

**In-vitro-Untersuchungen an Caco-2-Zellen zum Einfluss von
Naturstoffen und Drogenextrakten auf den Transport von Glucose,
Fructose und Palmitinsäure im Darm**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katharina Schreck

aus Erfurt

2022

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2017 bis April 2022 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Matthias F. Melzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel

Disputation am 20.06.2022

Lasst Nahrungsmittel unsere Heilmittel und Heilmittel unsere Nahrungsmittel sein [1].

-Hippokrates von Kos, 460 - 377 v. Chr. [2]-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Pathophysiologische Grundlagen und Entstehungsmechanismen des Diabetes mellitus.....	1
1.1.2 Klassifizierung und Epidemiologie des Diabetes mellitus.....	3
1.1.3 Risikofaktoren und Diagnose des Diabetes mellitus Typ 2	4
1.1.4 Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2	6
1.1.4.1 Traditionell verwendete Pflanzen	7
1.1.4.2 Die Verringerung der Aufnahme von Glucose, Fructose und langkettigen Fettsäuren in Darmzellen	14
1.2 Die antidiabetischen Wirkungen von Polyphenolen.....	16
1.3 Die Caco-2-Zelllinie	18
1.4 Zielstellung	20
2 Materialien und Methoden.....	21
2.1 Chemikalien und Lösungen	21
2.1.1 Allgemein.....	21
2.1.2 Zellkultur.....	22
2.1.3 Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion.....	22
2.1.4 Radiochemische Methoden	23
2.1.5 HPLC und LC-MS	23
2.2 Kits.....	23
2.3 Geräte.....	24
2.3.1 Allgemein.....	24
2.3.2 Extraktion.....	25
2.3.3 Zellkultur.....	25

2.3.4	Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion	26
2.3.5	Radiochemische Methoden.....	26
2.3.6	HPLC und LC-MS.....	26
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.4.1	Allgemein	27
2.4.2	Zellkultur	28
2.4.3	Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion	28
2.4.4	Radiochemische Methoden.....	29
2.5	Untersuchte, sekundäre Pflanzenstoffe und Pflanzenmaterial	29
2.5.1	Sekundäre Pflanzenstoffe und Metaboliten.....	29
2.5.2	Pflanzenmaterial	30
2.6	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials.....	33
2.6.1	Herstellung pflanzlicher Extrakte.....	33
2.6.2	Herstellung der Untersuchungslösungen aus pflanzlichen Extrakten.....	33
2.7	Zellbiologische und biochemische Methoden.....	34
2.7.1	Die Kultivierung der Caco-2-Zelllinie	34
2.7.2	Fixierung und Anfärbung zellulärer Strukturen	34
2.7.3	Expression von intestinalen Transportern in Caco-2-Zellen	35
2.7.3.1	Kultivierung der Caco-2-Zellen und Probenaufbereitung.....	35
2.7.3.2	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	36
2.7.3.3	Proteintransfer mit dem Semi-Dry-Western-Blot	39
2.7.4	Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay	40
2.7.5	Quantifizierung der DNA mit dem Hoechst-33258-Assay	41
2.7.6	Bestimmung des Proteingehalts mit dem BCA-Assay	41
2.8	Radioanalytische Methoden	42
2.8.1	Durchführung der Versuche mit ³ H-markierten Substraten	42
2.8.1.1	Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure über drei Wochen.....	43
2.8.1.2	Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure über drei Wochen mit und ohne Natriumbutyrat	43

2.8.1.3	Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure bei veränderter Temperatur	43
2.8.1.4	Die Hemmung der Aufnahme durch den FATP2-Inhibitor Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen	44
2.8.1.5	Versuche zur Kinetik der Glucose-Aufnahme	45
2.8.1.6	Die Aufnahme von Glucose und Fructose unter Einfluss von Extrakten, isolierten sekundären Pflanzenstoffen und Inhibitoren.....	45
2.9	Phytochemische Methoden	46
2.9.1	Analytische und präparative HPLC zur Fraktionierung des methanolischen Extrakts von <i>Brassica oleraceae var. capitata L. f. alba</i>	46
2.9.2	LC-MS-Methoden zur Untersuchung des methanolischen Extrakts von <i>Brassica oleraceae var. capitata L. f. alba</i>	47
2.9.2.1	Die Identifizierung von Inhaltsstoffen.....	48
2.9.2.2	Die Quantifizierung von Hexosen	50
2.10	Statistische Methoden und Verwendung von Software	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Morphologische Veränderungen bei Caco-2-Zellen durch Differenzierungsprozesse.....	53
3.2	Untersuchungen zur Expression intestinaler Glucose-, Fructose- und Palmitinsäure-Transporter im Caco-2-Modell	54
3.2.1	Inprozesskontrolle mit β -Actin	55
3.2.2	Expression der Monosaccharid-Transporter SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5.....	55
3.2.3	Expression der Fettsäure-Transporter FATP-2 und FATP-4	58
3.3	Charakterisierung der intestinalen Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure im Caco-2-Modell	60
3.3.1	Untersuchung zur Substrataufnahme über 15 bis 21 Tage.....	60
3.3.2	Untersuchung zur Substrataufnahme mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung über 15 bis 21 Tage.....	62
3.3.3	Untersuchung zur Substrataufnahme bei veränderter Temperatur.....	63

3.3.4	Bestimmung von methodisch bedingten Abweichungen im Umgang mit kultivierten Darmzellen.....	66
3.3.5	Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme des FATP2-Inhibitors Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen	66
3.3.6	Kinetische Untersuchungen der intestinalen Glucose-Transporter	67
3.4	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natriumbutyrat, DMSO und ausgewählten Extrakten auf Caco-2-Zellen.....	67
3.5	Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure durch pflanzliche Extrakte in Caco-2-Zellen.....	79
3.6	Charakterisierung des methanolischen Extraktes von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	88
3.6.1	Fraktionierung des methanolischen Extraktes von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	88
3.6.2	Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme der einzelnen Fraktionen des methanolischen Extraktes von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	89
3.6.3	Identifizierung von Inhaltsstoffen in den Fraktionen des methanolischen Extrakts von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> mithilfe von LC-QQQ-MS	90
3.6.4	Untersuchung von isolierten Naturstoffen zur Hemmung der Aufnahme von Glucose und Fructose in Caco-2-Zellen	92
3.6.5	Identifizierung aktiver Inhaltsstoffe in Fraktion 2 des methanolischen Extrakts von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	93
3.6.6	Quantifizierung von Hexosen im methanolischen Extrakt von <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	96
4	Diskussion.....	99
4.1	Untersuchungen zur Expression und Funktionalität von intestinalen Glucose-, Fructose- und Palmitinsäure-Transportern	99
4.1.1	Die Expression von SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 in Caco-2-Zellen mithilfe des Western-Blot-Verfahrens über drei Wochen.....	99
4.1.1.1	Multiple Banden.....	100
4.1.1.2	Die Intensität der Banden.....	101

4.1.1.3	Die Induktion der GLUT-2-Expression.....	102
4.1.1.4	Betrachtung ausgewählter Methoden zur Bestimmung der Proteinexpression.....	103
4.1.2	Untersuchungen zur Nährstoffaufnahme in die Zellen mithilfe ³ H-markierten Substraten über drei Wochen	103
4.1.3	Der Zusammenhang zwischen Expression von Transportern und ihrer Substrataufnahme über drei Wochen	105
4.1.4	Die Wirkungen von Natriumbutyrat auf Caco-2-Zellen	106
4.1.4.1	Die Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen.....	108
4.1.4.2	Aufnahmestudien mit bekannten Inhibitoren	109
4.1.4.3	Die kinetischen Untersuchungen	110
4.1.4.4	Die Wahl des Substrats für die Aufnahmestudien	112
4.2	Der Einfluss von Extrakten auf intestinale Transporter	113
4.2.1	Methanol als Lösungsmittel	113
4.2.2	Die Toxizität der verwendeten pflanzlichen Extrakte	113
4.2.3	Die Hemmung intestinaler Transporter durch pflanzliche Extrakte und Naturstoffe	114
5	Fazit	117
	Literaturverzeichnis	121
	Tabellenverzeichnis.....	135
	Abbildungsverzeichnis.....	137
	Publikationsverzeichnis.....	139
	Danksagung	141
	Eidesstattliche Erklärung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced glycosylation end products (Endprodukte der fortgeschrittenen Glykierung)
ALP	Alkalische Phosphatase
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve im Diagramm)
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BMI	Body Mass Index (Körpermasse-Index)
Caco-2-Zellen	Kolonrektale Adenokarzinom-Zelllinie
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
ENT1	Equilibrative nucleoside transporter 1 (äquilibrativer Nukleosid-Transporter Typ 1)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FATP-2/4	Fatty acid transport protein 2/4 (Fettsäure-Transporter 2/4)
FBS	Fetal Bovine Serum (fötales Rinderserum)
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLUT-1-5	Glucose-Transporter Typ 1-5
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEP-G2-Zellen	Menschliche Leberkrebs-Zelllinie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
MetOH	Methanol
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Abkürzungsverzeichnis

NaBu	Natriumbutyrat
PPAR γ	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor γ
QQQ	Triple-Quadrupole
Q-TOF	Quadrupole-Time-of-Flight
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SGLT-1/SGLT-2	Sodium-glucose linked transporter 1/2 (natriumabhängiger Glucose-Transporter)
SIM	Single ion monitoring
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline (trisgepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
TER	Transepithelial electrical resistance (transepithelialer elektrischer Widerstand)
TIC	Total ion current (Total-Ionenstrom)
tsFHI-Zellen	Temperature-sensitive fetal human intestinal cells (temperatursensitive, menschliche, fötale Darmzelllinie)
UV/VIS	Ultraviolettes/sichtbares Licht
V_{\max}	maximale Umsetzungs-/Transportgeschwindigkeit
2/4/A1-Zellen	Intestinale, immortalisierte Zelllinie von Ratten
^3H	Tritium

Schreibweise der weiblichen, männlichen und unbestimmten Form (Gendering):

Für die bessere und barrierefreie Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf die jeweilige Mehrfachnennung oder geschlechterspezifische Anpassung der Schreibweise verzichtet.

Schreibweise zusammengesetzter Substantive:

Einige zusammengesetzte Substantive wurden zum besseren Verständnis mit einem Bindestrich getrennt.

Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Stoffwechselerkrankung, die unbehandelt durch die verminderte Insulinwirkung im Körper und der einhergehenden, chronischen Hyperglykämie zu einer Vielzahl weiterer Erkrankungen und schwerer Komplikationen führen kann, unter denen die Lebensqualität der Patienten leidet. Weltweit hat sich im Jahr 2014 die Prävalenz der Stoffwechselstörung verglichen mit Anfang der 80-iger Jahre von 4,7% auf 8,5% der erwachsenen Bevölkerung verdoppelt. Die jährlichen, globalen Gesundheitsausgaben betragen schätzungsweise 827 Milliarden US\$. Bei der Entwicklung der Erkrankung sind Übergewicht und Adipositas entscheidende Risikofaktoren. Durch Veränderungen des Lebensstils, vor allem durch mehr körperliche Aktivität und eine gesunde Ernährung, kann dem Entstehen und dem Fortschreiten der Stoffwechselstörung durch den Patienten aktiv vorgebeugt werden, was vielen Menschen schwerfällt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Fokus auf die Modellierung der Energieaufnahme des Körpers durch Hemmung intestinaler Transporter von Monosacchariden und langkettigen Fettsäuren mithilfe von ausgewählten pflanzlichen Extrakten gelegt. Die *in-vitro*-Studien wurden in Caco-2-Zellen durchgeführt, die für die Experimente geeignet erschienen. Bei den Zellen handelt es sich um eine Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie, die spontan innerhalb von 15-21 Tagen nach Zellkonfluenz morphologische Merkmale von epithelialen Dünndarmzellen ausbildet, wie z. B. eine Bürstensaummembran mit Enzymen und Transportern.

Um optimale Bedingungen für Studien zur Aufnahmehemmung zu schaffen, ist das Caco-2-Modell genauer charakterisiert worden. Anhand von Ergebnissen aus dem Western-Blot wurde die Expression intestinaler Haupttransporter der untersuchten Substrate, insbesondere des Glucose-Transporters SGLT-1, des Glucose- und Fructose-Transporters GLUT-2, des Fructose-Transporters GLUT-5 sowie der Fettsäure-Transporter FATP-2 und FATP-4, über 15-21 Tage nachgewiesen. Die Funktionalität der Transporter wurde über die Substrataufnahme mit ³H-(Tritium-) markierter Glucose, Fructose und Palmitinsäure über 15-21 Tage gemessen. Durch die Beobachtungen von Expression und Funktionalität von Transportern in Caco-2-Zellen konnte ein qualitativer, jedoch kein quantitativer Zusammenhang festgestellt werden. Für die Charakterisierung des Modells wurden weitere Experimente zur Kinetik und passiven Diffusion durchgeführt.

Während die Untersuchungen mit bekannten Inhibitoren die Etablierung und Eignung des Zell-Assays für Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glucose und Fructose bestätigten, führte die Zugabe des FATP-2-Inhibitors Lipofermata, selbst unter verschiedenen, experimentellen Bedingungen, zu keiner Hemmung der

Palmitinsäure-Aufnahme. Auch beim späteren Screening ausgewählter, pflanzlicher Extrakte konnte kein Effekt gemessen werden. Möglicherweise besitzt der FATP-2 im Caco-2-Zellmodell nur eine untergeordnete Rolle bei der Fettsäure-Aufnahme oder Hemmungen werden durch passive Diffusionsvorgänge aufgrund des lipophilen Charakters des Substrats kompensiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Reduzierung der intestinalen Aufnahme von langkettigen Fettsäuren durch Transporter-Hemmung kritisch zu betrachten ist.

Für die Experimente zur Aufnahmehemmung intestinaler Glucose-Transporter wurden 38 Pflanzen ausgewählt, deren Zubereitungen traditionell bei Diabetes mellitus z. T. bis heute verabreicht werden und/oder die im Tierexperiment bzw. in Studien mit Menschen antidiabetische Effekte zeigten. Die methanolischen und wässrigen Extrakte der Pflanzen wurden im Caco-2-Zell-Assay getestet. Im Ergebnis des Screenings wurde eine signifikant verringerte Glucose-Aufnahme durch neun methanolische Extrakte aus den Früchten von *Aronia melanocarpa*, *Lycium chinense*, *Vaccinium myrtillus*, *Cornus officinalis* und *Crataegus pinnatifida*, aus den Blättern von *Peumus boldus*, *Juglans regia* und *Brassica oleraceae var. capitata f. alba*, sowie aus der Wurzel von *Adenophora triphylla* bestimmt. Die zwei methanolischen Extrakte aus den Blättern von *Peumus boldus* und *Juglans regia* hemmten neben der Aufnahme von Glucose zusätzlich die Aufnahme von Fructose in Caco-2-Zellen. Die zwei wässrigen Extrakte aus der Fruchtschale von *Malus domestica* 'Golden Delicious' und aus der Rinde von *Eucommia ulmoides* hemmten ebenfalls die Aufnahme von Glucose.

Der methanolische Extrakte aus den Blättern des Weißkohls (*Brassica oleraceae var. capitata* L. f. *alba*) wies mit einer Reduzierung der Glucose-Aufnahme um 82,8% die stärkste Hemmung auf. Nach der phytochemischen Untersuchung unter Verwendung von HPLC und LC-MS zeigte sich, dass im Extrakt Hexosen in hoher Konzentration enthalten waren, die vermutlich durch Verschiebung des Verhältnisses von radioaktiver zu nicht-radioaktiver Glucose eine Pseudohemmung bei ihrer Aufnahme erzeugen, was bei ähnlichen Experimenten in der Literatur bisher übersehen wurde. Trotz dieses Effekts kann ein Teil der Hemmung durchaus auf eine Interaktion weiterer Inhaltsstoffe des Weißkohls mit den intestinalen Transportern zurückgeführt werden. Bei vorausgegangenen Experimenten aus der Literatur und im Rahmen dieser Arbeit wurden isolierte sekundäre Pflanzenstoffe getestet, die zum Spektrum der Inhaltsstoffe in Kohlarten gehören. Dabei wurden Hemmungen der Glucose- und Fructose-Aufnahme festgestellt.

Abstract

Diabetes mellitus type 2 is a metabolic disorder, which, if left untreated, can lead to chronic hyperglycemia, comorbidities and severe complications caused by a reduced action of insulin. Commonly, patients suffer from an impaired life quality. Since 1980, the prevalence of the disease increased from 4.7% to 8.5% of the adult population in 2014. Based on cost estimates, the direct annual costs of Diabetes amounts to US\$ 827 billion to the world. Obesity and adipositas play a key role in the development of Diabetes mellitus type 2. People can prevent the occurrence and progress of the metabolic disorder actively by alterations in their lifestyle, specifically with more physical activity and a healthy diet, which is difficult to achieve for many people.

Therefore, the present work focused on the modulation of energy intake due to an inhibition of intestinal transporters of monosaccharides and long-chain fatty acids by selected plant extracts. The *in vitro* studies were performed in Caco-2 cells, which appeared as suitable for the experiments. These cells were derived from a colon adenocarcinoma and differentiate spontaneously within 15-21 days after confluence into epithelial enterocytes with their typical morphological characteristics, such as a brush border membrane with enzymes and transporters.

In order to choose optimal settings to study uptake inhibition, the Caco-2 model was characterized more precisely. The expression of the intestinal main transporters of the investigated substrates, specifically the glucose transporter SGLT-1, the glucose and fructose transporter GLUT-2, the fructose transporter GLUT-5 and the fatty acid transporters FATP-2 and FATP-4 was determined by Western blot over 15-21 days after confluence. The functionality of the transporters was proven by measuring the uptake of ³H-(tritium) labeled glucose, fructose and palmitic acid over 15-21 days as well. According to the results, the expression and functionality of transport proteins show a qualitative, but not a quantitative relation. Other studies were performed calculating kinetics and passive diffusion for further characterization of the intestinal barrier model.

Whereas the experiments with prominent inhibitors confirmed the establishment and suitability of the cell assay to perform uptake studies with radiolabeled glucose and fructose, the FATP-2 inhibitor lipofermata did not decrease the uptake of palmitic acid in Caco-2 cells using different settings. Furthermore, the plant extracts, which were screened, did not show any inhibitory effects on uptake of palmitic acid. Possibly, the FATP-2 plays a subordinated role in the Caco-2 cell model regarding the long-chain fatty acid uptake or inhibitions of the uptake of palmitic acid were compensated by passive diffusion due to the lipophilic character of the substrate. The results imply a critical assessment of the uptake inhibition of long-chain fatty acids by transporters as a therapy option.

For uptake studies, 38 plants, whose preparations has been traditionally used to treat Diabetes mellitus type 2 and/or showed anti-diabetic effects in animal or human studies, were chosen to investigate uptake inhibition of intestinal transporters. The methanolic and aqueous extracts of the plants were tested in the Caco-2 cell assay.

The nine methanolic extracts made from the fruits of *Aronia melanocarpa*, *Lycium chinense*, *Vaccinium myrtillus*, *Cornus officinalis*, *Crataegus pinnatifida*, from the leaves of *Peumus boldus*, *Juglans regia* and *Brassica oleraceae var. capitata f. alba* as well as the extract made from the roots of *Adenophora triphylla* decreased the glucose uptake significantly according to the results of the screening. Furthermore, the two methanolic extracts made from the leaves of *Peumus boldus* and *Juglans regia* reduced fructose uptake in Caco-2 cells as well. The two aqueous extracts made from the fruit peel of *Malus domestica* ‘Golden Delicious’ and from the bark of *Eucommia ulmoides* decreased the glucose uptake.

The methanolic extract of white cabbage (*Brassica oleraceae var. capitata* L. f. *alba*) showed reduced glucose uptake by 82.8%, which was the highest inhibition compared to other extracts. After phytochemical analysis by using HPLC and LC-MS, hexoses were determined in a sufficient amount to interfere with the measurement. Regarding the uptake studies, the shift of the relation between radioactive and non-radioactive glucose can generate a pseudo inhibition, which was overlooked in similar experiments in literature as yet. Despite this effect, a part of the inhibition can be caused by the constituents as some of the isolated, secondary plant metabolites contained in cabbage species, showed inhibitory activity on glucose and fructose uptake when tested in cell assays according to results in literature as well as in the present work.

1 Einleitung

Die an den Anfang gestellte, überlieferte Erkenntnis von Hippokrates, einem Arzt und Lehrer der griechischen Antike [2], unterstreicht, dass die Bedeutung der Lebensmittel auf die menschliche Gesundheit seit Jahrtausenden bekannt ist. Unsere tägliche Nahrungsaufnahme dient nicht nur banal der Energiezufuhr, sondern Art und Menge der konsumierten Lebensmittel wirken sich maßgeblich auf den Gesundheitszustand und somit auf die Lebensqualität aus. Neben genetischen Faktoren, besitzt der individuelle Lebensstil einen großen Einfluss insbesondere auf die Entwicklung und das Fortschreiten von Stoffwechselerkrankungen. Beispielsweise kann allein durch Umstellung der Ernährung und damit einhergehender Gewichtsreduktion das Fortschreiten eines metabolischen Syndroms bzw. die Manifestierung z. B. des Diabetes mellitus Typ 2 verhindert oder die gesundheitliche Situation verbessert werden [3].

1.1 Diabetes mellitus

Das Wort Diabetes ist von dem griechischen Wort „diabainein“ abgeleitet und bedeutet übersetzt „durchfließen“ [4]. Dieser Name weist auf die Polyurie als eines der Symptome der Erkrankung hin. Das zugehörige lateinische Adjektiv „mellitus“ wurde erst 1675 hinzugefügt, um den Geschmack des „honigsüßen“ Urins bzw. des Blutes der Erkrankten zu beschreiben. Erst 1815 konnte die Süße der Körperflüssigkeiten chemisch auf Glucose zurückgeführt werden [4,5].

1.1.1 Pathophysiologische Grundlagen und Entstehungsmechanismen des Diabetes mellitus

Das Krankheitsbild der Stoffwechselerkrankung basiert auf einer verminderten Wirkung des Polypeptidhormons Insulin, welches für die Aufnahme des Energielieferanten Glucose aus dem Blut in die Zellen verantwortlich ist und in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse produziert wird. Wenn die β -Zellen kein Insulin mehr produzieren, wird vom absoluten Insulinmangel gesprochen. Beim relativen Insulinmangel ist eine ausreichende Insulinsekretion vorhanden, jedoch kann das Hormon durch eine gestörte Insulin-Rezeptor-Signal-Kaskade an den Zellen nicht im ausreichenden Maß seine Wirkung entfalten. Der Körper versucht die daraus resultierende Insulinresistenz durch eine Hochregulierung der Insulinsekretion zu kompensieren, wobei sich langfristig aus der Hyperinsulinemie u. a. durch das Absterben von β -Zellen eine Hypoinsulinemie entwickelt [6-11].

Der Lebensstil, insbesondere körperliche Aktivität und Ernährung zeigen großen Einfluss auf die Entstehung der Insulinresistenz. Mit der Nahrung aufgenommene Fettsäuren sind u. a. wichtige Energielieferanten für den Körper, Hauptbestandteile von Zellmembranen und besitzen regulierende Wirkungen durch Beeinflussung der Genexpression [12]. Bei einem Überangebot werden die Lipide nicht nur in Fettzellen, sondern auch in dafür nicht vorgesehene Körperzellen von beispielsweise Muskeln, Leber und Pankreas eingelagert. Dieser Prozess führt zur Auslösung von zellulärem Stress, Dysfunktion und Apoptose und wird auch als „Lipotoxizität“ bezeichnet [13]. Bei viszeraler Fettleibigkeit werden zusätzlich zur exogenen Lipidaufnahme aus den Adipozyten vermehrt freie, langkettige, gesättigte Fettsäuren in die Peripherie des Körpers freigesetzt. Die regelmäßig auftretende Lipotoxizität kann durch Veränderungen der Insulin-Rezeptor-Signalwege z. B. an den Muskelzellen zu Insulinresistenz führen [14]. Außerdem kann bei übergewichtigen Patienten durch die verstärkte Aufnahme von nicht-veresterten Fettsäuren in Gewebe, wie z. B. Muskelzellen, ein Wechsel des Hauptenergielieferanten Glucose zu Fettsäure stattfinden, wodurch die Sensitivität der Zellen auf Insulin ebenfalls abnimmt [11].

Gesättigte, langkettige Fettsäuren, zu denen Palmitinsäure gehört, und Omega-6-Fettsäuren wie z. B. Arachidonsäure, sind in der Lage, in die Genregulierung einzugreifen, sodass eine verstärkte Transkription inflammatorischer Proteine stattfindet. Omega-3-Fettsäuren, wie z. B. die Eicosapentaen- und Docosahexaensäure agieren dabei als Gegenspieler [12,15]. Die durch freie Fettsäuren hervorgerufenen, chronischen Entzündungsprozesse begünstigen die Entstehung vieler Krankheiten wie z. B. des Diabetes mellitus Typ 2 [12,15]. In Studien konnten bereits erhöhte Entzündungsmarker bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden [16,17].

Fructose wird nach intestinaler Absorption zum Großteil in der Leber gespeichert und u. a. als Baumaterial für endogene Fettsäuren verwendet, wodurch die Menge gesättigter Fettsäuren im Körper ebenfalls erhöht wird [18]. Studien zeigten, dass ein Übermaß an Monosacchariden, vor allem Fructose, im menschlichen Körper die Entstehung von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz fördert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt werden konnten [19,20].

Durch die verminderte Insulinwirkung im Körper leiden die Betroffenen, vor allem nach Aufnahme von zuckerhaltigen Getränken und Nahrungsmitteln, unter Hyperglykämien. Reduzierende Zucker, wie z. B. Glucose, können in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit den Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reversibel zu einer Schiff'schen Base und zu Amadori-Produkten reagieren. Anschließend findet die irreversible Umwandlung zu Endprodukten der fortgeschrittenen Glykierung (AGE) statt, wodurch körpereigene Strukturen ihre Funktion verlieren [3,21]. Die chronische Hyperglykämie der Patienten führt unbehandelt zu einer Vielzahl weiterer Erkrankungen und schweren

Komplikationen, die u. a. die Augen, Nieren, Nerven, Blutgefäße und das Herz schädigen, bis hin zum Tod [8,22,23]. Bei einem höheren Angebot an Glucose und Fructose durch die Nahrung werden die für die Absorption verantwortlichen Darmtransporter, insbesondere GLUT-2, an der luminalen Membran hoch reguliert, sodass diese energiereichen Substrate effektiver aufgenommen werden können und das Fortschreiten der Krankheiten wiederum begünstigt wird [24,25].

1.1.2 Klassifizierung und Epidemiologie des Diabetes mellitus

Die Krankheit lässt sich, angelehnt an die Kategorisierung der *American Diabetes Association*, in vier Hauptklassen unterteilen. Diabetes mellitus Typ 1 tritt vorwiegend im Kindesalter, aber auch im jungen Erwachsenenalter auf und basiert auf einer Autoimmunerkrankung, bei der die β -Zellen des Pankreas zerstört werden und anschließend häufig ein absoluter Insulinmangel resultiert. Bei der idiopathischen Form des Diabetes mellitus Typ 1 können keine Autoimmunantikörper gegen die β -Zellen nachgewiesen werden und dennoch liegt ein episodisch-schwankender Insulinmangel vor. Als Ursachen werden in beiden Ausprägungen der Erkrankung genetische Disposition und äußere Umwelteinflüsse angesehen, die noch nicht genauer bestimmt werden konnten. Die zweite Hauptklasse bildet der erworbene Diabetes mellitus Typ 2, welcher vorwiegend bei Erwachsenen, aber auch bereits im Kindesalter vorkommt. Die verminderte Insulinwirkung wird durch einen relativen Insulinmangel hervorgerufen, der auf einer sinkenden Insulinsensitivität der Zellen beruht. Diese Form basiert neben der genetischen Disposition auf einer nachteiligen Lebensführung und tritt oft in Kombination mit Übergewicht und mangelnder Bewegung auf. Bei der dritten Hauptklasse handelt es sich um sonstige Formen des Diabetes mellitus, die durch bestimmte Ursachen wie z. B. genetische Defekte, Endokrinopathien, Medikamente oder Infektionen ausgelöst werden und auf verschiedene Weise die Insulinwirkung bzw. -produktion herabsetzen. Die vierte Hauptklasse umfasst den Gestationsdiabetes, wobei das Auftreten des Diabetes nach der Schwangerschaft wieder verschwinden kann [8].

Im Jahr 2014 waren 422 Mio. Menschen weltweit an Diabetes erkrankt. Die Prävalenz der Stoffwechselstörung hat sich verglichen mit Anfang der 80-iger Jahre von 4,7% auf 8,5% der erwachsenen Bevölkerung fast verdoppelt, wobei es in den letzten Jahren einen stärkeren Anstieg in den einkommensschwächeren Ländern gab [23,26]. Etwa 90-95% der Diabetes-Patienten leiden an Diabetes mellitus Typ 2 [8]. In Deutschland leben ca. 6 Mio. Betroffene, wobei Schätzungen zufolge weitere 2 bis 5 Mio. Menschen bereits an einem bisher nicht diagnostizierten Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind. In den letzten Jahren konnte eine steigende Inzidenz der an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Kinder und

Jugendlichen in Deutschland festgestellt werden. Die Neuerkrankungen an Diabetes mellitus Typ 2 im Alter von 12 bis 19 Jahren haben sich in den letzten 10 Jahren verfünffacht [27]. Mit steigender Tendenz ist zu rechnen.

Nicht nur Gesundheitssysteme und Gesellschaft sind mit geschätzten 827 Milliarden US\$ weltweiten, jährlichen Kosten vor eine neue Herausforderung gestellt, sondern auch die betroffenen Menschen, deren Arbeitsfähigkeit und Lebensqualität durch die Erkrankung stark eingeschränkt wird [26,28].

1.1.3 Risikofaktoren und Diagnose des Diabetes mellitus Typ 2

Gemäß der nationalen Versorgungsleitlinie der Bundesärztekammer spielen neben der genetischen Disposition, dem Lebensalter, den Glucosestoffwechsel beeinflussenden Medikamenten, Gestationsdiabetes und endokrinen Erkrankungen besonders der Lebensstil und das metabolische Syndrom als manifestationsfördernde Faktoren für Diabetes mellitus Typ 2 eine große Rolle [29]. Einige der aufgezählten Risikofaktoren können nicht direkt beeinflusst werden. Jedoch kann prophylaktisch oder im Rahmen der Basistherapie der Lebensstil verändert und mit ausreichender Bewegung, dem Verzicht auf Nikotin und Alkohol und einer ausgewogenen Ernährung die Entwicklung und das Fortschreiten des metabolischen Syndroms sowie des Diabetes mellitus Typ 2 vermindert werden [23,29].

Das metabolische Syndrom, auch als „Tödliches Quartett“ bezeichnet, ist eine Kombination aus gestörtem Fett- und Kohlehydratstoffwechsel, Hypertonie und Adipositas und entwickelt sich mit steigender Fettleibigkeit [30]. Eine Verringerung des Gewichts, vor allem durch Minderung des viszeralen Fetts, führt nicht nur zu einer Normalisierung des Blutdrucks [31], des Fettstoffwechsels [32] und der Glucose-Toleranz, sondern senkt auch das Risiko entscheidend, Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen auszubilden [30,33].

Das metabolische Syndrom wird bei Vorliegen einer viszeralen Adipositas (siehe 1.1.3.1) diagnostiziert, wenn mindestens zwei der folgenden Merkmale existieren [29]:

- erhöhte Triglyceridwerte (mindestens 1,7 mmol/L) bzw. bei bereits eingeleiteter Therapie
- erniedrigtes HDL-Cholesterin (Männer < 1,03 mmol/L, Frauen < 1,29 mmol/L) bzw. bei bereits eingeleiteter Therapie
- Bluthochdruck (systolisch < 130 mmHg oder diastolisch > 85 mmHg) bzw. bei bereits eingeleiteter Therapie
- erhöhte Nüchternplasmagluconespiegel (> 5,6 mmol/L) bzw. bei bereits diagnostizierten Diabetes mellitus Typ 2.

Die Diagnose des Diabetes mellitus Typ 2 wird mithilfe der Nüchtern-glucose (IGF) und/oder der Glucose-Toleranz (IGT) bestimmt. Eine gestörte Nüchtern-glucose besteht, sobald die

gemessene Plasmakonzentration zwischen $\geq 5,6$ mmol/L und $< 7,0$ mmol/L liegt. Der orale Glucose-Toleranz-Test (oGTT) wird ebenfalls nüchtern durchgeführt. Wenn die Plasmakonzentration der Glucose 2 h nach oraler Aufnahme von 75 g Glucose zwischen $\geq 7,8$ mmol/L und $< 11,1$ mmol/L gemessen wird, leidet der Patient an einer gestörten Glucose-Toleranz. Nach Überschreiten der jeweiligen, oberen Grenzwerte besteht ein Diabetes mellitus Typ 2, wobei die Messungen wiederholt durchgeführt werden [29].

Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 spielt auch Übergewicht, das häufig auf eine ungesunde Lebensweise zurückzuführen ist, eine entscheidende Rolle. Übergewicht und Fettleibigkeit basieren auf einer übermäßigen Fettansammlung am Körper, die eine Beeinträchtigung der Gesundheit nach sich ziehen kann [34]. In Deutschland sind ca. 67% der Männer und 53% der Frauen übergewichtig und ein Viertel der Erwachsenen adipös [35]. Im Jahr 2016 waren weltweit mehr als 1,9 Mrd. erwachsene Menschen übergewichtig, was etwa $\frac{1}{4}$ der Weltbevölkerung ausmacht, und 650 Mio. davon fettleibig [34,36]. Zur medizinischen Einschätzung der Körpermasse wird u. a. der Body Mass Index (BMI) verwendet, der mit folgender Formel berechnet wird:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{(\text{Körperhöhe [m]})^2}$$

Bei einem BMI-Wert $\geq 25 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ liegt Übergewicht und bei $\geq 30 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ Adipositas vor [34]. Um das Risiko auf metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen und Komplikationen abzuschätzen zu können, spielt zusätzlich das Fettverteilungsmuster, insbesondere die Menge der Fetteinlagerungen im Bauchbereich, eine große Rolle. Gemäß der International Diabetes Federation (IDF) liegt mit einem Taillenumfang ≥ 80 cm für Frauen und ≥ 94 cm für Männer eine viszerale Adipositas vor und das Risiko an Stoffwechselstörungen wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken ist erhöht [29,37]. In vielen Studien konnte durch Gewichtsreduktion, eine signifikante Abnahme der Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 erzielt werden [38]. Zum Beispiel wurde in der Interventionsgruppe einer japanischen Studie mit Patienten, die eine gestörte Glucose-Toleranz (IGT) entwickelt hatten, durch sportliche und diätetische Maßnahmen eine Gewichtsreduktion von durchschnittlich 2,2 kg und eine Risikoreduzierung um 67% an Diabetes zu erkranken gegenüber der Vergleichsgruppe mit Standardbehandlung über 4 Jahre in Nachuntersuchungen gezeigt [39]. Die Basistherapie des Übergewichts und der Adipositas umfasst die Umstellung des persönlichen Lebensstils. Durch verstärkte körperliche Aktivität, Ernährungsprogramme und eine Verhaltenstherapie soll eine dauerhafte Gewichtsreduktion erreicht werden. Bei einer medikamentösen Behandlung, die bei einem BMI $\geq 28 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ durchgeführt werden kann, wird mittlerweile nur noch Orlistat eingesetzt [40]. Dabei handelt es sich um einen Hemmstoff der gastrointestinalen Lipasen, die für die Spaltung von Triglyceriden in resorbierbare Monoglyceride und Fettsäuren verantwortlich sind [41].

1.1.4 Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2

Die lebensstilmodifizierenden, nicht-medikamentösen Maßnahmen stellen die Basistherapie für Risikogruppen und Patienten dar, um eine Verbesserung des gesundheitlichen Zustands zu erreichen und die Manifestierung eines Diabetes mellitus Typ 2 zu verhindern. Durch Stressbewältigungsstrategien, Rauchentwöhnung, Bewegungs- und Ernährungsprogramme werden individuelle Therapieziele entwickelt und deren Umsetzung begleitet und unterstützt, die den HbA_{1c}-Wert, Blutdruck, Lipide und eine Gewichtsreduktion umfassen [29]. Bereits existierende und bewährte, individuell adaptierbare Ernährungsvorschläge sollen den Patienten helfen, sich ausgewogen zu ernähren und eine ständige Energieüberladung des Körpers zu vermeiden. Dazu gehören Diäten mit hohem Kohlenhydrat- und wenig Fettanteil, mit wenig Kohlenhydrat- und hohem Proteingehalt oder die mediterrane Diät mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und Gemüse [42].

Je nach Grad des Insulinmangels kann die Therapie mithilfe von oralen Therapeutika und/oder Insulin ergänzt werden. Die Medikation des Patienten wird individuell und gemäß der nationalen Versorgungsleitlinien der Bundesärztekammer eingestellt [29]. Nachfolgend wird kurz auf die Wirkmechanismen der einzelnen Wirkstoffgruppen der medikamentösen, oralen Antidiabetika eingegangen.

Das Enzym α -Glucosidase ist im Bürstensaum des Dünndarms lokalisiert und spaltet enzymatisch Oligo- und Disaccharide zu Glucose. Die α -Glucosidase-Inhibitoren Acarbose und Miglitol unterbinden die Zerkleinerung der Zucker und verzögern somit die Kohlehydratverdauung.

Bei Metformin handelt es sich um ein Biguanid, das die Blutglucosekonzentration u. a. durch die Hemmung der Glykogenolyse und Gluconeogenese in der Leber und durch eine verbesserte Glucose-Verwertung in der Peripherie senkt. Als Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 verringert es mikro- und makrovaskuläre Spätfolgen des Diabetes mellitus Typ 2.

Die insulinotropen oralen Antidiabetika, zu denen Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid und Glinide wie Nateglinid gehören, blockieren die Kaliumkanäle von β -Zellen. Nach der Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle erhöht sich die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Exozytose von Insulin wird eingeleitet.

Pioglitazon als Vertreter der Glitazone stimuliert den intrazellulär lokalisierten PPAR γ , der durch Interaktion mit der DNA zur Bildung von Proteinen führt, die u. a. an einer vermehrten Glucose- und Fettsäure-Aufnahme in die Zellen beteiligt sind und die Gluconeogenese verringern.

Das Inkretin Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) ist ein nur kurzzeitig wirksames Darmhormon, das glucoseabhängig die Insulinsekretion stimuliert, die

Glucagonkonzentration senkt, den Appetit reduziert und den Energieumsatz des Körpers erhöht. Die Inkretin-Mimetika wie Exenatid und die Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren (DPP4-Inhibitoren oder Gliptine), die den Abbau des GLP-1 hemmen und zu denen u. a. Linagliptin und Sitagliptin gehören, zählen zur übergeordneten Gruppe der Inkretinwirkung-imitierenden Antidiabetika [41].

Die letzte Gruppe der oralen Antidiabetika bilden die Inhibitoren des SGLT-2, die auch als Gliflozine bezeichnet werden. Das Dapagliflozin ist ein bekannter Vertreter und verringert die Glucose-Rückresorption aus dem Harn durch Hemmung des renalen natriumabhängigen Glucose-Transporters SGLT-2 im proximalen Tubulus der Niere [43].

Anhand der Wirkmechanismen der vorgestellten Medikamente zeigt sich, dass über viele verschiedene Angriffspunkte antidiabetische Wirkungen erzielt werden können. Einige Wirkstoffe haben ihren Ursprung in der Natur, wie z. B. das Inkretin-Mimetikum Exenatid, das im Speichel der nordamerikanischen Krustenechse *Heloderma suspectum* COPE vorkommt [41]. Vermutlich gibt es noch eine Vielzahl unerforschter Targets, um Diabetes mellitus Typ 2 perspektivisch erfolgreich zu therapieren.

1.1.4.1 Traditionell verwendete Pflanzen

Das therapeutische Potential von pflanzlichem Material, dessen Zubereitungen traditionell zur Besserung von Symptomen und zur Heilung von Krankheiten eingesetzt wurde, ist in den letzten Jahrzehnten häufig im Rahmen der Wirkstoffentwicklung genauer erforscht worden [44,45]. Beispielsweise haben Aspirin, Atropin, Ephedrin, Digoxin und Morphin ihre Identifizierung und den Einsatz in der modernen Medizin der weiteren Erforschung von Erfahrungen aus der Volksmedizin zu verdanken [45,46].

Hieraus ergeben sich der Anlass und die Aufgabenstellung für die nachfolgenden wissenschaftlichen Untersuchungen von bisher traditionell genutzten Pflanzen mit gesundheitlich wirksamen Inhaltsstoffen, um neue Therapieansätze gegen Diabetes mellitus Typ 2 zu finden.

Als Grundlage für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten, 38 polyphenolreichen Pflanzen auf der Basis einer Literaturrecherche mit Google Scholar und PubMed ausgewählt, die traditionell bei Diabetes mellitus in den aufgeführten Ländern z. T. bis heute eingesetzt werden und in Studien mit Menschen oder Tieren hypoglykämische Eigenschaften gezeigt haben. Zur Aufklärung des Wirkmechanismus wurden sie auf ihre Hemmung von intestinalen Transportern im Caco-2-Modell umfangreich getestet.

Tabelle 1. Ausgewählte Pflanzen, die als antidiabetische Arzneimittel traditionell u. a. in den aufgeführten Ländern bis heute angewendet werden und ihre antidiabetischen Effekte, die in Studien gemessen wurden, sowie die diskutierten, aktiven Inhaltsstoffe [45].

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	n. g.	Abnahme der BGK, Hemmung der intestinalen Glucose-Absorption bei Ratten und Mäusen	n. b.	[47]
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Jordanien [48], Marokko [49], Indien [50], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der Glucose- und Triglycerid-Konzentration im Serum, Steigerung der Seruminsulin-Konzentration bei diabetischen Ratten	Verbindungen vom Allicin-Typ	[52]
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	n. g.	Abnahme der Glucose- und Fett-Konzentration im Serum, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase	Anthocyane	[53]
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der BGK und Blutinsulin-Konzentrationen bei diabetischen Mäusen	Flavonoide (Luteolin, Apigenin), Cumarine (Scopoletin), Sesquiterpenoidlactone (Costunolid), Zimtsäureester	[54]
<i>Brassica oleraceae</i> <i>var. capitata</i> L.f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Kongo [55], Marokko [49], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der BGK bei diabetischen Ratten, Abnahme der Blutfett-Konzentration und Wiederherstellung der renalen Funktion bei Ratten	n. b.	[56-58]
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Teepflanze)	Marokko [49]	Abnahme von BGK bei Ratten/Mäusen, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase, α -Amylase und der Lipase	Catechine, Flavanole, Polysaccharide	[59-61]

Einleitung

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Jordanien [48], Marokko [49]	Abnahme der BGK bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase and α -Amylase, Hemmung des intestinalen Glucose-Transports	Polyphenolische Verbindungen	[62]
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Kongo [55], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der BGK bei Ratten	n. b.	[63]
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	n. g.	Abnahme der BGK bei Ratten, reduzierte Glucose-Absorption, Stimulation der Insulinsekretion	Koffein, polyphenolische Verbindungen: Chlorogensäure, Quinolactone	[64]
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	China [65,66]	Abnahme der BGK bei Mäusen, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase, verstärkte Glucose-Aufnahme in HEP-G2	Morrnonside, Loganin, Ursolsäure	[67]
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	n. g.	Abnahme der BGK bei Ratten, Modulation der Insulinregulierung, antiadipotisch, antihyperlipidämisch, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase bei Ratten	Flavonoide, Hyperosid, Chlorogensäure	[68]
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Jordanien [48], Marokko [49]	Abnahme der BGK, von oxidativem Stress und der Bildung von AGEs bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase	Cuminaldehyd, Flavonoide	[69]
<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Marokko [49,70]	Abnahme der BGK und der Fett-Konzentration im Serum bei Menschen und Ratten	Flavonoide	[71,72]
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	China, Japan, Korea [73]	Abnahme der BGK und Erhöhung des Insulins im Plasma bei Ratten, Abnahme der Blutfett-Konzentration bei Mäusen, reduzierte Glykierung	Flavonoide	[74-76]

Einleitung

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Marokko [49]	Abnahme der BGK, der Hyperinsulinämie, der Lipide im Serum und der Bildung von AGEs bei Ratten	Polyphenolische Verbindungen	[77]
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Südamerika [78]	Abnahme der Lipide im Serum und der BGK bei Mäusen, Regulierung des Essverhaltens	Polyphenolische Verbindungen, Ethylxanthine, Saponine	[79]
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Jordanien [48], Marokko [49]	Abnahme der Nüchtern-BGK, des HbA _{1c} -Wertes und der Nüchtern-Blutfette-Konzentration beim Menschen	Phenolische Säuren und Flavonoide: 3- and 5-Kaffeoylchinasäure, Quercetin-3-galactosid, Quercetin-3-arabinosid	[80]
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	China [66]	Abnahme der BGK und Abschwächung der Dyslipidämie bei Ratten	Polyphenolische Verbindungen	[81]
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. (Kulturapfel)	Marokko [49]	Abnahme der postprandialen BGK bei Menschen und Mäusen, Abnahme der Glucose-Absorption im Dünndarm der Maus, Hemmung des menschlichen SGLT-1 in <i>Xenopus laevis</i> DAUDIN Oozyten, reduzierte Aktivität der Lipase, Abnahme der Triglycerid-Konzentration im Plasma bei Menschen und Mäusen	Polyphenolische Verbindungen: Quercetin, Phlorizin, Proanthocyanidine	[82,83]
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Iran, Türkei [84]	Abnahme der Glucose-Konzentration im Plasma bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase and α -Amylase, Abnahme des HbA _{1c} -Werts, der Triglycerid-Konzentration im Serum und der Nüchtern-BGK beim Menschen	Polyphenolische Verbindungen (Flavonoide), Ätherische Öle	[85,86]

Einleitung

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	n. g.	Abnahme der Nüchtern-BGK und Blutfett-Konzentration, nephroprotektiv, Abnahme des HbA _{1c} -Wertes und Erhöhung der Insulin-Konzentrationen bei Ratten	Polyphenolische Verbindungen (Flavonoide, Tannine), Saponine, Ätherische Öle	[87]
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Asien, Südamerika, Ostafrika [50], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der BGK, des HbA _{1c} -Wertes und Erhöhung der Insulin-Konzentration im Plasma in Tierversuchen, Hemmung intestinaler Transporter	Charantin, Polypeptid-P, Momordin Ic, Oleanolsäure-3-O-monodesmoside, Oleanolsäure-3-O-glucuronide	[88]
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Jordanien [48], Marokko [49]	Abnahme der Nüchtern-BGK, reduzierte Insulinresistenz und verbesserte β -Zellfunktion	n. b.	[89]
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Jordanien [48], Marokko [49], Portugal [90]	Abnahme der Glucose-, Triglycerid- und Cholesterolkonzentration im Serum, Erhöhung der Insulin-Konzentration im Serum	Oleuropeosid	[91]
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Marokko [49]	Abnahme der BGK, Blutfett-Konzentrationen und des HbA _{1c} -Werts bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Amylase	n. b.	[92]
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Asien [93]	Abnahme des 75g-OGTT-Glucosewertes im Plasma, der Nüchtern-Insulin-Konzentration und des 75g-OGTT-Insulinwertes im Plasma bei Menschen	Ginsenoside: PPT, (20R)-PPD, Rg1, Rc, Rd, Re, Rf, Rg2, Rh1, Rb1, and Rb2; Peptidoglycan: Panaxan B	[94]
<i>Peumus boldus</i> MOLINA (Boldo)	n. g.	Abnahme der Glucose-Konzentration im Plasma, Hemmung der α -Amylase und der Lipase	Boldin	[95,96]
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	n. g.	Hemmung der α -Amylase und der Lipase	n. b.	[96]

Einleitung

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	China [66]	Abnahme der Nüchtern-BGK, verbesserte Glucose-Toleranz und Insulinsensitivität bei Mäusen	Isoflavone: Puerarin	[97]
<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Marokko [49,70]	Abnahme der Nüchtern-BGK und Lipide im Serum bei Ratten	Phenolische Verbindungen	[98]
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Korea [99]	Abnahme der BGK, der Insulin- und Fett-Konzentration im Serum, verbesserte Insulinsensitivität bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase	Polyphenolische Verbindungen	[100]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Marokko [49,70]	Abnahme der BGK und Erhöhung der Insulin-Konzentration im Serum bei Kaninchen, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase	Ätherische Öle	[101]
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Marokko [49,70], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der 2-h-postprandialen BGK und der Cholesterolkonzentration bei Menschen, Abnahme von Glucose- und Fett-Konzentration im Serum bei Ratten	Flavonoide (Rosmarinsäure, Phenolsäuren, Carnosolsäure Verbindungen)	[102,103]
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) SPACH (Dornige Bibernelle)	Jordanien [48], Israel [104]	Verbesserte Glucose-Toleranz bei Mäusen, Insulin-like Effekte, verbessert Insulinsekretion <i>in vitro</i> , reduzierte Aktivität der α -Glucosidase und α -Amylase	Polyphenolische Verbindungen: Catechin, Epicatechin	[105,106]
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. &L.M.PERRY (Gewürznelkenbaum)	Marokko [49]	Abnahme der postprandialen BGK bei Ratten, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase und α -Amylase, Herabregulierung intestinaler Transporter	Triterpene (Oleanolsäure, Maslinsäure)	[107]

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Länder mit traditioneller Anwendung der Pflanzen bei Diabetes mellitus (Quellenangabe)	Ausgewählte, antidiabetische Effekte, die in Studien gemessen wurden	Diskutierte aktive Inhaltsstoffe	Quellenangabe anti-diabetischer Effekte und aktiver Inhaltsstoffe
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Marokko [49], Vereinigtes Königreich [51]	Abnahme der BGK und Blutfett-Konzentration im Serum bei Ratten	Flavonoide	[108]
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Europa [109]	Abnahme der BGK und Blutfett-Konzentration in Ratten	Polyphenolische Verbindungen	[110]
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Marokko [49]	Verringerung der postprandialen BGK bei Mäusen, reduzierte Aktivität der α -Glucosidase	Polyphenolische Verbindungen: Flavonoide, Anthocyane	[111]

BGK = Blutglucose-Konzentration; n. g. = in englisch-sprachiger Literatur für diese Indikation nicht gefunden; n. b. = nicht benannt.

1.1.4.2 Die Verringerung der Aufnahme von Glucose, Fructose und langkettigen Fettsäuren in Darmzellen

Wie unter 1.1.1 beschrieben, spielt eine übermäßig energiereiche Nahrungsaufnahme eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf des Diabetes mellitus Typ 2.

Im Darm finden sich mehrere Angriffspunkte zur Verminderung der Substrataufnahme. Durch eine Hemmung intestinaler Enzyme, wie z. B. der α -Glucosidase oder der Lipase, wird die Spaltung von Nahrungsbestandteilen in resorbierbare Substanzen unterbunden, was bereits im Therapieeinsatz mit Acarbose und Orlistat als Enzyminhibitoren umgesetzt wird [41]. Die Verminderung der Aufnahme von Monosacchariden und langkettigen, gesättigten Fettsäuren, die > 12 C-Atome enthalten, durch Hemmung intestinaler Transporter stellt die letzte Möglichkeit dar, um in den Resorptionsprozess einzugreifen, bevor sich die Energieüberladung auf den Körper auswirken kann [3,45]. Da Palmitinsäure in vielen Produkten, wie z. B. Fleisch und Fertiggerichten enthalten ist, spielt sie in der Ernährung eine wesentliche Rolle und wurde stellvertretend für die Gruppe der gesättigten, langkettigen Fettsäuren in den nachfolgenden Experimenten verwendet [112,113].

Die Glucose-Aufnahme verläuft im Dünndarm vorwiegend über den luminal gelegenen natriumabhängigen Glucose-Transporter Typ 1 (SGLT-1) in die Enterozyten und über den Glucose-Transporter Typ 2 (GLUT-2) aus den Zellen in die Blutbahn. Jedoch kann sich der GLUT-2 bei einem hohen Glucose-Angebot im Darm verstärkt in die apikale Membran einlagern und die Arbeit des SGLT-1 unterstützen. Die Aufnahme von Fructose in die Zellen wird neben dem Glucose-Transporter Typ 5 (GLUT-5), der nur Fructose transportiert, auch durch GLUT-2 gewährleistet [3]. Langkettige Fettsäuren können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften innerhalb von Sekunden die Zellmembran mithilfe eines Flipflops überqueren, bei dem das Lipidmolekül einen Seitenwechsel in der Zellmembran durchführt [114]. Dennoch kommen im Darm die Fettsäure-Transporter Typ 2 und 4 (FATP-2 und FATP-4) vor, um vermutlich den Transport geladener Fettsäuren zu erleichtern [3]. Mit Sotagliflozin existiert bereits ein dualer Arzneistoff, der sowohl SGLT-1 als auch SGLT-2 hemmt. In der Europäischen Union wurde das Medikament *Zynquista* mit dem Wirkstoff Sotagliflozin zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 bei Patienten mit einem BMI $>27 \frac{kg}{m^2}$ und bei nicht ausreichender Kontrolle der Blutglucosekonzentration durch Insulin, im Jahr 2019 zugelassen [115].

In der Forschung werden häufig das natürlich vorkommende Flavonoid Phlorizin als SGLT-1-Inhibitor und sein Aglykon Phloretin als GLUT-2-Inhibitor zur Kontrolle der Glucose- bzw. Fructose-Aufnahmehemmung eingesetzt [116]. Lipofermata gilt als

vielfersprechender Inhibitor der intestinalen Fettsäureaufnahme durch Hemmung von FATP2 [117,118]. Die Strukturen der aufgezählten Inhibitoren sind in Abb. 1 dargestellt.

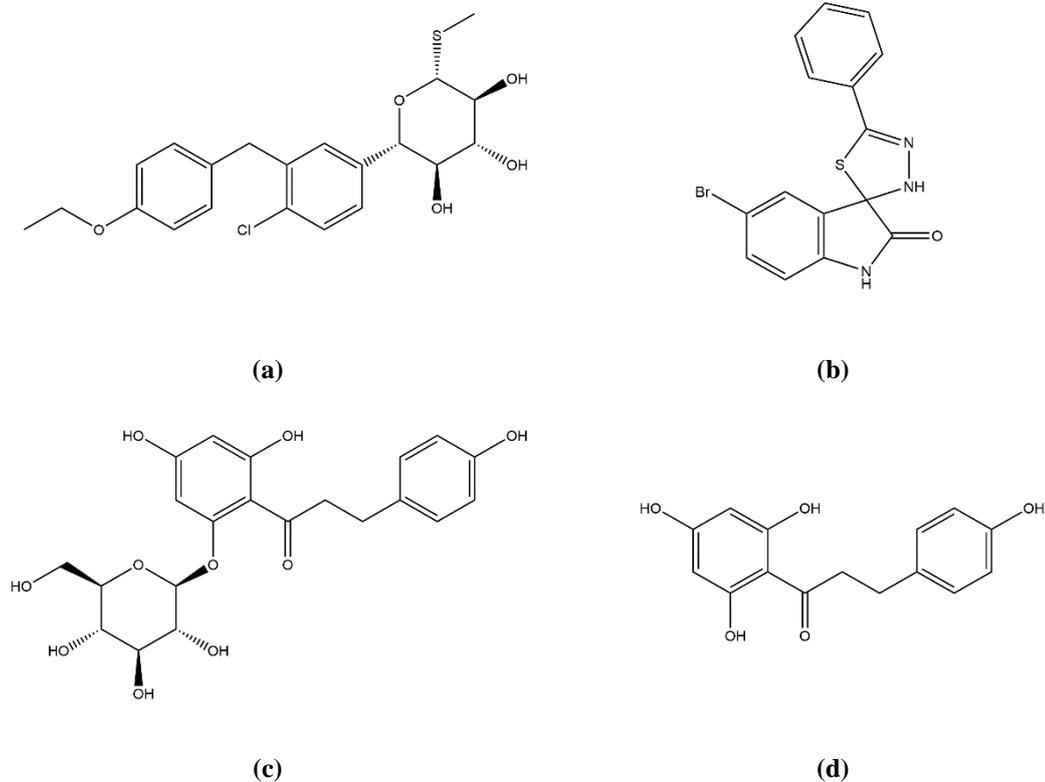


Abbildung 1. Strukturformeln des (a) SGLT-1-Inhibitors Sotagliflozin, (b) FATP2-Inhibitors Lipofermata, (c) SGLT-1-Inhibitors Phlorizin und (d) GLUT-2-Inhibitors Phloretin.

Zusätzlich zum eigentlichen Wirkmechanismus, zeigt die Hemmung von intestinalen Enzymen und Transportern einen weiteren positiven Effekt. Durch die verminderte Aufnahme passieren bereits zu früheren Zeitpunkten höhere Konzentrationen von Substraten und unverdauten Nahrungsbestandteilen die späteren Darmabschnitte, wodurch die Ileum-Bremse (Ileal break) aktiviert wird, die sowohl den Verdauungsprozess als auch das Essverhalten beeinflusst. Die Stimulation des negativen Feedback-Mechanismus führt zu einer Reduzierung der gastrointestinalen Beweglichkeit und Sekretion bei gleichzeitiger Erhöhung des Sättigungsgefühls [119]. Jedoch führen die erhöhten Konzentrationen unverdaulicher Nahrungsbestandteile zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die bereits durch den therapeutischen Einsatz von Enzyminhibitoren bekannt sind. Oligo- und Disaccharide werden erst in distalen Darmabschnitten wie dem Kolon vom körpereigenen Mikrobiom abgebaut, was zu Flatulenz und Diarrhö führt. Der erhöhte Fettanteil im Fäzes verursacht einen öligen Stuhl, Stuhl drang und Meteorismus [41]. Die Reduzierung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen kann durch Einsatz einer Kombinationstherapie bzw. eines Multi-Target-Arzneistoffs herbeigeführt werden. Dabei werden trotz geringerer

Dosierung durch Synergismus die positiven Effekte gewährleistet, während die unerwünschten Arzneimittelwirkungen abnehmen. [120]. Insbesondere bei pflanzlichen Zubereitungen kann häufig keinem isolierten Inhaltsstoff die alleinige Wirksamkeit nachgewiesen werden, weil durch synergistische und additive Effekte mehrerer enthaltener Verbindungen die komplexe Gesamtwirkung zustande kommt [121]. Auch aus diesem Grund sind pflanzliche Extrakte häufig Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Die antidiabetischen Wirkungen von Polyphenolen

Polyphenolische Verbindungen verdanken ihren Namen den Phenol-Gruppen, die sie als gemeinsames Strukturmerkmal aufweisen. Diese Naturstoffe gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen, die nicht lebensnotwendig sind, den Pflanzen aber vielfach nützen. Sie dienen u. a. als Schutz vor Fressfeinden, mikrobiellem Befall sowie UV-Strahlung oder zur Anlockung von Bestäubern. Die Gruppe der Polyphenole ist sehr vielfältig und umfasst verschiedene Untergruppen, die von einfachen Molekülen, wie beispielsweise Phenolsäuren bis zu komplexen Strukturen wie kondensierten Gerbstoffen reichen. Oft sind sie mit einem oder mehreren Zuckerresten konjugiert. Polyphenole kommen vorwiegend in den Randschichten von Obst und Gemüse, in Nüssen, Samenkörnern, Blüten und Rinde vor [122]. In vielen Studien konnten polyphenolhaltigen, pflanzlichen Zubereitungen gesundheitsfördernde Wirkungen, u. a. antioxidative, antiproliferative, antiinflammatorische und antihyperglykämische Effekte nachgewiesen werden [3,122]. Die antidiabetischen Eigenschaften der Polyphenole basieren abhängig von der jeweiligen Substanz auf unterschiedlichen Angriffspunkten. Sie zeigen positive Effekte auf die Wirkung und Sekretion von Insulin durch Reduzierung von β -Zellapoptose, Förderung der β -Zellproliferation, Abschwächung von oxidativem Stress, Verbesserung der Insulin-Signal-Kaskade und Stimulierung der Insulinsekretion aus dem Pankreas. Außerdem greifen Polyphenole durch Hemmung intestinaler Glucose-Transporter und Verdauungsenzymen, Regulierung des intestinalen Mikrobioms, Modifizierung von Entzündungsreaktionen und eine verminderte Bildung von AGEs auch in insulinunabhängige Mechanismen ein [123].

Aufgrund ihrer positiven Wirkungen auf die menschliche Gesundheit, wurde in den letzten Jahren vermehrt geforscht, um polyphenolreiche, pflanzliche Zubereitungen oder isolierte Polyphenole in Lebensmittel einzubringen. Mittlerweile existieren vor allem Milchprodukte wie Käse, Joghurt oder Milch, denen beispielsweise Flavonoide, Catechine oder Vollextrakte z. T. mithilfe von Mikroverkapselung zugesetzt wurden, um gesündere Produkte anzubieten und eine gesunde Lebensweise der Menschen auf diese Weise zu fördern [122].

Bei den meisten polyphenolischen Verbindungen, die in pflanzlichen Zubereitungen als aktive Hemmstoffe der intestinalen Glucose-Aufnahme identifiziert wurden, handelt es sich um Flavonoide, Phenylacrylsäuren und Tannine [3]. Einige Strukturen aktiver Polyphenole sind in Abb. 2 dargestellt.

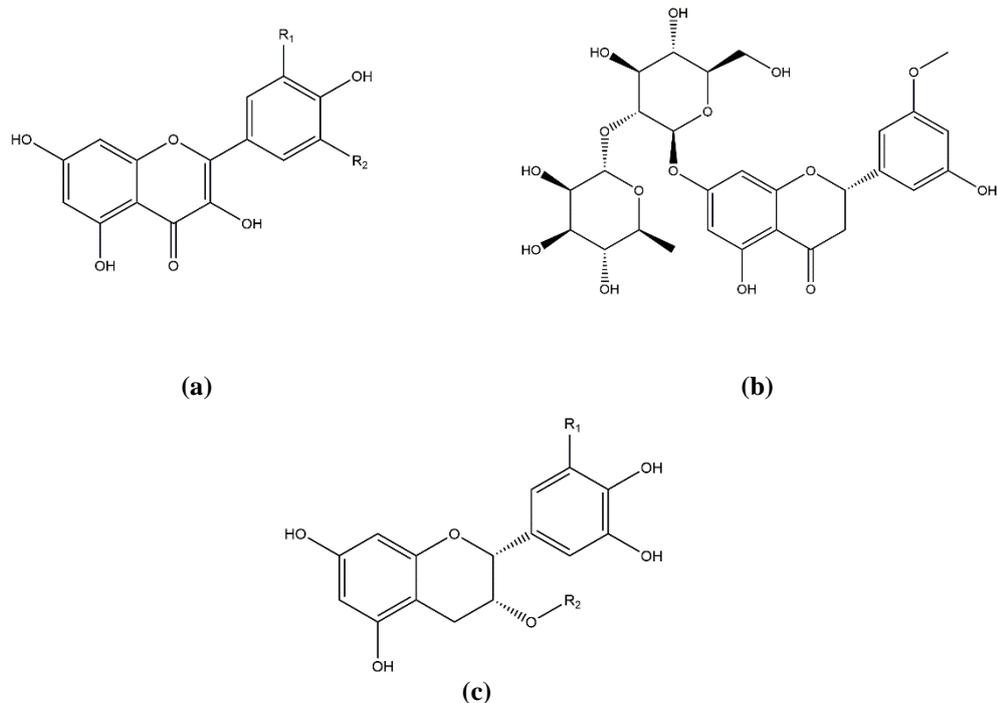


Abbildung 2. Ausgewählte Strukturformeln von Polyphenolen, die intestinale Transporter für Glucose und Fructose hemmen. (a) Strukturelles Grundgerüst von Flavonolen mit R₁=OH, R₂=OH: Myricetin und R₁=OH, R₂=H: Quercetin. (b) Die Strukturformel von Neohesperidin als Beispiel für ein aktives Flavonoid-Glykoside. (c) Strukturelles Grundgerüst einiger (-)-Epicatechingerbstoffe mit R₁=H, R₂=H: (-)-Epicatechin und R₁=OH, R₂=H: (-)-Epigallocatechin. Bei Vorliegen eines Gallatrestes bei R₂ entsteht mit R₁=H (-)-Epicatechingallat und bei R₁=OH (-)-Epigallocatechingallat.

Johnston et al. vermuteten durch ihre Forschungsergebnisse, dass der intestinale GLUT-2 vorwiegend von Flavonoid-Aglyka, wie z. B. Phloretin, Quercetin, Fisetin und Myricetin, gehemmt wird, während die Glykoside, wie z. B. Phlorizin und Neohesperidin, vorrangig die Glucose-Aufnahme über Interaktion mit SGLT-1 herabsetzen. Zur Unterscheidung der beiden Transportvorgänge arbeiteten sie für die Experimente von GLUT-2 natriumfrei [124]. Eine andere Studie, die Unterschiede des Stromflusses durch Transportvorgänge gemessen hat, zeigte ebenfalls eine Hemmung des SGLT-1 durch Quercetin. Die Wissenschaftler schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass durch Flavonoid-Glykoside eine kompetitive Hemmung des SGLT-1 vorliegt, wobei die Affinität des Inhibitors zum Transporter besonders stark ist, wenn die Glucose über Position 4' des aromatischen Flavonoid-Rings verbunden ist [125]. *Kwon et al.* konnten ebenfalls eine signifikante Hemmung des Glucose- und Fructose-Transports über GLUT-2, der in den Oozyten des *Xenopus laevis* DAUDIN

exprimiert wurde, durch die Flavonoid-Aglyka Fisetin, Myricetin, Quercetin und das Glykosid Isoquercetin feststellen [126].

Aufgrund ihrer Eigenschaft, Eiweißmoleküle vernetzen zu können, sind Gerbstoffe in der Lage, auch mit den Proteinen von Nährstofftransportern über Wasserstoffbrücken, Ionenbeziehungen, apolare Wechselwirkungen und kovalente Bindungen zu interagieren [121]. Die Hemmung von Glucose-Transportern durch (-)-Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechin findet unspezifisch, vor allem durch sterische Hinderung von GLUT-2 und SGLT-1 statt [124,127].

1.3 Die Caco-2-Zelllinie

Caco-2-Zellen, die ursprünglich von einem menschlichen Kolon-Adenokarzinom abstammen, bilden innerhalb von 15-21 Tagen nach Konfluenz spontan die morphologischen Eigenschaften von epithelialen Dünndarmzellen wie z. B. eine Bürstensaummembran mit Enzymen, Transportproteinen, Mikrovilli und Tight junctions aus [128-130]. Die Expression der Monosaccharid- und Fettsäure-Transporter SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 konnte in anderen Arbeiten bereits nachgewiesen werden [131-134].

