten Methode zu früh eluiert (mit dem Lösungsmittel / Derivatisierungsreagenz), da Laurinsäure aber keine Beeinflussung der Enzymaktivitäten zeigte, wurde auf die gaschromatographische Bestimmung der Säure in den Extrakten und Fraktionen verzichtet.

Interner Standard

Da an dem Gerät die Probenaufgabe manuell erfolgte, musste die Bestimmung der Retentionszeiten und die Quantifizierung der Fettsäuremethylester (und damit der Fettsäuren) mittels internen Standard erfolgen. Als Substanz wurde hier Erucasäure (C22:1) gewählt. Dazu wurde im *TIC* überprüft, ob Erucasäure(methylester) in den zu untersuchenden Extrakten vorkam. Dies war nicht der Fall und deckte sich mit den Angaben der Veröffentlichung [Müller 1994] für das Fettsäureprofil von *Heterobasidion*

annosum - Extrakten. Die Verwendung einer freien Fettsäure erwies sich auch hinsichtlich des Derivatisierungsreagenzes als günstig: es wurden jeweils der Extrakt und der interne Standard gemischt und anschließend das Derivatisierungsreagenz zugegeben. Sollte es bei sehr fettsäurereichen Fraktionen, doch zu einem Mangel an Derivatisierungsreagenz kommen, so dass nicht alles umgesetzt wird, wäre auch die Konzentration des Methylesters des internen Standards geringer. Pro Probenaufgabe wurde eine Menge, die 250ng (entspricht ca. 740pmol) Erucasäure entspricht, eingesetzt.

Methodenfaktor

Für die Quantifizierung mittels GC-MS war die Bestimmung der Methodenfaktoren der zu quantifizierenden Substanzen notwendig. Dazu musste das Peakflächenverhältnis Fettsäure / Standard ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Methodenfaktoren für eine gesättigte und eine ungesättigte Fettsäure (Stearinsäure: C18:0 bzw. Ölsäure: C18:1) bestimmt. Die Peakflächen bei aufgegebenen Mengen von 12.5 / 25.0 / 31.3 / 62.5 / 125.0 / 312.5 und 625ng Stearin- bzw. Ölsäure wurden gegen die Peakfläche bei 250ng Erucasäure bestimmt. Für Stearinsäure wurde als Methodenfaktor 0.64 und für Ölsäure 0.63 errechnet.

Qualitative Bestimmung von Fettsäuren und weiteren Verbindungen

Qualitative Aussagen über das Vorkommen von Substanzen in den zu untersuchenden Proben waren mittels GC-MS mit differierender Sicherheit möglich. In der vorliegenden Arbeit war eine sehr sichere Aussage möglich, wenn die Retentionszeit und das Massenspektrum mit denen eines Referenzfettsäuremethylester übereinstimmten. Sichere Aussagen waren möglich, wenn es sich bei den gefundenen Substanzen um Homologa der Referenzfettsäuren handelte, und entsprechend die Retentionszeit und das Massenspektrum zueinander „passten“ (z.B. für C15:0, C24:0). Unsichere Aussagen musste man bei Isomeren (der Fettsäuren), wie z.B. cis/trans bzw. auch Doppelbindung an C9, C10 oder C11, treffen: die Massenspektren der Isomere unterschieden sich nicht (s. Abb. 12: Darstellung der Massenspektren des gefundenen x-C18:1-Fettsäuremethylesters und der Methylester von Elaidin- bzw. Ölsäure), und mit Hilfe der Chromatographie (unter den hier gewählten Bedingungen) erfolgte keine Trennung der Isomere (bestätigt auch durch

die Literatur: Müller 1994). Es war in diesem Fall nur eine allgemeine Aussage über das Vorliegen, z.B. eines x-C18:1-methylesters oder x,x-C18:2-methylesters möglich. Da die Identifizierung der Verbindungen durch vorhandene Massenspektrenbibliotheken unterstützt wurde, war es außerdem möglich, Vermutungen über weiter vorliegende Verbindungsklassen, wie z.B. Ergosterol-Derivate zu tätigen. Die Aussagekraft dieser Vermutung wurde allerdings durch das Fehlen von Referenzsubstanzen stark eingeschränkt.

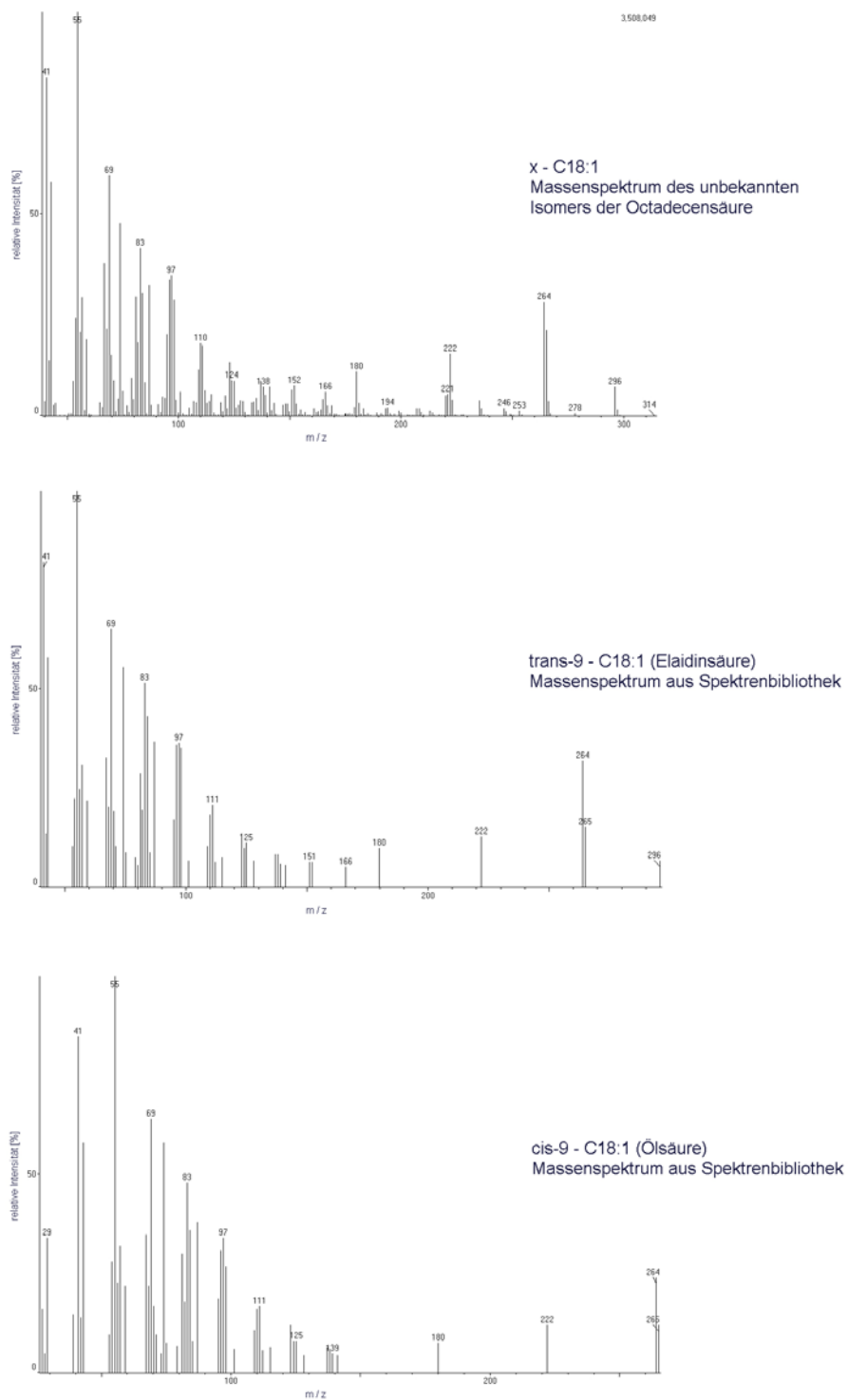


Abb. 12: Massenspektren der Methylester von C18:1-Fettsäuren: x-C18:1, Elaidinsäure, Ölsäure

Methode s. Exp. Teil 3.5.5:

EI: 70eV, Temperatur der Ionenquelle: 250°C, Massenscan: 40-500/1s

Quantitative Bestimmung ausgewählter Fettsäuren in den Extrakten

Für die Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. wurden der Gehalt an Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), einer einfach ungesättigten C18-Säure und einer zweifach ungesättigten C18-Säure bestimmt. Für die Berechnung der Gehalte für Palmitin- und Stearinsäure wurde der Methodenfaktor 0.64 (Stearinsäure), für x-C18:1 und x,x-C18:2 der Methodenfaktor 0.63 (Ölsäure) zugrunde gelegt. Die Ergebnisse zeigen Tab. 14 und Tab. 15, Beispielchromatogramme zeigen die Abb. 13 und Abb. 14.

Tab. 14: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. durch GC-MS (Angabe in $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ Extrakt)

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
PE-Extrakt	0.4 $R=0.3$	15.6 $R=11.6$	0.4 $R=0.2$	0.3 $R=0.2$
DCM-Extrakt	0.8 $R=1.3$	2.7 $R=0.4$		1.1 $R=1.6$
DCM-H ₂ O-Extrakt	-	-	-	-

$n = 3$, Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.5.5

Tab. 15: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Extrakte von *Lactarius deterrimus* Grög. durch GC-MS (Angabe in $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ Extrakt)

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
PE-Extrakt ($n=5$)	0.6 $R=0.5$	19.6 $R=8.4$		6.3 $R=6.0$
DCM-Extrakt ($n=7$)	0.5 $R=0.6$	11.5 $R=9.6$		4.2 $R=3.3$
MetOH-Extrakt ($n=2$)	0.2 $R=0.0$	-	-	0.8 $R=0.2$
DCM-H ₂ O-Extrakt ($n=6$)	0.1 $R=0.2$	0.1 $R=0.2$	0.1 $R=0.2$	0.4 $R=0.4$

Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.5.5

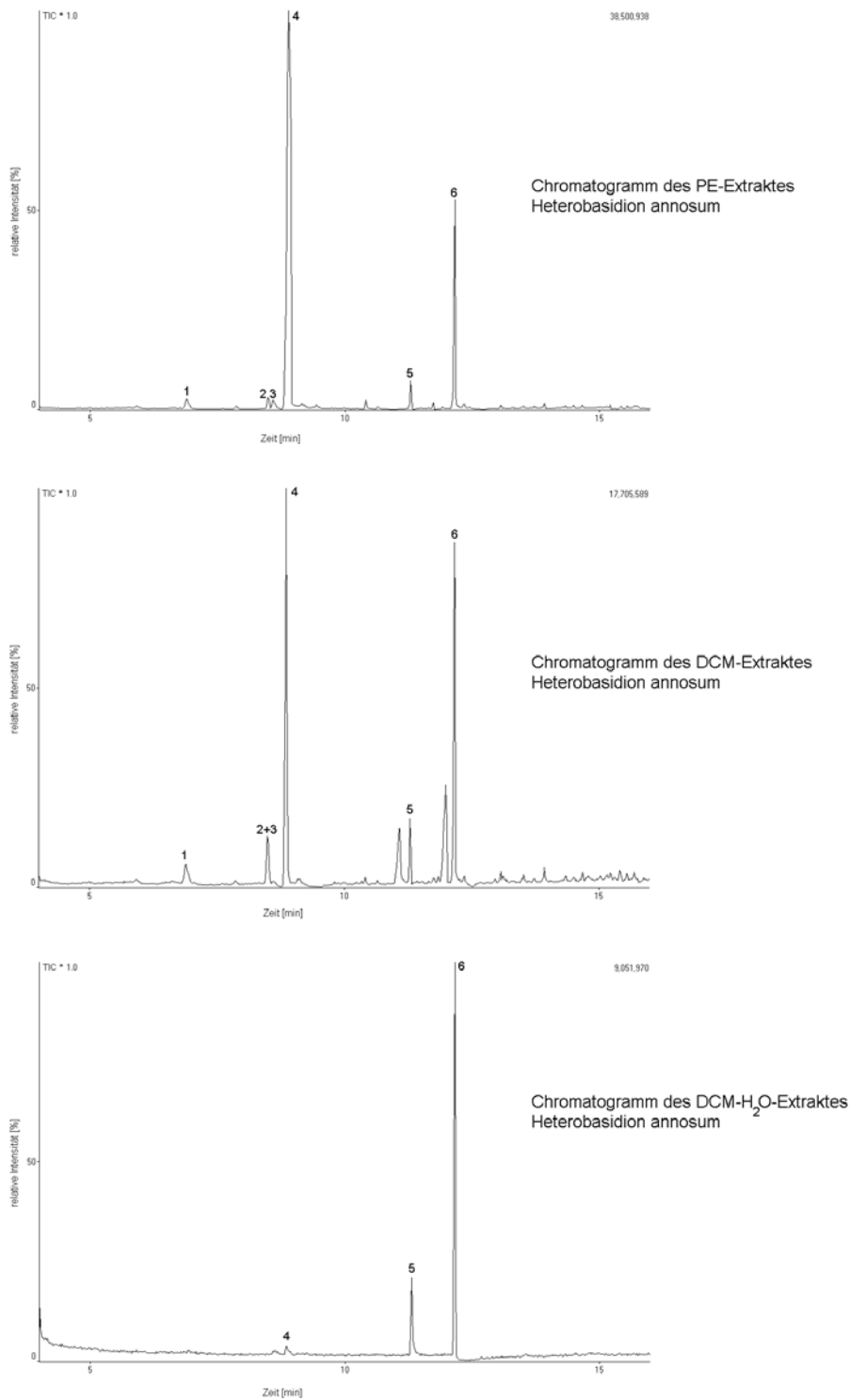


Abb. 13: Gaschromatogramme *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.:

PE-Extrakt, DCM-Extrakt und DCM-H₂O-Extrakt

TIC: 1 – C16:0, 2 – x,x-C18:2, 3 – x-C18:1, 4 – C18:0, 5 – Verunreinigung, 6 – C22:1(*cis*-13) (jeweils der Methylester); Methode s. Exp. Teil 3.5.5: DB-5MS: 30m×0.32mm (0.1µm), Injektor: 250°C (*split-splitless*), Säule: 150°C (1min) – Heizrate 10°C/min auf 300°C, Helium

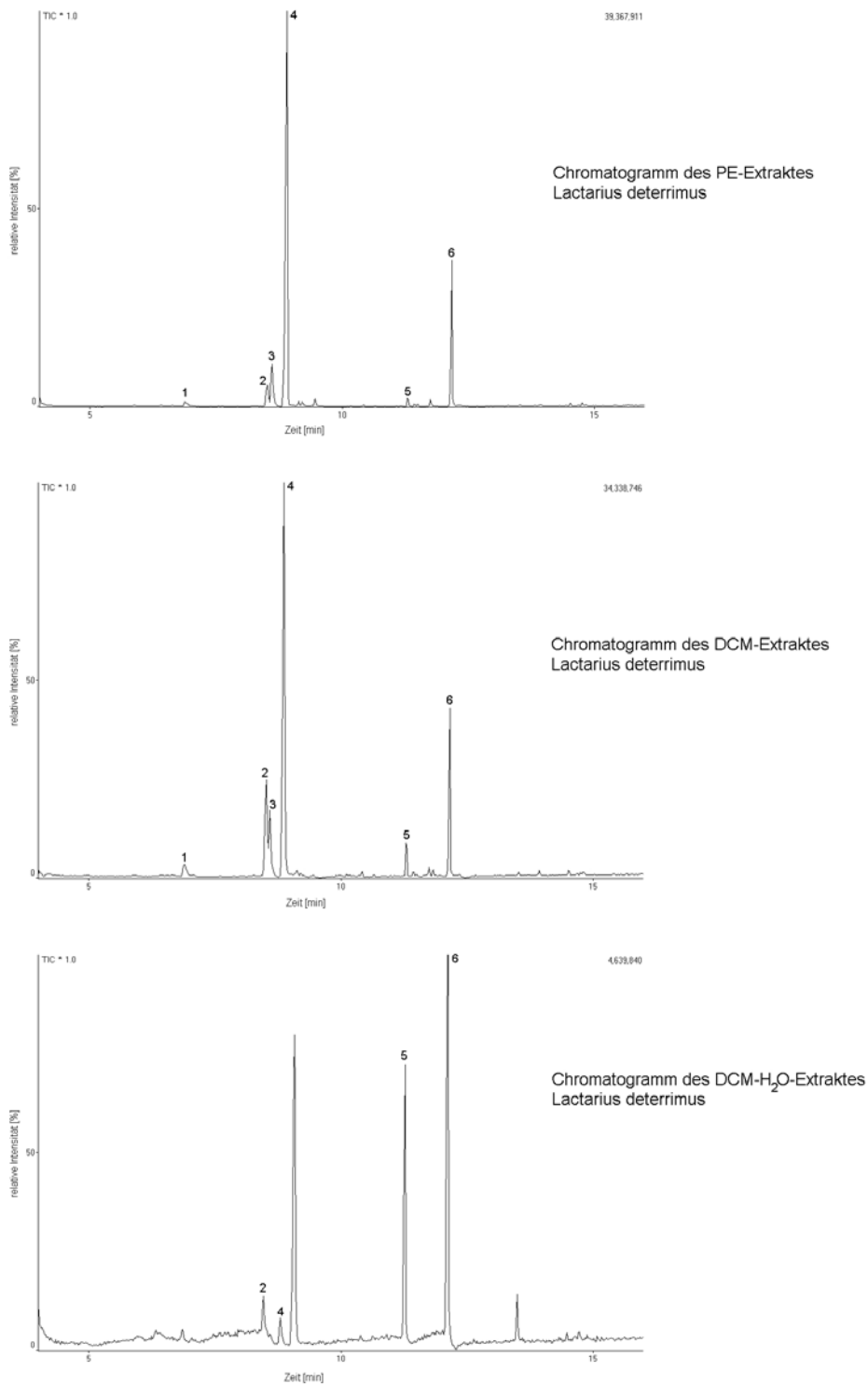


Abb. 14: Gaschromatogramme *Lactarius deterrimus* Grög.:
PE-Extrakt, DCM-Extrakt und DCM-H₂O-Extrakt

TIC: 1 – C16:0, 2 – x,x-C18:2, 3 – x-C18:1, 4 – C18:0, 5 – Verunreinigung, 6 – C22:1(*cis*-13)
(jeweils der Methylester); Methode s. Exp. Teil 3.5.5: DB-5MS: 30m×0.32mm (0.1µm),
Injektor: 250°C (*split-splitless*), Säule: 150°C (1min) – Heizrate 10°C/min auf 300°C, Helium

Die Ergebnisse zeigten, dass im Petrolether-Extrakt von *H. annosum* und dem Petrolether- und Dichlormethan-Extrakt von *L. deterrimus* Stearinsäure einen erheblichen Masseanteil einnahm. Sie kam in Konzentrationen von 15.6, 19.6 bzw. 11.5% vor. Im Petrolether- und Dichlormethan-Extrakt von *L. deterrimus* konnte daneben noch ein erheblicher Anteil (jeweils ca. 5%) an ungesättigten Fettsäuren bestimmt werden. Der Gesamtfettsäuregehalt des Dichlormethan-Extraktes von *H. annosum* war dagegen im Vergleich zu den anderen apolaren Extrakten auffallend gering. In den polaren Extrakten (Methanol- und Dichlormethan-Wasser-Extrakte) war der Masseanteil an den quantitativ bestimmten Fettsäuren bei beiden Pilzen max. 1%.

Quantitative Bestimmung ausgewählter Fettsäuren in den Fraktionen

Für die Fraktionen der dritten Säulenchromatographie des Extraktes von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und die Fraktionen der ersten Säulenchromatographie des Extraktes von *Lactarius deterrimus* Grög. wurde der Gehalt an Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), einer einfach ungesättigten C18-Säure und einer zweifach ungesättigten C18-Säure bestimmt. Für Palmitin- und Stearinsäure wurde der Methodenfaktor 0.64 (Stearinsäure), für x-C18:1 und x,x-C18:2 der Methodenfaktor 0.63 (Ölsäure) berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigen Tab. 16 und Tab. 17.