Die Differenzierung wird u. a. mikroskopisch anhand der Morphologie oder mithilfe der Aktivität intestinaler Hydrolasen, wie z. B. die ALP und die Sucrase-Isomaltase, gemessen [128-130,135]. Die Caco-2-Zellen werden seit Jahrzehnten als intestinales Barriere-Modell verwendet, um u. a. Aufnahmestudien *in vitro* durchzuführen und Erkenntnisse über die Absorption und den Metabolismus des Dünndarms zu gewinnen [128,136]. Die Differenzierungsreagenzien, wie z. B. Natriumbutyrat oder DMSO, können die Reifung der Zellen beeinflussen und werden im Zellmodell zur Verkürzung der Experimentierdauer eingesetzt. Die Buttersäure zählt wie Essigsäure und Propionsäure zu den kurzkettigen Fettsäuren, die eine Carboxylgruppe und einen C2-C4-Acetylrest aufweisen [137]. Sie entstehen im menschlichen Körper vorwiegend im Dickdarm bei der Fermentation von Ballaststoffen, wie z. B. Cellulose und Pektine, durch anaerobe Bakterien [138,139]. Die Aufnahme in die Enterozyten erfolgt bei den im Kolon vorherrschenden pH-Werten über Monocarboxylat-Transporter (MCT-1; Gen: SLC16A1) und über den natriumgekoppelten Monocarboxylat-Transporter Typ 1 (Gen: SLC5A8) als ionisiertes Substrat [137]. Während das Butyrat bei gesunden Darmzellen als Energiequelle die Proliferation unterstützt [140,141] und neben antiinflammatorischen [142-144] und antioxidativen Effekten [145,146] auch eine protektive Wirkung auf die Darmbarriere zeigt [143,145,147], leitet es bei Tumorzellen verstärkt Apoptose und durch Erhöhung der CDK-Inhibitoren p21 und p27 die Differenzierung ein [148]. Das Lösungsmittel DMSO stabilisiert im Zellmodell die Phospholipid-Doppelmembran durch Interaktion mit

Bestandteilen und begünstigt somit die Bildung heterogener Strukturen [149]. Während DMSO mit Zellen nur unter künstlichen Bedingungen in Kontakt kommt, spielt Natriumbutyrat bzw. Buttersäure als physiologischer Metabolit im Körper durchaus eine Rolle, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit Natriumbutyrat als Differenzierungsreagenz für die Untersuchungen ausgewählt wurde.

1.4 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Caco-2-Zellen als Zellmodell hinsichtlich der intestinalen Aufnahme der Substrate Glucose, Fructose und Palmitinsäure durch Transporter genauer charakterisiert und anschließend Extrakte traditionell verwendeter Pflanzen in diesem Modell auf eine Hemmung der intestinalen Substrataufnahme untersucht werden.

Die Experimente umfassten dabei folgende Hauptziele:

- Etablierung eines Zell-Assays unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate für Studien zur Substrataufnahme und Aufnahmehemmung
 - Untersuchungen zur Expression von intestinalen Transportern und zur Substrataufnahme in Caco-2-Zellen während der Differenzierung zur Feststellung der Beziehung zwischen Expression und Funktionalität von Transportproteinen
 - Untersuchungen zum Einfluss von Natriumbutyrat auf die Expression und die Substrataufnahme in Caco-2-Zellen während der Differenzierung zur Feststellung der optimalen Bedingungen bei Untersuchungen zur Substrataufnahme und Aufnahmehemmung
 - Untersuchungen zur Kinetik der Glucose-Aufnahme und zur Aufnahme über passive Diffusionsvorgänge von Glucose, Fructose und Palmitinsäure zur weiteren Charakterisierung des Barriere-Modells
- Screening von traditionell bei Diabetes mellitus eingesetzten Pflanzenextrakten auf eine Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in Caco-2-Zellen
- Phytochemische Untersuchung eines Extrakts mit hoher Wirksamkeit zur Identifizierung der aktiven Inhaltsstoffe
- Beurteilung der Eignung des etablierten Zell-Assays mit radioaktiv markierten Substraten und des Caco-2-Modells für Studien zur Substrataufnahme und Aufnahmehemmung

2 Materialien und Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit analytisch reinem Wasser (0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, filtriert mit einem 0,2 μm Filter), das aus der unten aufgelisteten Reinstwasseranlage gewonnen wurde, hergestellt.

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Allgemein

Material	Hersteller/Lieferant
Albumin fettsäurefrei, US-Origin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
DMSO	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Formaldehyd 37 Gew.- % Lsg. in Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Fructose	Berlin-Chemie AG, Berlin, Germany
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Hämatoxilin-Lösung II nach Gill modifizierte Lösung für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Methanol HPLC Grade	VWR International GmbH, S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France
Natriumbutyrat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Salzsäure 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumdodecylsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan: Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid/ Thiazolylblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

2.1.2 Zellkultur

Material	Hersteller/Lieferant
DMEM mit 3,7g/L NaHCO ₃ und 4,5 g/L D-Glucose, ohne L-Glutamine und Phenolrot	Biochrom GmbH, Berlin, Germany
DPBS ohne Calcium und Magnesium	Lonza Cologne GmbH, Köln, Germany
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin TrypLE™ Express	Life Technologies, Darmstadt, Germany
Ultraglutamine 1	Lonza Cologne GmbH, Köln, Germany

2.1.3 Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion

Material	Hersteller/Lieferant
Acrylamid/Bis-Lösung 37,5:1	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Antikörper Anti-β-Actin	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Anti-FATP-2 (ab175373)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Anti-FATP-4 (ab199719)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Anti-GLUT-2 (ab54460)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Anti-GLUT-5 (ab36057)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Anti-SGLT-1 (ab97682)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Goat-Anti-Rabbit IgG (HRP) (ab205718)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Antikörper Goat-Anti-Mouse (HRP) (ab205719)	Abcam plc, Biomedical Campus Cambridge, United Kingdom
Ammonium persulfate	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
BlueEye Prestained Protein Ladder	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
4x-Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Skim Milk Powder for microbiology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Tween® 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

2.1.4 Radiochemische Methoden

Material	Hersteller/Lieferant
Szintillationsflüssigkeit LSC-CocktailAquaLight Beta	Hidex, Mainz, Germany
1 mCi/mL 1- ³ H(N)-Glucose (spezifische Aktivität: 30 Ci/mmol)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Germany/ American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, USA
1 mCi/mL ³ H(G)-Fructose (spezifische Aktivität: 5 Ci/mmol)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Germany/ American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, USA
1 mCi/mL 16- ³ H-Palmitinsäure (spezifische Aktivität: 20 Ci/mmol)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Germany/ American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, USA

2.1.5 HPLC und LC-MS

Material	Hersteller/Lieferant
Acetonitril	VWR International GmbH, S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France
Ameisensäure für LC-MS	TCI EUROPE N.V., Zwijndrecht, Belgium

2.2 Kits

Material	Hersteller/Lieferant
FluoReporter™ Blue Fluorometric dsDNA Quantitation kit (Hoechst 33258)	Life Technologies Corporation, Eugene, USA
Lyse-Puffer mit Proteaseinhibitoren cOmplete™ Lysis-M	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, Germany
Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, Germany

2.3 Geräte

2.3.1 Allgemein

Gerät	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage Excellence XS205DU	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Germany
Aufnahmesystem PXi Touch Multi-Application Gel Imaging System	Syngene, Beacon House, Cambridge, CB4 1TF, United Kingdom
Einstabelektrode BlueLine 12 pH	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG – SI Analytics, Mainz, Germany
Kolbenhubpipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Laborautoklav Varioklav Dampsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Germany
Labor-pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Germany
Labortiefkühltruhe Profi Line Taurus PLTA 0986	National Lab GmbH, Mölln, Germany
Mehrkanalpipette Transferpette-8	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany
Mikroliterzentrifuge 20	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany
Mikroliterzentrifuge 200R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany
Mikroplattenreader Tecan Infinite F200	Tecan Group, Männedorf, Switzerland
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipettierhilfe „FB motorized Pipet Filler“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Präzisionswaage PT 1200	Sartorius Corporate Administration GmbH, Göttingen, Germany
Reinstwasseranlage LaboStar	Siemens AG Wasseraufbereitung Barsbüttel, Germany
Ultraschallbad Sonorex RK 100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany
Vortexer MS1 S1 Vortex Shaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany

2.3.2 Extraktion

Gerät	Hersteller/Lieferant
Allegra X-30R Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSCplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany
M20 Universalmühle	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
Rotationsverdampfer RV 10 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany

2.3.3 Zellkultur

Gerät	Hersteller/Lieferant
CO ₂ -Inkubator ICO105med	Memmert GmbH + Co. KG, Büchenbach, Germany
Hämocytometer nach Neubauer Superior Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany
Kamera EOS 1000D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Germany
Kreisschüttler SLT Shaker	Elmech, Elektronik & Mechanik GmbH, Celle, Germany
Präzisionsheizplatte Präzitherm PZ 28-1	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Germany
Sterilbank Tecnoflow 2F120-II GS	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Switzerland
Tischmikroskop DM LS2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Tischmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Germany
Wasserbad 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany

2.3.4 Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion

Gerät	Hersteller/Lieferant
Antriebsaggregat PowerPAC 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany
Antriebsaggregat Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Gelelektrophorese-Kammer für 1 mm Gele mit Begleitmodul, Halterungen und Rahmen, Probenaschenkamm und Glasplatten Mini-PROTEAN Tetra System vertical electrophoresis handcast gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany
Grant QBT Heizblock mit Aluminiumblock	Grant Instruments, Cambridge, United Kingdom
Microplattenschüttler PMS 1000i Microplate Shaker	Grant Instruments, Cambridge, United Kingdom
Wippschüttler Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt

2.3.5 Radiochemische Methoden

Gerät	Hersteller/Lieferant
Flüssigszintillationszähler/ β -Counter Hidex 300 SL	Hidex, Mainz, Germany
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany

2.3.6 HPLC und LC-MS

Analytische HPLC

Gerät	Hersteller/Lieferant
Controller CBM-20A	Shimadzu Corporation, Japan
Solvent delivery pump LC-10AT vp	
Reservoir selection valve FCV-10AL vp	
Detector SPD-10A vp	
Degasser DGU-14A	
Säule: Kinetex XB-C18 100 Å, 5 μ m, 250 x 4,6 mm	Phenomenex Inc., USA

Präparative HPLC

Gerät	Hersteller/Lieferant
Controller CBM-20A	Shimadzu Corporation, Japan
Solvent delivery pump LC-8A	
Reservoir selection valve FCV-130AL	
Detector SPD-20AV	
Säule 15QE181E2N, Eurospher II 100-10C18, 10 µm, 150 x 30 mm	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Germany

ESI-LC-QQQ-MS:

LC 1290 Infinity II System kombiniert mit 6495 Triple Quad MS von Agilent Technologies, USA

Säule: Poroshell 120 EC-C18, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm

ESI-LC-Q-TOF-MS:

LC 1290 Infinity II System kombiniert mit 6550 iFunnel Q-TOF MS von Agilent Technologies, USA

Säule: Poroshell 120 EC-C18, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm

2.4 Verbrauchsmaterialien

2.4.1 Allgemein

Material	Hersteller/Lieferant
Autoklavierbare Beutel, PP, bis 148 °C	VWR International GmbH, Darmstadt
Combitips advanced® 2,5, 5, 10, 50 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Nitril Handschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt
Petrischalen	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Pipettenspitzen 0,1-10 µL	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
Pipettenspitzen 10-100 µL	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
Pipettenspitzen 5-300 µL farblos	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany
Pipettenspitzen EpT.I.P.S. Standard/Bulk 50-1000 µL blau, 200-5000 µL farblos	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Materialien und Methoden

Reagenz- und Zentrifugenröhre 15 mm, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany
Reagenz- und Zentrifugenröhre 50 mm, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany
Reagiergefäß 1,5 mL EASY CAP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany
Reagiergefäße Protein LoBind® Tubes 0,5 mL und 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Serologische Pipetten 5, 10 und 20 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany

2.4.2 Zellkultur

Material	Hersteller/Lieferant
BlottingSheets Whatman™ Gel Blot paper 10x10 cm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Einfrierröhrchen Cryo.s™ 2 mL	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
Einmal-Wischtücher ROTIZELL®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Multiwellplatte Cellstar®, 24-Well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
Multiwellplatte, schwarz, 96F-Nunclon™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Multiwellplatten, 96-Well	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturenflasche Cellstar® 25, 75 und 175 cm ²	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
Zellschaber 23 cm mit Klinge (1,25 cm) und Griff	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter CA, steril, Porengröße 0,2 µm, Ø 25 mm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany
Spritzenvorsatzfilter PA, steril, Porengröße 0,2 µm, Ø 15 mm	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Spritzenvorsatzfilter CME, unsteril, Porengröße 0,8 µm, Ø 25 mm	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe, Germany)

2.4.3 Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion

Material	Hersteller/Lieferant
Top-Line® Gelloader Tip 1-200 µL, 67,0 mm, klar	ANH Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Germany
Western Blotting Membranes Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Gel Blot Paper 10x10 cm	Whatman GmbH, Dassel, Germany/ GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
Western-Blot-Box	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

2.4.4 Radiochemische Methoden

Material	Hersteller/Lieferant
Szintillationsröhrchen Plastik-Vials 6 mL Vol.	Hidex, Mainz, Germany

2.5 Untersuchte, sekundäre Pflanzenstoffe und Pflanzenmaterial

2.5.1 Sekundäre Pflanzenstoffe und Metaboliten

Material	Hersteller/Lieferant
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Benzylisothiocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
(±)-Catechin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Chlorogensäure	Fluka Chemie AG, Basel, Switzerland
(-)-Epigallocatechingallat	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ferulasäure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Fumarsäure	Fluka Chemie AG, Basel, Switzerland
Glucoraphanin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Isorhamnetin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Kämpferol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Lipofermata	Cayman Chemical, Michigan, USA
Phloretin	Cayman Chemical, Michigan, USA
Phlorizin Dihydrat	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Progoitrin	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Quercetin Dihydrat	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Rutin Trihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Sinapinsäure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany
Sotagliflozin	Cayman Chemical, Michigan, USA)
Urolithin A	Prof. Sebastian Granica, MicrobiotaLab Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Medical University of Warsaw, Poland

2.5.2 Pflanzenmaterial

Material	Pflanzenteil	Hersteller/Lieferant
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	Wurzel	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Zwiebel	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	Frucht	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Blatt	Europa Gewürze GmbH, Berlin, Germany
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Assam</i>) (Teepflanze)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Darjeeling</i>) (Teepflanze)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Gunpowder</i>) (Teepflanze)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Sencha</i>) (Teepflanze)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Frucht	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Fruchtschale	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	Grüne Samen	Ridders Kaffeerösterei, Berlin, Germany
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	Frucht	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	Frucht	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Samen	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)

Materialien und Methoden

<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Kraut	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	Rinde	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Blüte	Alfred Galke GmbH, Gittelde, Germany
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	Frucht	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' (Kulturapfel)	Fruchtschale	Lokaler Supermarkt, Berlin, Germany
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	Blatt	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Frucht	Dr. Serhat Sezai Çiçek, Institut für Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Samen	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Blatt	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Wurzel	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Peumus Boldus</i> MOLINA (Boldo)	Blatt	Heinrich Klenk GmbH & Co. KG, Schwebheim, Germany
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	Kraut	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	Wurzel	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)

Materialien und Methoden

<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Fruchtschale	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Blüte	Zieten Apotheke (Berlin, Germany)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Blatt	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L). SPACH (Dornige Bibernelle)	Wurzel	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. & L.M.PERRY (Gewürznelkenbaum)	Blüte	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Kraut	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Frucht	Kräuter Schulte aktiv Kräuter Drogerie e.K., Gernsbach, Germany
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Samen (Trester)	Alfred Galke GmbH (Gittelde, Germany)

Die pflanzlichen Drogen wurden, wenn möglich in der Qualität des Europäischen Arzneibuchs, des Deutschen Arzneimittel-Codex, des Homöopathischen Arzneibuchs, dem Österreichischen Arzneibuch, nach firmeneigenen Prüfvorschriften oder als Bio-Produkt bezogen.

2.6 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

2.6.1 Herstellung pflanzlicher Extrakte

Die einheitliche Aufarbeitung des Pflanzenmaterials bildete die Grundlage für reproduzierbare Ergebnisse und ist in den nachfolgenden Kapiteln angelehnt an die bereits veröffentlichten Daten protokolliert [45]. Mit Ausnahme des Apfels wurde das verwendete Pflanzenmaterial bereits in getrocknetem Zustand erworben. Die reifen Früchte von *Malus domestica* (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' wurden mit demineralisiertem Wasser gewaschen und geschält. Die Fruchtschale wurde in Stücke geschnitten, für drei Tage im Trockenschrank bei 40°C gelagert und danach für zwei weitere Tage gefriergetrocknet. Die pflanzlichen Drogen wurden in einer Mühle pulverisiert und anschließend vor Licht geschützt, trocken und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Es wurden methanolische und wässrige Extrakte von jeder Arzneipflanze nach *T. Buchholz et al.* [150] mit Modifikationen hergestellt.

Für die methanolische Extraktion wurde das getrocknete Pflanzenpulver mit Methanol für 60 min bei 40°C im Wasserbad unter Rückfluss extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt filtriert, das Filtrat in einen 250 ml Rundkolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40°C im Wasserbad auf ca. 5 ml eingengt. Nach Überführung des Extraktes in eine Petrischale wurde der Rundkolben zweimal mit Lösungsmittel nachgespült, der restliche Extrakt ebenfalls in die Petrischale übernommen und die Petrischale zum Abdampfen des Lösungsmittels über Nacht unter dem Abzug stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurde die Petrischale mindestens 3 h bei -20°C gelagert, bevor sich die Gefriertrocknung für weitere 48-96 h anschloss. Die pulverisierten Extrakte wurden in ein braunes Rollrandglas überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die wässrige Extraktion wurde das getrocknete Pflanzenpulver mit demineralisiertem Wasser für 15 min bei 40°C im Wasserbad unter Rückfluss extrahiert. Um den Filtrationsprozess zu beschleunigen, wurden einige der Extrakte für 5 min mit 4.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und durch einen Büchner-Trichter mit Filterpapier abgenutscht. Das Filtrat wurde aufgefangen und bei -80°C in einem 250 ml Rundkolben tiefgefroren. Im Anschluss erfolgte über 48-96 h eine Gefriertrocknung bis das Filtrat auskristallisiert war. Die pulverisierten Extrakte wurden in ein braunes Rollrandglas überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.2 Herstellung der Untersuchungslösungen aus pflanzlichen Extrakten

Zuerst wurde der pflanzliche Extrakt eingewogen und in HEPES-Puffer gelöst. Bei Extrakten, die mithilfe des Lösungsmittels Methanol gewonnen wurden, ist das Pulver

vorher in 0,3% (V/V) DMSO angelöst wurden. Nach 5 min Ultraschallbehandlung zur vollständigen Lösung der Partikel, wurde die Mischung mit einem 0,8 µM-Filter vorfiltriert, bevor die Sterilfiltration mit einem 0,2 µM-Filter erfolgte. Die Untersuchungslösung für die Experimente wurde u. a. zur Verringerung der Verluste durch Adhäsionskräfte am Filtermaterial aus dem gefriergetrockneten Extraktpulver einer Droge zehnfach konzentriert hergestellt, um schließlich in den drei finalen Konzentrationen im Well von 1 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0,01 mg/mL z. B. im MTT-Assay an den Zellen getestet zu werden. Die Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7 Zellbiologische und biochemische Methoden

2.7.1 Die Kultivierung der Caco-2-Zelllinie

Die Zellexperimente in der vorliegenden Arbeit wurden an Caco-2-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem menschlichen Kolon-Adenocarcinoma gewonnen wurde. In Kultivierung bilden Caco-2-Zellen ca. 15-20 Tage nach Konfluenz spontan die Charakteristika einer Dünndarmepithelialschicht aus und exprimieren u. a. eine Bürstensaummembran mit Enzymen und Transportsystemen [129,135,136,151], weshalb sie sich besonders gut für intestinale Aufnahmestudien eignet.

Während der Kultivierung wurden die Caco-2-Zellen im Abstand von 2-3 Tagen mit DPBS gewaschen und das Nährmedium ausgetauscht. Das Kulturmedium bestand dabei aus DMEM mit 20% FBS und 1% Alanin-Glutamin-Lösung. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin 5 min auf einer Heizplatte bei 37°C inkubiert und abgelöst und für weitere Experimente z. B. in Mikrotiterplatten mit 24 Wells ausgesät.

2.7.2 Fixierung und Anfärbung zellulärer Strukturen

Zur visuellen Begutachtung und Dokumentation der morphologischen Zelldifferenzierung wurden über drei Wochen nach Konfluenz gefärbte Zellpräparate angefertigt.

Die Zellen wurden in Petrischalen ausgesät, das Medium am Tag des Experiments abgesaugt und die Zellen mit einer 3,7%igen Formaldehyd-Lösung für 45-60 min inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen, bevor eine Inkubation mit Hämatoxylin-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte. Der Farbstoff wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen. Die Behandlung des Zellmaterials mit mehrwertigen Metallkationen durch Zugabe von Leitungswasser führte zur Bildung eines dauerhaften Farbstoffkomplexes, der die zellulären Strukturen, vor allem durch Kontrastbildung, besser erkennbar machte.

2.7.3 Expression von intestinalen Transportern in Caco-2-Zellen

2.7.3.1 Kultivierung der Caco-2-Zellen und Probenaufbereitung

Die Expression der intestinalen Nährstofftransporter SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 wurde über 21 Tage mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung in Caco-2-Zellen untersucht. Dafür wurden jeweils 2 Mio. Zellen in eine 25-cm²-Zellkulturflasche ausgesät und ihre Konfluenz 24 h nach der Aussaat visuell kontrolliert. Die Probennahme erfolgte zur gleichen Tageszeit an Tag 1, 2, 3, 4, 6, 15 und 21 nach Konfluenz, wie in Abb. 3 dargestellt.

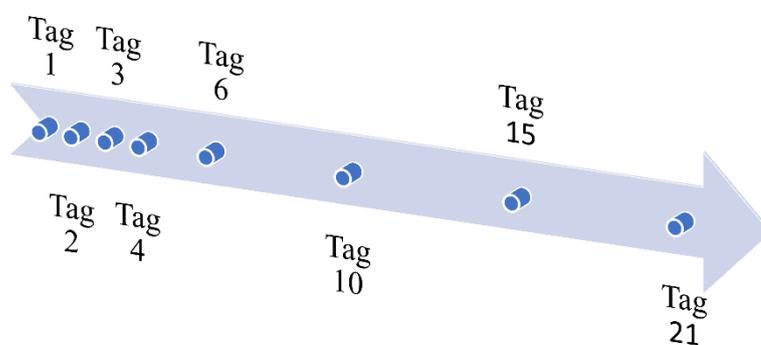


Abbildung 3. Zeitstrahl zur Probennahme für den Western-Blot an Tag 1, 2, 3, 4, 6, 15 und 21 nach Zellkonfluenz.

Im Abstand von 2-4 Tagen wurden die Zellflaschen jeweils zweimal mit DPBS gewaschen und frisches Nährmedium hinzugegeben. Für das Experiment wurde DMEM mit 5% FBS und 1% Alanin-Glutamin-Lösung verwendet. Das Differenzierungsmedium enthielt zusätzlich 5 mM Natriumbutyrat.

Als Vorbereitung zur Probennahme wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µL Zellaufschluss-Puffer mit Protease-Inhibitoren wurde die intestinale Epithelschicht vom Boden der Zellkulturflasche mit einem Zellschaber abgelöst, vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt und mit der Pipettenspitze durch Ansaugen und Ablassen homogen durchmischt. Nachdem die Zellen insgesamt 5 min im Zellaufschluss-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, wurde die Probe 15 min mit einer Beschleunigung von 18620g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für die weitere Aufarbeitung in ein zweites Reaktionsgefäß übertragen. Der Proteingehalt der

Proben wurde mittels BCA-Assay bestimmt, durch Verdünnung auf 800 µg/mL eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

In Abb. 4 ist das schrittweise Vorgehen von der Kultivierung der Zellen bis zur Detektion der chemilumineszierenden Proteinbanden der intestinalen Transporter nach dem Western-Blot veranschaulicht.

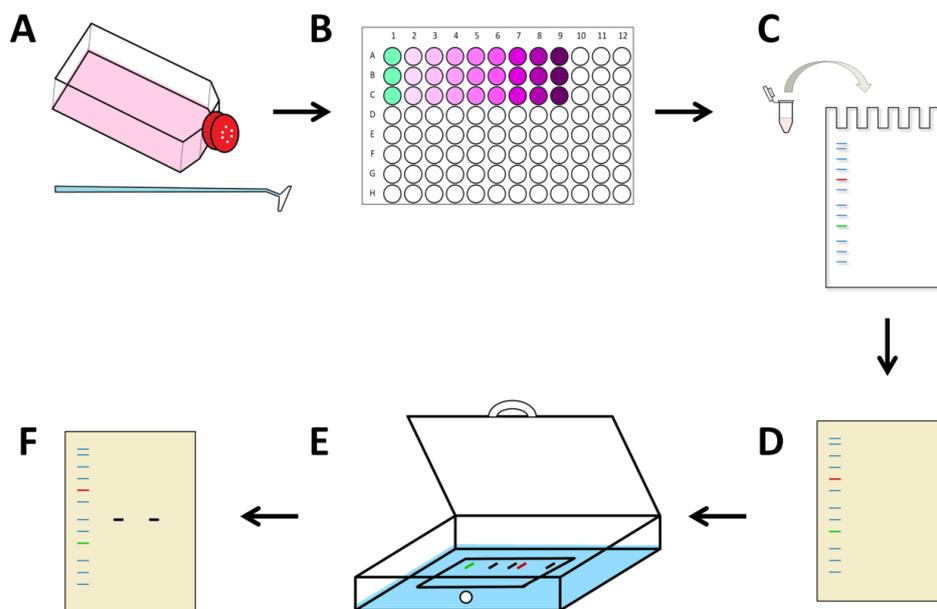


Abbildung 4. Vorgehensweise bei den Experimenten zur Expression von Transportproteinen aus Caco-2-Zellen. Die Darstellung zeigt (A) die Probennahme über 21 Tage, (B) die Angleichung des Proteingehalts der Proben auf 800 µg/mL nach Proteingehaltsbestimmung mithilfe des BCA-Assays, (C) die Probenbeladung des Gels mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Proteine, (D) den Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Western-Blot), (E) die Behandlung der Nitrocellulose-Membran mit Antikörper-Lösungen und (F) die Detektion der Proteinbanden durch Messung der Chemilumineszenz.

2.7.3.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die aufbereiteten Zellproben wurden mit 4x-Laemmli-Puffer und β-Mercaptoethanol versetzt und zur vollständigen Denaturierung der räumlichen Proteinstruktur für 5 min bei 95°C inkubiert.

Die anschließende diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das anionische Detergens SDS, welches im Laemmli-Puffer enthalten ist, lagert sich gleichmäßig an die aufgefaltete Struktur der

Proteine an und es bilden sich Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit von 1,4 g SDS pro g Protein [152]. Nach Applikation der Proben in die Probentaschen des Polyacrylamid-Gels, durchlaufen sie nach Anlegen einer Spannung von 200 V zuerst das großporige Sammelgel. Der Sammelgelpuffer enthält Chlorid-Ionen, die eine größere elektrische Mobilität als die Proben aufweisen und die vordere Front bilden. Die Glycin-Moleküle, die als Zwitter-Ion Bestandteil des Elektrophoresepuffers sind, liegen bei einem pH-Wert von 6,8 in ihrer Gesamtladung vor allem ungeladen vor und besitzen dadurch eine geringere elektrische Mobilität als die Proteinprobe. Zwischen Chlorid-Ionen und Glycin-Molekülen stapeln sich nun die Proteine, was als Stapel-Effekt oder Stacking-Effekt bezeichnet wird. Aufgrund der kleineren Porengröße werden beim Übergang zum Trenngel größere Proteine stärker zurückgehalten, während kleine Proteine sich schneller durch das Trenngel bewegen können. Die Porengröße des Trenngels, die über den Grad der Vernetzung bestimmt wird, kann je nach Größe des aufzutrennenden Proteins durch den Gehalt an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid sowie das Verhältnis der beiden Substanzen zueinander variiert werden [152,153].

Wie in Tab. 2 dargestellt, wurden für die SDS-Gelelektrophorese abhängig von der Molekülgröße der intestinalen Transportproteine Trenngele mit 10% oder 12,5% Acrylamidgehalt verwendet. Je nach Expression der Transporter in den Zellen wurden die Probentaschen mit 6 oder 15 µg Protein beladen.

Tabelle 2. Die Molekülmassen intestinaler Transporter und die Parameter zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese, zu denen die verwendete Konzentration des Acrylamids für die Gelherstellung, das Applikationsvolumen und die Proteinbeladung der Geltaschen zählen.

Protein	Größe des Proteins nach Herstellerinformation [kDa]	Acrylamidkonzentration des Gels [%]	Applikationsvolumen je Probentasche [µL]	Proteinbeladung je Probentasche [µg]
β-Actin	43	10	10	6
SGLT-1	73	10	25	15
GLUT-2	53-61	12,5	25	15
GLUT-5	56	12,5	25	15
FATP-2	70	10	25	15
FATP-4	72	10	10	6

Die Polyacrylamidgele und die Puffer für die Elektrophorese wurden gemäß *Schrimpf et al.* [152] hergestellt. In Tab. 3 ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die

SDS-Gelelektrophorese aufgelistet. Der Elektrophoresepuffer wurde vor Gebrauch 1+9 mit Wasser verdünnt.

Tabelle 3. Die Zusammensetzung der Puffer zur Durchführung der Gelelektrophorese.

Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCl q.s.
Trenngelpuffer pH 8,8	1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCl q.s.
10x Elektrophoresepuffer	144 g Glycin 30 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 10 g SDS Ad 1 L Wasser

In jedem Gel wurden parallel mit den Proben 5 µL einer vorgefärbten Proteinleiter aufgetragen, um die Auftrennung visuell zu beobachten und je nach gesuchter Proteingröße nach 1-2 h manuell stoppen zu können.

Um die Expression der Transporter über 21 Tage mit und ohne Natriumbutyrat bestimmen und vergleichen zu können, wurden die Proben nach dem Schema, wie in Tab. 4 veranschaulicht, auf zwei Gele verteilt. Auf beiden Gelen wurde die Probe von Tag 4 ohne Natriumbutyrat appliziert, wodurch die Proben mittels Relationen untereinander vergleichbar wurden.

Tabelle 4. Schemata für die Probenbeladung des **(a)** ersten und **(b)** zweiten Gels für die Gelelektrophorese. Auf beiden Gelen war die Probe **Tag 4** ohne Natriumbutyrat (**-NaBu**) appliziert worden. Für jeden Transporter wurde dieses Schema angewendet; ohne Natriumbutyrat (**-NaBu**) und mit Natriumbutyrat (**+NaBu**).

Proteinleiter	Tag 1 -NaBu	Tag 2 -NaBu	Tag 3 -NaBu	Tag 4 -NaBu	Tag 1 +NaBu	Tag 2 +NaBu	Tag 3 +NaBu	Tag 4 +NaBu
---------------	----------------	----------------	----------------	------------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------

(a)

Proteinleiter	Tag 4 -NaBu	Tag 6 -NaBu	Tag 15 -NaBu	Tag 21 -NaBu	Tag 4 +NaBu	Tag 6 +NaBu	Tag 15 +NaBu	Tag 21 +NaBu
---------------	------------------------------	----------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------

(b)

2.7.3.3 Proteintransfer mit dem Semi-Dry-Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mithilfe des Western-Blots auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um sie für eine Detektion zugänglich zu machen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Semi-Dry-Verfahren als Methode für den Protein-Transfer gewählt. Die negativ geladenen Proteine wandern dabei nach Anlegen eines Stromes aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran in Richtung der Anode unter Beibehaltung des Musters ihrer Auftrennung. Das Gel und die Membran sind während des Prozesses in einem mit Transferpuffer durchnässten Filterpapierblock eingebettet [152,154,155]. Nach dem Proteintransfer können entweder alle Proteinbanden durch Anfärbung mit Farbstoffen oder nur bestimmte Proteine z. B. durch Immundetektion sichtbar gemacht werden. Bei der Immundetektion lagert sich ein Primärantikörper selektiv an das Zielprotein an. Im weiteren Schritt wird ein Immunkonjugat hinzugegeben, das aus einem polyklonalen Sekundärantikörper und einer signalbildenden Substanz besteht. Der Sekundärantikörper kann an mehrere Epitope des Primärantikörpers binden und führt dadurch zur Signalverstärkung. Die Meerrettichperoxidase ist ein Enzym, das häufig an den Sekundärantikörper gekoppelt wird und nach Zugabe des Substrats wie z. B. Luminol dessen Umwandlung in ein chemilumineszierendes Produkt katalysiert [156-158]. Nach Durchführung des Western-Blots bei 250 mA für 2 h unter Verwendung des Transferpuffers, wurde die Membran frei gelegt und zum Trocknen für 1-2 h auf einem Papiertuch ausgebreitet. Nach dem Trocknen wurde die Membran zurechtgeschnitten und für die Antikörperbehandlung in einer Western-Blot-Box aufbewahrt. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran in der Western-Blot-Box dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit jeweils 5 mL Blockierungspuffer gewaschen. Nach Inkubation mit 4 mL Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C, wurde die Membran erneut dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit 5 mL Blockierungspuffer gespült. Anschließend wurden 4 mL Sekundärantikörper-Lösung hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor drei weitere Waschstritte für 10 min mit je 5 mL Blockierungspuffer folgten. Während der verschiedenen Behandlungen befand sich die Box mit der Membran auf einem Schüttler, um eine homogene Verteilung der Waschpuffer und Lösungen zu gewährleisten. Zur Vorbereitung auf die Detektion wurde die Membran dreimal für 5 min mit jeweils 5 mL TBST unter vorsichtigem Schütteln gewaschen. 4 mL des frisch hergestellten Aktivierungsreagenzes wurden auf die Membran appliziert und 5 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die entstandene Chemilumineszenz der mit Antikörpern markierten Proteinbanden mit einem Imager zu bestimmten Zeitpunkten aufgenommen wurde. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Reagenzien für den Western-Blot ist in Tab. 5 dargestellt.