Tab. 16: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Fraktionen von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. durch GC-MS (Angabe in $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ Extrakt)

Fraktion	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
E3.3	0.3 $R=0.3$	0.2 $R=0.2$	0.1 $R=0.2$	-
E3.4	0.4 $R=0.5$	18.7 $R=5.9$		0.2 $R=0.2$
E3.5	0.6 $R=0.2$	23.3 $R=8.4$	0.1 $R=0.1$	-
E3.6	4.5 $R=5.0$	50.3 $R=8.5$	1.2 $R=1.0$	-
E3.7	-	0.5 $R=0.6$	-	-

$n = 3$, Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.5.5

Tab. 16 ist zu entnehmen, dass der Masseanteil von Stearinsäure in den Fraktionen E3.4, E3.5 und vor allem E3.6 sehr hoch war, der Anteil an ungesättigten Fettsäuren war eher gering. In den Fraktionen E3.3 und E3.7 konnten dagegen kaum Fettsäuren nachgewiesen werden.

Tab. 17: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Fraktionen von *Lactarius deterrimus* Grög. durch GC-MS (Angabe in $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ Extrakt)

Fraktion	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
B	0.2 $R=0.1$	-	0.4 $R=0.1$	0.1 $R=0.0$
C	0.5 $R=0.5$	0.1 $R=0.2$		1.1 $R=0.1$
G	0.3 $R=0.2$	2.5 $R=0.1$		1.6 $R=0.0$
H	0.6 $R=0.2$	0.6 $R=0.1$		1.2 $R=0.2$
I	0.3 $R=0.4$	14.9 $R=8.8$		7.7 $R=3.2$
J	0.4 $R=0.4$	13.8 $R=2.7$		4.0 $R=2.0$
K	2.0 $R=1.7$	1.1 $R=1.4$		1.9 $R=1.0$
L	1.6 $R=1.5$	-	-	3.6 $R=1.8$
M	0.8 $R=0.9$	1.1 $R=0.1$	-	2.6 $R=1.6$
N	0.3 $R=0.2$	0.2 $R=0.2$		0.2 $R=0.0$

$n = 2$, Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.5.5

Aus Tab. 17 ist ersichtlich, dass der höchste Masseanteil an Stearinsäure in den Fraktionen I und J bestimmt wurde. In allen anderen Fraktionen war der Anteil gesättigter Fettsäuren eher gering. Auffallend ist jedoch der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, der in den Fraktionen I und J sehr hoch aber auch in den Fraktionen C-M noch verhältnismäßig hoch war. Dies korrelierte mit dem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren im DCM-Extrakt des *L. deterrimus* (s.Tab. 15).

5. Freie langkettige Fettsäuren: Einfluss auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase

Nachdem freie langkettige Fettsäuren als ein wirksames Prinzip für die Hemmung der *Clostridium histolyticum* Kollagenase bzw. der humanen neutrophilen Elastase erkannt wurden, sollten Untersuchungen hinsichtlich der Abhängigkeit der Struktur der Fettsäuren von ihrer inhibitorischen Wirksamkeit durchgeführt werden. Für dieses Screening wurden 17 Fettsäuren mit Kettenlängen von 12 bis 22 Kohlenstoffatomen, sowohl gerad- als auch ungeradzahlig und mit unterschiedlichen Sättigungsgraden (hier allerdings nur *cis* verknüpfte) ausgewählt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde auch hier mit den im Exp. Teil: 3.1.2 bzw. Exp. Teil: 3.2 beschriebenen *in vitro* Assays durchgeführt.

Der Großteil der getesteten Fettsäuren (mit Ausnahme der Laurin-, Behen-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure) hemmte die Kollagenase-Aktivität in Konzentrationen von 50-500 μ M. Die Elastase-Aktivität wurde in Konzentrationen von 5-50 μ M gehemmt (mit Ausnahme der Laurin-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure). Festzuhalten war, dass sich die inhibitorisch wirksamsten Fettsäuren der beiden Enzyme unterschieden. So hemmten die gesättigten Fettsäuren mit Kohlenstoffatomen von C₁₆-C₁₉ die Kollagenase-Aktivität am stärksten (Abb. 17). Hinsichtlich der Elastase-Aktivität waren die einfach ungesättigten Fettsäuren stärker wirksam als ihre gesättigten bzw. mehrfach ungesättigten Homologa (Abb. 18). Erucasäure war die potenteste der Fettsäuren gegenüber der Elastase mit einer IC₅₀ von 450nM. Tab. 18 zeigt die IC₅₀-Werte aller getesteten Fettsäuren.

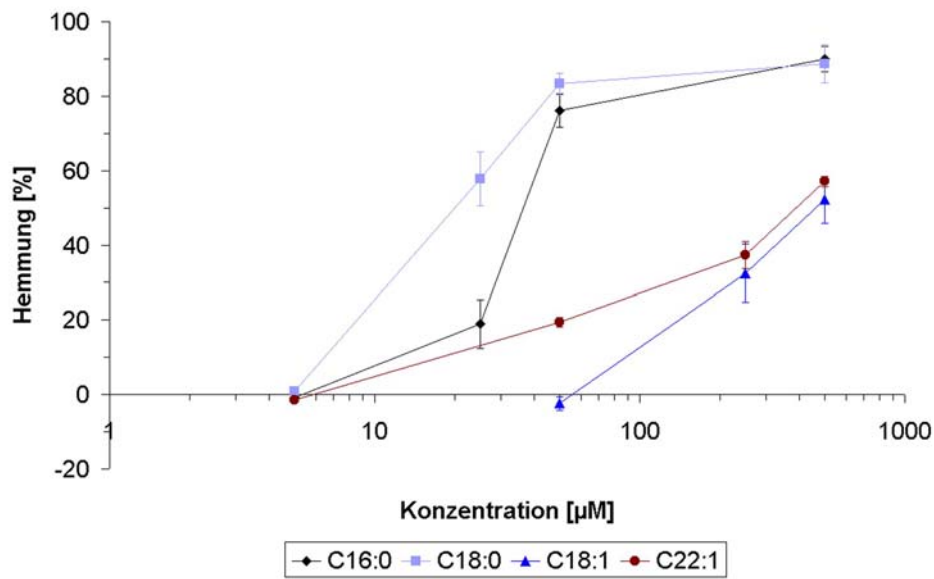


Abb. 15: *Clostridium histolyticum* Kollagenase: Dosis-Effekt-Kurven ausgewählter Fettsäuren

$n \geq 4$, Mittelwert \pm SD, Methode s. Exp. Teil 3.1.2

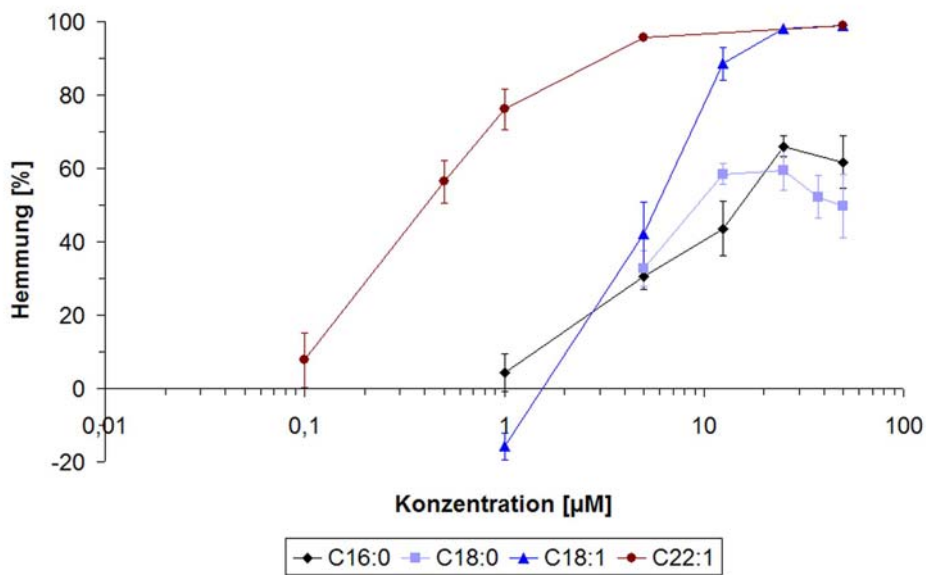


Abb. 16: Humane neutrophile Elastase: Dosis-Effekt-Kurven ausgewählter Fettsäuren

$n \geq 4$, Mittelwert \pm SD, Methode s. Exp. Teil 3.2

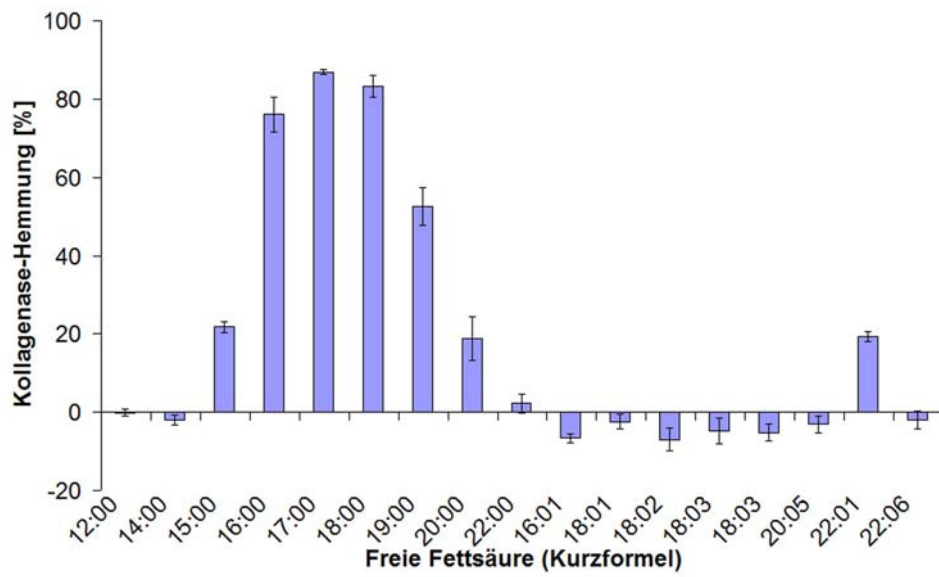


Abb. 17: *Clostridium histolyticum* Kollagenase: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren [50µM]

$n \geq 4$, Säule – Mittelwert, Fehlerbalken – *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.1.2

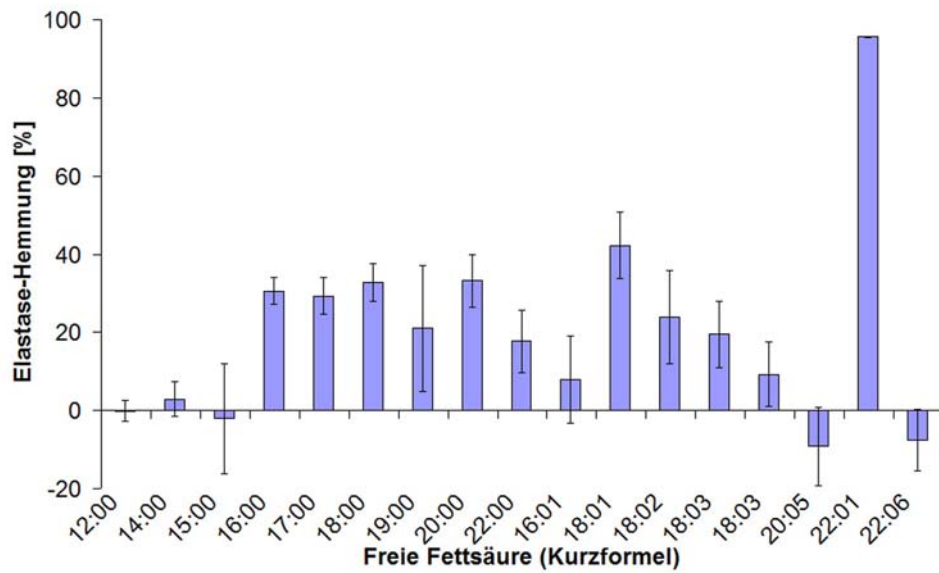


Abb. 18: Humane neutrophile Elastase: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren [5µM]

$n \geq 4$, Säule – Mittelwert, Fehlerbalken – *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.2

Tab. 18: Hemmung der Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase durch freie langkettige Fettsäuren

Trivialname	Kurz-Formel	Kollagenase IC₅₀ [µM]	Elastase IC₅₀ [µM]
Laurinsäure	12:00	k.H.	k.H.
Myristinsäure	14:00	270	35
Pentadecansäure	15:00	125	25
Palmitinsäure	16:00	35	15
Heptadecansäure	17:00	30	H.
Stearinsäure	18:00	20	10
Nonadecansäure	19:00	45	H.
Arachinsäure	20:00	H.	15
Behensäure	22:00	k.H.	30
Palmitoleinsäure	16:01 (<i>cis</i> -9)	405	20
Ölsäure	18:01 (<i>cis</i> -9)	460	5
Linolsäure	18:02 (<i>cis</i> -9,12)	375	10
α-Linolensäure	18:03 (<i>cis</i> -9,12,15)	460	15
γ-Linolensäure	18:03 (<i>cis</i> -6,9,12)	H.	15
Eicosapentaensäure	20:05 (<i>cis</i> -5,8,11,14,17)	k.H.	k.H.
Erucasäure	22:01 (<i>cis</i> -13)	415	0.45
Docosahexaensäure	22:06 (<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19)	k.H.	k.H.

k.H. – keine Hemmung, H. - Hemmung < 50% bei Konzentrationen von 500µM (Kollagenase) bzw. 50µM (Elastase), Methode s. Exp. Teil 3.1.2 und Exp. Teil 3.2

6. Beeinflussung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 durch ausgewählte freie langkettige Fettsäuren

Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit der Anzahl der Kohlenstoffatome 16, 18 und 22 wurden hinsichtlich einer Beeinflussung der Matrix-Metalloproteinase 9-Aktivität getestet (Methode: s. Exp. Teil 3.3). Es war festzustellen, dass die gesättigten Verbindungen in Konzentrationen von 250 μ M keine bzw. eine vernachlässigbare Beeinflussung der Enzymaktivität zeigten. Bei den ungesättigten Verbindungen waren Hemmungen der Aktivität in Konzentrationen von 250 und 50 μ M zu beobachten. Für die Fettsäuren mit der Kohlenstoffanzahl 18 war festzuhalten, dass die Hemmaktivität mit der Anzahl der Doppelbindungen zunahm: die inhibitorisch aktivsten Fettsäuren waren die α - und die γ -Linolensäure. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tab. 19:

Tab. 19: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9

Trivialname	Kurz-Formel	Hemmung der MMP-9-Aktivität [%]	
		250 μ M	50 μ M
Palmitinsäure	C16:0	10.5 $R=2.1$	k.H.
Palmitoleinsäure	C16:1 (<i>cis</i> -9)	43.2 $R=1.2$	27.1 $R=15.1$
Stearinsäure	C18:0	9.2 $R=15.5$	k.H.
Ölsäure	C18:1 (<i>cis</i> -9)	6.3 $R=0.3$	7.3 $R=8.1$
Linolsäure	C18:2 (<i>cis</i> -9,12)	39.2 $R=4.8$	13.4 $R=18.4$
α -Linolensäure	C18:3 (<i>cis</i> -9,12,15)	69.8 $R=2.7$	26.8 $R=22.6$
γ -Linolensäure	C18:3 (<i>cis</i> -6,9,12)	75.2 $R=9.2$	24.2 $R=21.1$
Behensäure	C22:0	k.H.	k.H.
Erucasäure	C22:1 (<i>cis</i> -13)	11.1 $R=10.3$	5.1 $R=6.8$

k.H. – keine Hemmung, $n \geq 2$, Streuung - R , Methode s. Exp. Teil 3.3

7. Bestimmung der Zytotoxizität

7.1. Extrakte

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. wurde an ECV-304 Zellen entsprechend Exp. Teil: 3.6 durchgeführt. Um eine Reduktion des MTT bzw. eine Hemmung der Reduktion allein durch Inhaltsstoffe der Extrakte auszuschließen, wurde in Blindversuchen der Einfluss der Extrakte auf die Bestimmungsmethode untersucht. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine entsprechende Störung der Methode. Die Ergebnisse der Testung der Extrakte hinsichtlich der Beeinflussung der Zellzahl zeigt Tab. 20:

Tab. 20: Einfluss der Extrakte auf Zellen der Linie ECV-304

	Relative Zellzahl [%]		
	100µg/ml	20µg/ml	2µg/ml
<i>Heterobasidion annosum</i>			
PE-Extrakt	2.4 <i>SD</i> =0.10	80.3 <i>SD</i> =5.80	92.3 <i>SD</i> =0.10
DCM-Extrakt	2.4 <i>SD</i> =0.15	45.3 <i>SD</i> =9.74	75.4 <i>SD</i> =0.15
DCM-H ₂ O-Extrakt	71.9 <i>SD</i> =5.20	83.3 <i>SD</i> =6.73	k.H.
H ₂ O-Extrakt	k.H.	-	-
<i>Lactarius deterrimus</i>			
PE-Extrakt	50.2 <i>SD</i> =10.85	k.H.	k.H.
DCM-Extrakt	22.9 <i>SD</i> =5.55	64.2 <i>SD</i> =2.93	93.9 <i>SD</i> =2.30
DCM-H ₂ O-Extrakt	80.9 <i>SD</i> =7.41	88.0 <i>SD</i> =1.57	k.H.
MetOH-Extrakt	78.3 <i>SD</i> =9.72	82.4 <i>SD</i> =10.83	k.H.
H ₂ O-Extrakt	k.H.	-	-

k.H. – keine Hemmung, $n \geq 3$, Streuung - *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.6: MTT-Test

Die wässrigen Extrakte beider Pilze wurden auch in höheren Konzentrationen untersucht: für den wässrigen Extrakt von *H. annosum* wurde in Konzentrationen von 1mg/ml bzw. 500µg/ml eine relative Zellzahl von 54.8% ($SD=1.66$, $n=3$) bzw. 73.0% ($SD=2.43$, $n=3$) bestimmt; der wässrige Extrakt von *L. deterrimus* beeinflusste auch in einer Konzentration von 1mg/ml die Zellzahl kaum (relative Zellzahl: 90.5%, $SD=7.22$, $n=4$).

7.2. Fettsäuren

Es wurden Untersuchungen zur Zytotoxizität von 14 Fettsäuren durchgeführt. Ziel dieser Bestimmung war die Beantwortung der Frage, ob die in den Enzymassays inhibitorisch aktiven Fettsäure-Konzentrationen bereits zytotoxisch bzw. proliferationshemmend sind oder nicht. Hiermit sollten erste Hinweise auf mögliche therapeutische Anwendungen gewonnen werden. Die Bestimmung wurde entsprechend Exp. Teil: 3.6 an der ECV-304 Zelllinie vorgenommen. Aufgrund nicht-ausreichender Löslichkeit bzw. unzureichender Stabilität und der geringen Bedeutung in den Enzymbestimmungen wurde auf die Bestimmung der Behensäure (C22:0), der Eicosapentaensäure [C20:05 (*cis*-5,8,11,14,17)] und der Docosahexaensäure [C22:06 (*cis*-4,7,10,13,16,19)] verzichtet.