Tabelle 5. Zusammensetzung der verschiedenen Puffer für den Western-Blot

Transferpuffer	14,41 g Glycin 3,025 g Tris-Base 0,2 L Methanol Ad 1 L Wasser
Blockierungspuffer	0,1 L 10 x TBS 0,1% Tween 20 40 g Magermilchpulver Ad 1 L Wasser
10X TBS	88 g Natriumchlorid 12,1 g Tris-Base Ad 1 L Wasser pH: 8,00 mit 6 M HCl
TBS	0,1 L 10 x TBS Ad 1 L Wasser
TBST	0,1% Tween 20 Ad 1 L TBS

2.7.4 Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay

Der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen und Reduktionsäquivalente lebender Zellen in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt [159]. Eine Herabsetzung der metabolischen Aktivität geht oft mit einer ebenfalls sinkenden Viabilität der Zellen bzw. steigenden Zytotoxizität applizierter Substanzen einher [160,161]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle wässrigen und methanolischen Extrakte im MTT-Assay getestet, um in späteren Experimenten eine Extraktkonzentration zu wählen, die keinen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität und somit auch auf Transportsysteme nehmen kann.

Für die Versuche wurden 30.000 Zellen je Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und mit Zellkulturmedium, welches 20% FBS und 1% Alanin-Glutamin-Lösung enthielt, auf 630 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Well-Platten wurden 3 min auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bewegt, um eine homogene Verteilung der Zellen beim Anwachsen zu gewährleisten. Nach 48 h Inkubation erfolgte die Zugabe von 70 µl des gelösten, sterilfiltrierten Extraktes in den drei Konzentrationen 1, 0,1, und 0,01 mg/mL. Die Well-Platten wurden ebenfalls wieder 3 min geschüttelt und weitere 24 h inkubiert. Für die Viabilitätstudien nach Zugabe von 5 mM Natriumbutyrat zum Nährmedium wurden bereits

zu Beginn in 700 μL in 5% FBS-haltigem Nährmedium mit und ohne Behandlung ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 -Sättigung für 72 h inkubiert.

Schließlich wurde 300 μl einer 5 mg/ml konzentrierten MTT-Lösung zu den Wells hinzugegeben, für 3 min geschüttelt und für weitere 2 h bei 37°C und 5% CO_2 -Sättigung inkubiert. Die Lösung wurde vollständig aus jedem Well abgesaugt, 1 ml DMSO jedem Well hinzugegeben und 4 min geschüttelt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 560 nm und 620 nm UV-photometrisch vermessen. Das Experiment wurde parallel in einer zweiten Well-Platte wiederholt.

Da Inhaltsstoffe der Extrakte mit reduzierenden Eigenschaften ebenfalls eine Umbildung des MTT zu Formazan hervorrufen und somit eine zytotoxische Aktivität des Extraktes vortäuschen können [162], wurde zusätzlich die Eigenabsorption des Extraktes nach Zugabe des MTT unter gleichen Bedingungen vermessen und später in die Auswertung aufgenommen.

2.7.5 Quantifizierung der DNA mit dem Hoechst-33258-Assay

Das Bisbenzimidazol Hoechst 33258 zählt zu einer Gruppe zellkernspezifischer Farbstoffe, die in der DNA-Quantifizierung, z. B. für die Bestimmung der Zellzahl, eingesetzt werden. In Lösung zeigen die Bisbenzimide eine schwache Eigenfluoreszenz, die durch Anlagerung an die DNA von Zellen um ein Vielfaches verstärkt wird. Nach Anregung bei ca. 360 nm kann das emittierte Licht bei ca. 460 nm gemessen werden [163,164].

Am Tag des Experiments wurde jeweils eine 24-Well-Platte mit Caco-2-Zellen stichprobenartig ausgewählt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 μL Reinstwasser für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend folgten drei vollständige Einfrier-Auftau-Zyklen, wobei das in die Zelle aufgenommene Reinstwasser gefror und die Zellmembran durch Ausdehnung zerstörte. Zur Sicherstellung des messbaren Bereichs der emittierten Fluoreszenz, wurden aus jedem Well 15 μL der homogenisierten Zellsuspension in eine schwarze Mikrotiterplatte mit 96 Wells übertragen und mit 85 μL Reinstwasser auf 100 μL verdünnt. Mithilfe eines Hoechst-Assay-Kits wurde entsprechend den Herstellerinformationen eine frisch zubereitete Hoechst-33258-Lösung hinzugegeben und die DNA in den Wells nach 30 s gleichmäßigem Schütteln mittels Fluoreszenzmessung in einem Tecan-Reader quantifiziert. Zur Einschätzung von methodisch bedingten Schwankungen wurde der Variationskoeffizient bestimmt.

2.7.6 Bestimmung des Proteingehalts mit dem BCA-Assay

Für die quantitative Bestimmung des Proteingehalts wird beim BCA-Assay ausgenutzt, dass Peptidbindungen Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren können. Die einwertigen Kupferionen binden die

Bicinchoninsäure in einem farbigen Komplex, der bei einer Absorptionswellenlänge von 560 nm photometrisch vermessen werden kann [165].

Die gesammelten Zellproben wurden aufgetaut und für 10 s mit einem Vortexmischer homogen durchmischt. Gemäß der Herstellerinformation des verwendeten Kits wurden 25 µL des Zell-Lysats in die Wells einer 96-Well-Platte übertragen. Zur Kalibrierung wurden Verdünnungen mit bekannten Konzentrationen von Albumin hergestellt und ebenfalls mit einem Volumen von 25 µL in die Mikrotiterplatte mit 96 Wells übertragen. Anschließend wurden in jedem Well mit einer Multikanalpipette 200 µL des vorbereiteten Arbeitsreagenzes hinzugefügt, die 96-Well-Platte für 30 s geschüttelt, 30 min bei 37°C inkubiert und danach die Absorption der einzelnen Wells bei 560 nm vermessen.

Nach der Mengenbestimmung wurden die Proben durch Verdünnung auf einen Proteingehalt von 800 µg/mL standardisiert.

2.8 Radioanalytische Methoden

2.8.1 Durchführung der Versuche mit ³H-markierten Substraten

Für Untersuchungen zur Aufnahme und Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in Caco-2-Zellen, wurden radioaktiv markierte, authentische Substrate eingesetzt. Es wurden 400.000 Zellen pro Well in eine Mikrotiterplatte mit 24 Wells ausgesät und die Konfluenz visuell nach 24 h mithilfe eines Mikroskops überprüft. Zur Herstellung der Testlösungen wurde das ³H-markierte Substrat mit einem Puffer, der sich aus Wasser, 20 mM HEPES und 150 mM NaCl zusammensetzte und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt war, vermischt. Die radioaktiv markierten Substrate wurden in einer finalen Konzentration von 2 nM Glucose, 54 nM Fructose und 10 nM Palmitinsäure pro Well appliziert. Abhängig vom Experiment enthielten die Testlösungen den zu prüfenden Extrakt, isolierten sekundären Pflanzenstoff oder Inhibitor. Für Aufnahmestudien mit Palmitinsäure enthielt der HEPES-NaCl-Puffer zusätzlich 0,1% (m/V) fettsäurefreies Albumin. Vor Applikation der radioaktiven Testlösungen wurden die Zellen mit 2 mL HEPES-NaCl-Puffer gewaschen und anschließend während einer Hungerzeit mit 900 µL HEPES-NaCl-Puffer ohne Substrat inkubiert, um eine messbare Aufnahme der Substrate in die Zellen für den nachfolgenden Versuch zu gewährleisten. Nach der Zugabe von 100 µL der Testlösung wurde die Mikrotiterplatte umgeschwenkt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit den Testlösungen wurde die Lösung von den Zellen abgesaugt und die nicht aufgenommene, radioaktive Glucose und Fructose einmal mit 1 mL eisgekühltem HEPES-NaCl-Puffer bzw. die Palmitinsäure mithilfe des Zusatzes von 0,1% Tween 20 im Puffer abgespült. Nach Zugabe von 500 µL 1%iger Triton-X-100-Lösung in

HEPES-NaCl-Puffer pro Well, folgte für den Zellaufschluss eine Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Das Zell-Lysat wurde durch Anziehen und Ablassen mit einer Pipettenspitze homogen gemischt. Es wurden 400 μ L pro Well entnommen und zu 2 mL eines Szintillationscocktails hinzugegeben. Nach Homogenisierung mit einem Vortexer auf höchster Stufe für 20 s wurden die Proben zur Aufnahme von Glucose und Palmitinsäure für 120 s und zur Aufnahme von Fructose für 300 s im β -Counter vermessen.

2.8.1.1 Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure über drei Wochen

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen und Charakterisierung des Caco-2-Zellmodells wurde die Substrataufnahme im Verlauf der spontan auftretenden Differenzierung über 15-21 Tage untersucht. Zusätzlich wurde nach der Zugabe von 0,1 pM bis 100 μ M nicht-radioaktiven Substrats zur radioaktiven Lösung beobachtet, ob die Transporter an den Zellen eine Mindestkonzentration an Substrat benötigen, um zu arbeiten, und die Messwerte auf diese Weise erhöht werden können.

Die Experimente fanden an Tag 3, 6, 10, 15 und für Fructose und Palmitinsäure zusätzlich an Tag 21 nach Konfluenz statt.

2.8.1.2 Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure über drei Wochen mit und ohne Natriumbutyrat

Der Einfluss einer künstlich induzierten Differenzierung auf die Nährstoffaufnahme durch die Zugabe von 5 mM Natriumbutyrat zum Zellkulturmedium wurde über 15-21 Tage gemessen. Während bei Messungen mit ^3H -markierter Glucose zur Verstärkung des Signals zusätzlich mit 0,001 μ M nicht-radioaktiver Glucose supplementiert wurde, sind die Experimente mit Fructose und Palmitinsäure nur unter Verwendung des radioaktiv markierten Substrats durchgeführt worden.

Die Experimente fanden an Tag 3, 6, 10, 15 und für Fructose und Palmitinsäure zusätzlich an Tag 21 nach Konfluenz statt.

2.8.1.3 Die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure bei veränderter Temperatur

Zur Charakterisierung passiver Diffusionsprozesse wurde die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in einer Well-Platte sowohl auf Eis bei einer Temperatur $< 4^\circ\text{C}$ als auch in einer zweiten Well-Platte parallel bei 37°C durchgeführt. Die Experimente fanden an Tag 3 nach Konfluenz für Glucose und Palmitinsäure und an Tag 15 nach

Konfluenz für Fructose statt. Bei den Untersuchungen mit Fructose und Palmitinsäure wurde nur das ³H-markierte Substrat als 54 nM bzw. 10 nM Lösung und jeweils die ½- und ¼-Verdünnung verwendet. Bei den Untersuchungen mit Glucose blieb die applizierte Konzentration des radioaktiven Substrats von 2 nM im Well gleich. Diese Lösung wurde mit 0,001 µM nicht-radioaktiver Glucose bzw. deren ½- oder ¼-Verdünnung ergänzt.

Bereits während der Hungerzeit wurde die Well-Platte, die zur Messung der passiven Diffusion bei < 4°C mit Substrat behandelt werden sollte, mit HEPES-NaCl-Puffer ohne Substrat für 1 h auf Eis inkubiert. Die Testlösungen mit den verschiedenen Substratkonzentrationen wurden je nach Experiment vorgekühlt oder erwärmt appliziert und die Zellen abermals auf Eis oder bei 37°C für 1 h inkubiert.

2.8.1.4 Die Hemmung der Aufnahme durch den FATP2-Inhibitor Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen

Aufgrund der chemischen Eigenschaften von Palmitinsäure war eine Kompensation von Transporthemmungen durch passive Diffusion bei 37°C denkbar. Zur Eignungsfeststellung des Zell-Assays für Studien zur Aufnahmemehmung von Palmitinsäure wurde eine 25 µM Lösung des FATP2-Inhibitors Lipofermata im Caco-2-Modell unter verschiedenen Bedingungen getestet. Es wurde eine Vorinkubation mit dem Inhibitor ausprobiert, bei der die Zellen bereits während der Hungerzeit, in der die Zellen kein Substrat erhielten, mit einer Lösung des Inhibitors im HEPES-NaCl-Puffer inkubiert wurden, bevor das Substrat appliziert wurde. Außerdem wurden bei der nachfolgenden Inkubation mit dem Substrat kürzere Zeiten getestet. Die genauen Versuchsbedingungen sind in Tab 6 gelistet.

Tabelle 6. Die experimentellen Bedingungen für die Versuche mit dem FATP2-Inhibitor Lipofermata.

Behandlung	Hungerzeit [min]	Substratinkubationszeit [min]
25 µM Lipofermata	60	60
25 µM Lipofermata	60	10
25 µM Lipofermata	60 (Vi)	60
25 µM Lipofermata	60 (Vi)	10

Vi = Vorinkubation mit Inhibitor

2.8.1.5 *Versuche zur Kinetik der Glucose-Aufnahme*

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) ist die Assoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes und beschreibt die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) erreicht ist. Die K_M stellt ein direktes Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar. Da die Prozesse der enzymatischen Umsetzung eines Stoffes dem Mechanismus des Transports von Substanzen durch Proteine ähneln, wurden mithilfe dieser Parameter die intestinale Glucose-Aufnahme in Caco-2-Zellen charakterisiert [113]. Es wurden 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM Glucose-Lösungen mit HEPES-NaCl-Puffer angesetzt, denen die ^3H -markierte Glucose in gleicher Menge zugesetzt war. Für jede dieser Substratkonzentrationen wurden zwei weitere Lösungen hergestellt, die zusätzlich entweder 1 mM des SGLT-1-Inhibitors Phlorizin oder 0,5 mM des GLUT-2-Inhibitors Phloretin enthielten. Beide Substanzen wurden in 1% (V/V) Ethanol angelöst. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 2 mL HEPES-NaCl-Puffer gewaschen und mit HEPES-NaCl-Puffer ohne Substrat für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jede der vorbereiteten Testlösungen für 30 s, 60 s und 90 s auf die Zellen appliziert. Bei der folgenden Formel handelt es sich um die Michaelis-Menten-Gleichung [113]:

$$V = \frac{v_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit, v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_M = Michaelis-Menten-Konstante, $[S]$ = Substratmenge

Nach Erstellen des Lineweaver-Burk-Diagramms wurde zur Berechnung der K_M und v_{max} die folgende Formel verwendet [113]:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit, v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_M = Michaelis-Menten-Konstante, $[S]$ = Substratmenge

2.8.1.6 *Die Aufnahme von Glucose und Fructose unter Einfluss von Extrakten, isolierten sekundären Pflanzenstoffen und Inhibitoren*

Die Untersuchungen zum Einfluss von Extrakten, isolierten sekundären Pflanzenstoffen und Inhibitoren auf die Substrataufnahme wurden für Glucose und Palmitinsäure an Tag 3 nach

Konfluenz und für Fructose an Tag 15 nach Konfluenz durchgeführt. Während für die Experimente mit Palmitinsäure und Fructose nur das radioaktiv markierte Substrat verwendet wurde, war der ^3H -markierten Glucose zusätzlich $0,001\ \mu\text{M}$ des nicht-radioaktiven Substrats zugesetzt.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 mL HEPES-NaCl-Puffer gewaschen. Nach Applikation von $900\ \mu\text{L}$ des Puffers ohne Substrat folgte eine Hungerzeit von 1 h bei 37°C . $100\ \mu\text{L}$ der Lösungen, die Substrat und Testsubstanzen enthielten, wurden zu den Zellen hinzugegeben und nach kurzem Umschwenken der Well-Platten für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.9 Phytochemische Methoden

2.9.1 Analytische und präparative HPLC zur Fraktionierung des methanolischen Extrakts von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba*

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein empfindliches und hochauflösendes Verfahren, bei dem die Auftrennung von Stoffgemischen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften erreicht wird. Die Methode kann analytisch mit sehr kleinen Mengen der Probe zur Identifikation von Inhaltsstoffen, aber auch präparativ zur Hochreinigung von größeren Substanzmengen mit anschließender Weiterverwendung eingesetzt werden [113,166].

Aufgrund begrenzter Ausgangsmengen des methanolischen Weißkohl-Extrakts wurden mithilfe einer analytischen HPLC die Rahmenbedingungen für die anschließende, präparative HPLC festgelegt. Der pflanzliche Extrakt wurde in Fraktionen aufgetrennt und gesammelt. Die Parametereinstellungen und die Lösungsmittelgradienten für die chromatographische Auftrennung sind in den Tab. 7-8 benannt.

Tabelle 7. Parametereinstellungen für die präparative HPLC.

Solvent A	Wasser + 0,1% Ameisensäure
Solvent B	Acetonitril
Detektion	UV: 230 + 330 nm
Flow	5,00 mL/min
Säule	15QE181E2N, Eurospher II 100 10C18, $10\ \mu\text{m}$, $150 \times 30\ \text{mm}$

Tabelle 8. Lösungsmittelgradienten für die präparative HPLC.

Zeit [min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
0,00	97,00	3,00
10,00	90,00	10,00
20,00	80,00	20,00
25,00	60,00	40,00
35,00	50,00	50,00
40,00	40,00	60,00
45,00	30,00	70,00
50,00	10,00	90,00
60,00	97,00	3,00
70,00	97,00	3,00

2.9.2 LC-MS-Methoden zur Untersuchung des methanolischen Extrakts von *Brassica oleraceae var. capitata L. f. alba*

Die Massenspektrometrie ist ein sehr genaues Verfahren zur Bestimmung der exakten Masse eines Moleküls. Die Kopplung mit einer chromatographischen Methode ermöglicht vor der Analyse die Auftrennung eines komplexeren Gemisches. Nach der Erzeugung von Ionen z. B. mit der ESI-Methode, werden die Teilchen im elektrischen Feld beschleunigt und können fragmentiert werden, bevor das genaue Masse-Ladungs-Verhältnis der Precursor- bzw. Fragment-Ionen detektiert wird [113]. Die grundlegenden Einstellungen für die nachfolgenden QQQ- bzw. Q-TOF-MS-Messungen sind in Tab. 9 dargestellt. Da die Parameter zur Messung im positiven und negativen Modus am Triple-Quadrupol identisch waren, wurden sie nicht getrennt aufgeschlüsselt.

Tabelle 9. Einstellungen für die MS-Messungen mit dem QQQ und Q-TOF.

Mass Detector	Triple Quadrupol MS (QQQ)		Quadrupol Time of Flight (Q-TOF)
Ionisationsquelle	Dual Jet Stream Technology Ion Source (AJS) and Electrospray Ionization (ESI)		
Gas Temperatur [°C]	260	260	240
Gas Flow [L/min]	15	15	18
Nebulizer [psi]	30	30	30
Sheath Gas Temperatur [°C]	380	380	380
Sheath Gas Flow [L/min]	12	12	12
Capillary [V]	4000	4000	k. A
VCharging [V]	1000	1000	k. A

k. A. = keine Angabe

2.9.2.1 Die Identifizierung von Inhaltsstoffen

Für die Identifizierung von Inhaltsstoffen wurden die einzelnen Fraktionen mithilfe der QQQ-MS auf Referenzsubstanzen untersucht. Zur genaueren Untersuchung von Fraktion 2 des methanolischen Weißkohl-Extrakts wurde die Q-TOF-MS verwendet. Beiden Verfahren war eine chromatographische Auftrennung durch eine LC vorgeschaltet, deren Einstellungen und Lösungsmittelgradienten in den Tab. 10-11 ersichtlich sind.

Tabelle 10. Parameter für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung von Fraktion 1-9 und der LC-Q-TOF-MS-Messung von Fraktion 2.

Solvent A	Wasser + 0,1% Ameisensäure
Solvent B	Acetonitril
Flow	0,250 mL/min
Säule	Poroshell 120 EC-C18, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm

Tabelle 11. Lösungsmittelgradienten für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung von Fraktion 1-9 und der LC-Q-TOF-MS-Messung von Fraktion 2.

Zeit [min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
15,00	50,00	50,00
18,00	5,00	95,00
22,00	5,00	95,00
22,01	100,00	0,00
25,00	100,00	0,00

Für die Messungen der isolierten sekundären Pflanzenstoffe als Referenzsubstanzen mit der Triple-Quadrupol-MS sind die spezifischen Einstellungen in Tab. 12 aufgeschlüsselt.

Tabelle 12. Einstellungen für die QQQ-MS-Messungen von Referenzsubstanzen. Neben dem Ionisierungsmodus und den Precursor-Ionen sind für jede Substanz zwei Fragment-Ionen (Qualifier und Quantifier) angegeben, die mithilfe einer bestimmten Kollisionsenergie erzeugt wurden.

Referenzsubstanz	Ionisierungsmodus	Precursor-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z] (CE [eV])	
			Qualifier	Quantifier
Catechin	Positiv	291,1	123,0 (40)	139,0 (16)
Chlorogensäure	Negativ	353,1	84,9 (48)	190,8 (12)
Ferulasäure	Negativ	193,1	178,0 (12)	133,9 (16)
Gallussäure	Negativ	169,0	79,0 (28)	124,9 (12)
Glucoraphanin	Negativ	436,0	96,7 (32)	372,2 (20)
3,4-Dihydroxycimtsäure	Negativ	179,0	91,1 (28)	135,0 (16)
Kämpferol	Negativ	285,0	151,1 (20) 198,9 (24)	257,0 (20)
Progoitrin	Negativ	388,0	74,9 (40)	97,0 (28)
Quercetin	Negativ	301,0	178,9 (20) 65,0 (68)	151,2 (24)
Rutin	Negativ	609,1	271,0 (72)	300,1 (36)
Sinapinsäure	Negativ	223,1	164,2 (16)	208,0 (12)

CE = collision energy

Die verwendete Kollisionsenergie für die Messung der Fraktion 2 mit der Q-TOF-MS wurde automatisch mithilfe von AutoMS bestimmt (Ramped Collision Energy mit Charge: all, Slope: 5 und Offset: 3). Es wurden Signale von Ionen mit m/z zwischen 50 und 1000 aufgenommen.

2.9.2.2 Die Quantifizierung von Hexosen

Aufgrund der mangelnden Fragmentierung wurde die Quantifizierung der im Q-TOF identifizierten Hexosen in Fraktion 2 des methanolischen Extrakts von Weißkohl mithilfe des Precursor-Ions $[M+Na]^+$ bei m/z 203,0 im SIM mit der Triple-Quadrupol-MS durchgeführt. Die Einstellungen und die Gradienten für die vorgeschaltete LC sind in den Tab. 13-14 dargestellt.

Tabelle 13. Parameter für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung zur Quantifizierung von Hexosen.

Solvent A	Wasser + 0,1% Ameisensäure
Solvent B	Acetonitril
Flow	0,350 mL/min
Säule	Poroshell 120 EC-C18, 1,9 μ m, 2,1 x 50 mm

Tabelle 14. Lösungsmittelgradienten für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung zur Quantifizierung von Hexosen.

Zeit [min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
2,00	10,00	90,00
4,00	10,00	90,00
4,01	95,00	5,00
7,00	95,00	5,00

2.10 Statistische Methoden und Verwendung von Software

Die rechnerische und statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels Microsoft Excel. Bei Vorliegen einer Normalverteilung nach manueller Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten mit der Funktion der Datenanalyse von Microsoft Excel im Zweistichproben-F- und -T-Test ausgewertet. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden sie manuell im Mann-Whitney-U-Test auf einen signifikanten Unterschied geprüft.

Die chemischen Strukturen wurden mithilfe der Software ChemDraw gezeichnet.

Die IC₅₀-Werte wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5.0 berechnet.

Unter Verwendung der Software ImageJ wurden die Farben der Fotos nach dem Immunassay invertiert und die Intensität der Banden ausgewertet.

Die Chromatogramme der präparativen HPLC entstammen der Shimadzu-Software.

Die Bearbeitung und Erstellung von Abbildungen erfolgte durch Anwendung der Microsoft-Programme PowerPoint und Paint.

Die Auswertung der LC-MS-Daten erfolgte mit der Software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0, von der auch die graphischen Darstellungen der Messungen stammen.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Veränderungen bei Caco-2-Zellen durch Differenzierungsprozesse

Die Differenzierung der Caco-2-Zellen verändert ihr morphologisches Erscheinungsbild. Nach Erreichen der Konfluenz ist die Entstehung von gewölbartigen Strukturen (Domes) visuell leicht erkennbar [129] in unbehandelten Zellen. In den Fotos der Abb. 5 sind die mikroskopischen Zellpräparate der ersten 4 Tage nach Konfluenz mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung dargestellt.

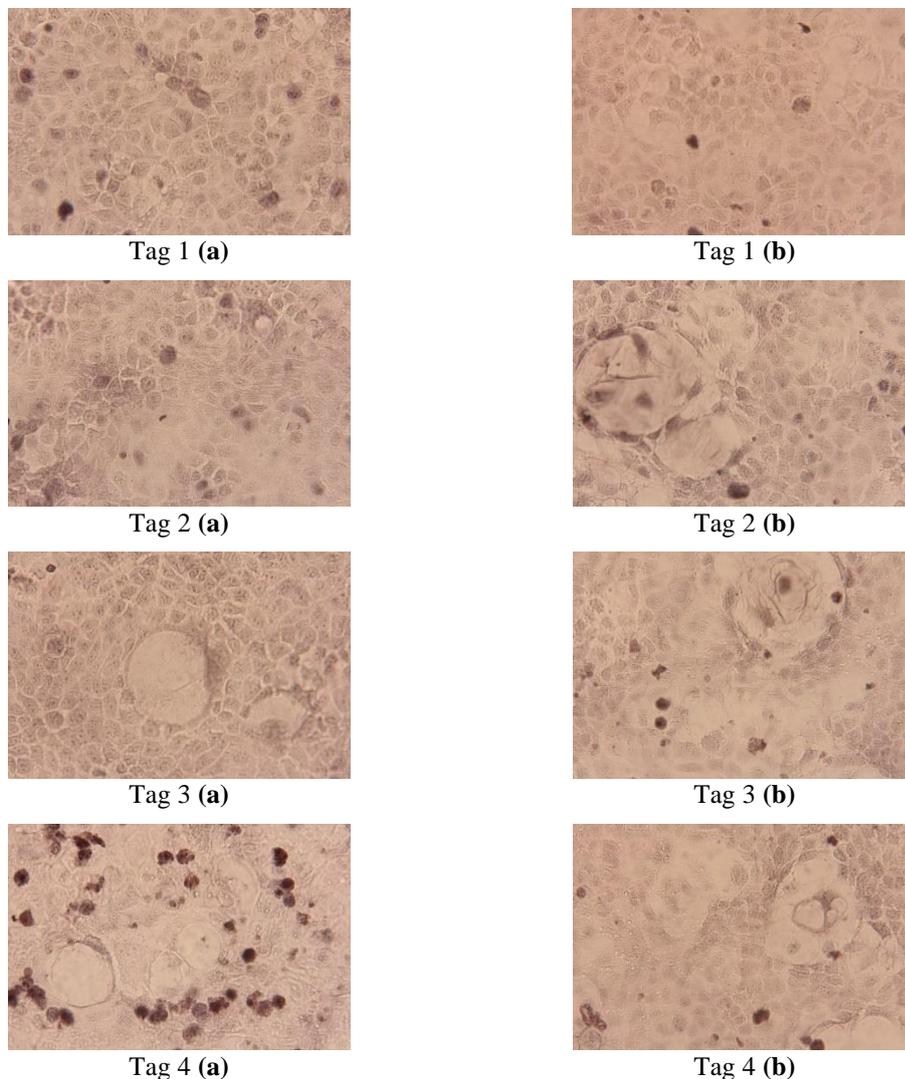


Abbildung 5. Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung von Caco-2-Zellen nach Hämatoxylin-Anfärbung an den ersten vier Tagen nach Konfluenz (a) ohne Natriumbutyrat und (b) mit Natriumbutyrat.

Deutlich erkennbar ist die Bildung der kuppelartigen Strukturen nicht nur an Tag 3 nach Konfluenz bei den Zellen ohne Natriumbutyrat Behandlung, sondern bereits an Tag 2 nach Konfluenz in den Präparaten mit Zugabe des Differenzierungsreagenzes.

3.2 Untersuchungen zur Expression intestinaler Glucose-, Fructose- und Palmitinsäure-Transporter im Caco-2-Modell

Die Messung zur Expression von Transportproteinen mit der Western-Blot-Methode wurde in Vorbereitung auf Studien zur Substrataufnahme durchgeführt. Sie dienten der Sicherstellung der Eignung des Caco-2-Modells für die vorliegende Aufgabenstellung durch den qualitativen Nachweis entsprechender Transporter. Die semiquantitative Auswertung der detektierten Banden ermöglichte eine Aussage zur Expression der Transporter während der Differenzierungszeit innerhalb von drei Wochen zu treffen.

Es wurden drei Zyklen zur Probengewinnung aus der Zellkultur über 21 Tage nach Eintritt der Konfluenz durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Zellansätze parallel mit und ohne 5 mM Natriumbutyrat behandelt. Nachdem die Proteinproben aufbereitet, im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Western-Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen worden waren, wurden die gesuchten Banden nach der Antikörperbehandlung durch Chemilumineszenz detektiert. Die Fotoaufnahmen der Chemilumineszenz in den Abb. 6, 7, 9, 10, 12 und 13 wurden zur besseren Anschaulichkeit farblich invertiert, sodass die Proteine als schwarze Banden auf weißem Untergrund in umgekehrter Farbreihenfolge zum Original erscheinen. Wie bereits in Tab. 4 im Abschnitt 2.7.3.2 dargestellt, wurden die Proben eines Zyklus auf zwei Polyacrylamid-Gele verteilt. Mit dem Ziel das Zellexperiment zeitlich zu verkürzen und somit zu vereinfachen, wurde die Probe vom Tag 4 ohne Natriumbutyrat ausgewählt und auf beide Gele für die Detektion eines Transporters appliziert. Unter Verwendung der Relationen zu Tag 4 ohne Natriumbutyrat konnten so die Intensitäten der Banden auch zwischen den Gelen verglichen werden. Jeder untersuchte Transporter konnte im Western-Blot qualitativ nachgewiesen werden. Im Rahmen der zusätzlichen semiquantitativen Begutachtung konnten die SGLT-1-Banden mithilfe von statistischen Tests ausgewertet werden. Trotz vieler Messungen, waren insbesondere GLUT-2 und FATP-2 lediglich als schwache Banden zu detektieren, die mit diverser Software nicht quantifizierbar waren. Sie wurden daher nur visuell auf Grundlage der Fotoaufnahmen ausgewertet. Die Banden der Transportproteine GLUT5 und FATP4 waren z. T. ausreichend für die visuelle Auswertung mit der Software.

3.2.1 Inprozesskontrolle mit β -Actin

Zur Sicherstellung des korrekt durchgeführten Aufarbeitungsprozesses der Proben wurde das nativ enthaltene Protein β -Actin gemessen. Mithilfe des Housekeeping-Proteins konnten u. a. der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran und die gleichmäßige Proteinbeladung der Probentasche überprüft werden, was in Abb. 6 visualisiert ist. Der Variationskoeffizient der Bandenstärke des β -Actin innerhalb eines Gels schwankte von 3,8 bis 7,5% ($n=6$) und zwischen den Gelen von 5,1 bis 15,4% ($n=3$). Somit war eine Vergleichbarkeit der Banden untereinander mit zelltypischen Abweichungen gegeben.

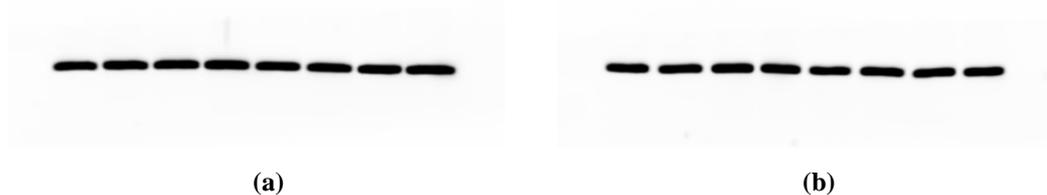


Abbildung 6. Chemilumineszierende Proteinbanden des β -Actins mit einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa nach 30 s Belichtungszeit. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat [167].

3.2.2 Expression der Monosaccharid-Transporter SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5

Für die Detektion des SGLT-1 wurde ein polyklonaler Primärantikörper verwendet, der auch unspezifisch an Epitope anderer Proteine binden kann. Trotz zarter Nebenbanden sticht eine Proteinbande auf Höhe der Markierung von 73 kDa in Abb. 7 hervor und ist als SGLT-1-Bande identifizierbar.

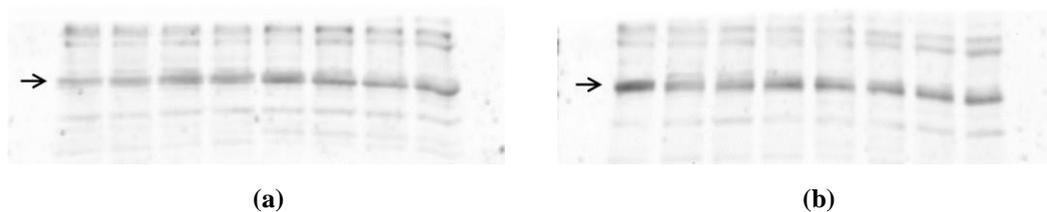


Abbildung 7. Chemilumineszierende Proteinbanden des SGLT-1 nach 8 min Belichtungszeit. Die Pfeile indizieren die zur statistischen Auswertung herangezogene Bande bei ca. 73 kDa. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat.

Nach visueller Betrachtung nahmen die exprimierten SGLT-1-Proteine über den Zeitraum der Probennahme sowohl in den Zellen mit Natriumbutyrat-Zugabe, als auch in der unbehandelten Gruppe schwach ab, wie in Abb. 8 dargestellt. Nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Tag 1 und den anderen Probennahmetagen und zwischen den beiden Behandlungsgruppen (ohne und mit Natriumbutyrat-Zugabe) an den einzelnen Tagen festgestellt werden ($n=5$; zweiseitig, $\alpha=0,05$, \pm Spannbreite).

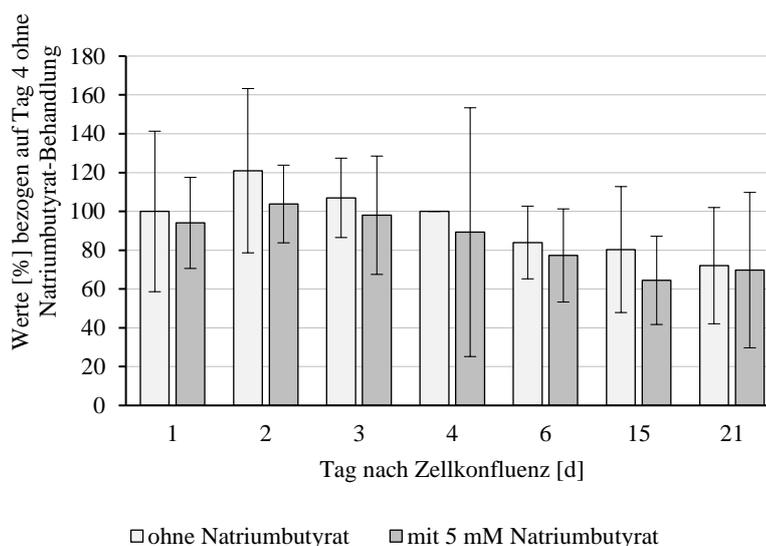


Abbildung 8. Die Expression von SGLT-1 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung. Es gab an keinem der Probennahmetage einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression des SGLT-1 zwischen Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests; * signifikanter Unterschied, $n=5$, zweiseitig, $\alpha=0,05$, \pm Spannbreite

Für die Detektion des Glucose- und Fructose-Transporters GLUT-2 wurde zuerst ein monoklonaler Primärantikörper verwendet. Trotz hoher Proteinbeladung der Geltaschen im Western-Blot konnte durch diesen nach Applikation des Sekundärantikörpers kein ausreichend hohes chemilumineszierendes Signal auf der Membran erreicht werden. Nach Austausch mit einem polyklonalen Primärantikörper wurden mehrere, zum Teil unspezifische, schwache Banden detektiert. Das stärkste Signal auf der Membran in Abb. 9, das die Bande an der unteren Markierung bei 48 kDa zeigt, wurde zusammen mit der oberen, schwächeren Proteinbande, die an der erwarteten Markierung bei 57 kDa verläuft, den Proteinen von GLUT-2 zugeordnet. Die Banden der mit Natriumbutyrat behandelten Zellproben sind sichtbar schwächer als die Banden der unbehandelten Proben. Innerhalb einer Behandlungsgruppe war visuell nur ein schwacher Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zu erkennen.

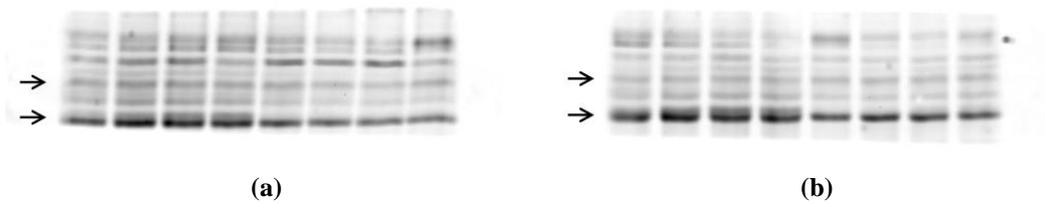


Abbildung 9. Chemilumineszierende Proteinbanden des GLUT-2 nach 8 min Belichtungszeit. Die Pfeile indizieren die zur visuellen Auswertung herangezogenen Banden. Die obere Bande entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 57 kDa, während die untere Bande ein Molekulargewicht von ungefähr 48 kDa aufweist. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat.

Die GLUT-5-Bande konnte mit einem monoklonalen Primärantikörper nicht detektiert werden, woraufhin im neuen Versuch ein polyklonaler Primärantikörper verwendet wurde. Die Fotos der Abb. 10 zeigen vor allem zwei starke Banden jeweils ober- und unterhalb der an der Markierung verlaufenden, schwächeren Bande mit stark ausgeprägten Chemilumineszenz-Signalen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um GLUT-5-Proteinbanden handelt.

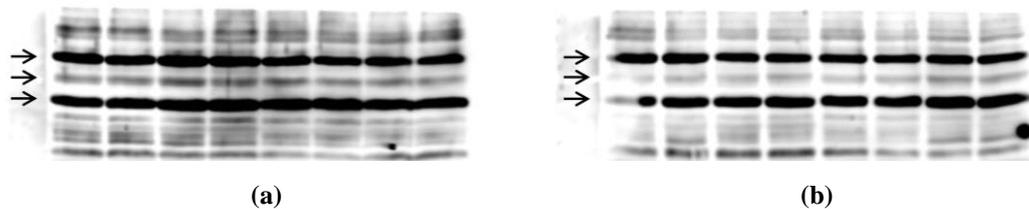


Abbildung 10. Chemilumineszierende Proteinbanden des GLUT-5 nach 30 s Belichtungszeit. Die Pfeile indizieren die zur visuellen Auswertung herangezogenen Banden. Die zweite Bande (von oben nach unten) entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 56 kDa. Die erste Bande weist ein Molekulargewicht von ca. 63 kDa auf und die dritte Bande von ca. 50 kDa. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat.

Das Vorhandensein von GLUT-5 scheint, wie in der Ausprägung der Chemilumineszenz-Signale in Abb. 11 erkennbar, über den Zeitraum von drei Wochen in den Zellen mit Natriumbutyrat-Zugabe und in der unbehandelten Gruppe schwach zu ansteigen. Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war visuell nicht feststellbar.

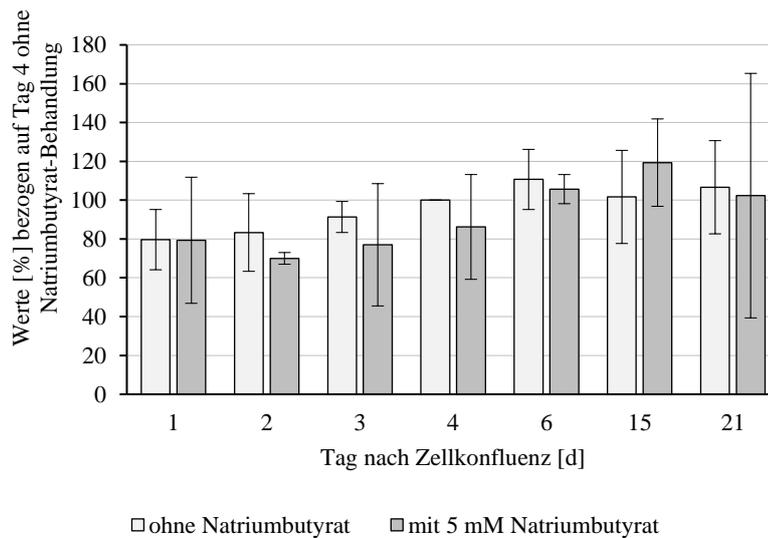


Abbildung 11. Die Expression von GLUT-5 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung; n=3, \pm Spannweite

3.2.3 Expression der Fettsäure-Transporter FATP-2 und FATP-4

Der FATP-2 war in den Zellproben wenig exprimiert. Dennoch ließ er sich bei ausreichender Proteinbeladung nachweisen. Wie die Abb. 12 zeigt, ist nach elektrophoretischer Auftrennung und Proteintransfer die Transportproteinbande von FATP-2 auch visuell deutlich auf Höhe des markierten Bereichs von unspezifischen Signalen zu unterscheiden. Die Fotos von FATP-2 nach dem Western-Blot zeigen bei visueller Betrachtung, vor allem an den Tagen 3 und 4 im ersten Gel, an Tag 21 im zweiten Gel ohne Natriumbutyrat und an Tag 4 im ersten Gel mit Natriumbutyrat-Behandlung, stärkere Signale als an den anderen Tagen. Das lässt einen Trend vermuten, bei dem FATP-2 im Verlauf der Zeit geringfügig stärker exprimiert werden. Jedoch sticht keine der Behandlungsarten durch stärkere Banden hervor.

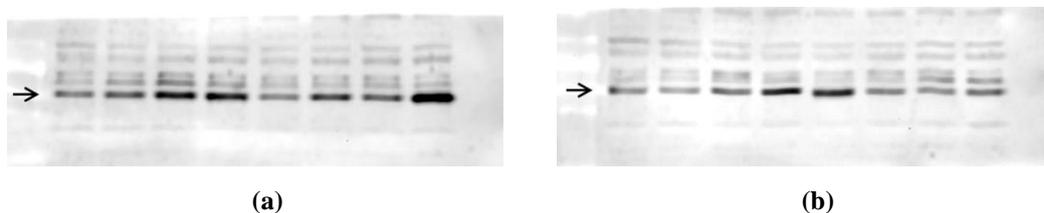


Abbildung 12. Chemilumineszierende Proteinbanden des FATP-2 nach 8 min Belichtungszeit. Der Pfeil indiziert die zur visuellen Auswertung herangezogene Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat [167].

In Abb. 13 sind die FATP-4-Proteine eindeutig als starke Bande auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 72 kDa identifizierbar.

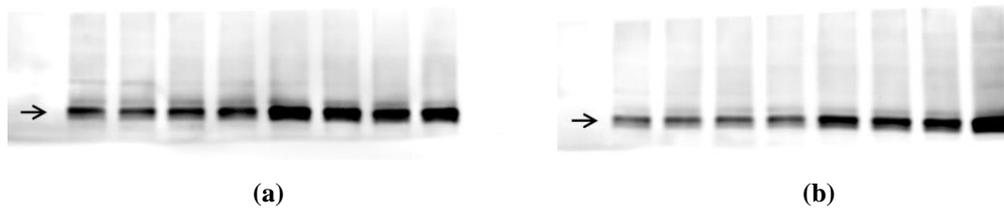


Abbildung 13. Chemilumineszierende Proteinbanden des FATP-4 nach 3 min Belichtungszeit. Der Pfeil indiziert die zur visuellen Auswertung herangezogene Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 72 kDa. **(a)** Erstes Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 1, 2, 3, 4 ohne Natriumbutyrat und Tag 1, 2, 3, 4 mit Natriumbutyrat. **(b)** Zweites Gel von links nach rechts: Proben vom Tag 4, 6, 15, 21 ohne Natriumbutyrat und Tag 4, 6, 15, 21 mit Natriumbutyrat [167].

Visuell konnte in Abb. 13-14 eine stärkere Proteinexpression von FATP-4 bei den Proben mit Natriumbutyrat-Behandlung im Vergleich zu unbehandeltem Zellmaterial festgestellt werden. Innerhalb einer Behandlungsgruppe wirkte die Intensität der Banden über 21 Tage Differenzierungszeit nahezu gleichbleibend mit leichtem Anstieg bei den Zellen mit Natriumbutyrat.

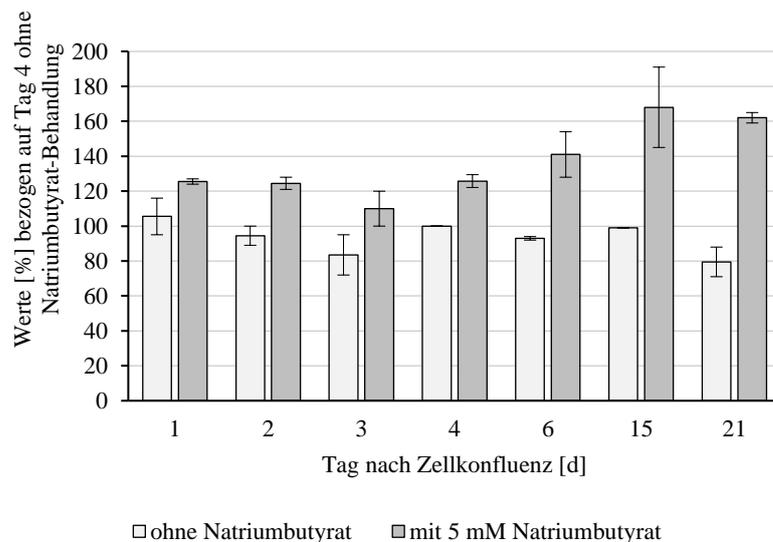


Abbildung 14. Die Expression von FATP-4 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung; n=2, \pm Spannweite

3.3 Charakterisierung der intestinalen Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure im Caco-2-Modell

Nachdem die Expression der Transportproteine von SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität der Transporter durchgeführt. Zur Charakterisierung des Modells und Optimierung eines Zell-Assays für die Substrataufnahme wurde die Absorption von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in Enterozyten über 21 Tage mit und ohne Zugabe von Natriumbutyrat gemessen. Weitere Studien zur Substrataufnahme bei veränderter Temperatur und zur Kinetik mit Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für den Glucose-Transport in Caco-2-Zellen wurden vorgenommen.

3.3.1 Untersuchung zur Substrataufnahme über 15 bis 21 Tage

Um gegebenenfalls eine erforderliche Mindestmenge an Substrat für die Aktivität der Transporter zu gewährleisten, wurde die Konzentration der nicht-radioaktiv markierten Substrats in Potenzschritten variiert. Die Zugabe des ³H-markierten Substrats blieb dabei gleich. Die Experimente fanden im Rahmen der Voruntersuchungen für die später durchgeführten Aufnahmestudien statt und waren u. a. durch die eine aufwändige Vorbereitung und Anzucht großer Mengen an Zellen sehr zeitintensiv. Aus diesem Grund wurden diese Zell-Experimente jeweils nur einmal durchgeführt, weshalb hier keine Aussage über die Signifikanz auf Grundlage statistischer Tests gemacht werden kann. Dennoch stellen diese Studien zur Funktionalität der untersuchten Transporter über die Differenzierungszeit wichtige Untersuchungen im Rahmen der Charakterisierung des Caco-2-Modells dar.

Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigte die Glucose-Aufnahme an Tag 3 nach Konfluenz die höchsten Messwerte und sank bis Tag 15 nach Konfluenz kontinuierlich auf die Hälfte ab. Aufgrund der starken Verminderung des apikalen Transports nach Tag 15 wurde die Untersuchung darüber hinaus nicht fortgeführt.

Im Gegensatz zu den Glucose-Transportern war für die Fructose-Transporter mit fortgeschrittener Differenzierung ein Anstieg der Funktionalität zu verzeichnen. Abb. 16 zeigt, dass die Fructose-Aufnahme an Tag 3 nach Konfluenz die kleinsten Messwerte aufwies, die bis zum Tag 15 und Tag 21 nach Konfluenz auf etwa das Dreifache anstiegen. Zwischen Tag 15 und Tag 21 nach Konfluenz zeigten sich keine weiteren großen Veränderungen, weshalb in Bezug auf eine verkürzte Experimentdauer Tag 15 nach Konfluenz für weitere Transportstudien geeignet erschien. Wie in Abb. 17 graphisch

dargestellt, gab es zwischen Tag 3 und Tag 21 nach Konfluenz nur geringe Unterschiede beim apikalen Palmitinsäure-Transport in die Zelle, weshalb weitere Studien zur Aufnahme auch an Tag 3 nach Konfluenz durchgeführt wurden.

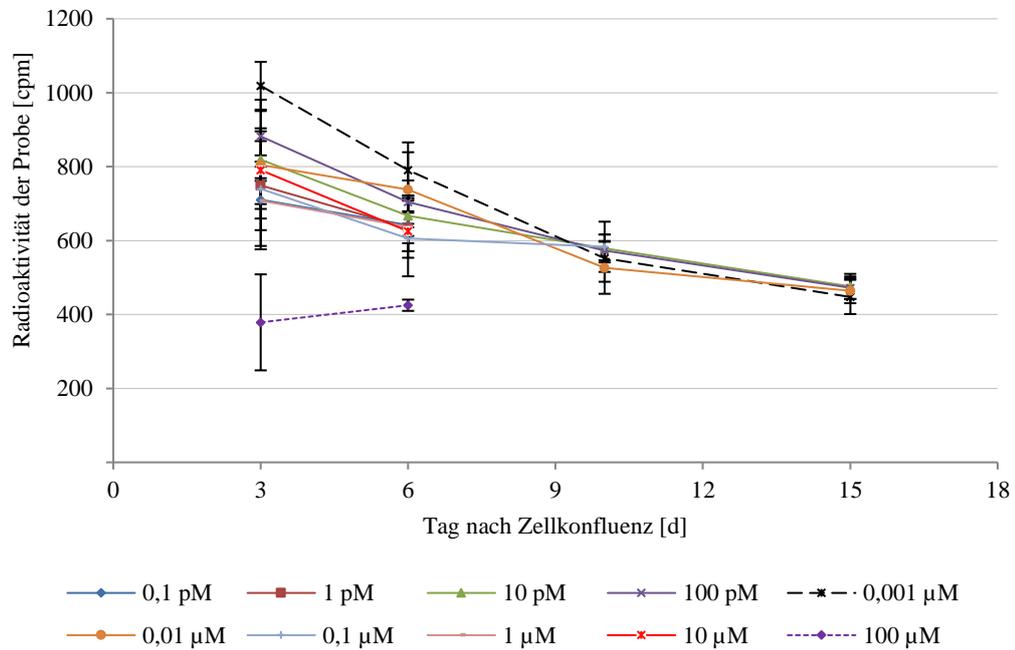


Abbildung 15. Aufnahme von Glucose über 15 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration des radioaktiv markierten Substrats und unter Zugabe von 0,1 pM-100 µM nicht-radioaktiver Glucose; n=1 mit 4 Wiederholungen, ± Spannweite

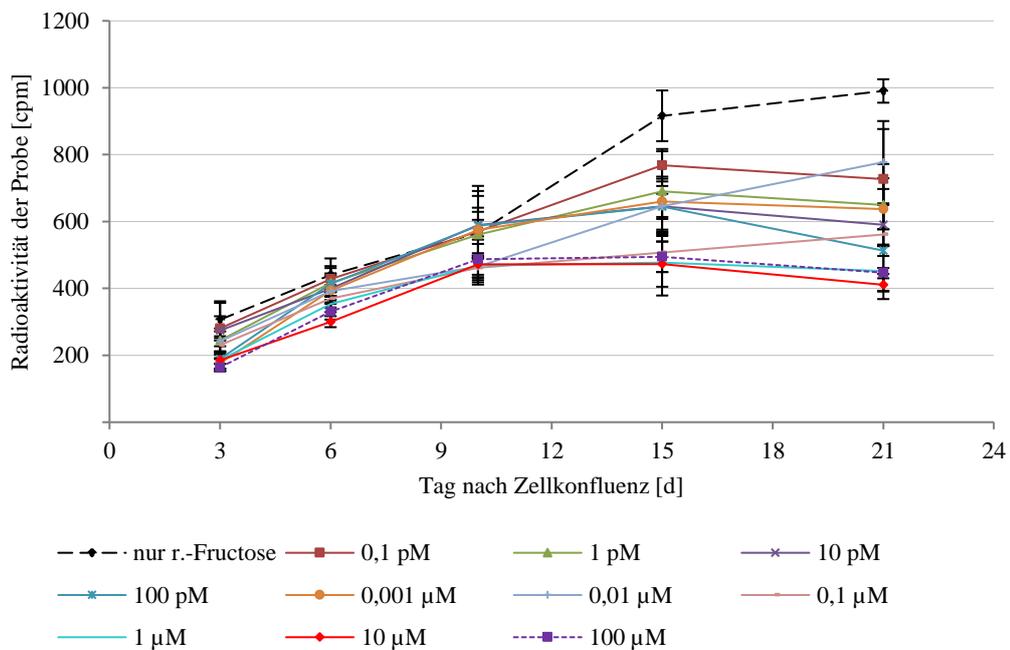


Abbildung 16. Aufnahme von Fructose über 21 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration der radioaktiv markierten Fructose (r.-Fructose) und unter Zugabe von 0,1 pM-100 µM nicht-radioaktiven Substrats; n=1 mit 4 Wiederholungen, ± Spannweite

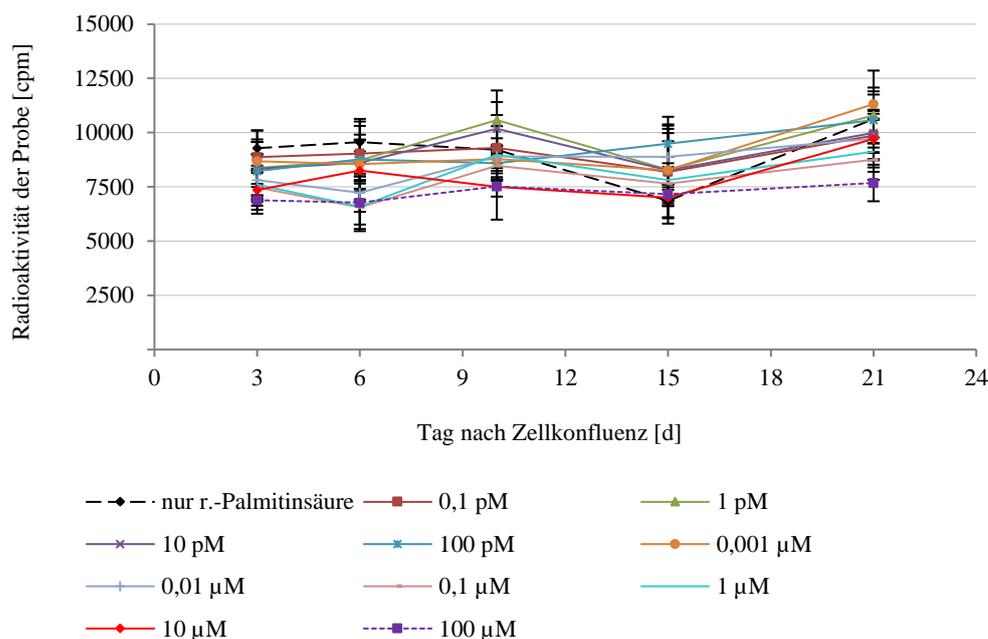


Abbildung 17. Aufnahme von Palmitinsäure über 21 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration der radioaktiv markierten Palmitinsäure (r.-Palmitinsäure) und unter Zugabe von 0,1 pM-100 µM nicht-radioaktiven Substrats; n=1 mit 4 Wiederholungen, ± Spannbreite

Um gegebenenfalls eine benötigte Mindestkonzentration an Substrat für die Aktivität der Transporter zu gewährleisten und somit höhere Messwerte zu erzielen, wurde mit nicht-radioaktiven Substraten supplementiert. Die Supplementierung mit nicht-radioaktivem Substrat zeigte bei den einzelnen Substraten, wie in den Abb. 15-17 dargestellt, unterschiedliche Effekte. Während bei der Glucose-Aufnahme an Tag 3 nach Konfluenz mit 0,001 µM nicht-radioaktiver Glucose die höchsten radioaktiven Signale gemessen wurden, ergaben sich für die Durchführung der Aufnahmestudien von Fructose an Tag 15 und Tag 21 nach Konfluenz höhere Messwerte unter alleinigem Einsatz des ^3H -markierten Substrats. Für die Aufnahmestudien mit Palmitinsäure an Tag 3 nach Konfluenz wurden visuell nur geringe Unterschiede zwischen Messungen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen festgestellt, weshalb eine Supplementierung sich nicht lohnte. Die Ergebnisse nahmen Einfluss auf die Durchführung weiterer Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

3.3.2 Untersuchung zur Substrataufnahme mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung über 15 bis 21 Tage

Wie die Ergebnisse in Abb. 18 zeigen, hat die Zugabe einer 5 mM Lösung des Differenzierungsreagenzes Natriumbutyrat zum Nährmedium keine wesentlich positiven Effekte auf die Vereinfachung der Zellkulturexperimente, wie z. B. eine verkürzte

Differenzierungszeit. Während Natriumbutyrat die Differenzierung der Caco-2-Zellen fördert, vermindert es das Zellwachstum und führt vermehrt zu apoptotischen Prozessen [148]. Die dargestellten Ergebnisse in Abb. 18 beziehen sich bereits auf denselben Proteingehalt, der anhand eines BCA-Assays parallel bestimmt wurde. Dieser Proteingehalt lag bei behandelten Zellen im Durchschnitt zwischen 17-38% je Well niedriger als bei unbehandelten Proben.

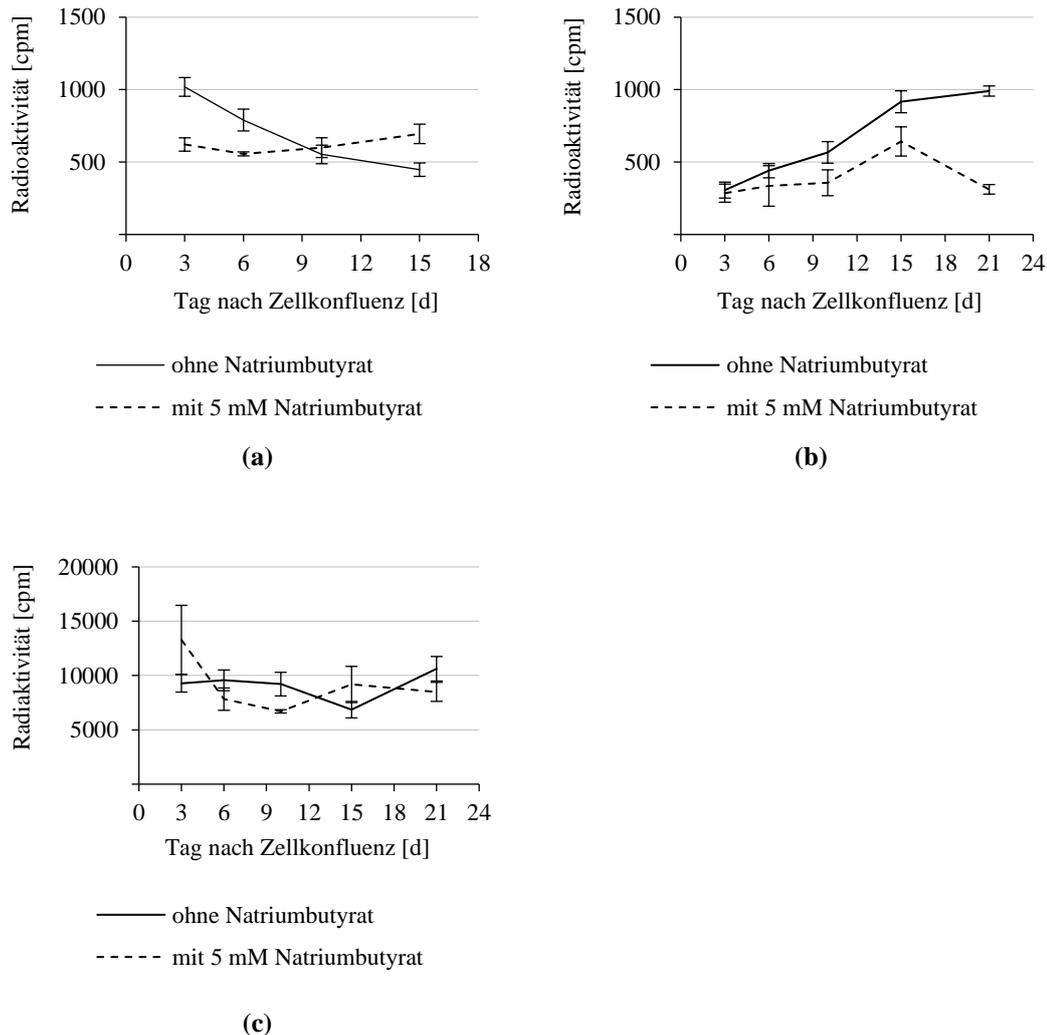


Abbildung 18. Die Aufnahme von (a) Glucose, (b) Fructose und (c) Palmitinsäure mit und ohne das Differenzierungsreagenz Natriumbutyrate über 15 – 21 Tage in Caco-2-Zellen; n=1 mit 4 Wiederholungen, ± Spannweite

3.3.3 Untersuchung zur Substrataufnahme bei veränderter Temperatur

Die Aufnahme von Nährstoffen in den Enterozyten funktioniert über verschiedene Wege. Die Substrate können je nach ihren chemischen Eigenschaften und ihrer Molekülgröße

parazellulär oder transzellulär mithilfe von passiver Diffusion oder durch aktive bzw. passive Transporter in die Zelle gelangen [168]. Um den Einfluss der passiven Diffusionsprozesse auf die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in die Zelle festzustellen, wurden Experimente mit drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen auf Eis ($<4^{\circ}\text{C}$) durchgeführt. Aufgrund der stark verminderten Aktivität von Proteinen, z. B. Enzyme oder Transporter, bei Temperaturen $<4^{\circ}\text{C}$, wird die passive Diffusion unter diesen extremen Bedingungen getestet, um eine Substrataufnahme durch Transportprotein ausschließen bzw. abschätzen zu können [169]. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt und zeigen eine signifikante Verminderung der Aufnahme von Fructose und Palmitinsäure bei Durchführung der Experimente auf Eis. Jedoch ist im Vergleich zu den Studien bei 37°C die Aufnahme von Glucose in die Darmzellen unter den Bedingungen bei $<4^{\circ}\text{C}$ signifikant erhöht.

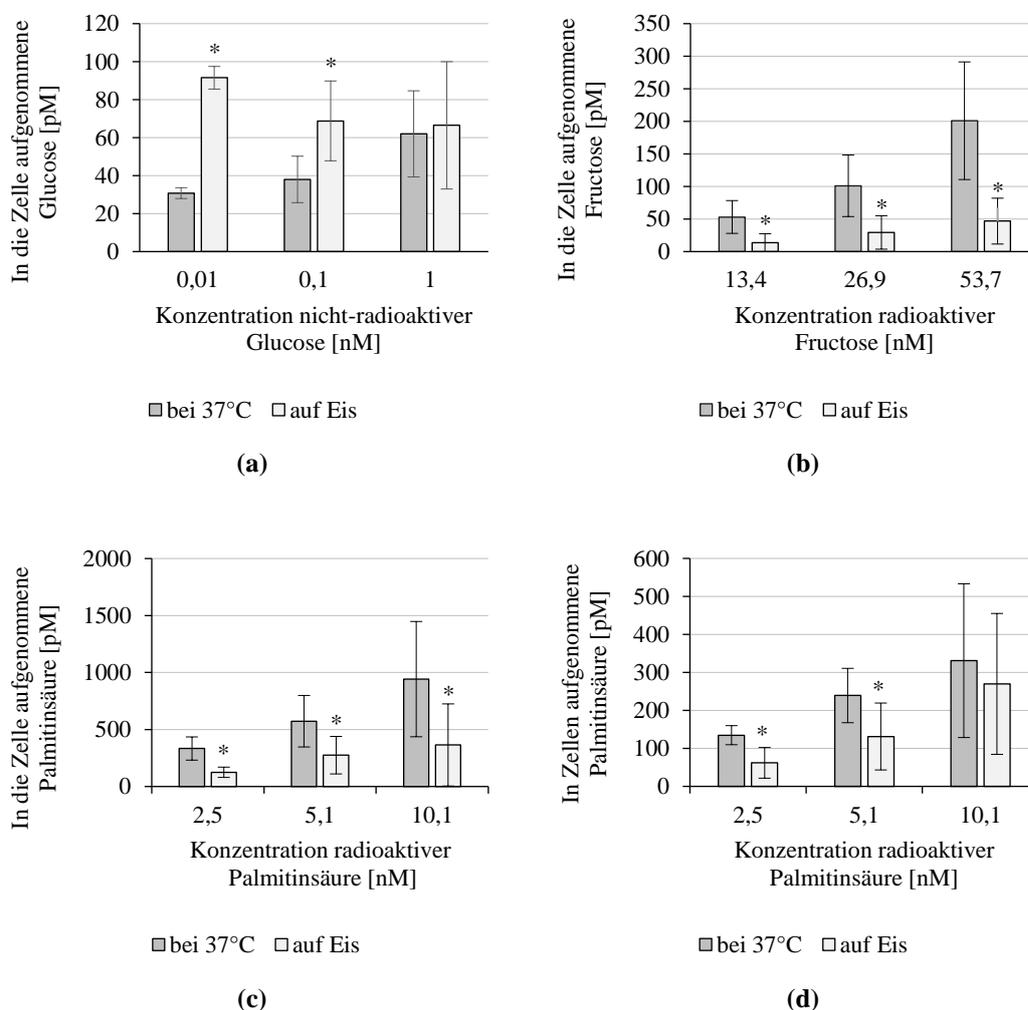


Abbildung 19. Die Aufnahme von (a) Glucose, (b) Fructose, (c) Palmitinsäure nach 1 h und (d) Palmitinsäure nach 10 min Inkubationszeit mit dem Substrat in Caco-2-Zellen bei 37°C und auf Eis; * signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Tests, $n=2$ mit 6-8 Wiederholungen, \pm Spannweite.