Es wurden Fettsäure-Konzentrationen von 50, 100 und 250µM getestet. Alle Substanzen zeigten eine konzentrationsabhängige Toxizität bzw. Proliferationshemmung. Eine Übersicht zu diesen Untersuchungen gibt Tab. 21:

Tab. 21: Einfluss der Fettsäuren auf Zellen der Linie ECV-304

Trivialname	Kurz-Formel	Relative Zellzahl [%]		
		250µM	100µM	50µM
Laurinsäure	12:00	41.6 <i>SD</i> =1.25	k.H.	k.H.
Myristinsäure	14:00	58.2 <i>SD</i> =5.25	+	+
Pentadecansäure	15:00	57.9 <i>SD</i> =5.25	+	k.H.
Palmitinsäure	16:00	40.4 <i>SD</i> =5.40	83.8 <i>SD</i> =10.37	90.2 <i>SD</i> =4.21
Heptadecansäure	17:00	12.0 <i>SD</i> =2.40	48.5 <i>SD</i> =6.70	92.2 <i>SD</i> =4.30
Stearinsäure	18:00	48.3 <i>SD</i> =9.65	72.3 <i>SD</i> =14.50	k.H. <i>SD</i> =3.11
Nonadecansäure	19:00	71.8 <i>SD</i> =4.45	72.4 <i>SD</i> =3.60	85.7 <i>SD</i> =4.17
Arachinsäure	20:00	70.3 <i>SD</i> =6.40	74.9 <i>SD</i> =2.10	77.8 <i>SD</i> =3.64
Palmitoleinsäure	16:01 (<i>cis</i> -9)	2.4 <i>SD</i> =0.87	k.H.	k.H.
Ölsäure	18:01 (<i>cis</i> -9)	1.8 <i>SD</i> =0.25	k.H.	k.H.
Linolsäure	18:02 (<i>cis</i> -9,12)	1.9 <i>SD</i> =0.15	k.H.	k.H.
α-Linolensäure	18:03 (<i>cis</i> -9,12,15)	1.8 <i>SD</i> =0.05	94.1 <i>SD</i> =4.50	92.3 <i>SD</i> =2.16
γ-Linolensäure	18:03 (<i>cis</i> -6,9,12)	2.0 <i>SD</i> =0.15	33.0 <i>SD</i> =2.60	k.H.
Erucasäure	22:01 (<i>cis</i> -13)	26.5 <i>SD</i> =0.90	k.H.	k.H.

k.H. – keine Hemmung, + - Aktivierung, *n* ≥ 3, Streuung – *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.6: MTT-Test

In Konzentrationen von 250µM bewirkten alle getesteten Fettsäuren eine Abnahme der Zellzahl. Die Zahl der Zellen nahm mit sinkender Fettsäure-Konzentration zu: bei Konzentrationen von 50µM war nur noch bei 5 Fettsäuren eine Abnahme der Anzahl lebender Zellen feststellbar. Sie lag aber mit Ausnahme der Nonadecan- und der Arachinsäure unter 10%. Interessant ist der steile Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve für die Palmitolein-, Öl- und Linolsäure: bei 250µM Konzentration ist die Zellzahl fast auf null gesunken, dagegen ist bei 100µM Konzentration keine Beeinflussung der Zellzahl nachweisbar.

8. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien und ihre Beeinflussung

8.1. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien

Die Proteaseaktivität wurde im Überstand der Zellen mit Hilfe eines universellen Proteasesubstrates (Resorufin-markiertes Casein) bestimmt. Die Versuche wurden entsprechend der unter Exp. Teil 3.7 beschriebenen Methode durchgeführt.

Einfluss der Inkubationsdauer auf die Proteasesekretion

Die Proteaseaktivität im Überstand der Zellen der Linien ECV-304 und MCF-7 wurde nach Inkubation mit Resorufin-markiertem Casein für 4, 8 und 24 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse (Angabe der Fluoreszenzeinheiten) zeigt Tab. 22:

Tab. 22: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Proteasesekretion

Zelllinie	Fluoreszenzeinheiten nach		
	4h	8h	24h
ECV-304	31 $n=1$	55 $n=1$	138 $R=123, n=4$
MCF-7	29 $R=3, n=2$	78 $R=6, n=2$	235 $R=72, n=3$

Streuung – R, Methode s. Exp. Teil 3.7

Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die Anzahl der Fluoreszenzeinheiten und damit der Abbau des Proteasesubstrates zu, die Proteasesekretion stieg. Nach 24 Stunden Inkubation war eine ausreichende Anzahl Fluoreszenzeinheiten messbar, bei gleichzeitig geringer Streuung der Werte. Die Zeit für die Inkubation mit dem Resorufin-markiertem Casein wurde auf 24 Stunden festgelegt.

Einfluss der Zellzahl auf die Proteasesekretion

Es wurde untersucht, ob eine Steigerung der Anzahl auszusäender Zellen zu einer Steigerung der Proteaseaktivität im Überstand der Zellen führte. Dazu wurden 100 000 bzw. 200 000 Zellen pro Kavität ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Die Ergebnisse (Angabe der Fluoreszenzeinheiten) zeigt Tab. 23:

Tab. 23: Einfluss der Zellzahl auf die Proteasesekretion

Zelllinie	Fluoreszenzeinheiten	
	100 000 Zellen	200 000 Zellen
MCF-7	235 $R=72, n=3$	293 $R=293, n=2$
MDA-MB-231	409 $R=57, n=4$	719 $R=264, n=2$

$n \geq 2$, Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.7

Bei Aussaat von 200 000 Zellen pro Kavität löste sich beim Waschen der Zellen bereits ein großer Teil der Zellen ab. Die Zellzahl in den Kavitäten war deshalb nicht reproduzierbar. Dies wurde auch aus der Streuung der Werte für die Bestimmung der Proteaseaktivität deutlich. Die auszusäende Zellzahl wurde deshalb auf 100 000 Zellen pro Kavität festgelegt.

Vergleich der Proteaseaktivität

Es wurde die Proteaseaktivität der Zelllinien ECV-304, MCF-7 und MDA-MB-231 bestimmt. Nach Aussaat von 100 000 Zellen pro Kavität und Kultivierung über 4 Tage wurden folgende Aktivitäten (wobei die Proteaseaktivität der ECV-304-Zellen 100% gesetzt wurde) bestimmt:

Tab. 24: Vergleich der Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Proteaseaktivität [%]
ECV-304	100 $SD=32.2$
MCF-7	171 $SD=21.2$
MDA-MB-231	297 $SD=14.8$

$n \geq 3$, Streuung – SD , Methode s. Exp. Teil 3.7

Die Proteaseaktivität der Überstände der Zelllinien nahm in der Reihenfolge ECV-304 < MCF-7 < MDA-MB-231 zu.

8.2. Einfluss von APMA

Um einen Hinweis auf die Eigenschaften der sezernierten Proteasen zu bekommen, wurde der Einfluss einer Organoquecksilber-Verbindung (APMA) auf die Proteaseaktivität im Überstand der Zellen untersucht. Dazu wurde nach Abnahme des Zellüberstandes und seiner Inkubation für 24 Stunden mit PBS-Glucose-Puffer diese Lösung mit APMA (Endkonzentration: 140µM) für 1 bzw. 2 Stunden versetzt. Die Ergebnisse (Angabe der Fluoreszenzeinheiten) zeigt Tab. 25:

Tab. 25: Einfluss von APMA auf die Proteaseaktivität

Zelllinie	Zeit [h]	Fluoreszenzeinheiten	
		APMA-Zugabe	ohne APMA-Zugabe
ECV-304	1	149 <i>SD=4.1</i>	154 <i>SD=2.0</i>
	2	157 <i>SD=7.2</i>	162 <i>SD=8.2</i>
MCF-7	1	320 <i>SD=24.5</i>	336 <i>SD=23.7</i>
	2	321 <i>SD=14.0</i>	337 <i>SD=16.2</i>
MDA-MB-231	1	555 <i>SD=12.9</i>	567 <i>SD=3.4</i>
	2	582 <i>SD=25.8</i>	591 <i>SD=27.1</i>

$n \geq 3$, Streuung – *SD*, Methode s. Exp. Teil 3.7

Es zeigte sich, dass APMA keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität hatte. Bei allen 3 Zelllinien wurden in den Lösungen mit APMA die gleiche Anzahl Fluoreszenzeinheiten gemessen wie in den Lösungen ohne. Als Ergebnis war festzuhalten, dass sich zum Zeitpunkt der Zugabe von APMA keine durch Organoquecksilber-Verbindungen-aktivierbaren Proteasen in den Zellüberständen befanden. Es war jedoch nicht auszuschließen, dass von den Zellen derartige Proteasen sezerniert wurden. Eine Zugabe von APMA direkt auf die Zellen war indes nicht sinnvoll, da die Verbindung zytotoxisch wirkte. Um einen Nachweis für die Sekretion der mit Organoquecksilber-Verbindungen-aktivierbaren Proteasen MMP-2 und MMP-9 zu erbringen, wären die Methoden des Enzym-Immunoassays (z.B. ELISA) oder der Zymographie geeignet.

8.3. Einfluss von 1.10-Phenanthrolin, EDTA und γ -Linolensäure

1.10-Phenanthrolin

Der Einfluss von 1.10-Phenanthrolin auf die Proteaseaktivität wurde untersucht. Handelte es sich bei den Proteasen um Metallopeptidasen so müßte nach Zusatz von 1.10-Phenanthrolin eine Hemmung der Proteaseaktivität nachweisbar sein. Es wurden Bestimmungen durchgeführt bei denen 1.10-Phenanthrolin dem von den Zellen abgetrennten Überstand zugegeben wurde und Untersuchungen bei denen 1.10-Phenanthrolin direkt auf die Zellen gegeben wurde. Die Aktivität der Lösungen ohne 1.10-Phenanthrolin-Zusatz wurde 100% gesetzt, die Aktivitäten der 1.10-Phenanthrolin-Lösungen entsprechend darauf bezogen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 26:

Tab. 26: Einfluss von 1.10-Phenanthrolin auf die Proteaseaktivität

	Proteaseaktivität [%]	
	2mM 1.10-Phenanthrolin 2h im Überstand	1mM 1.10-Phenanthrolin 24h auf Zellen
ECV-304	84.1 <i>n=1</i>	75.6 <i>R=2.4, n=2</i>
MCF-7	94.5 <i>n=1</i>	25.8 <i>R=31.3, n=2</i>
MDA-MB-231	113.9 <i>n=1</i>	19.8 <i>n=1</i>

R – Streuung, Methode s. Exp. Teil 3.7

Da es sich bei den Untersuchungen größtenteils um Einzelversuche handelte, war eine Auswertung nur bedingt möglich. In den Bestimmungen bei denen 1.10-Phenanthrolin nur dem Überstand zugesetzt worden war, war die Beeinflussung der Proteaseaktivität bei allen Zelllinien gering. Wurde 1.10-Phenanthrolin jedoch direkt auf die Zellen gegeben, so konnte bei allen Zelllinien eine deutliche Verringerung der Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine Aussage gemacht werden, ob die Proteasen durch 1.10-Phenanthrolin gehemmt wurden oder die Zellschädigung durch 1.10-Phenanthrolin eine geringere Proteasesekretion zur Folge hatte. An dieser Stelle fehlten die entsprechenden Zytotoxizitätsuntersuchungen für 1.10-Phenanthrolin.

EDTA und γ -Linolensäure

Um einen ersten Hinweis auf eine Hemmung der Proteaseaktivität durch freie Fettsäuren zu bekommen, wurde der Einfluss von γ -Linolensäure auf die Proteaseaktivität der Zellen getestet. Als Vergleichssubstanz wurde weiterhin EDTA, als unspezifischer Inhibitor von Metallopeptidasen, in die Testung einbezogen.

Die Versuche wurden mit Zellen der Linie MDA-MB-231 durchgeführt. Nach Aussaat von 100 000 Zellen pro Kavität und Inkubation für 3 Tage, wurden die Überstände abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 500 μ l PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Aufgabe von 400 μ l PBS-Glucose-Puffer, 50 μ l 0.1% Resorufin-markiertem Casein und 50 μ l Testsubstanz pro Kavität. Nach Inkubation für 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und der Abbau des Proteasesubstrats fluorimetrisch bestimmt. In allen Kavitäten betrug die Konzentration an DMSO 0.1%. Die Ergebnisse zeigt Tab. 27:

Tab. 27: Einfluss von EDTA und γ -Linolensäure auf die Proteaseaktivität

	Relative Proteaseaktivität [%]
0.1% (V/V) DMSO	100.0 $R=13.8$
50 μ M EDTA	76.1 $R=10.8$
50 μ M γ -Linolensäure	96.0 $R=36.1$

$n = 3$, Streuung – R , Methode s. Exp. Teil 3.7

EDTA hemmte die Proteaseaktivität in der Konzentration 50 μ M in allen 3 Versuchen um ca. 20-30%. Die 50 μ M γ -Linolensäure-Lösung zeigte in 2 Versuchen eine Hemmung und in einem Versuch eine Steigerung der Proteaseaktivität. Alle Versuche waren jedoch nur bedingt auswertbar, da keine Zytotoxizitätsbestimmungen der untersuchten Substanzen für die Zelllinie MDA-MB-231 durchgeführt worden waren. Diese wären jedoch notwendig, da die Substanzen für 24 Stunden auf den Zellen verblieben und eine Zellschädigung nicht auszuschließen war.

DISKUSSION

1. Einfluss der Basidiomyceten-Extrakte auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Beim Screening der wässrigen und Dichlormethan-Extrakte von 15 Basidiomyceten hinsichtlich einer Beeinflussung der Elastase-Aktivität konnte festgestellt werden, dass alle wässrigen Extrakte in Konzentrationen von 200 μ g/ml und 11 der Dichlormethan-Extrakte in Konzentrationen von 2 μ g/ml die Aktivität des Enzyms hemmten. Bei der Betrachtung der Werte der Dichlormethan-Extrakte fiel auf, dass die Konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung bewirkten, sehr ähnlich waren: sie lagen zwischen 200ng/ml und 2 μ g/ml. Auch schien der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve sehr steil zu sein: 9 der Extrakte hemmten in Konzentrationen von 2 μ g/ml die Aktivität um 80-90%, bei Konzentrationen von 200ng/ml konnte bei 4 Extrakten keine Hemmung und bei weiteren 4 Extrakten nur eine Hemmung von 20-30% festgestellt werden. Dies könnte auf einen ähnlichen Wirkmechanismus bei allen Extrakten und damit auf Substanzen hinweisen, die in Basidiomyceten häufig vorkommen. Die wässrigen Extrakte erwiesen sich als weniger wirksam gegenüber der Elastase als die Dichlormethan-Extrakte. Sie zeigten allerdings, zumindest zum Teil, deutlich flachere Verläufe der Dosis-Effekt-Kurven.

Die Konzentration der eingesetzten Dichlormethan-Extrakte, die eine Hemmung der Elastase-Aktivität bewirkten, war mit 2 μ g/ml gering. Da die Untersuchungen unter Verwendung von Rohextrakten, die also keine weitere Aufreinigung erfuhren, durchgeführt wurden, schienen in den Extrakten entweder sehr inhibitorisch aktive Verbindungen oder etwas weniger aktive Substanzen, die dann aber in großer Konzentration vorlagen, vorhanden zu sein. Eine aktivitätsgeleitete Isolierung der Substanzen schien Erfolg versprechend.

Der Vergleich der Konzentrationen der Pilzextrakte hinsichtlich der Aktivitätsbeeinflussung von Kollagenase und Elastase zeigte, dass die eingesetzten Konzentrationen sowohl der wässrigen als auch der Dichlormethan-Extrakte für eine 50%ige Elastase-Hemmung zahlenmäßig kleiner waren als die für eine 50%ige Kollagenase-Hemmung (s. Tab. 1, Tab. 12). Eine allgemeine Aussage, dass die Elastase durch Basidiomyceten-Extrakte stärker gehemmt würde, ließ sich daraus jedoch nicht

ableiten. Es wurden unterschiedliche Enzymmengen (unterschiedlicher Aktivität) eingesetzt und auch die Affinität zu den (unterschiedlichen) Substraten war nicht vergleichbar. Es handelte sich hier also nur um einen zahlenmäßigen aber keinen wertenden Vergleich.

Wie in der Einleitung erwähnt, lagen Ergebnisse hinsichtlich einer Beeinflussung von Serin-Proteasen durch Basidiomyceten-Extrakte vor. So untersuchten Pilgrim *et al.* [Pilgrim 1992] wässrige Extrakte von Basidiomyceten hinsichtlich einer Trypsin-Beeinflussung (s. Einleitung 2). Immerhin 9 der in dieser Publikation getesteten Basidiomyceten wurden auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet. Ein Vergleich der eingesetzten Extrakt-Konzentrationen war indes schwierig: in der vorliegenden Arbeit wurde eine definierte Menge lyophilisierter Extrakt mit einer definierten Menge Aqua bidest. in Lösung gebracht, in der Arbeitsgruppe Pilgrim *et al.* wurden jeweils 100µl einer frisch hergestellten Extraktlösung (50mg Pilzmaterial plus 5ml Aqua dest.) bzw. deren Verdünnung verwendet. Es konnte jedoch qualitativ festgestellt werden, dass die jeweils aktivsten Extrakte differierten. Doljak *et al.* [Doljak 2001] untersuchten den Einfluss von polaren Extrakten (50% Methanol/Wasser) von 95 Basidiomyceten auf die Aktivität von Thrombin und Trypsin (s. Einleitung 2). 5 der dort untersuchten Basidiomyceten fanden auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Auch hier war der Vergleich der eingesetzten Extrakt-Konzentrationen schwierig: Doljak *et al.* testeten die definierte Masse von 0.5ml lyophilisierter Extraktlösung. Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen und denen der Publikationen jedoch festgehalten werden, dass auch ein rein qualitativer Vergleich von aktiven und weniger bzw. nicht aktiven polaren Basidiomyceten-Extrakten keinen Hinweis auf eine Hemmung der Aktivität aller Serin-Proteasen durch polare Extrakte einzelner Basidiomyceten gab.

2. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung

Das Ziel aktivitätsgeleiteter Fraktionierungen ist die Abtrennung biologisch aktiver Fraktionen bzw. Einzelverbindungen von nicht-aktiven. Dabei wird der Nachweis der Anreicherung wirksamer Verbindungen durch ein Ansteigen der biologischen Aktivität erbracht. Diese biologische Testung muss nach jedem Trennungsschritt bzw. jeder Aufreinigung erfolgen. Für eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung ist also neben einer einfach und schnell durchführbaren Bestimmungsmethode, auch ausreichend Substanz nötig.

Eine gelungene Isolation von Einzelverbindungen, die für die biologische Aktivität eines Extraktes verantwortlich sind, allein durch die aktivitätsgeleitete Fraktionierung ist der Idealfall. Häufig ist zu beobachten, dass die biologische Aktivität durch weitere Aufreinigungsschritte nicht steigt bzw. kann es sein, dass die Aktivität bei der Auftrennung eines Extraktes bzw. einer Fraktion „verschwindet“. Das kann bedeuten, dass nur das Gemisch der Verbindungen bzw. auch der Rohextrakt wirksam ist. Je komplexer ein Wirkungsmechanismus und die Bestimmungsmethode ist, desto häufiger wird ein „Verschwinden“ der biologischen Aktivität auftreten, da hier das Zusammenspiel mehrerer Verbindungen, sei es z.B. durch Lösungsvermittlung, eine größere Rolle spielt als bei sehr einfachen Assays.

Weiterhin muss man bei aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen davon ausgehen, dass man bereits bekannte und ganz unspektakuläre Verbindungen (wie z.B. Fettsäuren) isoliert. Das muss dann allerdings auch akzeptiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung mit Hilfe von *in vitro* Enzymbestimmungsmethoden für die *Clostridium histolyticum* Kollagenase und die humane neutrophile Elastase als biologischen Testsystemen durchgeführt werden. Dazu wurden die Dichlormethan-Extrakte von zwei Basidiomyceten ausgewählt, die sich in den vorangegangenen Screenings als besonders aktiv gegenüber beiden Enzymen herausstellten. Bei einer Fraktionierung an zwei Systemen musste damit gerechnet werden, dass die jeweils aktivsten Fraktionen für jedes Testsystem differierten. Die Testergebnisse der jeweils ersten Separation in dieser Arbeit zeigten für die Kollagenase eine Anreicherung der aktiven Verbindungen in bestimmten (wenigen) Fraktionen, die Abtrennung unwirksamer Extraktanteile war gelungen. Für die Elastase konnte dies so

nicht festgestellt werden, die inhibitorische Aktivität konnte in fast allen Fraktionen in gleicher Größenordnung festgestellt werden. Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung hinsichtlich der Aktivität der Elastase war nicht gelungen.