Die Substrataufnahme auf Eis beträgt bei Glucose $195,3\% \pm 95,9$, bei Fructose $26,0\% \pm 2,9$, bei Palmitinsäure nach 1h $41,4\% \pm 5,8$ und nach 10 min $60,8\% \pm 18,5$ im Vergleich zur Aufnahme bei 37°C .

Im Ergebnis war die passive Diffusion von Fructose und Palmitinsäure unter den Bedingungen mit 1 h Hungerzeit und anschließender Substrat-Inkubation von 1 h bei jeder getesteten Konzentration signifikant geringer und somit unterscheidbar von der Aufnahme durch Transporter bei 37°C . Allerdings machte die passive Diffusion bei der Fructose-Aufnahme etwa 30% und bei der Palmitinsäure-Aufnahme etwa 40% der gesamten Substrataufnahme aus. Nach Verkürzung der Substrat-Inkubationszeit auf 10 min, erhöhte sich der Anteil der passiven Diffusion für die Palmitinsäure-Aufnahme sogar auf etwa 60%. Die Glucose-Aufnahme war bei den niedrigen Konzentrationen unter einer Temperatur $< 4^{\circ}\text{C}$ signifikant höher als bei Körpertemperatur, was möglicherweise auf die unentbehrliche Stellung der Glucose als Hauptenergielieferant besonders in Stresssituationen, wie z. B. unter Kälte-Einfluss, zurückgeführt werden kann.

Der Koeffizient D, der die passive Diffusion in die Zelle beschreibt, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$D = \frac{C_a}{t \cdot C_i \cdot m_p}$$

C_a = Konzentration des aufgenommenen Substrats in der Zelle [mol], t = Inkubationszeit [h], C_i = Anfangskonzentration des Substrats im System [mol], m_p = Proteinmasse [mg]

Für den Koeffizient D ergeben sich die Werte von $0,1884 \pm 0,0625 \text{ (h} \cdot \text{mg)}^{-1}$ für Glucose, $0,0061 \pm 0,0007 \text{ (h} \cdot \text{mg)}^{-1}$ für Fructose, $0,2874 \pm 0,0584 \text{ (h} \cdot \text{mg)}^{-1}$ für Palmitinsäure nach 1 h Inkubationszeit und $0,9491 \pm 0,0418 \text{ (h} \cdot \text{mg)}^{-1}$ für Palmitinsäure nach 10 min Inkubationszeit in Caco-2-Zellen ($n=3$, \pm SD).

Aufgrund chemischer Eigenschaften, wie z. B. die Löslichkeit in Wasser, wird die Relevanz der passiven Diffusion bei 37°C hinsichtlich Kompensationsmechanismen bei einer Hemmung der Transporter für Glucose und Fructose wesentlich geringer eingeschätzt als für Palmitinsäure. Ob eine Hemmwirkung durch passive Diffusion für die beschriebenen Aufnahme-Assays kompensiert und somit maskiert werden konnte, kann durch den Einsatz bekannter Inhibitoren abschließend beurteilt werden (u. a. siehe 3.3.5).

3.3.4 Bestimmung von methodisch bedingten Abweichungen im Umgang mit kultivierten Darmzellen

Zur Abschätzung von prozessbedingten Schwankungen, die insbesondere durch das Zählen und Aussäen der Zellen zustande kommen, wurde die Anzahl der Zellen in den Mikrotiterplatten stichprobenartig am Tag des jeweiligen Experiments über eine DNA-Quantifizierung mithilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 bestimmt. Aufgrund des durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 21,7% zwischen 14 willkürlich ausgewählten Well-Platten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Abweichung von > 25% festgelegt, um eine Aufnahmehemmung von zellkulturbedingter Streuung zu unterscheiden [45].

3.3.5 Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme des FATP2-Inhibitors Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen

Der lipophile Charakter von langkettigen Fettsäuren ermöglicht es ihnen, mithilfe eines Flipflops die Zellmembran von Adipozyten innerhalb von Sekunden zu passieren [170]. Trotzdem wurden Transportproteine identifiziert, die wahrscheinlich das ionisierte Substrat in die Zelle befördern [114]. Als Grundlage für weitere Untersuchungen zur Hemmung von Fettsäure-Transportern in Caco-2-Zellen wurde überprüft, ob nach Applikation eines geeigneten Inhibitors eine Aufnahmehemmung auftrat oder ob durch passive Diffusionsvorgänge die Hemmung der Transportproteine bereits kompensiert wurde. Dafür wurde eine 25 µM Lösung des FATP-2-Inhibitors Lipofermata, für den ein publizierter IC₅₀-Wert von 4,8 ± 0,7 µM existiert [117], auf seine Aufnahmehemmung von Palmitinsäure unter verschiedenen Bedingungen an den Darmzellen geprüft, wie in Tab. 15 dargestellt. Der Inhibitor wurde auf die Zellen nach einer Hungerzeit von 60 min für 10 oder für 60 min mit dem Substrat appliziert oder er wurde bereits während der gesamten Hungerzeit für 60 min zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Substrat entweder für 10 oder für 60 min inkubiert. Der Einfluss von 0,3% DMSO wurde ebenfalls getestet, in dem die methanolischen Extrakte gelöst vorlagen. Die Ergebnisse zeigen, dass mit 25 µM Lipofermata auch unter verschiedenen Bedingungen keine Aufnahmehemmung der Palmitinsäure in Caco-2-Zellen erreicht werden konnte.

Tabelle 15. Aufnahmehemmung von Palmitinsäure nach Applikation von 0,3% DMSO und dem FATP-2-Inhibitor Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen am Tag 3 nach Konfluenz

Behandlung	Hungerzeit [min]	Substratinkubationszeit [min]	Aufnahmehemmung von Palmitinsäure [%]
0,3% (V/V)	60	60	< 25
0,3% (V/V)	60 (Vi)	60	< 25
25 μ M Lipofermata	60	60	< 25
25 μ M Lipofermata	60	10	< 25
25 μ M Lipofermata	60 (Vi)	60	< 25
25 μ M Lipofermata	60 (Vi)	10	< 25

Vi = Vorinkubation mit Inhibitor

3.3.6 Kinetische Untersuchungen der intestinalen Glucose-Transporter

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Aufnahmegeschwindigkeit v_{max} wurden für den vom Lumen im Dünndarm vorwiegend durch SGLT-1 und GLUT-2 in die Zellen gewährleisteteten, intestinalen Glucose-Transport an Tag 3 nach Konfluenz in Caco-2-Zellen bestimmt (n=3 mit je 8 Wiederholungen, \pm SD). Sie betragen durchschnittlich $44,3 \pm 27,1$ mM und $2953,1 \pm 1795,0$ nmol/min pro mg Protein. Nach Applikation von 0,5 mM des SGLT-1-Inhibitors Phlorizin, erhöhte sich die K_M für den Glucose-Transport in die Zelle, der nun hauptsächlich über GLUT-2 abgewickelt wurde, auf $94,3 \pm 16,6$ mM bei ähnlicher maximaler Aufnahmegeschwindigkeit mit einem v_{max} -Wert von $3040,2 \pm 1458,2$ nmol/min pro mg Protein (n=3 mit je 8 Wiederholungen, \pm SD). Nach Behandlung der Zellen mit 1 mM des GLUT-2-Inhibitors Phloretin erreichte die K_M einen Wert von $86,4 \pm 40,5$ mM für den Glucose-Transport, der nun hauptsächlich durch die Aktivität des SGLT-1 gewährleistet wurde. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit verringerte sich auf $2160,5 \pm 398,6$ nmol/min pro mg Protein.

3.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natriumbutyrat, DMSO und ausgewählten Extrakten auf Caco-2-Zellen

In Vorbereitung auf die Untersuchungen zur Hemmung der intestinalen Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen der

wässrigen und methanolischen Extrakte 38 pflanzlicher Drogen auf die Zellviabilität im MTT-Assay getestet.

Die ausgewählten Pflanzen sind mit ihrer Bezeichnung (lateinisch und deutsch), dem verwendeten Pflanzenteil, dem ermittelten DEV, der Zellviabilität nach Applikation von 0,01, 0,1 und 1 mg/mL des methanolischen bzw. wässrigen Extraktes und gegebenenfalls der errechneten IC_{50} in den Tab. 16 und 17 aufgeführt. Die Daten wurden während einer Masterarbeit im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhoben [171] und zum Teil publiziert [45]. Für weitere Studien zur Aufnahmehemmung wurde die höchste Extraktkonzentration verwendet, bei der sich kein signifikanter Unterschied der Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigte.

Die Behandlung der Zellen mit 5 mM Natriumbutyrat führte zu einer signifikanten Herabsetzung der Zellviabilität von $19,2 \pm 10,4\%$, die im Zweistrichproben-T-Test statistisch bestätigt wurde ($n=4$ mit je 12 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD). Die Zugabe von 0,3% (V/V) DMSO zu den Zellen induzierte nach Auswertung mithilfe des Zweistrichproben-T-Test keinen signifikanten, zytotoxischen Effekt. Die Viabilität betrug $103,1 \pm 11,1\%$ ($n=4$ mit je 12 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD).

Ergebnisse

Tabelle 16. Ergebnisse aus dem MTT-Assay zur Zytotoxizität von methanolischen Pflanzenextrakten; *signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 6 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des MetOH-Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	Wurzel	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Zwiebel	20:1	o. Z.	82,3* \pm 8,3	56,3* \pm 7,5	> 1
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	Frucht	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Blatt	9:1	o. Z.	o. Z.	79,5* \pm 16,7	> 1
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L.f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Blatt	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Assam) (Teepflanze)	Blatt	11:1	o. Z.	o. Z.	12,8* \pm 10,5	0,8
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Darjeeling) (Teepflanze)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	23,0* \pm 8,3	0,5
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Gunpowder) (Teepflanze)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	16,4* \pm 3,2	0,6
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Sencha) (Teepflanze)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	13,1* \pm 5,0	0,7
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Frucht	4:1	85,0* \pm 15,7	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Fruchtschale	7:1	o. Z.	o. Z.	72,3* \pm 8,1	> 1
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	Grüne Samen	7:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des MetOH-Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	Frucht	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	Frucht	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Samen	n.bs.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Kraut	n.bs.	o. Z.	o. Z.	1,2* ± 1,1	0,5
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	Rinde	4:1	o. Z.	o. Z.	80,9* ± 13,6	> 1
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Blüte	7:1	o. Z.	o. Z.	86,7* ± 11,4	> 1
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Blatt	12:1	o. Z.	o. Z.	27,8* ± 9,6	0,9
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Blatt	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	Frucht	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' (Kulturapfel)	Fruchtschale	16:1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Blatt	13:1	o. Z.	o. Z.	86,2* ± 16,4	> 1
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	Blatt	14:1	o. Z.	o. Z.	69,8* ± 10,9	> 1

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des MetOH-Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Frucht	5:1	o. Z.	o. Z.	77,0* ± 15,3	> 1
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Samen	16:1	o. Z.	o. Z.	76,4* ± 23,2	> 1
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Blatt	9:1	o. Z.	o. Z.	80,5* ± 16,7	> 1
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	23,3* ± 7,3	0,7
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Wurzel	15:1	o. Z.	o. Z.	80,2* ± 15,1	> 1
<i>Peumus Boldus</i> MOLINA (Boldo)	Blatt	6:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	Kraut	6:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	Wurzel	6:1	o. Z.	o. Z.	81,5* ± 12,9	> 1
<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Fruchtschale	9:1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Blüte	14:1	o. Z.	o. Z.	33,0* ± 14,0	0,8
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Blatt	17:1	o. Z.	o. Z.	43,1* ± 13,0	0,9
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Blatt	14:1	o. Z.	o. Z.	56,7* ± 8,0	> 1
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) SPACH (Dornige Bibernelle)	Wurzel	2:1	o. Z.	o. Z.	73,1* ± 13,4	> 1

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des MetOH-Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des MetOH-Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY (Gewürznelkenbaum)	Blüte	15:1	o. Z.	o. Z.	22,4* ± 19,0	0,6
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Kraut		o. Z.	o. Z.	31,6* ± 11,2	> 1
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Frucht		o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Samen (Trester)		o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1

DEV = Droge-Extrakt-Verhältnis; o. Z. = ohne Zytotoxizität; k. A. = keine Angabe

Gemäß den Ergebnissen in Tab. 16, bewirkte die Zubereitung des Johannesbrotbaums bereits nach Zugabe von 0,01 mg/mL Extrakt eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität. Für höhere Konzentrationen konnte diese Wirkung jedoch nicht bestätigt werden. Auch Knoblauch zeigte bereits in einer Konzentration von 0,1 mg/mL einen signifikanten, zytotoxischen Effekt. Die Abb. 20 erfasst die methanolischen Extrakte, die in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Zytotoxizität aufweisen. Vor allem die Zubereitungen aus der Teepflanze, Artischocke, Mate, Oregano, Kartoffel-Rose, Rosmarin, Gewürznelke und Thymian treten mit einer Verringerung der Zellviabilität um mehr als 50% hervor, wobei der methanolische Extrakt aus dem Artischockenkraut mit einer IC_{50} von 0,5 mg/mL den stärksten zytotoxischen Effekt besitzt. Die Positivkontrolle wurde mit einer 1%igen Triton-X-100-Lösung durchgeführt.

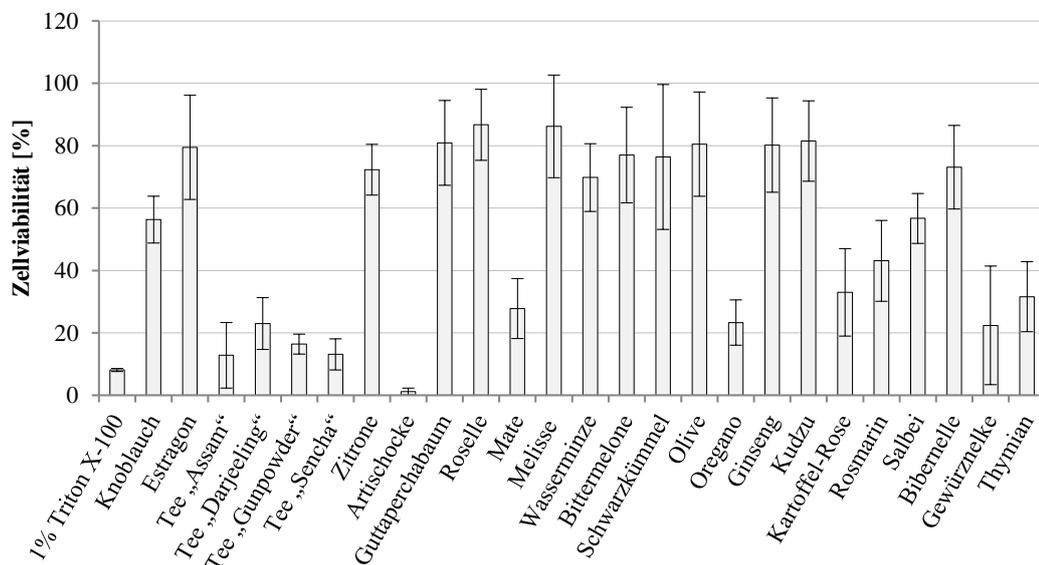


Abbildung 20. Die methanolischen Extrakte der dargestellten Pflanzen zeigten in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität. Die Daten beziehen sich auf Tabelle 16; Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 6 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD

Ergebnisse

Tabelle 17. Ergebnisse aus dem MTT-Assay zur Zytotoxizität von wässrigen Pflanzenextrakten; *signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 6 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des wässrigen Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	Wurzel	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Zwiebel	2:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	Frucht	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L.f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Blatt	2:1	o. Z.	o. Z.	84,0* \pm 5,6	> 1
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Assam) (Teepflanze)	Blatt	6:1	o. Z.	o. Z.	12,3* \pm 5,7	0,8
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Darjeeling) (Teepflanze)	Blatt	7:1	o. Z.	o. Z.	4,6* \pm 3,2	0,8
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Gunpowder) (Teepflanze)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	22,2* \pm 8,7	0,8
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Sencha) (Teepflanze)	Blatt	6:1	o. Z.	o. Z.	33,6* \pm 25,1	0,8
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Frucht	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Fruchtschale	4:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des wässrigen Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	Grüne Samen	5:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	Frucht	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	Frucht	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Samen	5:1	o. Z.	o. Z.	68,2* ± 4,9	> 1
<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Kraut	3:1	o. Z.	o. Z.	67,5* ± 7,2	> 1
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	Rinde	16:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Blüte	2:1	o. Z.	o. Z.	76,0* ± 10,7	> 1
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	3,4* ± 1,5	0,8
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Blatt	7:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	Frucht	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' (Kulturapfel)	Fruchtschale	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Blatt	4:1	o. Z.	63,8* ± 11,2	28,2* ± 11,7	0,2

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des wässrigen Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	Blatt	6:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Frucht	6:1	80,3* ± 15,1	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Samen	4:1	o. Z.	o. Z.	71,8* ± 12,6	> 1
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Blatt	4:1	o. Z.	o. Z.	63,9* ± 12,5	> 1
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Wurzel	3:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Peumus Boldus</i> MOLINA (Boldo)	Blatt	n.bs.	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	Kraut	8:1	o. Z.	o. Z.	61,4* ± 8,8	> 1
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	Wurzel	4:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Fruchtschale	3:1	o. Z.	o. Z.	17,2* ± 7,0	0,6
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Blüte	n.bs.	o. Z.	o. Z.	57,2* ± 29,3	> 1
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	76,0* ± 26,0	> 1
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Blatt	5:1	o. Z.	o. Z.	86,9* ± 9,6	> 1

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	DEV	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,01 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 0,1 mg/mL des wässrigen Extrakts	Viabilität [%] nach Zugabe von 1 mg/mL des wässrigen Extrakts	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L). SPACH (Dornige Bibernelle)	Wurzel	28:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY (Gewürznelkenbaum)	Blüte	n.bs.	o. Z.	o. Z.	11,3* ± 3,0	0,8
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Kraut	6:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Frucht	2:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Samen (Trester)	27:1	o. Z.	o. Z.	o. Z.	> 1

DEV = Droge-Extrakt-Verhältnis; o. Z. = ohne Zytotoxizität; k. A. = keine Angabe

Angelehnt an die Ergebnisse in Tab. 17 bewirkte die Zubereitung der Bittermelone bereits in einer Konzentration von 0,01 mg/mL eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität. Nach Zugabe von 0,1 und 1 mg/mL des Extrakts konnte die Zytotoxizität nicht bestätigt werden. Auch Melisse zeigte bereits bei 0,1 mg/mL einen signifikanten, zytotoxischen Effekt. Die Abb. 21 erfasst die wässrigen Pflanzenextrakte, die in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Zytotoxizität auslösten. Die wässrigen Extrakte von der Teepflanze, Mate, Melisse, Granatapfel und Gewürznelke riefen in einer Konzentration von 1 mg/mL mehr als 50% Zytotoxizität hervor, wobei der wässrige Extrakt aus Melissenblättern mit einer IC_{50} von 0,2 mg/mL die stärkste Wirkung zeigte. Die Positivkontrolle wurde mit einer 1%igen Triton-X-100-Lösung durchgeführt.

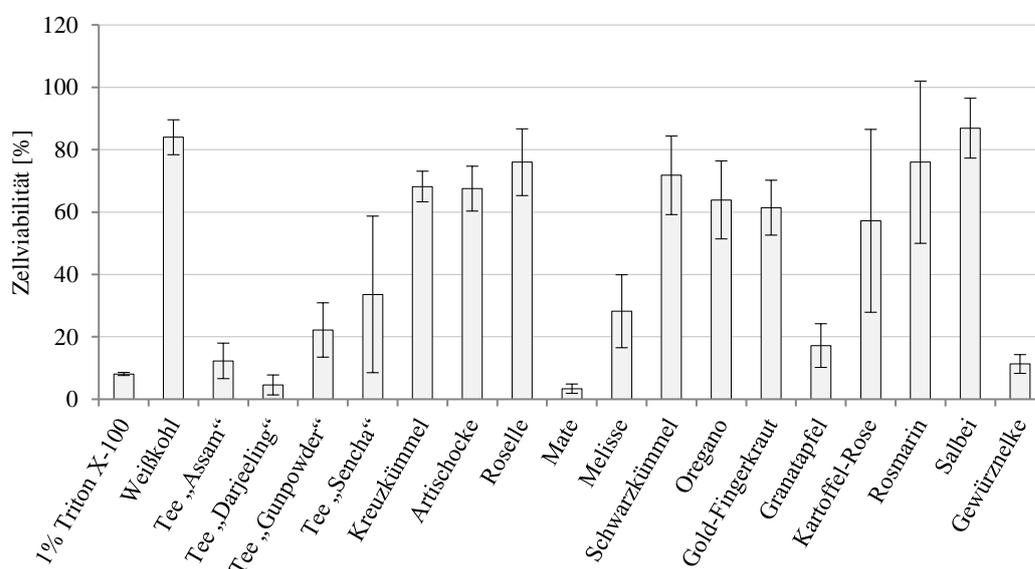


Abbildung 21. Die wässrigen Extrakte der dargestellten Pflanzen zeigten in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität. Die Daten beziehen sich auf Tabelle 17; Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 6 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD

3.5 Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure durch pflanzliche Extrakte in Caco-2-Zellen

Das Screening methanolischer und wässriger Extrakte ausgewählter Pflanzen zur Hemmung der Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in die Zellen wurde mithilfe von ^3H -markierten Substraten durchgeführt. In den Tab. 18 und 19 sind die Pflanzenbezeichnungen (lateinisch und deutsch), die verwendeten Pflanzenteile, die getestete Extraktkonzentration, die im MTT-Assay keinen Einfluss auf die Zellviabilität gezeigt hat und die Ergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure dokumentiert. Die Werte ergeben sich aus der Differenz der Aufnahme von unbehandelten Zellen (Kontrollgruppe) und behandelten Zellen und sind zum Teil bereits publiziert worden [45].

Die pflanzlichen Drogen, die eine signifikante Hemmung der Glucose-Aufnahme bewirkten, wurden wiederholt und zusätzlich auch auf eine mögliche Hemmung der Fructose- und Palmitinsäure-Aufnahme getestet. Bei einigen Pflanzen führte sowohl der methanolische als auch der wässrige Extrakt zu signifikanten Hemmungen der Glucose-Aufnahme. In diesen Fällen wurde zwischen den beiden Zubereitungen nur der Extrakt mit der stärksten Wirkung ausgewählt und im Fructose- und Palmitinsäure-Assay untersucht.

Die Chalkone Phlorizin und Phloretin agieren als SGLT-1- bzw. GLUT-2-Inhibitor und verringerten in einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ die Glucose-Aufnahme jeweils um $55,1 \pm 4,3\%$ bzw. $60,3 \pm 9,0\%$. Die berechneten IC_{50} von Phlorizin und Phloretin betragen $57,6 \pm 25,7\ \mu\text{M}$ bzw. $38,7 \pm 29,7\ \mu\text{M}$ im Caco-2-Modell. Eine $100\ \mu\text{M}$ Lösung des Phloretins hemmte die Fructose-Aufnahme ebenfalls signifikant um $72,8 \pm 1,0\%$ und die IC_{50} ließ sich auf $24,2 \pm 20,3\ \mu\text{M}$ berechnen. Die $25\ \mu\text{M}$ Lösung des dualen SGLT-1- und SGLT-2-Inhibitors Sotagliflozin zeigte keine signifikante Hemmung der Glucose-Aufnahme. Die Daten zu Messungen mit den Inhibitoren wurden mithilfe des Zweistichproben-T-Test ($n=2$ mit je 8 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD) statistisch ausgewertet.

Die Verringerung der Aufnahme von Glucose ($7,9 \pm 8,9\%$) und Fructose ($3,2 \pm 9,8\%$) nach Zugabe von $0,3\%$ DMSO zur Anlösung methanolischer Extrakte zeigte keine Signifikanz im Zweistichproben-T-Test ($n=6$ mit je 8 Wiederholungen; $\alpha=0,05$; zweiseitig; \pm SD) und war somit ohne Bedeutung.

Tabelle 18. Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure mit methanolischen Extrakten in Caco-2-Zellen [45]; *signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 12 Wiederholungen, zweiseitig, $\alpha=0,05$; \pm SD

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	Verwendete Konzentration des MetOH-Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	Wurzel	1	64,6* \pm 4,5	< 25	< 25
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Zwiebel	0,01	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	Frucht	1	57,1* \pm 7,2	< 25	< 25
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L.f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Blatt	1	82,8* \pm 4,3	< 25	< 25
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Assam</i>) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Darjeeling</i>) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Gunpowder</i>) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (<i>Sencha</i>) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Frucht	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Fruchtschale	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	Grüne Samen	1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	Verwendete Konzentration des MetOH-Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	Frucht	1	73,8* ± 6,7	< 25	< 25
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	Frucht	1	73,7* ± 4,2	< 25	< 25
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Samen	k.A.	k.A.	k. A.	k. A.
<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Kraut	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	Rinde	0,1	< 30	n.bs.	n.bs.
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Blüte	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Blatt	1	52,4* ± 1,7	30,2* ± 11,7	< 25
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	Frucht	1	75,2* ± 0,5	< 25	< 25
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' (Kulturapfel)	Fruchtschale	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Frucht	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	Verwendete Konzentration des MetOH-Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Samen	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Wurzel	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Peumus Boldus</i> MOLINA (Boldo)	Blatt	1	47,5* ± 7,5	32,6* ± 26,1	< 25
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	Kraut	1	< 25	n.bs.	n.bs.
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	Wurzel	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Fruchtschale	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Blüte	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) SPACH (Dornige Bibernelle)	Wurzel	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY (Gewürznelkenbaum)	Blüte	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Kraut	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzenbezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzenteil	Verwendete Konzentration des MetOH-Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Frucht	1	79,9* ± 1,1	< 25	< 25
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Samen (Trester)	1	< 25	n. bs.	n. bs.

n. bs. = nicht bestimmt; k. A. = keine Angabe

Tabelle 19. Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure mit wässrigen Extrakten in Caco-2-Zellen [45]; *signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 12 Wiederholungen, zweiseitig, $\alpha=0,05$, \pm SD

Wissenschaftliche Pflanzen-bezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzen-teil	Verwendete Konzentration des wässrigen Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Adenophora triphylla</i> (THUNB.) A.DC. (Quirlblättrige Schellenblume)	Wurzel	1	< 40	n. bs.	n. bs.
<i>Allium sativum</i> L. (Knoblauch)	Zwiebel	1	< 50	n. bs.	n. bs.
<i>Aronia melanocarpa</i> MICHX. ELLIOTT (Schwarze Apfelbeere)	Frucht	1	< 60	n. bs.	n. bs.
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Estragon)	Blatt	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> (Weißkohl)	Blatt	0,1	< 60	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Assam) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Darjeeling) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Gunpowder) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTZE (Sencha) (Teepflanze)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Johannesbrotbaum)	Frucht	1	< 25	n.bs.	n.bs.
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Zitrone)	Fruchtschale	1	< 40	n. bs.	n. bs.
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeepflanze)	Grüne Samen	1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzen-bezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzen-teil	Verwendete Konzentration des wässrigen Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitin-säure [%]
<i>Cornus officinalis</i> SIEBOLD & ZUCC. (Asiatische Kornelkirsche)	Frucht	1	< 65	n. bs.	n. bs.
<i>Crataegus pinnatifida</i> BUNGE (Fiederblatt-Weißdorn)	Frucht	1	< 60	n. bs.	n. bs.
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Kreuzkümmel)	Samen	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Cynara cardunculus</i> L. (Artischocke)	Kraut	0,1	< 30	n.bs.	n.bs.
<i>Eucommia ulmoides</i> OLIV. (Chinesischer Guttaperchabaum)	Rinde	1	68,7* ± 13,2	< 25	< 25
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Roselle)	Blüte	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Ilex paraguariensis</i> A. ST.-HIL. (Mate-Strauch)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Juglans regia</i> L. (Echte Walnuss)	Blatt	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Lycium chinense</i> MILL. (Chinesischer Bocksdorn)	Frucht	1	< 75	n. bs.	n. bs.
<i>Malus domestica</i> (SUCKOW) BORKH. 'Golden Delicious' (Kulturapfel)	Fruchtschale	1	57,5* ± 9,2	< 25	< 25
<i>Melissa officinalis</i> L. (Zitronenmelisse)	Blatt	0,01	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Mentha aquatica</i> L. (Wassermintze)	Blatt	1	< 40	n. bs.	n. bs.
<i>Momordica charantia</i> L. (Bittermelone)	Frucht	1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzen-bezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzen-teil	Verwendete Konzentration des wässrigen Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitin-säure [%]
<i>Nigella sativa</i> L. (Echter Schwarzkümmel)	Samen	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Olea europaea</i> L. (Olivenbaum)	Blatt	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Origanum creticum</i> L. (Oregano)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY. (Ginseng)	Wurzel	1	< 25	n.bs.	n.bs.
<i>Peumus Boldus</i> MOLINA (Boldo)	Blatt	1	< 40	n. bs.	n. bs.
<i>Potentilla aurea</i> L. (Gold-Fingerkraut)	Kraut	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Pueraria lobata</i> (WILLD.) OHWI (Kudzu)	Wurzel	1	< 50	n. bs.	n. bs.
<i>Punica granatum</i> L. (Granatapfel)	Fruchtschale	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Rosa rugosa</i> THUNB. (Kartoffel-Rose)	Blüte	0,1	< 30	n. bs.	n. bs.
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Rosmarin)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Salvia officinalis</i> L. (Echter Salbei)	Blatt	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) SPACH (Dornige Bibernelle)	Wurzel	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY (Gewürznelkenbaum)	Blüte	0,1	< 25	n. bs.	n. bs.

Ergebnisse

Wissenschaftliche Pflanzen-bezeichnung (deutscher Name)	Verwendeter Pflanzen-teil	Verwendete Konzentration des wässrigen Extraktes [mg/ml]	Hemmung der Aufnahme von Glucose [%]	Hemmung der Aufnahme von Fructose [%]	Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure [%]
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Echter Thymian)	Kraut	1	< 25	n. bs.	n. bs.
<i>Vaccinium myrtillus</i> L. (Heidelbeere)	Frucht	1	< 80	n. bs.	n. bs.
<i>Vitis vinifera</i> L. (Weinrebe)	Samen (Trester)	1	< 40	n. bs.	n. bs.

n. bs. = nicht bestimmt

Abb. 22 zeigt eine graphische Darstellung der Screening-Ergebnisse von Pflanzenextrakten mit signifikanter Hemmung der Glucose- und Fructose-Aufnahme aus Tab. 18 und 19. Der SGLT-1-Inhibitor Phlorizin und der GLUT-2-Inhibitor Phloretin dienten als Positivkontrolle. Die neun methanolischen Extrakte aus den Früchten der schwarzen Apfelbeere, des chinesischen Bocksdorns, der Heidelbeere, der asiatischen Kornelkirsche und des fiederblättrigen Weißdorns, sowie aus den Blättern von Boldo, Walnuss und Weißkohl und aus der Wurzel der quirlblättrigen Schellenblume hemmten die Glucose-Aufnahme signifikant. Die Extrakte aus den Blättern von Boldo und Walnuss verminderten zusätzlich die Fructose-Aufnahme in Caco-2-Zellen. Die zwei wässrigen Extrakte aus der Fruchtschale des Apfels und der Rinde des chinesischen Guttaperchabaums zeigten eine Hemmung der Glucose-Aufnahme. Keine der pflanzlichen Zubereitungen hemmte die Palmitinsäure-Aufnahme signifikant im Zell-Modell. Für den wirksamsten methanolischen Extrakt aus den Blättern des Weißkohls und den effektivsten wässrigen Extrakt aus der Rinde des chinesischen Guttaperchabaums sind die IC_{50} mit Werten von 0,1 mg/mL bzw. 0,4 mg/mL bestimmt worden [45]. Eine wiederholte Testung mit einem frisch hergestellten methanolischen Weißkohl-Extrakt verringerte die Glucose-Aufnahme um $88,1\% \pm 2,5$ und bestätigte die starke Hemmung ($n=2, \pm SD$).

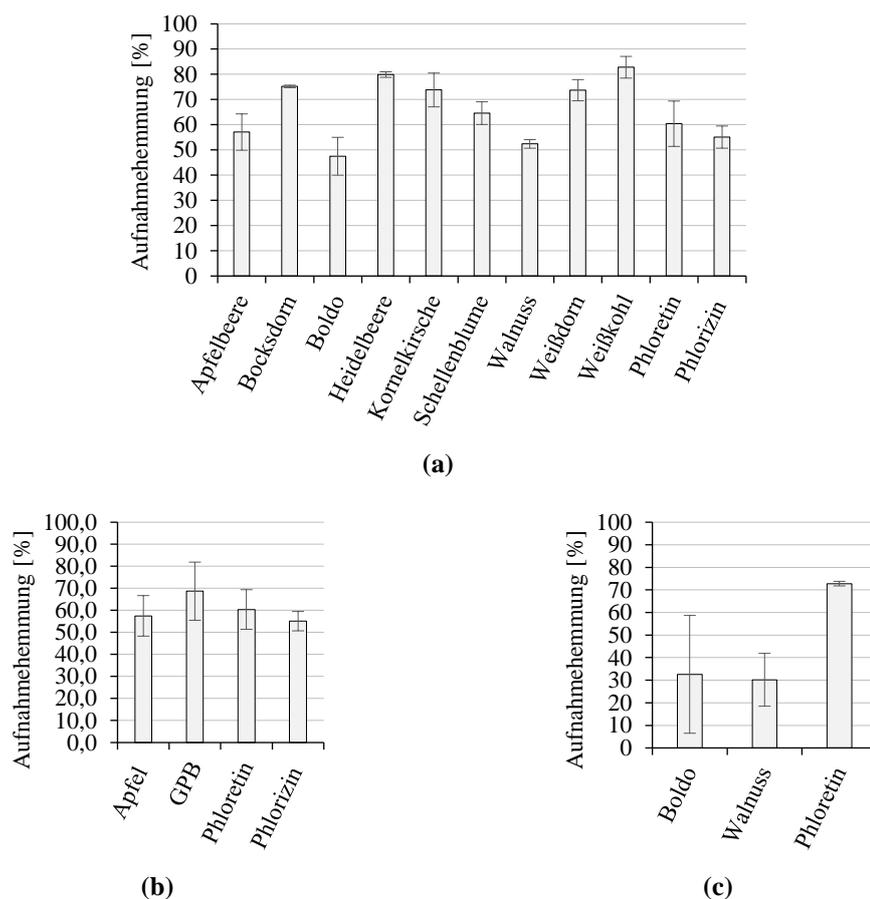


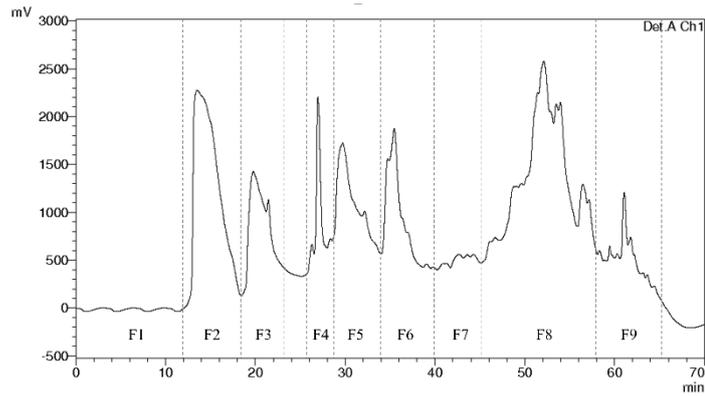
Abbildung 22. Signifikante Ergebnisse zur Aufnahmehemmung von **(a)** Glucose mit methanolischen Extrakten, **(b)** Glucose mit wässrigen Extrakten und **(c)** Fructose mit methanolischen Extrakten aus den Tab. 18-19 [45]; GPB = chinesischer Guttaperchabaum; *signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test, n=2 mit je 12 Wiederholungen, zweiseitig, $\alpha=0,05$, \pm SD

3.6 Charakterisierung des methanolischen Extraktes von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba*

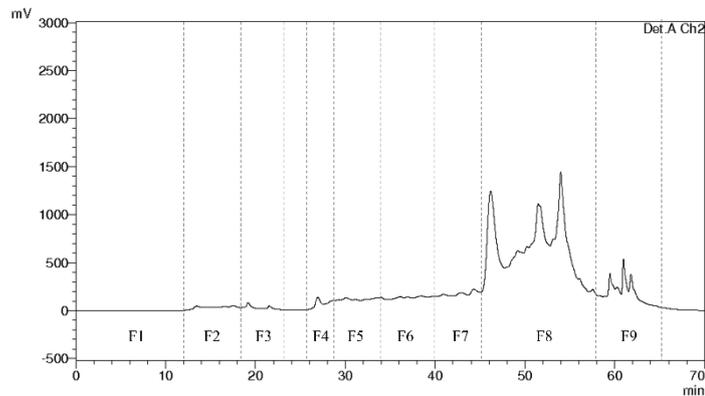
Der methanolische Extrakt aus den Blättern des Weißkohls wurde aufgrund seiner starken Hemmung der intestinalen Glucose-Aufnahme fraktioniert und die Fraktionen auf ihre Inhaltsstoffe untersucht.

3.6.1 Fraktionierung des methanolischen Extraktes von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba*

Mithilfe einer präparativen HPLC wurden insgesamt 480 mg des Extrakts chromatographisch, wie in Abb. 23 dargestellt, aufgetrennt und die Fraktionen anschließend aufgefangen.



(a)



(b)

Abbildung 23. Chromatogramme nach Auftrennung mit der präparativen HPLC und anschließender UV/VIS-Detektion bei (a) 230 nm und (b) 330 nm. Die gestrichelten Linien teilen die Chromatogramme in die aufgefangenen Fraktionen 1-9 (F1-9) ein.

Den Fraktionen wurde in einer Zentrifuge unter Vakuum innerhalb von 2 h das Lösungsmittel Acetonitril entfernt. Nachdem die Proben im Tiefkühler bei -80°C vollständig durchgefroren waren, wurden sie für mindestens 72 h gefriergetrocknet.

3.6.2 Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme der einzelnen Fraktionen des methanolischen Extraktes von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba*

In Tab. 20 sind die Untersuchungsergebnisse zur Hemmung der Glucose- und Fructose-Aufnahme nach Applikation von $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ der einzelnen Fraktionen dokumentiert. Angelehnt an das Droge-Extrakt-Verhältnis ist das Extrakt-Fraktion-Verhältnis aufgeführt, das zur Einschätzung der Ausbeute nach Auftrennung des Extrakts herangezogen wird.

Tabelle 20. Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose und Fructose durch die Fraktionen 1-9 in einer Konzentration von je 50 µg/mL; * signifikanter Unterschied im Zweistichproben-T-Test, n=3 mit je 8-12 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig

Fraktion	Extrakt-Fraktion-Verhältnis	Hemmung der Glucose-Aufnahme [%]	Hemmung der Fructose-Aufnahme [%]
Fraktion 1	>4000:1	n. g.	n. g.
Fraktion 2	2:1	48,2* ± 4,2	< 25
Fraktion 3	90:1	< 25	n. g.
Fraktion 4	1070:1	< 25	n. g.
Fraktion 5	382:1	< 30	n. g.
Fraktion 6	274:1	< 25	n. g.
Fraktion 7	>4000:1	n. g.	n. g.
Fraktion 8	198:1	< 25	n. g.
Fraktion 9	2295:1	< 25	n. g.

n. g. = nicht getestet

Aufgrund der geringen Ausbeute wurden Fraktion 1 und Fraktion 7 nicht im Zell-Assay mit radioaktiv markierten Substraten getestet. Fraktion 2 zeigte mit fast 50%iger Herabsetzung der Glucose-Aufnahme den stärksten Effekt. Es wurde keine signifikante Hemmung der Fructose-Aufnahme durch Fraktion 2 gemessen.

3.6.3 Identifizierung von Inhaltsstoffen in den Fraktionen des methanolischen Extrakts von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba* mithilfe von LC-QQQ-MS

Als Referenzsubstanzen für die Durchführung der LC-QQQ-MS dienten ausgewählte, isolierte sekundäre Pflanzenstoffe. Dabei handelte es sich um Polyphenole und Glucosinolate, von denen viele bereits in anderen Studien in *Brassica*-Arten nachgewiesen werden konnten [172,173]. In Tab. 21 sind Angaben zur Messung und die dabei erhaltenen Ergebnisse mit den Referenzsubstanzen und den Fraktionen ausführlich dokumentiert, insbesondere die injizierte Stoffmenge, der gemessene Ionisierungsmodus, die Retentionszeit, spezifische Produkt-Ionen (Quantifier, Qualifier) und das Verhältnis der AUC von Qualifier und Quantifier. Anhand von Übereinstimmungen der Messwerte von Referenzsubstanzen in den Fraktionen konnten einige Inhaltsstoffe identifiziert werden, vor allem in den Fraktionen 4-9.

Tabelle 21. Testergebnisse der LC-QQQ-MS-Messung mit Referenzsubstanzen zur Identifizierung von Inhaltsstoffen in den Fraktionen 1-9 des methanolischen Weißkohl-Extrakts.

Referenz-Substanz	Inj. Stoff-menge [nmol]	IM	Referenz RT [min] (AUC Quantifier)	Referenz	Fraktion RT [min] (AUC Quantifier)	Fraktion	EF
				$\frac{\text{AUC Qualifier}}{\text{AUC Quantifier}} * 100$ [%]		$\frac{\text{AUC Qualifier}}{\text{AUC Quantifier}} * 100$ [%]	
Chlorogensäure	0,1	N	4,36 (1.341.599)	9,0	4,31 (2.265)	6,8	8
3,4-Dihydroxy-zimtsäure	0,1	N	4,68 (2.859.404)	0,6	4,64 (7.178)	n. d.	9
Ferulasäure	0,1	N	6,30 (864.941)	62,4	6,27 (3.194)	60,8	9
Gallussäure	0,1	N	1,87 (929.199)	8,0	1,83 (601)	7,8	7
					1,80 (643)	11,0	
Glucoraphanin	0,1	N	1,08 (711.675)	65,7	1,08 (54.086)	69,2	4
					1,04 (88.941)	64,4	5
					1,08 (995)	66,4	6
Kämpferol	1	N	10,67 (20.215)	90,2	n. d.	n. d.	n. d.
				18,0			
Progoitrin	0,1	N	0,93 (429.091)	75,4	0,92 (133.487)	71,8	4
					0,91 (72.443)	62,8	5
					1,08 (2.738)	67,4	6
Quercetin	1	N	9,32 (70.450)	50,8	n. d.	n. d.	n. d.
				15,3			
Rutin	0,1	N	6,54 (840.897)	51,3	6,55 (2.045)	46,6	8
Sinapinsäure	0,1	N	6,39 (1.003.044)	55,7	6,35 (30.084)	60,8	9

n. d. = nicht detektiert; RT = Retentionszeit; IM = Ionisierungsmodus; Inj. = injiziert; EF = Ermittelte Fraktion

Das Vorkommen der Senfölglykoside Glucoraphanin und Progoitrin, die typischerweise in Kreuzblütengewächsen enthalten sind [172], konnte in den Fraktionen 4, 5 und 6 bestätigt werden. Polyphenolische Verbindungen, wie z. B. Chlorogensäure und Rutin, wurden in Fraktion 8 und Gallussäure zusätzlich in Fraktion 7 nachgewiesen, während die Zimtsäurederivate Ferula- und Sinapinsäure in Fraktion 9 gefunden worden. Für 3,4-Dihydroxymzimtsäure (Kaffeensäure) stimmte die Retentionszeit mit einer gefundenen Substanz in Fraktion 9 überein, aber aufgrund des nicht detektierten bzw. nicht bestimmbareren Verhältnisses der AUC von Qualifier und Quantifier konnte Kaffeensäure nicht

sicher als Komponente von Fraktion 9 identifiziert werden. Obwohl in anderen Studien Quercetin und Kämpferol als polyphenolische Bestandteile in *Brassica*-Arten nachgewiesen wurden [174], fand sich keine Übereinstimmung in den Fraktionen 1-9, was an einer schlechten Bestimmbarkeit liegen kann. Diese Flavonoid-Aglyka wurden in größerer Menge als andere Referenzsubstanzen injiziert (siehe Tab 21). Jedoch war die AUC des Quantifiers bereits in den Referenzmessungen von Quercetin und Kämpferol wesentlich geringer im Vergleich zu den anderen isolierten Pflanzenstoffen. Somit waren diese Substanzen auch in den Fraktionen schwer zu detektieren, was vermutlich u. a. an einer schlechten Ionisierbarkeit oder einer schlechten Löslichkeit liegt.

Die Referenzsubstanz Benzylisothiocyanat konnte aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nicht ausreichend ionisiert werden, sodass weder im positiven noch im negativen Ionisierungsmodus eine Detektion von Precursor- und Produkt-Ionen möglich war. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Substanz in den Fraktionen enthalten war.

3.6.4 Untersuchung von isolierten Naturstoffen zur Hemmung der Aufnahme von Glucose und Fructose in Caco-2-Zellen

Es wurden ausgewählte, isolierte Naturstoffe als 100 μ M Lösung auf eine Hemmung der Glucose- und Fructose-Aufnahme in Caco-2-Zellen untersucht, deren Ergebnisse in Tab. 22 aufgeführt sind. Viele der getesteten isolierten Naturstoffe, vorwiegend Polyphenole und Glucosinolate, sind in *Brassica*-Arten enthalten [172,173]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Epigallocatechingallat die Aufnahme von Glucose und Fructose signifikant hemmte, während die getesteten Flavonoid-Aglyka Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin lediglich die Aufnahme von Fructose in Caco-2-Zellen verminderten. Die hemmende Wirkung dieser Substanzen auf Glucose- und Fructose-Transporter wurde schon in anderen wissenschaftlichen Arbeiten bestätigt [126].

Tabelle 22. Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmungen von Glucose und Fructose durch 100 µM Lösungen isolierter Naturstoffe; * signifikanter Unterschied im Zweistichproben-T-Test, n=2 mit je 8 Wiederholungen, $\alpha=0,05$, zweiseitig, \pm SD

Substanz	Hemmung der Glucose-Aufnahme [%]	Hemmung der Fructose-Aufnahme [%]
Ascorbinsäure	< 25	< 25
Benzylisothiocyanat	< 25	< 25
Catechin	< 25	< 25
Chlorogensäure	< 25	< 25
Epigallocatechingallat	32,3* \pm 11,4	25,8* \pm 13,7
Ferulasäure	< 25	< 25
Fumarsäure	< 25	< 25
Glucoraphanin	< 25	< 25
Isorhamnetin	< 25	27,5* \pm 1,9
Kämpferol	< 25	34,0* \pm 7,4
Progoitrin	< 25	< 25
Quercetin	< 25	26,9* \pm 9,9
Rutin	< 25	< 25
Sinapinsäure	< 25	< 25
Urolithin A	< 25	41,3* \pm 6,9

Polyphenolische Verbindungen werden während der Verdauung auch durch das körpereigene Mikrobiom im Darm metabolisiert, wodurch sich Aufnahme in Darmzellen und die Wirkung auf den menschlichen Körper verändern. Bei der Umsetzung von Ellagitanninen entsteht das Urolithin A [175], das in den Experimenten keinen signifikanten Effekt auf die Glucose-Aufnahme zeigte, aber im Vergleich zu den anderen Naturstoffen die stärkste Hemmung von $41,3 \pm 6,9\%$ der Fructose-Aufnahme hervorrief.

3.6.5 Identifizierung aktiver Inhaltsstoffe in Fraktion 2 des methanolischen Extrakts von *Brassica oleraceae var. capitata L. f. alba*

Die vorausgegangene LC-QQQ-MS-Messung mit den Referenzsubstanzen lieferte Erkenntnisse über die Inhaltsstoffgruppe einiger Fraktionen. Jedoch konnten keine Inhaltsstoffe der Fraktion 2 zugeordnet werden, die im Zell-Assay eine Hemmung der Glucose-Aufnahme von fast 50% zeigte.

Zur Identifizierung von Inhaltsstoffen bzw. Inhaltsstoffgruppen in Fraktion 2 wurden Messungen mithilfe der LC-Q-TOF-MS vorgenommen. Nach Durchführung dieser Experimente konnten Ionen bestimmter Masse-Ladungs-Verhältnisse wasserlöslichen Verbindungen zugeordnet werden. In Tab. 23 sind die mit der Software MassHunter ermittelten chemischen Summenformeln und die möglichen, abgeleiteten Substanzen dargestellt, für die sich häufig im positiven und negativen Modus ein hoher Score und kleiner Abweichungsfehler errechnete. Dabei handelte es sich vor allem um Saccharide und Aminosäuren als Inhaltsstoffe in Fraktion 2.

Tabelle 23. Ergebnisse der LC-Q-TOF-MS-Messungen zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in Fraktion 2 des methanolischen Extrakts von Weißkohl.

Summenformel	Ermittelte Substanz	Score		Abweichungsfehler [ppm]	
		Negativer Modus	Positiver Modus	Negativer Modus	Positiver Modus
C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Arginin	k. A.	98,0	k. A.	2,8
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Glutamin	95,7	k. A.	2,6	k. A.
C ₄ H ₈ O ₄	z. B. Erythrose und Threose	96,6	k. A.	5,0	k. A.
C ₅ H ₁₀ O ₄	Desoxyribose	95,9	k. A.	5,9	k. A.
C ₆ H ₁₂ O ₆	Hexosen z. B. Glucose und Fructose	96,8	99,4	4,8	1,9
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Disaccharide z. B. Cellobiose, Maltose, Lactose, Saccharose	99,1	99,5	0,8	1,0
C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	Trisaccharide z. B. Cellotriase, Raffinose, Maltotriose	98,7	99,8	-0,3	0,3

k. A. = keine Angabe

Da in der Fraktion enthaltene Glucose und Fructose die Messung mit den jeweils radioaktiv markierten Substraten beeinflussen können, wurden die Massenspektren, wie in Abb. 24 dargestellt, auf typische Addukte und nach Fragmentierung auf Produkt-Ionen von Hexosen und ihren Oligomeren genauer untersucht.

Im negativen Modus konnten die Peaks mit m/z 179,057 und 215,034 der deprotonierten Form $[M-H]^-$ und dem Halogen-Addukt $[M+Cl]^-$ von Hexosen zugeordnet werden. Mithilfe von Ergebnissen in vergleichbaren Arbeiten u. a. von *March et al.* wurden die Signale bei folgenden Ladungs-Masse-Verhältnissen als Produkt-Ionen des Precursor-Ions $[M-H]^-$ mit m/z 179,057 von Hexosen und abgeleiteten Di- und Trisacchariden identifiziert: 161,045

(Neutralverlust H_2O), 143,035 (Neutralverlust $2\text{H}_2\text{O}$), 131,034 (Neutralverlust $\text{CH}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}$); 119,035 (Neutralverlust $2\text{CH}_2\text{O}$); 113,025 (Neutralverlust $\text{CH}_2\text{O}+2\text{H}_2\text{O}$) 101,025 (Neutralverlust $2\text{CH}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}$) und 89,025 (Neutralverlust $3\text{CH}_2\text{O}$) [176].

Deutlich in Abb. 24a ist der Peak mit m/z 377,086 zu erkennen, der zum Halogen-Addukt $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ von Disacchariden gehört, die aus zwei Hexose-Einheiten bestehen. Der Peak mit m/z 341,109 konnte der deprotonierten Form $[\text{M}-\text{H}]^-$ der Zweifachzucker zugeordnet werden und bildete durch Neutralverlust $4\text{CH}_2\text{O}$ das Produkt-Ion mit m/z 121,067. Außerdem wurden die Ionenpeaks mit m/z 503,160 und 539,139 als deprotonierte Form $[\text{M}-\text{H}]^-$ und Halogen-Addukt $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ von Trisacchariden ermittelt, die sich aus drei Hexose-Einheiten zusammensetzen. Die daraus entstandenen Fragmente des typischen Peaks einer Hexose mit m/z 179,057 und eines Dissaccharids mit m/z 341,109 haben sich bei der Spaltung der glykosidischen Bindung gebildet [176,177]. Abgesehen vom Peak mit m/z 131,034, dessen Abweichungsfehler bei 7,5 ppm liegt, beträgt die Differenz zwischen theoretischer und gemessener Masse bei den anderen Signalen <5 ppm.

Bei den Messung im positiven Modus wurden vor allem die Alkalimetall-Addukte $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und $[\text{M}+\text{K}]^+$ der Hexosen und deren Oligomere identifiziert. Das betraf den deutlich erkennbaren Peak in Abb. 24b mit m/z 203, 053 und den Peak mit 219,027 für Hexosen, aber auch die anderen Signale mit m/z 365,106 und 381,08 für Disaccharide und mit m/z 527,158 und 543,132 für die Trisaccharide. Bei dem Peak mit m/z 185,042, der als Produkt-Ion der Di- und Trisaccharide identifiziert werden konnte, handelte es sich um das Addukt $[\text{M}+\text{Na}]^+$, das nach Neutralverlust $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ entstand [176,177]. Die Abweichungsfehler der Masse-Ladungs-Verhältnisse waren bei den identifizierten Signalen <5 ppm.

Daraus lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass Fraktion 2 eine Mischung aus Aminosäuren und Hexosen und ihren Oligomeren darstellt.

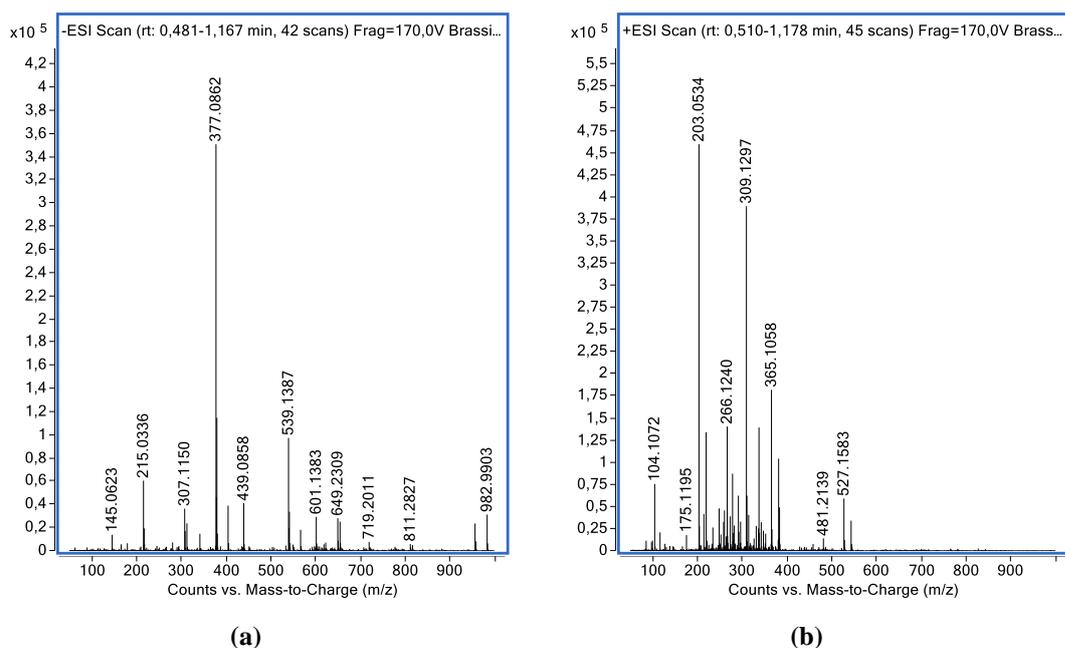


Abbildung 24. ESI-Q-TOF-MS-Spektrum im (a) negativen Modus und (b) positiven Modus gemessen. Deutlich zu erkennen sind die jeweiligen Addukt-Ionen der Hexosen und ihrer Di- bzw. Trisaccharide.

3.6.6 Quantifizierung von Hexosen im methanolischen Extrakt von *Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba*

Um einschätzen zu können, ob die im Extrakt enthaltene Menge an Hexosen, zu denen auch Glucose und Fructose zählen, durch Verdrängung der ^3H -markierten Substrate bei der Aufnahme eine Pseudohemmung hervorgerufen haben, wurde eine Quantifizierung mithilfe der LC-QQQ-MS durchgeführt. Da die Referenzsubstanz Glucose keine Produkt-Ionen gebildet hatte, die als Quantifier in Frage gekommen wären, wurde das Precursor-Ion mit m/z 203,0 im Single Ion Monitoring (SIM) gemessen und die Peaks wurden integriert, wie in Abb. 25 dargestellt.

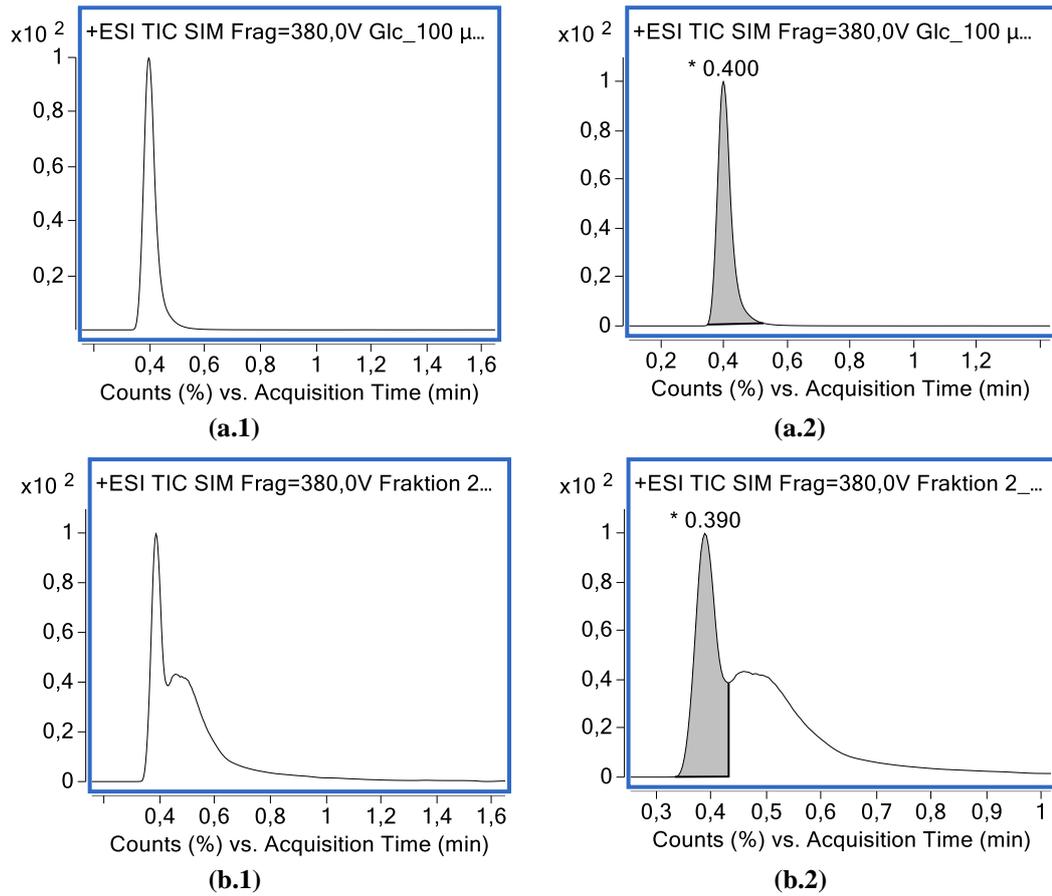


Abbildung 25. TIC-SIM-MS-Spektren von der Referenzsubstanz Glucose mit einer Retentionszeit von 0,40 min **(a.1)** nicht integriert und **(a.2)** integriert und Fraktion 2 mit einer Retentionszeit von 0,39 min **(b.1)** nicht integriert und **(b.2)** integriert.

Eine Unterscheidung zwischen den Hexosen Glucose und Fructose war mit den verwendeten MS-Methoden nicht möglich. Der Kalibrierbereich zwischen 1 und 100 μM Glucose-Lösung erwies sich als linear. Basierend auf der Kalibriergeraden, die in Abb. 26 dargestellt ist, enthält die zweifach getestete Konzentration 1 mg/mL des methanolischen Extrakts, der aus den Blättern von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba* gewonnen wurde, $61,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ Glucose oder Fructose bzw. ein Gemisch der beiden Hexosen. Diese Konzentration genügt, um die 2 nM radioaktive Glucose- bzw. die 54 nM radioaktive Fructose-Lösung zu verdrängen und eine Pseudohemmung hervorzurufen.

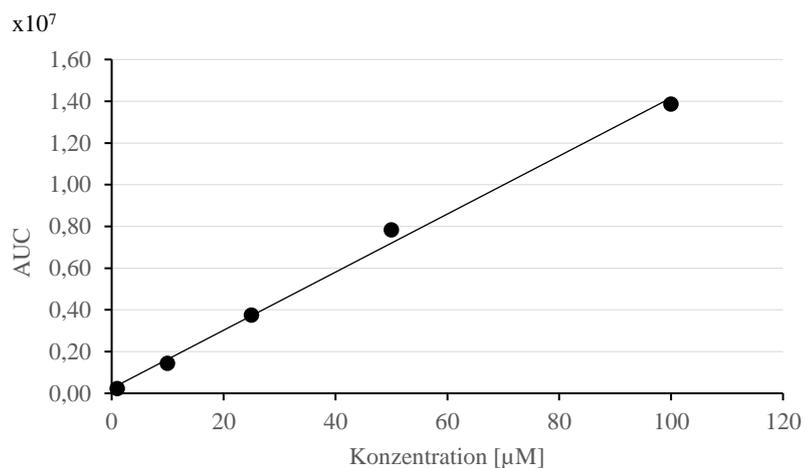


Abbildung 26. Linearer Kalibrierbereich mit $R=0,9954$ zur Quantifizierung der Hexosen im methanolischen Extrakt von *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba*.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Expression und Funktionalität von intestinalen Glucose-, Fructose- und Palmitinsäure-Transportern

4.1.1 Die Expression von SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 in Caco-2-Zellen mithilfe des Western-Blot-Verfahrens über drei Wochen

Zur Charakterisierung des Caco-2-Modells wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Maß sich die Expression der Transporter in den Enterozyten nach Erreichen der Konfluenz im Laufe der Differenzierung ändert. Die Expression des SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 wurde in Caco-2-Zellen bereits in verschiedenen Studien unter Verwendung unterschiedlicher Methoden, wie z. B. über die mRNA-Bestimmung oder Immunassays, festgestellt [131-134]. Da sich die Ergebnisse meist auf den Tag des Experiments am Ende der Differenzierung bezogen, ist über die Veränderung der Expression von Transportproteinen, insbesondere der Fettsäure-Transporter, während der Differenzierung von Caco-2-Zellen nur wenig bekannt. Die Ergebnisse, die mithilfe des Western-Blots in der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, zeigten bei GLUT-2 und GLUT-5 kaum Unterschiede und bei SGLT-1 eine schwache Abnahme über drei Wochen, die nicht signifikant war. *Mahraoui et al.* bestimmten die mRNA für verschiedene Hexose-Transporter in unterschiedlichen Caco-2-Klonen über 20 Tage und berichteten abhängig vom Klon von unterschiedlichen Expressionen der Transporter. Außerdem wählten sie ein Studiendesign, bei dem die Zellen erst zwischen Tag 5 und 10 nach der Aussaat Konfluenz erlangten [131]. Wie gezeigt werden konnte, ist die Expression von SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5 in Zellen, die nicht konfluent sind, z. T. nicht messbar [131,134], weshalb der Fokus der Experimente in der vorliegenden Arbeit vor allem auf die Untersuchung der Differenzierung konfluenter Zellen gelegt wurde. Die Studie von *Mahraoui et al.* zeigte auch, dass die mRNA zumindest für SGLT-1 und GLUT-5 in einigen Klonen, wie z. B. PD7, in der konfluenten Phase von Tag 8 bis Tag 20 relativ stabil sind [131].

Auch die Fettsäure-Transporter FATP-2 und FATP-4 konnten in der vorliegenden Arbeit in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Während die Expression des FATP-2 im Western-Blot über drei Wochen visuell schwach zunahm, war hinsichtlich der Expression von FATP-4 visuell kaum ein Unterschied wahrnehmbar.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich nach Erreichen der Konfluenz die Expression von SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 im Laufe der Differenzierung von Caco-2-Zellen in nicht relevantem Maß veränderte. Die Menge der exprimierten Transportproteine blieb über drei Wochen nach Konfluenz relativ stabil und war daher auch schon zu früheren Zeitpunkten für Experimente zur Aufnahme und deren Hemmung geeignet.

4.1.1.1 Multiple Banden

Der ordnungsgemäße Ablauf von der Probenaufarbeitung bis zur Messung der Intensität der chemilumineszierenden Banden der Transportproteine wurde durch die Bestimmung des Strukturproteins β -Actin sichergestellt, das in allen Proben nativ enthalten war. Nach Inkubation mit den Antikörper-Lösungen wurden zusätzlich oberhalb bzw. unterhalb der spezifischen Bande noch weitere Signale bei anderen Molekulargewichten detektiert. In Vorbereitung auf die Detektion von SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5 wurden polyklonale Primär-Antikörper eingesetzt, während zum Nachweis von FATP-2 und FATP-4 monoklonale Primär-Antikörper verwendet wurden. Beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern wird nur ein einziges Epitop am Antigen erkannt. Hingegen können polyklonale Antikörper an mehrere Epitope des Zielproteins binden [178,179]. Besonders nach ungewolltem Abbau des Zielproteins durch Enzymaktivität während des Aufbereitungsprozesses können durch Epitope, die sich möglicherweise an verschiedenen Bruchstücken befinden, mehrere Banden mit kleineren Molekulargewichten auf der Membran erscheinen. Auf diese Weise sind vermutlich die zusätzlichen Banden unterhalb des erwarteten Molekulargewichts auf der Membran von SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5 entstanden. Außerdem können während der Probenvorbereitung Modifikationen z. B. durch Phosphorylierung oder Multimeren-Bildung entstehen, die zu weiteren Banden oberhalb des erwarteten Molekulargewichts führen und wie bei GLUT-5 ein zusätzliches, starkes Signal direkt oberhalb der gesuchten Bande entstehen lassen [180,181].