Von den aktivsten Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes des *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. wurden mit Hilfe von zwei weiteren Säulenchromatographien weitere Kollagenase-inaktive Substanzen abgetrennt. Die Dünnschichtchromatographie ergab Hinweise auf das Vorkommen von freien Fettsäuren in den aktiven Fraktionen. Dies konnte durch GC-MS-Bestimmungen bestätigt werden. Bei der Auftrennung des Dichlormethan-Extraktes des *Lactarius deterrimus* Grög. wurde nach der ersten Säulenchromatographie sofort eine GC-MS-Bestimmung angeschlossen. Auch hier konnten als eine wirksame Verbindungsklasse die freien Fettsäuren bestimmt werden.

Das reichhaltige Vorkommen von freien Fettsäuren in Pilzen ist bereits beschrieben worden [Müller 1994]. Es ist jedoch zu vermuten, dass nicht alle bestimmten Fettsäuren von Beginn der Extraktion an oder sogar originär frei vorkamen. So stellten Bergendorff *et al.* fest, dass nach Zerkleinerung der Fruchtkörper von *Lactarius deterrimus* Grög. freie Fettsäuren und strukturell veränderte Sesquiterpene vorlagen statt der in nicht zerstörten Fruchtkörpern vorkommenden ursprünglichen Ester [Bergendorff 1988].

Freie Fettsäuren waren sicher nicht die einzig wirksamen Substanzen der Extrakte. Dies galt vor allem für die Elastase. Bei beiden Dichlormethan-Extrakten konnte nach der ersten Säulenchromatographie in fast allen Fraktionen eine Elastase-hemmende Wirkung nachgewiesen werden. In der Literatur wurde die vielfältige Beeinflussung der Elastase durch Naturstoffe beschrieben (s. auch Diskussion 4). Es konnte also sein, dass in den einzelnen Fraktionen tatsächlich Substanzen unterschiedlicher Struktur vorlagen. Aber auch bei Betrachtung der Ergebnisse der Kollagenase musste man feststellen, dass weitere aktive Substanzen vorhanden waren. So zeigte die Fraktion E3.7 des Extraktes von *H. annosum* zwar eine Kollagenase-hemmende Aktivität (s. Abb. 9), es konnten aber nur geringe Mengen Fettsäure (s. Tab. 16) nachgewiesen werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt betrifft die Auswahl der Pilze. Die DCM-Extrakte beider Pilze wiesen sowohl gegenüber der Kollagenase als auch gegenüber der Elastase eine starke inhibitorische Aktivität auf, es war also eher wahrscheinlich, dass man für beide Extrakte das gleiche Prinzip isoliert. Hinsichtlich einer Isolierung unterschiedlicher

Naturstoffgruppen ist es unter Umständen vorteilhafter einen Extrakt mit starker Kollagenase- aber schwacher bzw. keiner Elastase-Aktivität und *vice versa* auszuwählen. Zusätzlich muss auch beachtet werden, dass die Auftrennung der Gemische nicht in zu viele Fraktionen erfolgt, da man immer ausreichend Substanz sowohl für die Testungen als auch zur weiteren Bearbeitung aktiver Fraktionen zur Verfügung haben muss. Möglicherweise kann es auch günstiger sein, die Separation anhand von Naturstoffgruppen vorzunehmen, als das Trennsystem an einer möglichst großen Anzahl detektierbarer Banden in der DC bzw. an Probensäulen zu optimieren, wie es in dieser Arbeit gehandhabt wurde.

Die Feststellung, dass freie Fettsäuren die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase hemmten, verlagerte den weiteren Forschungsschwerpunkt: von der Isolation und Charakterisierung weiterer inhibitorisch-wirksamer Verbindungen wurde zu Gunsten einer intensiven Betrachtung der Gruppe der Fettsäuren hinsichtlich der Beeinflussung von Bindegewebe-abbauenden Proteasen abgesehen.

3. Freie langkettige Fettsäuren

3.1. Einfluss auf die Aktivität der Enzyme

In der vorliegenden Arbeit konnte ein hemmender Einfluss freier langkettiger Fettsäuren auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase nachgewiesen werden. In der Literatur wurden keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Kollagenase-Aktivität durch Fettsäuren gefunden. Die 17 getesteten Fettsäuren hemmten in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge und dem Grad ihrer Sättigung die Kollagenase-Aktivität unterschiedlich stark. Die gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen von C16-C19 (Palmitin-, Heptadecan-, Stearin-, Nonadecansäure) erwiesen sich als besonders potent (IC_{50} : 20-45 μ M). Sowohl die getesteten ungesättigten Homologa als auch Fettsäuren mit kürzeren oder längeren Ketten waren weniger aktiv. Als ein möglicher Reaktionsmechanismus könnte hier die Bildung unlöslicher Salze mit Calcium-Ionen postuliert werden. Da die *Clostridium histolyticum* Kollagenase zur Stabilisierung ihrer Struktur (nicht jedoch im aktiven Zentrum) Calcium-Ionen benötigte [van Wart 1998], war bei vermindertem Calcium-Gehalt auch mit einer verringerten Enzymaktivität zu rechnen. Dass langkettige gesättigte Fettsäuren mit Calcium-Ionen schwerlösliche Salze bildeten, war bekannt.

Bei der Untersuchung der Wirkung von 17 freien Fettsäuren auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase konnte eine Beeinflussung der Enzym-Aktivität durch Fettsäuren in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge und dem Grad der Sättigung nachgewiesen werden. Hierbei erwiesen sich die einfach ungesättigten Fettsäuren als potenter als ihre gesättigten bzw. mehrfach ungesättigten Homologa. Die stärkste inhibitorische Aktivität konnte für die Erucasäure (IC_{50} : 450nM) nachgewiesen werden. Bereits Ashe *et al.* [Ashe 1977] stellte fest, dass die Aktivität der Elastase durch *cis*-ungesättigte Fettsäuren gehemmt werden konnte. In der Arbeit wurden vor allem *cis*- und *trans*-ungesättigte Fettsäuren mit den Kettenlängen C14-C22 (nur geradzahlig) getestet, ferner deren Alkohole. Dort wurde festgestellt, dass die *cis*-ungesättigten Fettsäuren einen hemmenden Effekt zeigten, während die *trans*-Fettsäuren die Enzymaktivität nicht beeinflussten. Auch hier waren einfach ungesättigte Fettsäuren aktiver als ihre zweifach oder dreifach ungesättigten Homologa (C18:x). Die gesättigten Fettsäuren (C16:0 und C18:0) zeigten keinen Effekt, die Alkohole stimulierten die Elastase-Aktivität. Beim Vergleich der Werte der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Ashe *et al.* [Ashe 1977] ist jedoch zu

berücksichtigen, dass unterschiedliche Substrate eingesetzt wurden. Arbeiten, die sich mit dem Einfluss freier Fettsäuren auf die Aktivität der Elastase beschäftigten und in welchen das gleiche Substrat wie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, erschienen von Sklan *et al.* [Sklan 1990] und Tyagi *et al.* [Tyagi 1991]. Bei Sklan *et al.* [Sklan 1990] wurden die Stearin-, Öl- und Linolsäure untersucht mit dem Ergebnis, dass Ölsäure die stärkste inhibitorische Aktivität zeigte. Tyagi *et al.* [Tyagi 1991] stellten fest, dass die Elastase-Aktivität durch die *cis*- und *trans*- Parinarsäure [C18:4(*x*-9,11,13,15)] gehemmt werden konnte. Abschließend ist festzuhalten, dass alle Arbeiten, die die Fettsäuren C18:x mit in die Untersuchungen einbezogen, für diese Verbindungen qualitativ die selben Ergebnisse ermittelten. Die Unterschiede in den Werten der Hemmkonzentrationen waren aufgrund der Verschiedenartigkeit der eingesetzten Substrate und der unterschiedlichen Enzymmengen zu erwarten. Bode *et al.* [Bode 1989] untersuchten Struktur, Strukturspezifität und bekannte Inhibitoren der Elastase intensiv. Sie stellten fest, dass der Raum um die Substratbindungsstelle viele hydrophobe Seitenketten enthielt, so dass eine Hemmung durch kleinere Verbindungen mit hydrophoben Eigenschaften erklärbar schien. Ein Hinweis auf eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch eine verminderte Calciumkonzentration (ähnlich der Kollagenase) wurde nicht gefunden. Die Stabilität der neutrophilen Elastase war im Gegensatz zur Stabilität der Pankreas-Elastase nicht von Calcium-Ionen abhängig [Bode 1989].

Als weiteres Enzym wurde die Matrix-Metalloproteinase 9 hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch freie langkettige Fettsäuren untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bei den getesteten Säuren die Hemmaktivität mit zunehmender Anzahl der Doppelbindungen stieg. Für die C18:x – Säuren waren die α -Linolensäure und γ -Linolensäure inhibitorisch am stärksten aktiv. Insgesamt war jedoch festzuhalten, dass die inhibitorisch-wirksamen Konzentrationen mit 250 μ M (in Konzentrationen von 50 μ M konnte nur für Palmitoleinsäure, α -Linolensäure und γ -Linolensäure eine Aktivitätshemmung festgestellt werden) sehr hoch lagen. Eine Untersuchung zur Beeinflussung der MMP-9 durch Fettsäuren lag bereits vor. Berton *et al.* [Berton 2001] testeten ausgewählte Fettsäuren. Als wirksamste Verbindung wurde *cis*-Parinarsäure [C18:4 (*cis*-9, *trans*-11, *trans*-13, *cis*-15)] gefunden, während Ölsäure weniger und Stearinsäure deutlich weniger potent waren. In dieser Untersuchung wurde jedoch ein anderes Substrat als in der vorliegenden Arbeit verwendet, dennoch wiesen die Ergebnisse beider Arbeiten qualitativ in die gleiche

Richtung. Die Hemmung der Aktivität der MMP-9 durch Fettsäuren wurde wahrscheinlich durch das Vorhandensein der Fibronectin-artigen Domäne möglich gemacht. Berton *et al.* [Berton 2001] untersuchten den Einfluss der Fettsäuren auf die Aktivität der MMP-1, der MMP-2 und einer rekombinanten MMP-2 (ohne Fibronectin-artige Domäne). Es wurde festgestellt, dass auch die Aktivität der MMP-2 durch Fettsäuren hemmbar war, im Gegensatz dazu wurden die Aktivität der MMP-1 und die Aktivität der rekombinanten MMP-2 nicht beeinflusst. Da MMP-2 wie MMP-9 eine Fibronectin-artige Domäne enthält, diese jedoch bei MMP-1 wie bei allen anderen MMPs fehlt und auch die Aktivität der rekombinanten MMP-2 nicht durch Fettsäuren beeinflussbar war, schien für die Hemmung der Enzymaktivität durch Fettsäuren die Fibronectin-artige Domäne essentiell zu sein.

Beim Zusammenfassen der Ergebnisse für alle drei Enzyme stellte man fest, dass für jedes Enzym eine andere Gruppe von Fettsäuren die potenteste darstellte. Ein wertender Vergleich der eingesetzten inhibitorisch wirksamen Fettsäuren-Konzentrationen zwischen den unterschiedlichen Enzymen verbietet sich auch hier (s. Diskussion 1).

Weitergehende Untersuchungen zum Einfluss freier Fettsäuren auf andere Metalloendopeptidasen bzw. Serin-Proteasen bieten sich an. Hier könnte überprüft werden, ob die inhibitorische Wirkung der Fettsäuren für einzelne Enzyme spezifisch ist oder sich Gemeinsamkeiten in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen finden lassen. Für die Serin-Protease Thrombin (EC 3.4.21.5) lagen Untersuchungen vor, bei denen 10 Fettsäuren, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, hinsichtlich einer Beeinflussung der Enzymaktivität getestet worden waren [Henke 2004]. Erucasäure und Ölsäure erwiesen sich als die inhibitorisch aktivsten Säuren mit IC_{50} -Werten von $5\mu\text{M}$ bzw. $7\mu\text{M}$. Ähnlich dem Ergebnis für die humane neutrophile Elastase waren ihre gesättigten und mehrfach ungesättigten Analoga weniger potent [Henke 2004].

Um erste Hinweise auf mögliche therapeutische Anwendungen zu erhalten und auch die Ergebnisse der biochemischen Experimente auf Zellkultursysteme übertragbar zu machen, wurden die Fettsäuren hinsichtlich einer möglichen toxischen bzw. proliferationshemmenden Wirkung auf Zellen untersucht. Dazu wurden Zellen der Linie ECV-304 verwendet. Für die inhibitorisch aktivsten Fettsäuren der *Clostridium histolyticum* Kollagenase, die gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge C16-C19, wurden IC_{50} -Werte von $20\text{-}45\mu\text{M}$ bestimmt. In Konzentrationen von $50\mu\text{M}$ waren diese Fettsäuren

nicht bzw. nur gering zytotoxisch bzw. proliferationshemmend. Die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen schon durch geringe Fettsäure-Konzentrationen gehemmt. Die größte eingesetzte Konzentration wurde deshalb auf 50µM festgelegt. Für alle hinsichtlich der Zytotoxizität untersuchten Fettsäuren wurden für die Elastase IC₅₀-Werte unter 50µM bestimmt (Ausnahme: Heptadecan-, Nonadecansäure). In der Konzentration von 50µM waren alle Fettsäuren nur noch gering oder gar nicht zytotoxisch bzw. proliferationshemmend wirksam. Die gegenüber der MMP-9 inhibitorisch aktivsten Fettsäuren (Palmitolein-, α- Linolen-, γ- Linolensäure) waren zwar in der Konzentration von 50µM nicht zytotoxisch bzw. proliferationshemmend, aber auch nicht mehr sehr potent gegenüber der MMP-9. Die für die MMP-9 ebenfalls untersuchte Konzentration von 250µM erwies sich gerade für die ungesättigten Fettsäuren als sehr zytotoxisch bzw. proliferationshemmend. Der Vergleich der Konzentration für die Zytotoxizität mit der inhibitorisch wirksamen Konzentration gibt nur einen ersten Hinweis, ob eine Übertragung des Enzymassays auf einen Zellkulturassay möglich ist. Sollte eine solche Übertragung stattfinden, muss für jedes Enzym eine Zellkultur gesucht werden, die das entsprechende Enzym in großen Mengen sekretiert. Dann sind erneut für jede Zellkultur Zytotoxizitätsuntersuchungen nötig, um anschließend eine Beeinflussung des sekretierten Enzyms durch Fettsäuren zu bestimmen.

Abschließend soll angemerkt werden, dass die Aussage zur Zytotoxizität bzw. Proliferationshemmung aufgrund der verwendeten Methode begrenzt ist. Im MTT-Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Eine verringerte Aktivität kann auch durch eine partielle Hemmung der Aktivität der Dehydrogenasen bewirkt worden sein, es ist keinesfalls belegt, dass die Verringerung des MTT-Umsatzes allein durch eine geringere Anzahl an Zellen bewirkt wurde. Sollen die Aussagen zur Zytotoxizität präzisiert werden, wären Bestimmungsmethoden erforderlich, die u.a. die Zellmembranpermeabilität (z.B. Farbstoffaufnahme-, Farbstoffausschlusstests oder der Laktat-Dehydrogenase-Assay), die DNA-Synthese (z.B. ³H-Thymidin-Markierung) oder die Proteinsynthese (z.B. ³⁵S-Methionin-Markierung) charakterisieren.

3.2. Physiologische und therapeutische Bedeutung

Physiologische Bedeutung

Langkettige Fettsäuren gehören als Bestandteile der Lipide zu den Biomolekülen im menschlichen Körper. Sie kommen zum überwiegenden Teil im Körper gebunden, meist verestert, vor. Freie langkettige Fettsäuren findet man nur in geringen Mengen. Im Blut erfolgt der Transport der langkettigen, in Wasser unlöslichen Säuren durch Bindung an Albumin. Bei physiologischem pH-Wert liegen die Fettsäuren ionisiert vor.

Fettsäuren erfüllen im Körper bedeutende physiologische Funktionen. Zum einen sind sie als Bausteine von Phospholipiden und Glykolipiden Bestandteile von biologischen Membranen. Zum anderen sind Fettsäuren wichtige Energieträger, wobei sie hierfür als Triacylglycerole gespeichert werden. Eine dritte Aufgabe ist die thermische, mechanische und elektrische Isolierung. Außerdem agieren Fettsäurederivate als Hormone und intrazelluläre Signalmoleküle, sowie als sogenannte Membrananker, wobei sie in dieser Funktion durch kovalente Bindung Proteine an bestimmte Membranorte fixieren [Koolman 1998].

Fettsäuren werden mit der Nahrung aufgenommen, sie können jedoch auch vom Körper synthetisiert werden. Die Bereitstellung der Fettsäuren erfolgt meist durch Hydrolyse von Nahrungslipiden und körpereigenen Lipiden. Kettenverlängerungen von Fettsäuren (immer C_2 -Einheiten) kann der Organismus selbst vornehmen, sie werden in den Mitochondrien vollzogen. Eine totale Neusynthese von Fettsäuren erfolgt im Zytoplasma. Es gibt jedoch Fettsäuren, die der Mensch mit der Nahrung zuführen muss. Bei diesen essentiellen Fettsäuren handelt es sich im engeren Sinne um Linol- ($C_{18:2}$ *cis*-9,12) und α -Linolensäure ($C_{18:3}$ *cis*-9,12,15), im weiteren Sinne zusätzlich um Arachidonsäure ($C_{20:4}$ *cis*-5,8,11,14). Arachidonsäure wird im Körper für die Biosynthese von Eicosanoiden benötigt. Die Neusynthese der Arachidonsäure ist im Körper jedoch nicht möglich, weil der Organismus zwar Fettsäuren um C_2 -Einheiten verlängern, nicht jedoch Doppelbindungen in den hinteren Teil der Fettsäuren einführen kann. Die kürzere Linol- und α -Linolensäure können durch Verlängerung in Arachidonsäure umgewandelt werden und sind deshalb in der Lage, die Arachidonsäure in der Nahrung zu ersetzen. Um den Bedarf an Arachidonsäure zu decken, muss also entweder gleich Arachidonsäure oder zumindest aber die kürzere Linolsäure mit der Nahrung aufgenommen werden [Koolman

1998]. Bei Mangel an essentiellen Fettsäuren, vor allem bedingt durch eine fettfreie Diät oder fettfreie parenterale Ernährung, kann es zu Hautveränderungen (Hyperkeratose, Alopezie), Thrombopenie und Wachstumsstörungen kommen.

Der Abbau der Fettsäuren erfolgt nach vorheriger Aktivierung in den Mitochondrien enzymatisch durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA. Dieses wird anschließend im Citratcyclus unter Energiefreigabe zu CO_2 und H_2O abgebaut. Der Energiegewinn beträgt, z.B. für Palmitinsäure 106 Mol ATP pro Mol Fettsäure (28 Mol ATP aus β -Oxidation, 80 Mol ATP aus Citratcyclus abzüglich 2 Mol ATP von Aktivierung der Säure). Im Vergleich dazu werden pro 1 Mol Glucose unter den Bedingungen der aeroben Oxidation 32 Mol ATP freigesetzt (7 Mol ATP aus Glycolyse, 5 Mol ATP aus Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, 20 Mol ATP aus Citratcyclus). Neben diesem Hauptweg des Fettsäureabbaus, der für die geradzahigen, gesättigten Fettsäuren typisch ist, gibt es für ungesättigte, ungeradzahige, methylverzweigte oder sehr langkettige Fettsäuren noch andere Möglichkeiten des Abbaus [Koolman 1998].

Wie bereits beschrieben kommen freie Fettsäuren im Körper nur in sehr geringem Maße vor. Eine vermehrte Freisetzung von freien Fettsäuren kann durch die verstärkte Ausschüttung von Adrenalin (bei Stress) oder durch eine gesteigerte Lipolyse, z.B. bedingt durch eine verringerte Glucoseverwertung bei Diabetes mellitus oder bei Hyperthyreose, beim Phäochromozytom und beim Hunger hervorgerufen werden. Die freien Fettsäuren werden dann in die Prozesse der β -Oxidation und des Citratcycluses eingespeist. Ist die Aufnahmekapazität des Citratcyclus jedoch erschöpft, kommt es bei einem Überangebot an Acetyl-CoA zur Bildung und Ausscheidung von Ketonkörpern.

Die Menge Fettsäuren, die im Körper frei vorliegt, wird also durch Regulationsmechanismen eingegrenzt. Entweder werden die Fettsäuren verestert und der Fettspeicherung zugeführt, oder es erfolgt der Abbau durch β -Oxidation und Citratcyclus. Eine interne therapeutische Anwendung größerer Mengen freier Fettsäuren wird wahrscheinlich immer an diese Grenzen stoßen.

Säureschutzmantel der Haut

Die Funktionen der Haut sind neben der rein mechanischen Barriere gegenüber der Umwelt auch die Wärmeregulierung, die Energiespeicherung (Fettpolster), der Schutz vor Strahlen (Pigmentierung) und Mikroorganismen. Weiterhin gilt die Haut auch als ein Sinnesorgan. Die oberste Hautschicht (Epidermis) wird von einem dünnen Oberflächenfilm bedeckt, der aus einer wässrigen Lösung von Salzen, Harnstoff, Harnsäure, Aminosäuren, Ammoniak, Zucker, Lipiden, Milchsäure und Ascorbinsäure besteht. Die Lösung wird überwiegend aus den Absonderungen der Talg- und Schweißdrüsen aufgebaut und besitzt einen sauren pH-Wert (pH 4.2 bis 5.6). Dieser sogenannte Säureschutzmantel der Haut übt vor allem eine Schutzwirkung gegenüber Mikroorganismen aus [Bauer 1993]. Er wird durch häufiges Waschen bzw. Waschen mit Seifen abgetragen bzw. zerstört. Bis zum Wiederaufbau des Säureschutzmantels ist die Haut einer verstärkten Wasserverdunstung ausgesetzt, wodurch es zu Austrocknungserscheinungen kommen kann. Eine frühzeitige Rückfettung der Haut kann dem entgegenwirken. Um den physiologischen pH-Wert wiederherzustellen, sind Hautpflegemittel mit einem leicht sauren pH-Wert einzusetzen. Aus dieser Überlegung und aus dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass freie Fettsäuren Bindegewebe-abbauende Enzyme in ihrer Aktivität hemmen können, könnte sich als weitergehender Forschungsschwerpunkt, die Untersuchung des Einflusses von freien Fettsäuren in Pflegemitteln, die direkt auf die Haut gebracht werden, ergeben. Als Fragen könnten geklärt werden, inwieweit eine Erhöhung des Fettsäureanteils in Salben die Neubildung des Säureschutzmantels beeinflusst oder ob der Einsatz freier Fettsäuren in Salben das Eindringen von Mikroorganismen in den Körper behindert.

3.3. Erucasäure

Erucasäure zeigte sich in der vorliegenden Arbeit als potenteste Fettsäure hinsichtlich der Hemmung der Elastase-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 450nM. Ihre therapeutischen Eigenschaften sollen deshalb näher betrachtet werden.

Erucasäure gilt, obwohl eine tatsächliche Gefährdung des Menschen experimentell nicht nachgewiesen ist, als eine für die menschliche Ernährung gesundheitsschädliche Fettsäure. Bei Zufuhr hoher Mengen erucasäurereicher Fette (vor allem aus Samen von Brassicaceen:

Brassica napus L.) kommt es zu Fettablagerungen im Herzmuskel (Lipidose) bei Ratten. Daraufhin hat man erucasäurearme Rapsorten (bezeichnet als 0-Sorten) gezüchtet, die Öle mit Erucasäuremengen unter 5% liefern. Im *Codex Alimentarius* wird der Erucasäuregehalt für Speise-Rapsöl auf unter 2% festgelegt [Codex Alimentarius 2004], diese Menge wird auch bei den in Deutschland angebauten Sorten erreicht. Allerdings gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Rapsöl und Herzschäden beim Menschen, so dass die Obergrenze für die empfohlene Tagesdosis anhand der Tierversuche abgeschätzt wird. Inwieweit diese Tierexperimente jedoch auf den Menschen übertragbar sind, ist umstritten. Weiterhin muss festgestellt werden, dass sich bei Wiederholung der Tierversuche mit erucasäurearmen Ölen die Myokarditiden ebenfalls erzeugen ließen. Es scheint also fraglich zu sein, ob die Schädigungen Ausdruck einer spezifischen Toxizität der Erucasäure sind oder nicht vielmehr Folge einer unsachgemäßen Fütterung der Versuchstiere [Lindner 1990, Macholz 1989, Freepedia 2004].

Therapeutisches Interesse hat die Erucasäure als Bestandteil des sogenannten Lorenzo's Öl (4:1 Mischung von Glycerintriolat und Glycerintrierucat) zur Behandlung der Adrenoleukodystrophie gefunden. Bei dieser Erkrankung handelt es um eine X-chromosomal vererbte Störung des Metabolismus der Peroxisomen. Sie ist biochemisch gekennzeichnet durch eine unzureichende β -Oxidation von sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren vor allem der Cerotinsäure (Hexacosansäure C26:0) aber auch der Lignocerinsäure (Tetracosansäure C24:0). Die daraus folgende abnorme Anhäufung der sehr langkettigen Fettsäuren im ZNS führt zu Demyelinisation (Entmarkung) im ZNS und in deren Folge zu neurologischen Ausfällen. Bei Ablagerung in der Nebenniere kann es zur Atrophie und weiter zu Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) kommen [van Geel 1999, Krenn 2001]. Es handelt sich bei der Adrenoleukodystrophie um eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 1 : 20 000 – 50 000 [Suzuki 2001]. Da die Krankheit X-chromosomal-rezessiv vererbt wird, sind nur Männer betroffen, Frauen sind Konduktoren. Für die klinischen Phänotypen gibt es eine große Variabilität: sie reicht von einer rasch progressiven infantilen Form bis zu einer mild verlaufenden langsam progredienten Adrenomyeloneuropathie [s.a.: Krenn 2001]. Als ein Ziel der Therapie galt die Reduktion der Plasmaspiegel der sehr langkettigen Fettsäuren. Rizzo *et al.* [Rizzo 1989] konnten unter Behandlung mit Lorenzo's Öl eine Normalisierung der Plasmaspiegel zeigen. Allerdings konnte im Anschluß daran keine Gruppe eine klinisch relevante

Verbesserung der Erkrankung nachweisen. Neuere Studien zeigen, dass eine alleinige Normalisierung der Plasmaspiegel nicht ausreicht, um die Krankheit aufzuhalten oder deren Verlauf abzumildern. Der Effekt des Lorenzo` Öl wird dadurch in Zweifel gezogen und nach Abwägung der Nebenwirkungen eher für den Nichteinsatz plädiert [van Geel 1999, Moser 1999]. Das Problem aller Studien ist, dass aufgrund der geringen Patientenzahlen und der gleichzeitigen großen Variabilität der Phenotypen randomisierte Studien im Prinzip nicht möglich sind. Interessant wäre trotzdem die Untersuchung, ob die Normalisierung der Plasmaspiegel der sehr langkettigen Fettsäuren allein durch eine Konkurrenz der Fettsäuren bei der β -Oxidation bewirkt wird, oder hier nicht auch eine Proteasehemmung eine Rolle spielen könnte.

4. Einfluss von Naturstoffen und Synthetika auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Vor allem in den letzten Jahren wurden viele Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase durch Naturstoffe publiziert. Es fällt auf, dass man in einem Großteil der Naturstoffgruppen Vertreter findet, die die Aktivität der Elastase hemmen (Tab. 28):

Tab. 28: Naturstoffe, die die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase hemmen

Naturstoffgruppe	aktivste Verbindung	IC ₅₀	Literatur
Isoprenoide			
Sesquiterpenlactone	Podachaenin	7µM	Siedle 2002
Triterpene	Lupeol	1.9µM	Mitaine-Offer 2002
	Ursolsäure	4µM (K _i)	Ying 1991
Phytosterole	3-O-β-D-Glucopyranosyl-β-Sitosterol		Mitaine-Offer 2002
Phenolische Verbindungen			
Phenolcarbonsäuren	Fukinolsäure	0.23µM (0.1µg/ml)	Löser 2000
	Kaffeesäurebornylester	1.6µM (0.5µg/ml)	Melzig 1999
	<i>trans</i> -Drimenylkaffeesäureester	0.2µM	Melzig 2001
	3,5-O-Dicaffeoylchinasäure	0.2µM	
Cumarin-Derivate			Pochet 2000
Flavonoide	Myricetin	4µM	Sartor 2002a
	Hyperosid	0.3µM	Melzig 2001
Catechine	(-)-Epigallocatechin-3-gallat	0.34µM (K _i)	Sartor 2002b
Antibiotika			
Makrolide	Erythromycin	3.0µM (K _i)	Gorrini 2001

bei den in der Tab. zitierten Untersuchungen wurde immer als Substrat das *N*-Methoxysuccinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilid, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, eingesetzt

Bei den Elastase-hemmenden Naturstoffgruppen handelt es sich zum einen um hydrophobe Moleküle (z.B. Triterpene, Phytosterole) oder aber phenolische Verbindungen (z.T. mit Gerbstoffeigenschaften), wobei auch hier die Aglyka meist inhibitorisch aktiver als ihre glykosidischen Verbindungen sind. Keine Angaben konnten zu Naturstoffgruppen, wie Anthranoide, Saponine, Alkaloide, Kohlenhydraten oder Ätherisch Öl – Komponenten gefunden werden. Die Frage, ob es sich hierbei um zu polare Verbindungen (Saponine, Anthranoid-Glykoside, Kohlenhydrate, Alkaloide) oder zu kleine Moleküle (Ätherisch Öl – Komponenten) handelt, die die Aktivität des Enzyms nicht beeinflussen oder aber diese Gruppen nur nicht auf eine Aktivitätsbeeinflussung hin getestet wurden, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten. Es wäre bei diesem Enzym wichtig, Testungen mit Naturstoffen, die die Aktivität der Elastase nicht beeinflussen zu veröffentlichen, da sich sonst der Eindruck ergibt, dass die Elastase ein beliebig hemmbares Enzym ist. Dies würde dann auch therapeutische Anwendungen in Frage stellen. In diesem Sinne sind auch Testungen von Extrakten von Drogen, die als antirheumatisch oder antiinflammatorisch wirksam gelten zu bewerten. Die Feststellung, dass eine Droge Elastase-inhibierend wirkt, lässt weder den Rückschluss zu, dass diese Hemmung für diese Droge spezifisch ist (meist werden Drogen, die nicht als antiinflammatorisch oder antirheumatisch gelten, nicht getestet), noch dass im Fall einer antiinflammatorisch / antirheumatisch wirksamen Droge die Elastase-Hemmung das wirksamkeitsbestimmende Prinzip ist. Nicht unerheblich ist auch die Frage, in welcher Form die *in vitro* getesteten Verbindungen am Wirkort vorliegen. Dazu müssten Resorptions-, Metabolisierungs- und Stabilitätsstudien durchgeführt werden.

Beim Vergleich der in dieser Arbeit bestimmten IC_{50} -Werte der freien Fettsäuren (Tab. 29:) mit den Werten in Tab. 28 musste man feststellen, dass die Aktivität der Fettsäuren (insbesondere der Erucasäure) sich in gleichen Größenordnungen, wie die der jeweils als inhibitorisch-aktivsten Vertreter gefundenen, befindet. Auch das sollte bei der Interpretation von Untersuchungen zur Elastase-Aktivität beachtet werden.

Tab. 29: Hemmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase durch ausgewählte Fettsäuren (aus: Tab. 18)

Fettsäure	IC ₅₀ Elastase	
	[μ M]	[μ g/ml]
Palmitinsäure	15	3.9
Stearinsäure	10	2.8
Ölsäure	5	1.4
Linolsäure	10	2.8
Erucasäure	0.45	0.2

Ein sehr wichtiger Diskussionspunkt betrifft die physiologische, pathologische und „therapeutische“ Bedeutung der Elastase. Dadurch dass das Enzym in eine Vielzahl von Reaktionsprozessen involviert ist und es ein breites Spektrum an Substraten zu haben scheint (es baut, z.B., fast alle Bestandteile der extrazellulären Matrix ab, s. Einleitung 2) ist eine Hemmung der Aktivität der Elastase nur bedingt sinnvoll. Zum einen gibt es für die Reaktionsprozesse andere Enzyme, die die Funktion der Elastase wahrnehmen können, zum anderen soll mitunter nur ein bestimmter Prozess unterdrückt werden. Dies ist bei der Omnipotenz der Elastase schwierig. Bei der Vielzahl der Publikationen und des damit verbundenen großen Interesses der Forschung an der Elastase ist es überraschend, dass bis jetzt kaum Elastase-Hemmer Eingang in die Therapie gefunden haben. Eine Ausnahme ist der ONO-6818 (CP-955), ein oral verfügbarer Elastase-Hemmer, der derzeit für die Indikationen: rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen und chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (*chronic obstructive pulmonary disease, COPD*) untersucht wird [Ohmoto 2001, Trifilieff 2002].

5. Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien

Eine Voraussetzung für die Invasion von Zellen ist der Abbau der extrazellulären Matrix. Dies geschieht hauptsächlich durch Proteasen. Die Hemmung der Aktivität dieser Proteasen könnte entsprechend eine verminderte Invasion von Zellen bewirken. Bevor also die Invasivität von Zellen mit erheblichen experimentellem Aufwand untersucht wird, sollten Zelllinien zuerst hinsichtlich ihrer Proteaseaktivität untersucht werden. Ziel der Versuche der vorliegenden Arbeit war es, Zellen zu finden, die eine hohe proteolytische Aktivität zeigten und diese Aktivität zu charakterisieren. Es wurden Zellen der Linien ECV-304, MCF-7 und MDA-MB 231 untersucht. Die Bestimmung wurde ähnlich einem Enzymassay durchgeführt, als Enzym(-quelle) fungierte der Überstand der Zellen. Als Substrat diente das Resorufin-markierte Casein (s. Kollagenase-Assay: Exp. Teil 3.1.2, MMP-9-Assay: Exp. Teil 3.3), ein unspezifisches und deshalb als universell bezeichnetes Proteasesubstrat. Mit diesem Substrat war ein großer Teil der Proteaseaktivität erfassbar, allerdings war keine Charakterisierung der Enzyme möglich.

In der Arbeit wurde festgestellt, dass die Proteaseaktivität der Überstände der Zellen unter den Versuchsbedingungen in der Reihenfolge ECV-304 < MCF-7 < MDA-MB 231 zunahm.

Um die sezernierten Proteasen zu charakterisieren, wurden Versuche unter Verwendung einer Organoquecksilber-Verbindung (APMA) zur Aktivierung der Proteasen (z.B. MMP-2, MMP-9) und unter Verwendung von Chelatbildnern (1.10-Phenanthrolin, EDTA) zur Hemmung von Metalloendopeptidasen durchgeführt. Die Zugabe von 140µM APMA hatte unter den Versuchsbedingungen keinen Effekt auf die Proteaseaktivität. Daraus konnte man jedoch nicht schließen, dass keine mit APMA-aktivierbaren Proteasen sezerniert wurden, da die APMA-Zugabe (aufgrund der Toxizität der Substanz) erst spät durchgeführt wurde. Mögliche sezernierte Proenzyme (z.B. MMP-2, MMP-9) konnten schon durch andere Proteasen aktiviert worden sein. Unter Zusatz von 1mM 1.10-Phenanthrolin und 50µM EDTA verringerte sich die Proteaseaktivität. Allerdings läßt sich nicht ausschließen, dass dieser Effekt auf eine Zellschädigung zurückzuführen war, da die Substanzen auf den Zellen für 24h verblieben. Zytotoxizitätsprüfungen lagen nicht vor.

Abschließend wurde der Einfluss von 50µM γ -Linolensäure auf die Proteaseaktivität

getestet. Hier wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten: in zwei Versuchen hemmte die Fettsäure die Proteaseaktivität, in einem Versuch wurde eine erhöhte Proteaseaktivität bestimmt.

Die Zellen, der als hoch invasiv beschriebenen Zelllinie MDA-MB 231 [Price 1990, Gohla 1996], zeigten in dieser Arbeit die höchste Proteaseaktivität. Mit den Zellen dieser Linie könnten Versuche zur Invasivität durchgeführt werden, auch wenn eine hohe Proteaseaktivität wahrscheinlich noch kein Nachweis für eine hohe Invasivität der Zellen ist. Für die Charakterisierung der Proteasen sollte man auf die Bestimmung mittels ELISA zurückgreifen, da diese Methode spezifisch und meist einfach durchführbar ist (bei Verwendung der industriell hergestellten Kits). Neben den MMPs und der humanen neutrophilen Elastase sollte der Fokus auch auf die Plasminogen-Aktivatoren (tPA: *tissue plasminogen activator* EC 3.4.21.68; uPA: *urokinase plasminogen activator* EC 3.4.21.73) gelegt werden, da das durch die Plasminogen-Aktivatoren freigesetzte Plasmin in hohem Maße sowohl zum Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix als auch zur Aktivierung von Bindegewebe-abbauenden Enzymen (wie MMPs) befähigt zu sein scheint [Mignatti 1993]. Zytotoxizitätsuntersuchungen müssen für alle zu testenden Substanzen und die entsprechenden Zelllinien vorliegen.

Als Invasionsassay bietet sich der Matrigel-Assay an [Albini 1987]. Bei dieser Methode wird die Migrationsfähigkeit der Zellen durch die Barriere des Matrigels, ein solubilisierter Extrakt der Basalmembran des Englebreth-Holm-Swarm-Tumors mit den Hauptkomponenten Laminin und Kollagen Typ IV, untersucht. Die Quantifizierung der invasiven Zellen kann z.B. durch Auszählen [Albini 1987] oder eine DNA-Bestimmung [Gohla 1996] vorgenommen werden. Der Literatur war zu entnehmen, dass sich die Invasivität von Zellen während der Subkultivierung verändern konnte [Kolkhorst 1998], aber auch der Zusatz unterschiedlicher Substrate [Seftor 1990] oder von Wachstumsfaktoren (TGF β) [Mooradian 1992] konnte zur Veränderung des invasiven Potentials von Zellen führen. Dies wäre zu beachten bei der Durchführung entsprechender Versuche. Auch die parallele Beobachtung von Invasivität und Proteaseaktivität bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen erscheint interessant. Wenn ein entsprechender Invasionsassay etabliert würde, wäre eine Untersuchung der Fettsäuren hinsichtlich der Beeinflussung des Migrationsverhaltens der Zellen lohnenswert.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening von Extrakten von Basidiomyceten hinsichtlich einer Beeinflussung von Bindegewebe-abbauenden Enzymen durchgeführt. Aus den beiden näher untersuchten Extrakten von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. wurde als ein wirksamkeitsbestimmendes Prinzip die Fraktion freier Fettsäuren isoliert. In der anschließenden breitangelegten Untersuchung der freien Fettsäuren wurde eine Hemmung der Aktivität der Bindegewebe-abbauenden Enzyme *Clostridium histolyticum* Kollagenase, humane neutrophile Elastase und Matrix Metalloproteinase 9 durch Fettsäuren in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge und des Sättigungsgrades festgestellt.

Fortführende Untersuchungen könnten klären, ob die Hemmung der Kollagenase- und MMP-9-Aktivität bzw. der Elastase-Aktivität durch die Fettsäuren spezifisch ist. Dazu sollte der Einfluss der freien Fettsäuren auf andere Metalloendopeptidasen bzw. Serin-Proteasen geprüft werden.

Auch die Untersuchung der Beeinflussung von Hauterkrankungen bzw. Hautveränderungen, die aufgrund einer Schädigung des Säureschutzmantels der Haut entstanden sind, durch freie Fettsäuren erscheint lohnenswert. Ein weiterer Forschungsansatz wäre der lokale Einsatz freier Fettsäuren bei der Behandlung von Entzündungsreaktionen, die mit einer hohen Elastase-Aktivität bzw. einer hohen bakteriellen Kollagenase-Aktivität einhergehen, wie die Parodontitits oder Gingivitis.

Weitere Arbeiten mit Protease-aktiven bzw. invasiven Zellen könnten prüfen, ob sich die Proteaseaktivität hemmen und die Invasivität der Zellen durch freie Fettsäuren vermindern läßt. Sollte dies *in vitro* nachweisbar sein, würde sich ebenfalls eine Untersuchung *in vivo* anbieten.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Geräte

Spektroskopie / -metrie

Fluorometrie:

RF-5001 PC Spectrofluorophotometer, Shimadzu

Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

GC-17A Gas Chromatograph, Shimadzu

GCMS-QP5050A Gas Chromatograph Mass Spectrometer, Shimadzu

Photometrie:

UV-2101 PC UV-VIS Scanning Spectrophotometer, Shimadzu

Plattenfluorometrie/-photometrie:

Spectra Fluor, Tecan

Zell-Labor

Mikroskopie:

Tischmikroskop TMS-F, Nikon

Zellzählung:

Casy[®] 1 TT, Schärfe System GmbH

Zellkultivierung:

CO₂-Brutschrank Cellstar, Nunc GmbH

Sicherheitswerkbank Herasafe HS, Heraeus Instruments

2. Material

2.1. Enzyme

Clostridium histolyticum Kollagenase (EC 3.4.24.3)

aus *Clostridium histolyticum* Kulturen isoliert,

Enzymaktivität: 180U/mg Protein

(Worthington Biochemicals Corporation, Freehold, New Jersey, USA)

Humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37)

aus menschlichen neutrophilen Granulozyten isoliert,

Enzymaktivität: 20U/mg Protein

(ICN Biomedicals GmbH, Eschwege)

Matrix Metalloproteinase 9 (EC 3.4.24.35)

aus menschlichem Blut isoliert,

Enzymaktivität: 200U/mg

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.2. Drogenmaterial

Für das Screening der Basidiomyceten-Extrakte hinsichtlich einer Beeinflussung der Elastase-Aktivität wurden die in der Diplomarbeit [Rennert 1998] hergestellten Extrakte verwendet.

Für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung wurde von neuem Drogenmaterial ausgegangen. Die Fruchtkörper von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. wurden von Frau Prof. Dr. U. Lindequist (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt. Sie wurden am 30.09.1998 von Fichten in Nehringen (bei Grimmen, Mecklenburg-Vorpommern) gesammelt. Die Fruchtkörper von *Lactarius deterrimus* Grög. wurden selbst am 09.09.2000 in einer Fichtenschonung bei Bad Sülze (Mecklenburg-Vorpommern) gefunden. Die Identifizierung erfolgte durch Herrn Prof. H. Kreisel und Herrn Dr. N. Amelang (beide: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald). Die Pilze wurden jeweils gesäubert, tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

2.3. Zelllinien

ECV-304

(DSMZ: ACC 310)

ECV-304 ist eine humane Harnblasen-Karzinom Zelllinie, die als abgeleitete Linie von T-24 betrachtet werden kann. Sie wurde früher als humane Nabelschnur-Endothelzelllinie beschrieben [Takahashi 1990], jedoch beweisen DNA-Analysen die Verwandtschaft der T-24 Linie zu der von der DSMZ ausgegebenen ECV-304 Linie [Dirks 1999].

Kultivierung:

Die Zellen wurden im Medium 199 EARLE (mit 2.2g/l NaHCO₃ und 0.177g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und unter 5%CO₂-Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Verwendung von Trypsin / EDTA – Lösung 1× wöchentlich, mit einem Teilungsverhältnis von etwa 1:13.

MCF-7

(ATCC: HTB-22, DSMZ: ACC 115)

Die Zelllinie wurde von Frau Dr. H. Tullberg (Universität Basel) zur Verfügung gestellt.

MCF-7 ist eine humane Brust-Adenokarzinom Zelllinie und gilt als Estrogen-Rezeptor positiv.

Kultivierung:

Die Zellen wurden im MEM-EARLE (mit 2.2g/l NaHCO₃ und 0.516g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 1% nichtessentiellen Aminosäuren und 1% Natriumpyruvat bei 37°C und unter 5%CO₂-Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Verwendung von Trypsin / EDTA – Lösung 1× wöchentlich, mit einem Teilungsverhältnis von etwa 1:6. Zusätzlich wurde 2× wöchentlich das Medium gewechselt.

MDA-MB-231

(ATCC: HTB-26)

Die Zelllinie wurde von Herrn Prof. Dr. H.R. Maurer (Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

MDA-MB-231 ist eine humane Brust-Adenokarzinom Zelllinie und gilt als Estrogen-Rezeptor negativ.

Kultivierung:

Die Zellen wurden im RPMI-Medium 1640 (mit 2.0g/l NaHCO₃ und stabilem Glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und unter 5%CO₂-Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Verwendung von Trypsin / EDTA – Lösung alle 3-4 Tage, mit einem Teilungsverhältnis von etwa 1:10. Zusätzlich wurde nach 2 Tagen das Medium gewechselt.

2.4. Fettsäuren

IUPAC-Bezeichnung	Kurzformel	Trivialname	Reinheitsgrad
<i>n</i> -Dodecansäure	C12:0	Laurinsäure	≥ 99%
<i>n</i> -Tetradecansäure	C14:0	Myristinsäure	≥ 99.5% (GC)
<i>n</i> -Pentadecansäure	C15:0		ca. 99% (GC)
<i>n</i> -Hexadecansäure	C16:0	Palmitinsäure	> 99% (GC)
<i>n</i> -Heptadecansäure	C17:0		ca. 99%
<i>n</i> -Octadecansäure	C18:0	Stearinsäure	> 99% (GC)
<i>n</i> -Nonadecansäure	C19:0		ca. 99%
<i>n</i> -Eicosansäure	C20:0	Arachinsäure	≥ 99% (GC)
<i>n</i> -Docosansäure	C22:0	Behensäure	ca. 99%
<i>cis</i> -6-Hexadecensäure	C16:1 (<i>cis</i> -9)	Palmitoleinsäure	ca. 99% (GC)
<i>cis</i> -9-Octadecensäure	C18:1 (<i>cis</i> -9)	Ölsäure	> 99% (GC)
<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadiensäure	C18:2 (<i>cis</i> -9,12)	Linolsäure	min. 99%
<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatriensäure	C18:3 (<i>cis</i> -9,12,15)	α-Linolensäure	min. 99%
<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-Octadecatriensäure	C18:3 (<i>cis</i> -6,9,12)	γ-Linolensäure	min. 99%
<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure	C20:5 (<i>cis</i> -5,8,11,14,17)		97.49%
<i>cis</i> -13-Docosensäure	C22:1 (<i>cis</i> -13)	Erucasäure	≥ 99% (GC)
<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	C22:6 (<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19)		98.31%

Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland:

Merck KGaA, Darmstadt:

Redinomedica AG, Bielefeld:

Carl Roth GmbH, Karlsruhe:

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

Myristinsäure, Arachinsäure

Laurinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure

Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure

Erucasäure

Pentadecansäure, Heptadecansäure,

Nonadecansäure, Behensäure,

Palmitoleinsäure, Linolsäure, α-

Linolensäure, γ-Linolensäure

2.5. Chemikalien, Reagenzien und Zellmedien

APMA	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
DMSO (Uvasol®)	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Medium 199 EARLE (1×) (mit 2.2g/l NaHCO ₃ und 0.177g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	Biochrom KG, Berlin
MEM-EARLE (1×) (mit 2.2g/l NaHCO ₃ und 0.516g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	Biochrom KG, Berlin
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumpyruvat (100mM)	Biochrom KG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (100×)	Biochrom KG, Berlin
N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-Nitroanilid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS-Puffer (1×) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
1.10-Phenanthrolin	Merck KGaA, Darmstadt
Pz-peptid	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
Quarz	Merck KGaA, Darmstadt
RPMI 1640 (1×) (mit 2.0g/l NaHCO ₃ und stabilem Glutamin)	Biochrom KG, Berlin
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tricin	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton® X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin (EC 3.4.21.4)	Spofa, Praha, Czech republic
Trypsin/EDTA-Lösung [0.05%/0.02% (m/V)] in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Trypsin-Inhibitor (<i>type I-S: from soybean</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Universelles Proteasensubstrat [<i>casein, labeled with N-(resorufin-4-carbonyl)-piperidine-4-carbonic acid</i>]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Alle weiteren Chemikalien oder Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck KGaA und Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Zur Herstellung der wässrigen Basidiomyceten-Extrakte, zur Extraktion der DCM-Extrakte und zur Herstellung der wässrigen Lösungen (Puffer etc.) wurde Aqua bidest. (pH 4.5-6.0) verwendet.

3. Methoden

3.1. Bestimmung der Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase

3.1.1. Methode unter Verwendung des Pz-peptids

Bei der Bestimmungsmethode nach Wunsch und Heidrich [Wunsch 1963] diente das synthetische Peptid [[[4-(Phenylazo-)benzyl-]oxy-]carbonyl]-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Pro-D-Arginin (Pz-peptid) als spezifisches Substrat für die *Clostridium histolyticum* Kollagenase. Nach Hydrolyse des Peptides wurde das freigesetzte Fragment [[[4-(Phenylazo-)benzyl-]oxy-]carbonyl]-L-Pro-L-Leu mit Ethylacetat extrahiert und die Absorption der organischen Phase spektrophotometrisch vermessen.

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte entsprechend der Diplomarbeit [Rennert 1998]: Kollagenase und Pz-peptid wurden in Tricin-Puffer gelöst (50mM, pH 7.8). 50µl der 2.5mM Substratlösung wurden mit 180µl Puffer (Tricin, 50mM, pH 7.8) versetzt. Durch Zusatz von 20µl (1.44U) Kollagenase-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte 60min bei 24°C (Wasserbad). Durch Zugabe von 1ml 3%iger Zitronensäurelösung (m/V, Aqua bidest.) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 2ml Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung der Ethylacetatphase über Na₂SO₄ konnte deren Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 320\text{nm}$ (Spaltbreite: 1.5nm) bestimmt werden.

3.1.2. Methode unter Verwendung von Resorufin-markiertem Casein

In der zweiten Methode zur Bestimmung der Kollagenase-Aktivität wurde Resorufin-markiertes Casein (Universelles Proteasensubstrat) als unspezifisches Substrat verwendet. Unter Einwirkung von Proteasen auf das Resorufin-markierte Casein wurden Resorufin-markierte Peptide, die mit Trichloressigsäure nicht fällbar waren, freigesetzt. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Resorufin-markierten Peptide wurde anschließend fluorimetrisch bestimmt [Schickaneder 1988]. Die Nutzung von Casein als Substrat setzte reine Enzyme voraus, da es sich hierbei um ein universell einsetzbares (und damit abbaubares) Proteasesubstrat handelte.

Die Bestimmung wurde, wie folgt, durchgeführt: 50µl Substratlösung (0.04% m/V entsprechend 16.95µM, Aqua bidest.), 50µl Tris-HCl-Puffer (0.2M, pH 7.4) und 50µl Aqua bidest. wurden gemischt. Nach Zugabe von 50µl Kollagenase-Lösung (360mU, Aqua bidest.) wurden die Proben für 60min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 480µl 5%iger TCA-Lösung (m/V, Aqua bidest.) und anschließender Inkubation (10min bei 37°C) gestoppt. Nach Zentrifugation (5min, 10000g) wurden 400µl Überstand abgenommen. Der Überstand wurde mit 600µl Tris-HCl-Puffer (0.5M, pH 8.8) gemischt und anschließend wurden sofort die Fluoreszenzeinheiten der Proben bestimmt ($\lambda_{\text{ex}}=574\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=584\text{nm}$, Spaltbreite: jeweils 3nm).

Die Berechnung der Substratkonzentration erfolgte über das Molekulargewicht von Kuhmilch-Casein, wobei als Wert 23600g/mol zugrunde gelegt wurde [Calbiochem 2003].

3.2. Bestimmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Für die Bestimmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase wurde das Substrat *N*-Methoxysuccinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilid [Nakajima 1979] genutzt. Nach Hydrolyse des Substrates konnte das freigesetzte *p*-Nitroanilin spektrophotometrisch (bei $\lambda=405\text{nm}$) bestimmt werden [Stein 1983].

Die Bestimmung wurde, wie folgt, durchgeführt: das Substrat wurde in DMSO gelöst und anschließend mit Tris-HCl-Puffer (60mM, pH 7.5) verdünnt (10mM Substrat-Stammlösung, 5% DMSO). 125µl Substratlösung (1.4mM) wurden mit 455µl Tris-HCl-Puffer (60mM, pH 7.5) gemischt. Nach Zugabe von 20µl Enzymlösung (2.5mU, Aqua bidest.) wurden die Proben für 60min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte mit 500µl Trypsin-Inhibitor-Lösung (0.2mg/ml Tris-HCl-Puffer 60mM, pH 7.5). Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei $\lambda=405\text{nm}$ (Spaltbreite: 1.5nm) vermessen.

3.3. Bestimmung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9

Zur Bestimmung der MMP-9-Aktivität wurde das Resorufin-markierte Casein (Universelles Proteasensubstrat) genutzt. Wie bereits unter Exp. Teil 3.1.2 beschrieben,

handelte es sich beim Resorufin-markierten Casein um ein unspezifisches Substrat, welches unter Proteaseeinwirkung zu mit Trichloressigsäure nicht fällbaren Resorufin-markierten Peptiden abgebaut werden konnte. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Resorufin-markierten Peptide war ein Maß für die Proteaseaktivität und wurde fluorimetrisch bestimmt. Da die MMP-9 als inaktives Proenzym vorlag, musste sie vor der Inkubation mit dem Substrat mit Hilfe der Organoquecksilber-Verbindung *p*-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) in die aktive Form überführt werden.

Die Bestimmung wurde folgendermaßen durchgeführt: zur Herstellung der APMA-Verdünnung wurde 1 Teil APMA-Stammlösung (10mM in 100mM NaOH) mit 3 Teilen TTC-Puffer (Tris-HCl: 50mM, pH 7.5, 0.05% Triton[®] X-100, 5mM CaCl₂) gemischt. Diese Lösung wurde mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 7.0-7.5 eingestellt. Zur Aktivierung der MMP-9 wurden 7.5µl APMA-Verdünnung, 7.5µl TTC-Puffer (Tris-HCl: 50mM, pH 7.5, 0.05% Triton[®] X-100, 5mM CaCl₂) und 2.5µl MMP-9-Lösung (250µU) gemischt und für 30min bei 37°C (Wasserbad) belassen. Anschließend wurden 50µl Tris-HCl-Puffer (0.2M, pH 7.4) und 82.5µl Aqua bidest. zugesetzt. Nach Durchmischung und Zugabe von 50µl Substratlösung (0.04%, m/V, Aqua bidest.) wurden die Proben für 4h bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 480µl 5%iger TCA-Lösung (m/V, Aqua bidest.) und anschließender Inkubation (10min bei 37°C) gestoppt. Nach Zentrifugation (5min, 10000g) wurden 400µl Überstand abgenommen. Der Überstand wurde mit 600µl Tris-HCl-Puffer (0.5M, pH 8.8) gemischt und anschließend wurden sofort die Fluoreszenzeinheiten der Proben bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 574\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 584\text{nm}$, Spaltbreite: jeweils 3nm).

Für die Versuche unter Verwendung von Trypsin (EC 3.4.21.4) als Aktivator der MMP-9 wurden 2.5µl MMP-9-Lösung (250µU) und 15µl Trypsin-Lösung (400µg/ml Aqua bidest.) gemischt und für 30min bei 37°C (Wasserbad) belassen. Anschließend wurde die Aktivität von Trypsin durch Zugabe von 65µl Trypsin-Inhibitor-Lösung (2mg/ml Aqua bidest.) gehemmt. Es erfolgte der Zusatz von 50µl Tris-HCl-Puffer (0.2M, pH 7.4) und 17.5µl Aqua bidest. Nach Durchmischung und Zusatz von 50µl Substratlösung (0.04%, m/V, Aqua bidest.) wurden die Proben für 4h bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Weiteres Vorgehen s. oben.

3.4. Herstellung der Pilzextrakte

Screening

Für das Screening wurden die in der Diplomarbeit von Rennert [Rennert 1998] hergestellten Extrakte verwendet: die Extraktion erfolgte nach der Zerkleinerung des Drogengutes mittels Schlagmühle zunächst mit Aqua dest. in einer Schüttelmaschine für 4h bei Raumtemperatur. Dazu wurde 1g Droge mit 10ml Aqua dest. versetzt. Nach Filtration wurden Drogenrückstände und Extrakte lyophilisiert. Zur Gewinnung der Dichlormethan-Extrakte wurden die lyophilisierten Drogenrückstände mit Dichlormethan für 4h bei 25°C im Wasserbad gleichmäßig geschüttelt (1g Droge mit 10ml DCM). Nach Filtration erfolgte das Verdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck bei max. 35°C Wasserbadtemperatur.

Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.

50.6g lyophilisiertes Drogenmaterial wurden in der Schlagmühle zerkleinert und mit Quarzsand verrieben. Die Extraktion erfolgte in der Reihenfolge: Petrolether, Dichlormethan, Aqua bidest. Die zerkleinerte Droge wurde mit Extraktionsmittel versetzt (Verhältnis: 1g Droge inkl. Quarzsand und 10ml Lösungsmittel) und für 4h bei 35°C im Wasserbad gleichmäßig geschüttelt (Schüttelmaschine). Anschließend wurde filtriert. Das Lösungsmittel (Petrolether bzw. Dichlormethan) wurde unter vermindertem Druck bei max. 35°C Wasserbadtemperatur abgedampft und der Rohextrakt erhalten. Das aus der Extraktion mit Aqua bidest. erhaltene Filtrat wurde lyophilisiert. Die Extraktion mit Dichlormethan wurde zweimal durchgeführt, mit Petrolether und Aqua bidest. wurde jeweils einmal extrahiert. Der erhaltene Dichlormethan-Extrakt wurde mit 100ml Dichlormethan aufgenommen und 3× mit 50ml Aqua bidest. ausgeschüttelt. Die Lösungsmittelphasen wurden getrennt: das Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck abgedampft, der wässrige Extrakt lyophilisiert.

Ausbeuten Extraktion:

Petrolether-Extrakt:	0.4g
Dichlormethan-Extrakt:	0.6g
Wässriger Extrakt:	3.4g

Ausbeuten Dichlormethan-H₂O-Extraktion:

Dichlormethan-Extrakt:	0.56g
Dichlormethan-H ₂ O-Extrakt:	0.04g

Lactarius deterrimus Grög.

78.1g lyophilisiertes Pilzmaterial wurde vor der Extraktion in der Schlagmühle zerkleinert und mit Quarzsand verrieben. Es wurde in folgender Reihenfolge extrahiert: Petrolether, Dichlormethan, Methanol, Aqua bidest. Dazu wurde das zerkleinerte Material mit dem Extraktionsmittel versetzt (Verhältnis: 1g Droge inkl. Quarzsand und 10ml Lösungsmittel) und für 4h bei 35°C im Wasserbad in einer Schüttelmaschine belassen. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgedampft (bei max. 35°C Wasserbadtemperatur). Der wässrige Extrakt wurde lyophilisiert. Die Extraktionen mit Petrolether und Dichlormethan wurden jeweils zweimal durchgeführt, mit Methanol und Aqua bidest. wurde jeweils einmal extrahiert. Der Dichlormethan-Extrakt wurde anschließend mit 200ml Dichlormethan aufgenommen und 3× mit jeweils 100ml Aqua bidest. ausgeschüttelt, die Phasen wurden getrennt und anschließend das Lösungsmittel abgedampft bzw. lyophilisiert.

Ausbeuten Extraktion:

Petrolether-Extrakt:	6.2g
Dichlormethan-Extrakt:	1.7g
Methanol-Extrakt:	8.6g
Wässriger Extrakt:	13.9g

Ausbeuten Dichlormethan-H₂O-Extraktion:

Dichlormethan-Extrakt:	1.35g
Dichlormethan-H ₂ O-Extrakt:	0.24g

3.5. Isolation und Identifizierung der Fettsäuren

3.5.1. Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2mm (Merck KGaA)

Mobile Phase: FM 1: CHCl₃
FM 2: CHCl₃-Methanol: 10T+1T

Detektion:

1. UV 254nm
Die Platte wurde unter UV-Licht 254nm bezüglich auftretender Fluoreszenzlösungen ausgewertet.
2. UV 366nm
Die Platte wurde unter UV-Licht 366nm bezüglich auftretender Fluoreszenzen ausgewertet.
3. Schwefelsäure 10%
(V/V, Ethanol 96%)
Die Platte wurde mit dem Reagenz besprüht und anschließend für 5-10 min auf 110°C erhitzt und sowohl im UV als auch im Tageslicht ausgewertet.
4. Wasser
Die Platte wurde mit Wasser bis zur Durchtränkung des Adsorbens besprüht und noch feucht im Tageslicht ausgewertet.
5. Rhodamin B – Reagenz
(100mg Rhodamin B / 100ml Ethanol 96%)
Die Platte wurde mit dem Reagenz besprüht. Nach dem Trocknen wurde sowohl im UV als auch im Tageslicht ausgewertet.

3.5.2. Säulenchromatographie

Stationäre Phase:	Kieselgel 60, silanisiert, Korngröße 63-200 μ m	Merck KGaA, Darmstadt	
	Sephadex LH-20	Pharmacia, Uppsala, Sweden	
	Kieselgel 60, Korngröße 63-200 μ m	Merck KGaA, Darmstadt	
Mobile Phase:	FM A:	Fraktion 1-144	CHCl_3
		Fraktion 145-172	CHCl_3 -Methanol: 10T+1T
		Fraktion 173-195	CHCl_3 -Methanol: 9T+2T
		Fraktion 196-215	CHCl_3 -Methanol: 1T+1T
	FM B:	Fraktion 1-99	CHCl_3 - <i>n</i> -Hexan: 2T+1T
		Fraktion 100-114	CHCl_3
		Fraktion 115-138	CHCl_3 -Methanol: 1T+1T
	FM C:	Fraktion 1-102	CHCl_3
	FM D	Fraktion 1-160	CHCl_3
		Fraktion 161-189	CHCl_3 -Methanol: 9T+1T
		Fraktion 190-201	CHCl_3 -Methanol: 4T+1T
		Fraktion 202-227	CHCl_3 -Methanol: 1T+1T
		Fraktion 228-300	Methanol

Die Adsorbentien wurden in dem jeweils verwendeten Fließmittel suspendiert und in eine mit Mull und Watte abgedichtete Säule gegeben. Bei Verwendung von Sephadex LH-20 und dem Fließmittel CHCl_3 wurde das Adsorbens mit Glaskugeln (auf Filterpapier) beschwert.

Bei allen Chromatographien wurde das zu trennende Substanzgemisch in wenig Fließmittel gelöst und vorsichtig auf die gefüllte Säule aufgegeben.

3.5.3. Isolation der Fettsäuren – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.

Der Dichlormethan-Rohextrakt wurde an silanisierem Kieselgel mit dem FM A chromatographiert (Belastung der Säule 1:100, Tropfgeschwindigkeit: ca. 2.5ml pro min). Die Chromatographie ergab 215 Fraktionen a 5ml. Die Fraktionen wurden nach dc-Untersuchungen mit den FM 1 und 2 zu 13 Fraktionen (Fraktionen A-M) vereinigt. Kollagenase-hemmende Effekte konnten in den Fraktionen E-H nachgewiesen werden. Nach Vereinigung der Fraktionen E (118mg) und F (63mg) erfolgte eine weitere Auftrennung dieses Gemisches an silanisierem Kieselgel mit dem FM B (Belastung der Säule 1:200, Tropfgeschwindigkeit ca. 1ml pro min). Diese Säulenchromatographie ergab 138 Fraktionen a 2-3ml, die nach dc-Untersuchungen mit dem FM 1 zu 8 Fraktionen (Fraktionen E1-E8) zusammengefasst wurden. Die Kollagenase-hemmende Wirkung konnte in den Fraktionen E2-E4 nachgewiesen werden, den stärksten Effekt zeigte Fraktion E3 (64mg). Die Fraktion E3 wurde weiters an Sephadex LH-20 mit dem FM C aufgetrennt (Belastung der Säule 1:100, Tropfgeschwindigkeit ca. 0.5ml pro min.). Diese Säulenchromatographie ergab 102 Fraktionen a 2ml, die nach dc-Untersuchungen mit dem FM 1 zu 9 Fraktionen (Fraktionen E3.1-E3.9) zusammengefasst wurden. Die Kollagenase-hemmende Wirkung konnte in den Fraktionen E3.4-E3.7 nachgewiesen werden, den stärksten Effekt zeigten die Fraktionen E3.5 (17mg) und E3.6 (8mg). Es schloss sich eine GC-MS-Untersuchung der Fraktionen E3.3.-E3.7 an.

3.5.4. Isolation der Fettsäuren – *Lactarius deterrimus* Grög.

Der Dichlormethan-Rohextrakt wurde an Kieselgel mit dem FM D chromatographiert (Belastung der Säule 1:200, Tropfgeschwindigkeit ca. 1ml pro min.). Die Chromatographie ergab 300 Fraktionen a 7ml. Die Fraktionen wurden nach dc-Untersuchungen mit dem FM 1 und 2 zu 14 Fraktionen (Fraktionen A-N) vereinigt. Die stärksten Kollagenase-hemmenden Effekte konnten in den Fraktionen I und J nachgewiesen werden, von denen 165 bzw. 300mg erhalten wurden. Der Großteil der Fraktionen wurden anschließend gaschromatographisch untersucht.

3.5.5. Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Gaschromatographie

Derivatisierungsreagenz:	N,N-Dimethylformamid / Dimethylacetal / Pyridin: 1/1 (DMF-DMA; Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren)
Trennsäule:	DB-5MS (J&W Scientific Products GmbH, Köln), 30m × 0.32mm, Filmdicke: 0.1µm
Temperaturprogramm:	GC-Injektor: 250°C GC-Ofen: Anfangstemperatur: 150°C (1min) Heizrate: 10°C/min bis auf 300°C
Trägergas:	Helium (5.0)
Injektion:	manuelle Probenaufgabe (Luftpolster) Injektionsvolumen: 2µl <i>split-splitless injection:</i> <i>splitless:</i> 1.5min <i>split:</i> 23.7ml Gesamtgasfluss

Massenspektrometrie

Temperatur vom Interface:	250°C
Temperatur der Ionenquelle:	250°C
Modus der Ionisation:	EI (70eV)
Massenscan:	40-500/1s
Aufzeichnungszeit:	4.0-16.0min
Massenspektrenbibliothek:	Wiley / NIST (Shimadzu)
Kalibriersubstanz:	Perfluortributylamin (PFTBA)
Interner Standard für Identifizierung / Quantifizierung:	Erucasäure [C22:1 (<i>cis</i> -13)]

Für die Derivatisierung wurden die Proben in CHCl_3 gelöst. Anschließend wurden 50µl der Probelösung mit 100µl des Derivatisierungsreagenzes versetzt und für 20min bei 60°C (Trockenschrank) inkubiert.

3.6. Bestimmung der Zytotoxizität

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Extrakte und Fettsäuren wurde an der ECV-304 Zelllinie (Passage 33-38 und Passage 45-50) vorgenommen.

Die Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen erfolgte mit Hilfe des MTT-Testes. Dieser erlaubte über den Nachweis der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen eine indirekte Bestimmung der Zellzahl. Aktive mitochondriale Dehydrogenasen wandelten das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT durch Spaltung des Tetrazoliumringes in unlösliches violetteres Formazan um [Mosmann 1983]. Das auskristallisierte Formazan wurde anschließend zur spektrophotometrischen Bestimmung gelöst. Der Test wurde entsprechend der Literatur [Freshney 1990] durchgeführt:

Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung von 96 *well plates*. Pro Kavität wurden ca. 1000 Zellen (Casy[®]1 TT) in 100µl Medium [Medium 199 EARLE (1×) (mit 2.2g/l NaHCO₃ und 0.177g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum] ausgesät. Nach 24h Inkubation (37°C, 5%CO₂, Brutschrank) wurden die zu untersuchenden Substanzen (in 100µl Medium) aufgegeben. Nach 4 Tagen weiterer Inkubation (37°C, 5%CO₂, Brutschrank) wurden pro Kavität 20µl der MTT-Lösung (5mg/ml PBS-Puffer) zugegeben, die Platte wurde 3min geschüttelt und für 2h im Inkubator (37°C, 5%CO₂) belassen. Anschließend wurden das Medium und die MTT-Lösung entfernt und pro Kavität 100µl DMSO zugegeben. Die Platte wurde für 15min geschüttelt und die Absorption bei $\lambda=580\text{nm}$ (Hintergrundwellenlänge: $\lambda=620\text{nm}$) im Plattenphotometer vermessen.

3.7. Nachweis von Proteaseaktivität im Überstand der Zellen

Die Untersuchungen zum Nachweis von Proteaseaktivität im Überstand der Zellen wurden an Zellen der Linien ECV-304 (Passage 37-48), MCF-7 (Passage 44-48 und Passage 62-64) und MDA-MB 231 (Passage 5-10 und Passage 24-26) vorgenommen.

Für die Bestimmung der Proteaseaktivität im Überstand der Zellen wurden die Zellen ausgesät und kultiviert. Nach Zugabe des Resorufin-markierten Caseins (Universelles Proteasensubstrat) und dessen Inkubation mit den Zellen, konnten die abgebauten mit TCA

nicht-fällbaren Peptide fluorimetrisch ermittelt werden (s. auch Exp. Teil 3.1.2). Die Bestimmung wurde, wie folgt, durchgeführt:

Unter Verwendung von 24 *well plates* wurden pro Kavität ca. 100 000 Zellen (Casy[®] 1 TT) in 100 µl Medium ausgesät. Nach Zugabe von 900µl Medium erfolgte die Inkubation 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit je 450µl PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 450µl Glucose-PBS-Puffer (1g/l) und 50µl Proteasensubstrat (1mg/ml Aqua bidest.) für 24h auf den Zellen belassen (37°C, 5%CO₂, Brutschrank). Um die Reaktion zu beenden, wurden 200µl Überstand abgenommen und mit 480µl TCA-Lösung (5%, m/V) versetzt. Nach Inkubation (10min bei 37°C, Wasserbad) wurde für 5min bei 10000g zentrifugiert. 400µl Überstand wurden mit 600µl Tris-HCl-Puffer (0.5M, pH 8.8) gemischt und sofort die Fluoreszenzeinheiten der Proben bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 574\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 584\text{nm}$, Spaltbreite: jeweils 3nm).

3.8. Mathematische Berechnungen und statistische Methoden

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Daten sind als Mittelwert von 2 – 5 unabhängigen Experimenten mit je 2 Proben dargestellt. Als Streuungsmaß wurden die Standardabweichung (*SD*, bei mindestens 3 unabhängigen Experimenten) oder die Spannweite (*R*, bei 2 unabhängigen Experimenten) verwendet. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Bestimmung der Fettsäure-Gehalte mittels GC

Die Daten sind als Mittelwert von 2 – 5 unabhängigen Experimenten mit je 1 – 2 Proben dargestellt. Als Streuungsmaß wurde die Spannweite (*R*) verwendet.

Bestimmung der Zytotoxizität

Die Daten sind als Mittelwert von 3 – 4 unabhängigen Experimenten mit je 8 Proben dargestellt. Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung (*SD*) verwendet. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Bestimmung der Proteaseaktivität der Zellen

Die Daten sind als Mittelwert von 1 – 4 unabhängigen Experimenten mit je 4 Proben dargestellt. Als Streuungsmaß wurde die Spannweite (*R*, bei 2 unabhängigen Experimenten) oder die Standardabweichung (*SD*, bei mindestens 3 unabhängigen Experimenten) verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase durch wässrige und Dichlormethan-Extrakte von 15 Basidiomyceten konnte festgestellt werden.
2. Nach Auswertung des Screenings bzw. der bereits aus der Diplomarbeit bekannten Daten hinsichtlich einer Beeinflussung der humanen neutrophilen Elastase bzw. der *Clostridium histolyticum* Kollagenase durch Basidiomyceten-Extrakte wurden die Dichlormethan-Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. genauer untersucht. Durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung konnten Fraktionen freier langkettiger Fettsäuren als ein wirksames Prinzip isoliert werden.
3. Der qualitative und quantitative Nachweis der Fettsäuren in den Extrakten und Fraktionen erfolgte mittels GC-MS.
4. Das Screening von 17 freien langkettigen Fettsäuren hinsichtlich einer Beeinflussung der *Clostridium histolyticum* Kollagenase zeigte als aktivste Verbindungen Palmitin- (C16:0), Heptadecan- (C17:0), Stearin- (C18:0) und Nonadecansäure (C19:0) mit IC_{50} -Werten von 20-45 μ M. Diese gesättigten Fettsäuren zeigten eine erheblich stärkere Hemmwirkung als ihre ungesättigten Homologa. In der Literatur ist ein Einfluss freier Fettsäuren auf die Aktivität der *Clostridium histolyticum* Kollagenase bisher nicht beschrieben worden.
5. Beim Screening von 17 freien langkettigen Fettsäuren hinsichtlich der Beeinflussung der humanen neutrophilen Elastase ergab sich, dass die einfach ungesättigten Fettsäuren eine stärkere Hemmaktivität als ihre gesättigten und mehrfach ungesättigten Homologa zeigten. So wurde für Ölsäure (C18:1 *cis*-9) eine IC_{50} von 5 μ M bestimmt, die IC_{50} -Werte für Stearin-(C18:0) und Linolsäure (C18:2 *cis*-9,12) lagen bei 10 μ M bzw. für α -Linolensäure (C18:3 *cis*-9,12,15) und γ -Linolensäure (C18:3 *cis*-6,9,12) bei 15 μ M. Die inhibitorisch am stärksten wirksame Verbindung war die Erucasäure (C22:1 *cis*-13) mit einer IC_{50} von 450nM. Die Beeinflussung der Elastase-Aktivität durch freie langkettige Fettsäuren war in der Literatur bereits bekannt. Unsere Untersuchungen unterstützten und erweiterten die Ergebnisse früherer Publikationen.

6. Die Untersuchungen von 9 ausgewählten Fettsäuren bezüglich einer Beeinflussung der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 zeigten als die inhibitorisch aktivsten Verbindungen die Palmitolein-, die α -Linolen- und die γ -Linolensäure. Die inhibitorisch wirksamen Konzentrationen waren mit 250 μ M (bei 50 μ M sehr geringe Hemmung) sehr groß. Die Beeinflussung der MMP-9-Aktivität war in der Literatur bereits bekannt, wobei unsere Untersuchungen diese Ergebnisse erweiterten.
7. Zytotoxizitätsuntersuchungen der Extrakte von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. und *Lactarius deterrimus* Grög. sowie der freien Fettsäuren wurden an der Zelllinie ECV-304 durchgeführt.
8. Untersuchungen zur Proteaseaktivität der Zelllinien ECV-304, MCF-7 und MDA-MB 231 wurden durchgeführt. Die Proteaseaktivität der Zelllinien nahm unter den gegebenen Versuchsbedingungen in der Reihenfolge ECV-304 < MCF-7 < MDA-MB 231 zu. Ein Zusatz von 140 μ M APMA bzw. 2mM 1.10-Phenanthrolin zum Überstand der Zellen zeigte keine Beeinflussung der Proteaseaktivität. Ein Zusatz von 1mM 1.10-Phenanthrolin bzw. 50 μ M EDTA direkt auf die Zellen führte zu einer Abnahme der Proteaseaktivität, es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf eine Zellschädigung zurückzuführen war. Die einzig untersuchte Fettsäure γ -Linolensäure zeigte keine reproduzierbare Beeinflussung der Proteaseaktivität.

LITERATURVERZEICHNIS

- Albini 1987: Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47: 3239-3245 (1987)
- Anke 1989: Anke H, Bergendorff O, Sterner O: Assays of the biological activities of guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible lactarius species. *Food Chem Toxicol* 27(6): 393-397 (1989)
- Anke 1991: Anke H, Sterner O: Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms. *Planta Med* 57: 344-346 (1991)
- Ashe 1977: Ashe BM, Zimmerman M: Specific inhibition of human granulocyte elastase by cis-unsaturated fatty acids and activation by the corresponding alcohols. *Biochem Biophys Res Commun* 75(1): 194-199 (1977)
- Bauer 1993: Bauer KH, Frömming K-H, Führer C: *Pharmazeutische Technologie* 4.Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 194 (1993)
- Baugh 1976: Baugh RJ, Travis J: Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. *Biochemistry* 15(4): 836-841 (1976)
- Bergendorff 1988: Bergendorff O, Sterner O: The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry* 27(1): 97-100 (1988)
- Berton 2001: Berton A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Patthy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, Emonard H: Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 276(23): 20458-20465 (2001)
- Bieth 1998: Bieth JG: 15. Leukocyte elastase. Hrsg.: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of proteolytic enzymes* Academic Press: 54-60 (1998)
- Bode 1989: Bode W, Meyer E, Powers JC: Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28 (5): 1951-1963 (1989)
- Bond 1984a: Bond MD, van Wart HE: Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 23(13): 3085-3091 (1984a)
- Bond 1984b: Bond MD, van Wart HE: Relationship between the individual collagenases of *Clostridium histolyticum*: evidence for evolution by gene duplication. *Biochemistry* 23(13): 3092-3099 (1984b)

Calbiochem 2003: Calbiochem-Novabiochem GmbH: *Sicherheitsdatenblatt: Casein, bovine milk* (2003)

Codex Alimentarius 2004: Codex Alimentarius: *Vegetable Oils*.

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/336/CXS_210_2003e.pdf

(29.11.2004 11:30 Uhr)

Collier 1998: Collier IE, Goldberg GI: 402. Gelatinase B. Hrsg.: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of proteolytic enzymes* Academic Press: 1205-1210 (1998)

Delclaux 1996: Delclaux C, Delacourt C, d'Ortho M-P, Boyer V, Lafuma C, Harf A: Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 288-295 (1996)

Dirks 1999: Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG: ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross-contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35(10): 558-559 (1999)

Doljak 2001: Doljak B, Stegnar M, Urleb U, Kreft S, Umek A, Ciglaric M, Strukelj B, Popovic T.: Screening for selective thrombin inhibitors in mushrooms. *Blood Coagul Fibrinolysis* 12(2): 123-128 (2001)

Donnelly 1982: Donnelly DMX, O'Reilly J, Polonsky J, van Eijk GW: Fomajorin S and D from fomes annosus (FR) Cooke. *Tetrahedron Lett* 23 (51): 5451-5452 (1982)

Donnelly 1988: Donnelly DMX, Fukuda N, Kouno I, Martin M, O'Reilly J: Dihydrobenzofurans from *Heterobasidion annosum*. *Phytochemistry* 27 (8): 2709-2713 (1988)

Ferry 1997: Ferry G, Lonchamp M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, Tucker GC: Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett* 402 (2-3): 11-15 (1997)

Freepedia 2004: Freepedia: *Erucasäure*.

<http://de.freepedia.org/index.php?title=Erucas%E4ure&printable=yes> (29.11.2004 11:02

Uhr)

Freshney 1990: Freshney RI: *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch*. 2.Aufl. de Gruyter Berlin, New York: 259-260 (1990)

Giollant 1993: Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E: Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol* 101(2): 513-522 (1993)

- Gohla 1996: Gohla A, Eckert K, Maurer HR: A rapid and sensitive fluorometric screening assay using YO-PRO-1 to quantify tumour cell invasion through Matrigel. *Clin Exp Metastasis* 14(5): 451-458 (1996)
- Gorrini 2001: Gorrini M, Lupi A, Viglio S, Pamparana F, Cetta G, Iadarola P, Powers JC, Luisetti M: Inhibition of human neutrophil elastase by erythromycin and flurythromycin, two macrolide antibiotics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(4): 492-499 (2001)
- Hänssel 1999: Hänssel R, Sticher O, Steinegger E: *Pharmkognosie – Phytopharmazie*. 6.Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 401-406 (1999)
- Henke 2004: Henke K: *Etablierung eines Thrombin-Assays und Testung phenolischer Naturstoffe auf Thrombin-inhibitorische Aktivität*. Diplomarbeit Greifswald (2004)
- Heslin 1983: Heslin MC, Stuart MR, Murchú PO, Donnelly DMX: Fomannoxin, a phytotoxic metabolite of *Fomes annosus*: in vitro production, host toxicity and isolation from naturally infected Sitka spruce heartwood. *Eur J For Pathol* 13(1): 11-23 (1983)
- Hibbs 1987: Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH: Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 80(6): 1644-1650 (1987)
- Hirotnani 1977: Hirotnani M, O'Reilly J, Donnelly DMX, Polonsky J: Fomannoxin - a toxic metabolite of *Fomes annosus*. *Tetrahedron Lett* 7: 651-652 (1977)
- Jung 1999: Jung C-M, Matsushita O, Katayama S, Minami J, Sakurai J, Okabe A: Identification of metal ligands in the *Clostridium histolyticum* colH collagenase. *J Bacteriol* 181(9): 2816-2822 (1999)
- Kepler 1967: Kepler JA, Wall ME, Mason JE, Bassett C, McPhail AT, Sim GA: The structure of fomannosin, a novel sesquiterpene metabolite of the fungus *Fomes annosus*. *J Am Chem Soc* 89(5): 1260-1261 (1967)
- Kohlmunzer 2000: Kohlmunzer S, Wegiel J, Muszynska B, Sulkowska-Ziaja K, Guillot J: Indole metabolites in mycelial culture of higher fungi (Abstract). *Herba Polonica* 46(2): 98-104 (2000)
- Kolkhorst 1998: Kolkhorst V, Stürzebecher J, Wiederanders B: Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 598-606 (1998)
- Koolman 1998: Koolman J, Röhm K-H: *Taschenatlas der Biochemie*. 2.Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 44-47, 156-159 (1998)

- Koul 1985: Koul SK, Taneja SC, Ibrahim SP, Dhar KL, Atal CK: A C-formylated azulene from *Lactarius deterrimus* *Phytochemistry* 24(1): 181-182 (1985)
- Krenn 2001: Krenn M, Bonelli RM, Niederwieser G, Reisecker F, Költringer P: Adrenoleukodystrophie kann multiple Sklerose imitieren. *Nervenarzt* 72: 794-797 (2001)
- Kumar 2003: Kumar D, Gupta SP: A quantitative structure-activity relationship study on some matrix metalloproteinase and collagenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 11: 421-426 (2003)
- Lauer-Fields 2002: Lauer-Fields JL, Fields GB: Triple-helical peptide analysis of collagenolytic protease activity. *Biol Chem* 383: 1095-1105 (2002)
- Lee 2001: Lee WL, Downey GP: Leukocyte elastase: Physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 896-904 (2001)
- Lindequist 1990: Lindequist U, Teuscher E, Narbe G: Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. *Zeitschrift für Phytotherapie* 11: 139-149 (1990)
- Lindner 1990: Lindner E: *Toxikologie der Nahrungsmittel*. 4.Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 53-56 (1990)
- Liotta 1979: Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR: Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(5): 2268-2272 (1979)
- Löffler 1998: Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6.Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 734-748 (1998)
- Löser 2000: Löser B, Kruse SO, Melzig MF, Nahrstedt A: Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* 66: 751-753 (2000)
- Macholz 1989: Macholz R, Lewerenz H-J: *Lebensmitteltoxikologie*. Akademie Verlag Berlin: 210-211 (1989)
- Maifeld 1998: Maifeld D: *Endophytische Pilze der Fichte (Picea abies L. Karst.) - Neue Aspekte zur biologischen Kontrolle von Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.* Dissertation Tübingen (1998)
- Matrisian 1992: Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 14(7): 455-463 (1992)
- Melzig 1996: Melzig MF, Pieper S, Siems W-E, Heder G, Böttger A, Liberra K, Lindequist U: Screening of selected basidiomycetes for inhibitory activity on neutral endopeptidase (NEP) and angiotensin-converting enzyme (ACE). *Pharmazie* 51(7): 501-503 (1996)

- Melzig 1999: Melzig MF, Löser B, Lobitz GO, Tamayo-Castillo G, Merfort I: Inhibition of granulocyte elastase activity by caffeic acid derivatives. *Pharmazie* 54: 712 (1999)
- Melzig 2001: Melzig MF, Löser B, Ciesielski S: Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie* 56(12): 967-970 (2001)
- Mignatti 1993: Mignatti P, Rifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73(1): 161-195 (1993)
- Mitaine-Offer 2002: Mitaine-Offer AC, Hornebeck W, Sauvain M, Zeches-Hanrot M: Triterpenes and phytosterols as human leucocyte elastase inhibitors. *Planta Med* 68(10): 930-932 (2002)
- Mookhtiar 1992: Mookhtiar KA, van Wart HE: Clostridium histolyticum collagenases: a new look at some old enzymes. *Matrix Suppl 1*: 116-126 (1992)
- Mooradian 1992: Mooradian DL, McCarthy JB, Komanduri KV, Furcht LT: Effects of transforming growth factor-beta 1 on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility, and invasion in vitro. *J Natl Cancer Inst* 84(7): 523-527 (1992)
- Moser 1999: Moser HW: Treatment of X-linked adrenoleukodystrophy with Lorenzo's oil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(3): 279-280 (1999)
- Mosmann 1983: Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63 (1983)
- Müller 1994: Müller MM, Kantola R, Kitunen V: Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycol Res* 98(6): 593-603 (1994)
- Mykonet 2003: Müller R: *Mykonet*. <http://www.mykonet.ch> (14.03.2003 10:30Uhr)
- Nakajima 1979: Nakajima K, Powers JC, Ashe BM, Zimmerman M: Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. *J Biol Chem* 254 (10): 4027-4032 (1979)
- Ohmoto 2001: Ohmoto K, Yamamoto T, Okuma M, Horiuchi T, Imanishi H, Odagaki Y, Kawabata K, Sekioka T, Hirota Y, Matsuoka S, Nakai H, Toda M: Development of orally active nonpeptidic inhibitors of human neutrophil elastase. *J Med Chem* 44(8): 1268-1285 (2001)
- Okada 1989: Okada Y, Nakanishi I: Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ("gelatinase") by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett* 24(2): 353-356 (1989)

- Pilgrim 1992: Pilgrim H, Haasmann S, Schröder K: Trypsininhibitoraktivität in Basidiomyceten. *Zentralbl Mikrobiol* 147: 400-404 (1992)
- Pochet 2000: Pochet L, Doucet C, Dive G, Wouters J, Masereel B, Reboud-Ravaux M, Pirotte B: Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of alpha-chymotrypsin and human leukocyte elastase. *Bioorg Med Chem* 8(6): 1489-1501 (2000)
- Price 1990: Price JE, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM: Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 50(3): 717-721 (1990)
- Rennert 1998: Rennert B: *Untersuchungen zur Hemmung der Kollagenase-Aktivität unter besonderer Berücksichtigung von Basidiomyceten-Extrakten*. Diplomarbeit Greifswald (1998)
- Rice 1995: Rice A, Banda MJ: Neutrophil elastase processing of gelatinase A is mediated by extracellular matrix. *Biochemistry* 34(28): 9249-9256 (1995)
- Rizzo 1989: Rizzo WB, Leshner RT, Odone A, Dammann AL, Craft DA, Jensen ME, Jennings SS, Davis S, Jaitly R, Sgro JA: Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 39(11): 1415-1422 (1989)
- Roche 1999: Roche Diagnostics GmbH: *Produktinformation: Gelatinase, 92kD* (1999)
- Rothmaler 1984: Schubert R, Handke HH, Pankow H: *Exkursionsflora*. Bd. 1 (Niedere Pflanzen - Grundband) 2.Aufl. Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin (1984)
- Sartor 2002a: Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S: Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 64(2): 229-237 (2002a)
- Sartor 2002b: Sartor L, Pezzato E, Garbisa: S(-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *J Leukocyte Biol* 71(1): 73-79 (2002b)
- Schickaneder 1988: Schickaneder E, Hösel W, Eltz H v d, Geuß U: Casein-resorufin, a new substrate for a highly sensitive protease assay. *Fresenius Z Anal Chem* 330: 360 (1988)
- Scozzafava 2000: Scozzafava A, Supuran CT: Protease inhibitors: synthesis of potent bacterial collagenase and matrix metalloproteinase inhibitors incorporating N-4-nitrobenzylsulfonylethylglycine hydroxamate moieties. *J Med Chem* 43(9): 1858-1865 (2000)
- Seftor 1990: Seftor RE, Seftor EA, Cress AE, Hendrix MJ: Profiles of human melanoma cell surface proteins: effects of culturing on two different substrates. *Pigment Cell Res* 3(1): 44-48 (1990)

Senior 1991: Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG: Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266(12): 7870-7875 (1991)

Shapiro 2002: Shapiro SD: Neutrophil elastase: Path clearer, pathogen killer or just pathologic? *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 266-268 (2002)

Siedle 2002: Siedle B, Cisielski S, Murillo R, Löser B, Castro V, Klaas CA, Hucke O, Labahn A, Melzig MF, Merfort I: Sesquiterpene lactones as inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10: 2855-2861 (2002)

Sklan 1990: Sklan D, Rappaport R, Vered M: Inhibition of the activity of human leukocyte elastase by lipids particularly oleic acid and retinoic acid. *Lung* 168(6): 323-332 (1990)

Sonnenbichler 1983: Sonnenbichler J, Lamm V, Gieren A, Holdenrieder O, Lotter H: A cyclopentabenzopyranone produced by the fungus *Heterobasidion annosum* in dual cultures. *Phytochemistry* 22: 1489-1491 (1983)

Stein 1983: Stein RL: Catalysis by human leukocyte elastase: substrate structural dependence of rate-limiting protolytic catalysis and operation of the charge relay system. *J Am Chem Soc* 105: 5111-5116 (1983)

Suzuki 2001: Suzuki Y, Imamura A, Shimozawa N, Kondo N: The clinical course of childhood and adolescent adrenoleukodystrophy before and after Lorenzo's oil. *Brain Dev* 23(1): 30-33 (2001)

Takahashi 1990: Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T: Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26(3 Pt 1): 265-274 (1990)

Travis 2000: Travis J, Potempa J: Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1477 (1-2): 35-50 (2000)

Trifilieff 2002: Trifilieff A: ONO-6818 Cortech/Ono. *Curr Opin Investig Drugs* 3(8): 1161-1164 (2002)

Tyagi 1991: Tyagi SC, Simon SR: Parinaric acids as probes of binding domains in neutrophil elastase. *J Biol Chem* 266(23): 15185-15191 (1991)

van Geel 1999: van Geel BM, Assies J, Haverkort EB, Koelman JHTM, Verbeeten B Jr, Wanders RJA, Barth PG: Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(3): 290-299 (1999)

- van Wart 1985: van Wart HE, Steinbrink DR: Complementary substrate specificities of class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 24(23): 6520-6526 (1985)
- van Wart 1998: van Wart HE: 368. *Clostridium* collagenases. Hrsg.: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of proteolytic enzymes* Academic Press: 1098-1102 (1998)
- Wasser 1999: Wasser SP, Weis AL: Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19(1): 65-96 (1999)
- Westermarck 1999: Westermarck J, Kähäri V-M: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB* 13: 781-792 (1999)
- Wünsch 1963: Wünsch E, Heidrich H-G: Zur quantitativen Bestimmung der Kollagenase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 333: 149-151 (1963)
- Ying 1991: Ying QL, Rinehart AR, Simon SR, Cheronis JC: Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem J* 277(6): 521-526 (1991)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Abhängigkeit der Zahl der Fluoreszenzeinheiten von der enzymatischen Aktivität im Kollagenase-Assay	18
Abb. 2: Abhängigkeit der Zahl der Fluoreszenzeinheiten von der Inkubationsdauer im Kollagenase-Assay	19
Abb. 3: Abhängigkeit der Absorption von der Substratkonzentration im Elastase-Assay.....	22
Abb. 4: Abhängigkeit der Absorption von der enzymatischen Aktivität im Elastase-Assay.....	23
Abb. 5: <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	32
Abb. 6: <i>Lactarius deterrimus</i> Grög.	34
Abb. 7: <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase: Einfluss der Fraktionen A-M (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von <i>H. annosum</i>	38
Abb. 8: Humane neutrophile Elastase: Einfluss der Fraktionen A-M (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von <i>H. annosum</i>	38
Abb. 9: <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase: Einfluss der Fraktionen E3.2-E3.8 (Säule 3) aus dem DCM-Extrakt von <i>H. annosum</i>	40
Abb. 10: <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase: Einfluss der Fraktionen B-N (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von <i>L. deterrimus</i>	41
Abb. 11: Humane neutrophile Elastase: Einfluss der Fraktionen B-N (Säule 1) aus dem DCM-Extrakt von <i>L. deterrimus</i>	41
Abb. 12: Massenspektren der Methylester von C18:1-Fettsäuren: x-C18:1, Elaidinsäure, Ölsäure.....	45
Abb. 13: Gaschromatogramme <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.: PE-Extrakt, DCM-Extrakt und DCM-H ₂ O-Extrakt	47
Abb. 14: Gaschromatogramme <i>Lactarius deterrimus</i> Grög.: PE-Extrakt, DCM-Extrakt und DCM-H ₂ O-Extrakt	48
Abb. 15: <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase: Dosis-Effekt-Kurven ausgewählter Fettsäuren	52
Abb. 16: Humane neutrophile Elastase: Dosis-Effekt-Kurven ausgewählter Fettsäuren.....	52
Abb. 17: <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren	53
Abb. 18: Humane neutrophile Elastase: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren.....	53

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Einfluss der Dichlormethan-Extrakte von Basidiomyceten auf die Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase	15
Tab. 2: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase	20
Tab. 3: Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase	21
Tab. 4: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	24
Tab. 5: Einfluss unterschiedlicher Enzymaktivitäten auf die Bestimmungsmethode der MMP-9....	25
Tab. 6: Einfluss der Aktivierungsdauer (APMA) auf die MMP-9-Aktivität	25
Tab. 7: Vergleich der Aktivierung der MMP-9 durch APMA und Trypsin.....	26
Tab. 8: Einfluss von DMSO auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9.....	26
Tab. 9: Vergleich der Inkubationsdauer von MTT im Zytotoxizitätstest.....	27
Tab. 10: Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Mengen MTT im Zytotoxizitätstest	28
Tab. 11: Einfluss von DMSO auf die Zellzahl (MTT-Test).....	29
Tab. 12: Einfluss der Basidiomyceten-Extrakte auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase	31
Tab. 13: Einfluss der Extrakte von <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref. und <i>Lactarius deterrimus</i> Grög. auf die Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase	36
Tab. 14: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Extrakte von <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref. durch GC-MS	46
Tab. 15: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Extrakte von <i>Lactarius deterrimus</i> Grög. durch GC-MS	46
Tab. 16: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Fraktionen von <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref. durch GC-MS	49
Tab. 17: Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes der Fraktionen von <i>Lactarius deterrimus</i> Grög. durch GC-MS	50
Tab. 18: Hemmung der Aktivität der <i>Clostridium histolyticum</i> Kollagenase und der humanen neutrophilen Elastase durch freie langkettige Fettsäuren.....	54
Tab. 19: Einfluss freier langkettiger Fettsäuren auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9..	55
Tab. 20: Einfluss der Extrakte auf Zellen der Linie ECV-304.....	56
Tab. 21: Einfluss der Fettsäuren auf Zellen der Linie ECV-304.....	58
Tab. 22: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Proteasesekretion.....	59
Tab. 23: Einfluss der Zellzahl auf die Proteasesekretion	60

Tab. 24: Vergleich der Proteaseaktivität verschiedener Zelllinien	60
Tab. 25: Einfluss von APMA auf die Proteaseaktivität	61
Tab. 26: Einfluss von 1.10-Phenanthrolin auf die Proteaseaktivität	62
Tab. 27: Einfluss von EDTA und γ -Linolensäure auf die Proteaseaktivität.....	63
Tab. 28: Naturstoffe, die die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase hemmen.....	78
Tab. 29: Hemmung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase durch ausgewählte Fettsäuren (aus: Tab. 18).....	80

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Rennert B, Melzig MF: Free fatty acids inhibit the activity of *Clostridium histolyticum* collagenase and human neutrophil elastase. *Planta Med* 2002; 68: 767-769

Rennert B, Melzig MF: Screening of selected basidiomycetes for inhibitory activity on *Clostridium histolyticum* collagenase and human leukocyte elastase. *Phytother Res* 2002; 16 (Suppl 1): S81-83

Vortrag:

Rennert B, Melzig MF: Einfluss von freien Fettsäuren auf die Aktivität von Bindegewebe-abbauenden Proteasen. DPhG-Jahrestagung 2002, Berlin, 9.-12.10.2002: V-B5

Posterpräsentationen:

Rennert B, Reznicek G, Melzig MF: Bioassay-guided fractionation of extracts of basidiomycetes for inhibitory activity on collagenase and elastase. 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Barcelona 2002 September 8-12: poster A015

Major H, Rennert B, Kreuter MH, Netsch M, Melzig MF: Effects of green tea extract and its polyphenols on various peptidases. 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Erlangen 2001 September 2-6: poster 3.40

Rennert B, Melzig MF: Free fatty acids inhibit the activity of collagenase and elastase. 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Zuerich 2000 September 3-7: poster P2A/79

Rennert B, Melzig MF: Screening of selected basidiomycetes for inhibitory activity on *Clostridium histolyticum* collagenase (EC 3.4.24.3) and human leukocyte elastase (EC 3.4.21.37). Joint Meeting 1999, Amsterdam 1999 July 26-30: poster 307

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig (Humboldt-Universität zu Berlin) für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Betreuung, Beratung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Betreuung bei den GC-MS-Untersuchungen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. G. Reznicek (Universität Wien) bedanken, an den ich mich mit vielen Fragen wenden konnte und der mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite stand.

Den Mitarbeitern am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für das freundliche Arbeitsklima. Für ihre Hilfsbereitschaft, sowohl im Rahmen der Forschungsarbeiten als auch bei der gemeinsamen Gestaltung der Praktika möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. H. Major, Frau Dr. H. Haber, Herrn Dr. Ph. Hebestreit und Frau I. Funke bedanken.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakognosie der Universität Wien möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis bedanken.

Frau Prof. Dr. U. Lindequist (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) möchte ich für die Bereitstellung des Pilzmaterials und ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Herrn Dr. N. Amelang und Herrn Prof. H. Kreisel (beide: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) danke ich für ihre Hilfe bei der Identifizierung der Pilze.

Bei meiner Familie möchte ich mich für das Sammeln des Pilzes *Lactarius deterrimus* und die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gegeben hat, bedanken.

Für die finanzielle Förderung von Teilen der Arbeit danke ich der Hans und Stefan Bernbeck Stiftung und der Universität Wien.

Abschließend danke ich Thomas, seine Hinweise und Kritiken und seine motivierende und liebevolle Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Berlin, im März 2005

Beate Rennert