GLUT-5 und GLUT-2 gehören zur GLUT-Familie, die aus 14 Proteinen besteht, die im Menschen exprimiert werden und ähnliche Strukturen bzw. Eigenschaften aufweisen [182]. Es ist denkbar, dass die GLUT-2- und GLUT-5-Primär-Antikörper eine Kreuzreaktivität untereinander und gegenüber anderen Transportern der GLUT-Familie wie z. B. GLUT-1 und GLUT-3 zeigen, die in Caco-2-Zellen exprimiert werden [131], aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht intensiver betrachtet wurden.

Schmitz et al. beschrieb bereits 1973 die Methodenoptimierung der Isolation und Auftrennung der Bürstensaummembran aus menschlichen Organproben in unterschiedliche Fraktionen für die weitere Analyse [183]. Auch wenn es sich bei Caco-2-Zellen bereits nur

noch um eine intestinale Epithelialzellschicht handelt, kann ein umfangreicher Aufreinigungsprozess die Anzahl der Banden möglicherweise vermindern. In der Veröffentlichung von *Mahraoui et al.* wird die Expression des GLUT-5 in Caco-2-Zellen im Western-Blot untersucht, wobei unter Verwendung des ursprünglichen Homogenisats wesentlich mehr Banden und die Hauptbande mit einem wesentlich schwächeren Signal detektiert wurden als in den Proben, die eine aus der Bürstensaummembran aufgereinigte und konzentrierte Fraktion der Caco-2-Zellen darstellen [184].

Gegebenenfalls ist das Erscheinen mehrerer Banden für einige Transportproteine sogar charakteristisch. In den Untersuchungen von *Helliwell et al.* wurden trotz Verwendung einer aufbereiteten Zubereitung aus Bürstensaummembranvesikeln für GLUT-5 drei Proteinbanden zwischen 57 und 62 kDa detektiert [185].

Da in vielen Publikationen die Ergebnisse lediglich als Membranausschnitte mit der erwarteten Bande gezeigt werden, kann über die Anzahl und Rolle zusätzlicher Banden nur spekuliert werden. Eine vollständige Darstellung der Membranen führt hingegen zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse und fördert neue Erkenntnisse durch transparente Forschung.

Zur kompletten Erfassung der Transportproteine im Rahmen der semiquantitativen Betrachtung der Expression von GLUT-2 und GLUT-5 über drei Wochen, wurden neben der Bande beim erwarteten Molekulargewicht weitere Banden herangezogen, die ebenso starke oder stärkere Intensitäten zeigten.

4.1.1.2 Die Intensität der Banden

Die Proteinbanden des GLUT-2 und FATP-2 waren trotz hoher Proteinbeladung des Gels nur schwer zu detektieren. Häufig waren die Banden visuell schwer zu erkennen und konnten mithilfe von Software nicht ausgewertet werden. Die Problematik kann neben technischen Fehlern wie z. B. einer schlechten Antikörperbindung auf eine geringe Expression der Transporter in Caco-2-Zellen hindeuten. In der Literatur gibt es dazu unterschiedliche Ergebnisse und Meinungen. Während FATP-4 als der intestinale Haupttransporter für langkettige Fettsäuren aufgrund seiner starken Expression an der apikalen Membran von Enterozyten galt, konnte der FATP-2 kaum detektiert werden [186,187]. In anderen Untersuchungen zeigte FATP-2 ebenfalls eine starke Expression in Caco-2-Zellen und eine größere Relevanz des Transporters bei der Fettsäure-Aufnahme als bisher angenommen [118]. Die Rolle des GLUT-2 wird in der apikalen Glucose-Aufnahme ebenfalls diskutiert. Der Glucose-Transport in die Zelle findet im Darm vorwiegend über SGLT-1 statt. Jedoch kann GLUT-2 bei hohem luminalen Glucose-Angebot schnell in die apikale Bürstensaummembran der Enterozyten eingebaut

werden und auf diese Weise die Arbeit des SGLT-1 unterstützen [3,185,188]. Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Expression, die auch in der Literatur zu finden sind, kann auf die große Heterogenität zurückgeführt werden, die Caco-2-Zellen aufweisen. Beispielsweise gibt es abhängig von der Herkunft aus verschiedenen Zellbanken Unterschiede der Expression des SGLT-1 [189].

Die Caco-2-Zellen unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft zwischen den Zelllinien, sondern verändern sich auch in Kultivierung mit zunehmender Passagierung. Caco-2-Zellen können Subpopulationen wie z. B. TC7 bilden, die aufgrund von genetischen Veränderungen Merkmale gewinnen bzw. verlieren [135,190,191]. Die Auswahl der Passagennummer der Caco-2-Zellen hat einen großen Einfluss auf den Glucose-Verbrauch und die Expression der Hexose-Transporter. Während der Glucose-Verbrauch mit steigender Passagennummer zwischen 29 bis 198 sinkt [192], erhöht sich die Menge an mRNA von SGLT-1, GLUT-2 und GLUT-5, was mit einer steigenden Expression dieser Transporter einhergeht [193,194]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Passagennummern 20-40 gearbeitet, die basierend auf den Ergebnissen des Western-Blots, GLUT-2 und FATP-2 wenig exprimieren.

4.1.1.3 Die Induktion der GLUT-2-Expression

Zur Untersuchung der Glucose-Aufnahme über GLUT-2, gab es bereits mehrere Ansätze, die Expression des Transporters in Zellen zu verstärken, wie u. a. durch die Erhöhung der Glucose-Konzentration im Medium. Allerdings führte eine hohe Zugabe von Glucose (25 mM) im Vergleich zu wenig Glucose (1 mM) in den niedrigen Passagen der Caco-2-Zellen zu einer geringeren Menge der gemessenen GLUT-2-mRNA [194], was auf die unkontrollierbare Heterogenität einer Krebszelllinie zurückgeführt wird [195]. Da Insulin in den Muskel- und Fettzellen die Translokalisierung von GLUT-4 in die Membran bewirkt, wurde nach Zugabe des Pankreashormons ebenfalls die Expression von GLUT-2 genauer untersucht. *Tobin et al.* beschrieben, wie die Behandlung der Caco-2-Zellen mit Insulin stattdessen zu einer Internalisierung von GLUT-2 führte, sodass weniger Transporter an der Bürstensaummembran exprimiert wurden. Demzufolge kontrolliert Insulin abhängig vom Gewebe die Glucosekonzentration im Blut durch unterschiedliche Mechanismen, u. a. durch Verringerung aktiver Transporter in den Plasmamembranen der Darmzellen [196]. Nach der Behandlung der Zellen mit dem Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) zeigte sich eine verstärkte Expression von SGLT-1 und GLUT-5, während sich die Menge der mRNA von GLUT-2 verringerte [197]. Schließlich erhöhte keine der Maßnahmen die GLUT-2-Expression in Caco-2-Zellen. Außerdem kann die Zugabe, insbesondere von

hormonell wirkenden Substanzen, das Caco-2-System im unkontrollierten Maß verändern und ein noch artifizielles System erschaffen.

4.1.1.4 Betrachtung ausgewählter Methoden zur Bestimmung der Proteinexpression

Wie bereits unter 4.1.1 beschrieben, ist die Existenz von SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 in Caco-2-Zellen nach der Differenzierung untersucht worden. Häufig wurden die Expression und ihre Veränderung z. B. nach Behandlung mit Hemmstoffen mithilfe der mRNA ermittelt. Im Gegensatz zur Bestimmung der Transportproteine durch Immunassays, wie z. B. dem Western-Blot, wird bei der Messung der mRNA die Proteinexpression auf Transkriptionsebene untersucht. Von der mRNA bis zur tatsächlichen Bildung eines Transportproteins sind noch einige Schritte notwendig, die durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden können [198]. Die Immunassay-Methoden eignen sich besser zur Bestimmung der tatsächlichen Proteinexpression, weil sie die bereits exprimierten Proteine anstatt der Vorstufen detektieren. Jedoch lässt die Bestimmung der Proteine mithilfe der beschriebenen Methoden keine Schlussfolgerungen auf ihre korrekte Struktur und Faltung zu. Durch den Nachweis der Expression von Transportproteinen kann nicht auf deren Funktionalität geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure über drei Wochen in Caco-2-Zellen beobachtet und mit der Expression verglichen, die im Western-Blot gemessen wurde.

4.1.2 Untersuchungen zur Nährstoffaufnahme in die Zellen mithilfe ³H-markierten Substraten über drei Wochen

Die Veränderung der Substrataufnahme in Caco-2-Zellen nach Erreichen der Konfluenz und während der Differenzierung ist bisher wenig erforscht. Viele Studien, insbesondere zum Glucose-Transport und dessen Hemmung, wurden nach Bestimmung der mRNA oder der Transportproteine im Immunassay pauschal zum Ende der Differenzierung durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten bisher in der Annahme, dass nur differenzierte Zellen funktionierende Transporter exprimieren [133,199]. Im Hinblick auf eine Verkürzung der Experimentierdauer und zur weiteren Charakterisierung des Caco-2-Modells wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme von Glucose, Fructose und Palmitinsäure in die Enterozyten über drei Wochen untersucht. Während die Glucose-Aufnahme ihr Maximum an Tag 3 mit anschließender Verminderung bis Tag 21 nach Konfluenz zeigte, stieg die Aufnahme der Fructose ab Tag 3 bis Tag 15 bzw. 21 nach Konfluenz kontinuierlich an. Die Palmitinsäure-Aufnahme blieb über die drei Wochen relativ konstant. Die erhöhte

Glucose-Aufnahme an Tag 3 nach Konfluenz ist möglicherweise auf einen verstärkten Glucosebedarf zu Beginn der Differenzierung zurückzuführen. Glucose als Schlüsselmolekül in menschlichen Zellen liefert bei seiner Verstoffwechslung neben Bausteinen für die Biosynthese auch schnell Energie [113], was wahrscheinlich zu Beginn der Spezialisierung der Caco-2-Zellen vermehrt eine Rolle spielte. Die Steigerung der Fructose-Aufnahme verlief parallel zur Differenzierung der Zellen und zeigte möglicherweise als Surrogat-Parameter die generelle Funktionalität von Proteinen an. Da zur Deckung des Energiebedarfs bevorzugt Kohlenhydrate verwendet werden, ist die konstante Fettsäure-Aufnahme über drei Wochen vermutlich auf die kontinuierliche Speicherung der Lipide als Energiereserve zurückzuführen [113].

Um für die Aktivität der Transporter eine ausreichende Substratkonzentration zu gewährleisten, wurde die Aufnahme des radioaktiven Substrats zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von 0,1 pM-100 μ M der nicht-radioaktiven Glucose, Fructose oder Palmitinsäure über drei Wochen getestet. Außerdem hat eine Supplementierung des ^3H -markierten Materials mit einer größeren Konzentration des nicht-radioaktiven Substrats zur Folge, dass im Testmaterial enthaltene Monosaccharide und Fettsäuren im kleinen Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Messung zeigen. Die Anreicherung von radioaktiver Glucose-Lösung mit nicht-radioaktivem Substrat ist eine gängige Methode und wurde auch in anderen Arbeiten bei Aufnahmestudien verwendet [199]. Allerdings führt die Zugabe höherer Konzentrationen des nicht-radioaktiven Materials zum radioaktiven Substrat zu einer Verringerung des Messsignals, wodurch kleine Aufnahmehemmungen durch das Testmaterial bei zu geringen Messwerten nicht mehr erfasst werden können. Die Pseudohemmung kommt durch das erhöhte Angebot an nicht-radioaktiver Glucose zustande, die das radioaktive Substrat an den Transportern verdrängt und vermehrt aufgenommen wird. Unter Verwendung von 0,1, 1, 10 und 100 μ M nicht-radioaktiver Glucose, waren die Messwerte bereits an Tag 3 nach Konfluenz sichtbar reduziert, weshalb sich die Experimente mit diesen Konzentrationen nicht eigneten und vor Erreichen von Tag 15 abgebrochen wurden. Nach Supplementierung mit 100 μ M nicht-radioaktiver Glucose sank das Messsignal an Tag 3 nach Konfluenz im Vergleich zu den Werten nach Zugabe von nur 0,001 μ M nicht-radioaktivem Substrat sogar auf weniger als die Hälfte ab.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Fructose und Palmitinsäure, bei denen die Versuche nur mit radioaktiven Substraten umgesetzt wurden, sind die Experimente mit ^3H -markierter Glucose nur mit Supplementierung von 0,001 μ M nicht-radioaktiver Glucose durchgeführt wurden. Die Vorgehensweise nur das radioaktiv markierte Substrat einzusetzen, entwickelte sich erst im Verlauf der vorliegenden Arbeit. Jedoch gab es unter der Supplementierung mit 0,1, 1, 10 und 100 pM nicht-radioaktiver Glucose bereits einen sanften Anstieg der Aufnahme, wobei nach Applikation von 0,001 μ M nicht-radioaktiver

Glucose das Maximum erreicht wurde. Vermutlich fand der Glucose-Transport bereits bei sehr geringen Mengen des Substrats statt, benötigte aber höhere Konzentration, um seine Aktivität vollständig zu entfalten.

Für weitere Experimente wurde aus den genannten Gründen die radioaktive Lösung zur Messung der Glucose-Aufnahme mit 0,001 μM nicht-radioaktivem Substrat angereichert, während die Studien mit Fructose und Palmitinsäure ohne Supplementierung durchgeführt wurden.

4.1.3 Der Zusammenhang zwischen Expression von Transportern und ihrer Substrataufnahme über drei Wochen

Mithilfe des Western-Blot-Verfahrens wurden die Transportproteine SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 qualitativ über drei Wochen in Caco-2-Zellen nachgewiesen. Durch die zeitintensive Methode und die hohe Anzahl an Versuchen, die nötig war, um das Western-Blot-Verfahren für jeden Transporter zu optimieren, konnten nur die Ergebnisse für den SGLT-1 untereinander semiquantitativ statistisch ausgewertet werden. Anschließend wurde die Aufnahme in die Zellen mithilfe ^3H -markierter Substrate einmalig über drei Wochen untersucht und mit den Ergebnissen aus dem Western-Blot verglichen. Bei näherer Betrachtung der Bandenintensitäten, schien die Expression des SGLT-1 über drei Wochen schwach abzunehmen. Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Probetag 1 und den anderen Probetagen. Die Expression des GLUT-2 wirkte nach visueller Auswertung über die Probenzeit stabil. Beim Fructose-Transporter GLUT-5 nahm die Bandenstärke, die der Expression entspricht, über drei Wochen im geringen Maß zu. Die Ergebnisse zur Aufnahme von Glucose und Fructose über drei Wochen stützen die visuell schwach wahrnehmbaren Tendenzen über die Expression der Proteine im Western-Blot. Während die Glucose-Absorption von Tag 1 bis Tag 15 nach Konfluenz um die Hälfte abnahm, stieg die Fructose-Aufnahme von Tag 1 bis Tag 15 nach Konfluenz um ca. die doppelte Menge an. Die verstärkte Bandenintensitäten der FATP-2-Proteine an Tag 3 und 4 im ersten Gel und an Tag 21 im zweiten Gel deuteten einen Trend an, bei dem die Expression des FATP-2 über drei Wochen geringfügig zunahm. Auch die Expression des FATP-4 zeigte eine leichte Steigerung über den Zeitraum der Probennahme. Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Palmitinsäure konnten die Tendenzen der Expression der Proteine nicht bestätigen und zeigten stattdessen eine relativ stabile Aufnahme der Fettsäure über drei Wochen.

Eine qualitative Korrelation zwischen Expression der intestinalen Transporter aus den Ergebnissen des Western-Blots und Funktionalität, konnte durch eine vorhandene Substrataufnahme für jede getestete Substanz über die Differenzierungszeit bestätigt werden. Hingegen konnte kein zuverlässiger quantitativer Zusammenhang zwischen der Expression

von Transportproteinen und ihrer Funktionalität festgestellt werden. Die Expression von Proteinen muss nicht zwangsläufig mit einer entsprechenden Aktivität und Funktionalität einhergehen, weil z. B. die detektierten Antigene nicht zu vollständigen Proteinen gehören, sondern nur zu Partialstrukturen oder durch Ähnlichkeit zum Antigen polyklonale Antikörper auch andere Proteine binden können. Außerdem können, insbesondere bei lipophilen Substanzen, passive Diffusionsvorgänge eine Rolle spielen und die Aufnahme in die Zellen beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vor allem die Substrataufnahme in die Zellen über Transporter an der apikalen Membran untersucht. Jedoch wurden mit dem Western-Blot die Transportproteine im kompletten Zell-Lysat erfasst. Transporter, wie z. B. GLUT-2, sind vorwiegend an der basolateralen Seite der Enterozyten positioniert und wandern nur bei hohen luminalen Glucose-Konzentrationen zur apikalen Membran [188]. In früheren Arbeiten konnte bewiesen werden, dass auch Transporter, wie z. B. SGLT-1, die sich nur an der apikalen und nicht an der basolateralen Membran der Enterozyten befinden, vermutlich als Reserve in einer erheblichen Menge in den Zellen vorkommen [200], die im Western-Blot ebenso erfasst werden.

4.1.4 Die Wirkungen von Natriumbutyrat auf Caco-2-Zellen

Im Durchschnitt zeigten die Zellen, die mit 5 mM Natriumbutyrat behandelt wurden, eine signifikante Herabsetzung der Zellviabilität von $19,2 \pm 10,4\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde eine verminderte Proliferation und eine verstärkte Differenzierung nach Zugabe der kurzkettigen Fettsäure zu intestinalen Krebszelllinien festgestellt [140,201,202]. In Zellen, in denen Apoptose stattfand, welche u. a. durch eine Veränderung der Regulatorproteine der Bcl-2-Familie induziert wurde, gab es gleichzeitig eine Erhöhung der an der Differenzierung beteiligten CDK-Inhibitoren p21 und p27 [148]. Für gesunde Darmzellen hingegen stellt das Butyrat eine wichtige Energiequelle dar [140] und unterstützt die Proliferation, was auch als Butyrat-Paradox bekannt ist [141]. In Ratten wurde nach ballaststoffreicher Diät eine Erhöhung des Butyrats und damit verbunden eine Verminderung der Tumormasse im Darm gemessen [203]. Mittlerweile werden CDK-Inhibitoren als Arzneistoff in der Tumorthherapie eingesetzt [204]. In Zellversuchen werden zur Beschleunigung der Spezialisierung von Caco-2-Zellen Differenzierungscocktails verwendet [117], die häufig Buttersäure und ihre Salze enthalten und laut der Protokolle Experimente mit differenzierten Enterozyten zu früheren Zeitpunkten als nach 15-21 Tagen möglich machen [205]. Aufnahmestudien, die unbehandelte und behandelte Zellen umfassen und die Aktivität der Transporter im Laufe der Differenzierung untersuchen, wurden dazu bisher nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteingehalt aller Proben bestimmt und auf denselben Gehalt eingestellt bzw. bezogen, um den Einfluss der verminderten Zellproliferation auf die Ergebnisse der Expression von Transportproteinen und Substrataufnahme zu minimieren. Die Natriumbutyrat-Behandlung zeigte über drei Wochen eine verstärkte Expression von FATP-4 und eine verminderte Menge des exprimierten GLUT-2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe im Western-Blot. Auf die Expression der restlichen Transporter schien die Behandlung mit Natriumbutyrat keinen visuell wahrnehmbaren Effekt zu haben. Über die Wirkung der kurzkettigen Fettsäure auf Enzym- und Transportsysteme intestinaler Krebszelllinien ist bisher wenig bekannt. Die Applikation von Butyrat, Propionat und Acetat führte im Zellversuch in anderen Studien zu einer reduzierten parazellulären Permeabilität, was sich in einer Erhöhung des TER und einer Verminderung des aufgenommenen Mannitols äußerte. Gleichzeitig waren Differenzierungsmerkmale nach Zugabe von Butyrat, wie z. B. die Aktivität der alkalischen Phosphatase, das carcinoembryonale Antigen und die Bildung von gewölbeartigen Strukturen (Domes) erhöht [138]. Experimente an Ratten zeigten, dass die Bildung neuer Tumore durch Einleitung der Apoptose unterdrückt werden konnte, was u. a. auf die Wirkung des Natriumbutyrats als Histon-Deacetylase-Inhibitor im Zellkern zurückgeführt wird [202,206-209]. Über diesen Weg kann die kurzkettige Fettsäure die Regulierung von Genen und somit die Expression von Proteinen, wie z. B. GLUT-2 oder FATP-4 steuern. Allerdings lässt sich von der Expression der Proteine nicht unbedingt auf deren Funktionalität schließen.

Aus den Untersuchungen zur Substrataufnahme geht hervor, dass erst am Tag 10 und Tag 15 nach Konfluenz die Glucoseabsorption in die Zellen unter Behandlung mit Natriumbutyrat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht erhöht war. Die Funktionalität der Fructose-Transporter war nach Natriumbutyrat-Zugabe über den Differenzierungszeitraum deutlich vermindert. Die Palmitinsäure-Aufnahme war an Tag 3 und Tag 15 nach Konfluenz mit Natriumbutyrat-Behandlung schwach erhöht. Da die Versuche nur einmal jeweils über 15-21 Tage durchgeführt wurden, konnte über die Signifikanz keine Aussage getroffen werden. Die Unterschiede der Palmitinsäure-Aufnahme über drei Wochen wirkten besonders durch die alternierende Abwechslung der Ergebnisse zwischen den Behandlungen mit und ohne Natriumbutyrat als gering und zufällig entstanden. Es lässt sich keine Parallele zwischen der Expression von Transportproteinen und Substrataufnahme unter Natriumbutyrat-Einfluss erkennen. Die Wirkung, die Natriumbutyrat auf die Expression von GLUT-2 und FATP-4 gezeigt hatte, konnte für die Substrataufnahme nicht bestätigt werden. Entweder glichen Kompensationsmechanismen anderer Transporter desselben Substrats die Aufnahme aus oder die exprimierten Proteine waren z. T. nicht voll funktionsfähig. Da die Zugabe des Differenzierungsreagenzes keinen offensichtlichen Vorteil auf die Substrataufnahme aufgrund einer beschleunigten Funktionalität oder verstärkten Ausprägung

von Transportern gegenüber unbehandelten Zellen zeigte, ist die Verwendung von Natriumbutyrat im Rahmen entsprechender Experimente nicht empfehlenswert.

4.1.4.1 Die Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen

Zur Charakterisierung von Transportprozessen wird die passive Diffusion häufig auf Eis bestimmt. Dabei wird ausgenutzt, dass die Aktivität von Proteinen temperaturabhängig ist und bei Temperaturen $< 4^{\circ}\text{C}$ nur im vernachlässigbaren Maß stattfindet [169]. Während die Aufnahme von Fructose und Palmitinsäure auf Eis bei den drei Testkonzentrationen niedrigere Werte im Gegensatz zur Aufnahme bei 37°C zeigte, waren die Ergebnisse der Glucose-Aufnahme bei einer Temperatur $< 4^{\circ}\text{C}$ unerwarteterweise signifikant höher als bei Körpertemperatur. Wie bereits unter 4.1.2.1 erläutert spielt Glucose als Energielieferant für Zellen eine lebenswichtige Rolle. Die Inkubation auf Eis setzte die Zellen unter Stress und führte vermutlich zu einem größeren Energieverbrauch, um die lebenswichtigen Funktionen aufrechtzuerhalten. Da es sich bei Glucose um ein hydrophiles Molekül handelt, ist der Transport in die Zelle durch passive Diffusion in dieser Menge schlecht zu erklären. Möglicherweise haben sich Mechanismen im Laufe der Evolution entwickelt, welche die Glucose-Aufnahme auch unter ungünstigen Bedingungen gewährleisten. Eventuell spielt dabei GLUT-2 eine Rolle, der die passive Diffusion von Glucose erleichtert.

Auf der anderen Seite gibt es inzwischen wissenschaftliche Arbeiten, in denen die Ergebnisse entgegen der allgemeinen Annahme, auf eine Aktivität von Transportern bei Temperaturen $< 4^{\circ}\text{C}$ hindeuten. *Takano et al.* untersuchten den Nukleosidtransporter ENT1 von Erythrozyten und stellten eine Aufnahmehemmung des Substrats Uridin nach Zugabe eines bekannten Inhibitors bei Durchführung auf Eis fest. Außerdem verringerte Phloretin als GLUT-1-Inhibitor unter gleichen Bedingungen konzentrationsabhängig die Aufnahme von Glucose in die Zellen [169]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls auf eine Funktionsfähigkeit der GLUT-Transporter bei Temperaturen $< 4^{\circ}\text{C}$ hin, wodurch der erhöhte Glucosebedarf der Zellen unter Kältestress gedeckt werden konnte. Da auch Fructose über GLUT-Transporter in die Zelle gelangt, sind die Ergebnisse zur passiven Diffusion ebenfalls kritisch zu betrachten.

Für die drei getesteten Substrate wurde ein Diffusionskoeffizient D errechnet, der die Aufnahme in die Zellen bei Temperaturen $< 4^{\circ}\text{C}$ beschreibt. Obwohl der Koeffizient D die Zeit und die Proteinmasse einbezieht, unterscheidet er sich bei Experimenten mit Palmitinsäure nach 10 min $(0,9491 \pm 00418 \text{ (h}\cdot\text{mg)}^{-1})$ und nach 1 h $(0,2874 \pm 0,0584 \text{ (h}\cdot\text{mg)}^{-1})$ Inkubationszeit deutlich. Auch die prozentuale Aufnahme der Fettsäure auf Eis ist nach 1 h um 20% geringer als nach 10 min. Bei der langkettigen Fettsäure handelt es sich um ein lipophiles Molekül, das aufgrund seiner chemischen

Eigenschaften fähig ist, mithilfe eines Flipflops die Zellmembran in wenigen Sekunden zu überwinden [114]. Die Temperaturabhängigkeit der Membran-Lipid-Fluidität spielt neben der Zusammensetzung der Membran bei der passiven Diffusion von Fettsäuren in die Zelle eine große Rolle. Bei vermehrter Einlagerung gesättigter Fettsäuren, wie z. B. Palmitinsäure, und bei längerer Kälteexposition nimmt die Unbeweglichkeit der Membran zu [210], wodurch die Abnahme der Palmitinsäure-Aufnahme in die Zelle und des Diffusionskoeffizients D über die Zeit erklärt werden kann. Aufgrund möglicher Aktivität von Transportern bei Temperaturen $< 4^{\circ}\text{C}$ und Veränderung der Membranfluidität durch Kälte und Substrat, eignet sich die Messung zur Bestimmung der passiven Diffusion für Glucose; Fructose und Palmitinsäure auf Eis nicht.

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der passiven Transportvorgänge von Glucose ist die Verwendung des in der Natur bedeutungsloseren L-Enantiomers. Dabei wird angenommen, dass L-Glucose aufgrund seiner veränderten räumlichen Anordnung der Atome die Transportproteine von D-Glucose nicht benutzen kann und nur über passive Diffusionsvorgänge aufgenommen wird. In einigen wissenschaftlichen Arbeiten wurde diese Methode verwendet, um bei Aufnahmestudien mit Transportern die Menge des Substrats, das nicht über Transporter aufgenommen wurde, abzuziehen. Jedoch wurden keine Daten dazu veröffentlicht [25,199], was die Einschätzung hinsichtlich Plausibilität und Vergleichbarkeit mit anderen Studien unmöglich macht. Da L-Glucose keine Rolle im menschlichen Organismus spielt, sind die Ergebnisse, die bei den Aufnahmestudien mithilfe von L-Glucose erzielt wurden, möglicherweise nicht auf D-Glucose übertragbar.

4.1.4.2 Aufnahmestudien mit bekannten Inhibitoren

Der SGLT-1-Inhibitor Phlorizin und der GLUT-2-Inhibitor Phloretin zeigten sowohl im Glucose-Assay als auch im Fructose-Assay starke Aufnahmehemmungen von über 55%. Der duale SGLT-1/SGLT-2-Inhibitor Sotagliflozin wurde als $25\ \mu\text{M}$ Lösung appliziert und zeigte keine signifikante Hemmwirkung. Bei Vorliegen einer schwachen Hemmung ist eine ausreichende Kompensation durch andere Glucose-Transporter bei einer Substratinkubation von 1 h im Caco-2-System möglich. Dennoch wurde mithilfe der Chalkone als Positivkontrolle die Funktionalität der Methode für Aufnahmestudien von Glucose und Fructose bestätigt. Nach Applikation von $25\ \mu\text{M}$ FATP-2-Inhibitor Lipofermata konnte keine Aufnahmehemmung von Palmitinsäure gezeigt werden. In Anlehnung an *Sandoval et al.*, die für Lipofermata (CB-16.2) eine IC_{50} in Caco-2-Zellen von $4,84\ \mu\text{M}$ bestimmten [117], wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Einstellungen ausprobiert, u. a. wurde die Inkubationszeit mit Substrat und Inhibitor nach der Hungerzeit auf 10 min herabgesetzt. In einem weiteren Versuch wurde bereits während der Hungerzeit

für 1 h mit Lipofermata inkubiert und danach entweder für 10 min oder für 1 h mit ^3H -markiertem Substrat inkubiert. Keine der Maßnahmen führte zu einer messbaren Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind eventuell auf dem Einsatz verschiedener Substrate zurückzuführen. Während *Sandoval et al.* mit dem fluoreszierenden Fettsäure-Substratanaloga C1-BODIPY-C12 arbeiteten, wurde bei den vorliegenden Experimenten die ^3H -markierte Palmitinsäure als authentisches Substrat verwendet. Mögliche andere Gründe für die unterschiedlichen Resultate werden nachfolgend diskutiert. Gegebenenfalls hätte nach 1 h Vorinkubation mit Inhibitor die Inkubationszeit mit Substrat auf Sekunden bis wenige Minuten reduziert werden müssen, um eine Hemmung zu sehen, was aufgrund des Zeitverzugs durch Waschschrte, vor allem in Bezug auf die gleichzeitige Testung mehrerer Extrakte, praktisch nicht umsetzbar war. Womöglich wurde die Hemmung des FATP-2 nach Applikation von Lipofermata durch passive Diffusionsvorgänge der Fettsäure bereits nach kurzer Zeit kompensiert. Wie bereits unter 4.1.2.2 beschrieben, findet der Flipflop der Lipide über die Membran innerhalb von Sekunden statt. Im Hinblick auf die therapeutische Anwendung beim Menschen ist eine kurzzeitige Hemmung von Transportern für wenige Minuten eher unbedeutend, da die Nahrung während der intestinalen Transitzeit mehrere Stunden bis Tage im Darm verweilt [211]. Falls es sich bei FATP-4 doch um den intestinalen Haupttransporter für die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren handelt (siehe 4.1.1.2), könnte dieser aufgrund einer stärkeren Expression bzw. Aktivität die Hemmung des FATP-2 ausreichend kompensieren. Da es noch keinen kommerziell erhältlichen FATP-4-Inhibitor gibt, konnte dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit nicht getestet werden. Hinsichtlich der Suche nach neuen Inhibitoren für intestinale Fettsäuretransporter eignete sich das Caco-2-Modell unter den gegebenen Bedingungen nicht. Der Einsatz von Inhibitoren für intestinale Fettsäuretransporter ist aufgrund der stark ausgeprägten passiven Diffusion kritisch zu betrachten.

4.1.4.3 Die kinetischen Untersuchungen

Zur Charakterisierung des Caco-2-Modells wurden als Parameter für die Kinetik die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Aufnahmegeschwindigkeit v_{\max} für die Glucose-Absorption mit und ohne Inhibitoren in Caco-2 Zellen bestimmt. In Zellsystemen werden oft mehrere Transporter für das gleiche Substrat exprimiert. Caco-2-Zellen exprimieren für die Aufnahme von Glucose vorwiegend SGLT-1 und GLUT-2. Zusätzlich konnte die mRNA von anderen Transportern der GLUT-Familie, wie z. B. GLUT-1 und GLUT-3, nachgewiesen werden [131], die mit einem K_M -Wert von 20 mM und 10 mM möglicherweise Aufnahmehemmungen anderer Transporter kompensierten [212]. Aus

diesem Grund beschreiben die erhaltenen Ergebnisse der kinetischen Parameter nicht einen einzelnen Transporter, sondern das gesamte System. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M war für die Glucose-Aufnahme mit $44,3 \pm 27,1$ mM mehr als die Hälfte niedriger als nach Zusatz von SGLT-1-Inhibitor Phlorizin mit $94,3 \pm 16,6$ mM oder GLUT-2-Inhibitor Phloretin mit $86,4 \pm 40,5$ mM. Somit war die Affinität der Transporter zum Substrat nach Behandlung mit Inhibitoren herabgesetzt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Hexose-Aufnahme ähnelte mit einem Wert von $2953,1 \pm 1795,0$ nmol/min pro mg Protein dem erhaltenen v_{max} -Wert nach Zugabe von Phlorizin mit $3040,2 \pm 1458,2$ nmol/min pro mg Protein, während die v_{max} nach Behandlung mit Phloretin mit $2160,5 \pm 398,6$ nmol/min pro mg Protein etwas geringer ausfiel. Eine Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante bei gleichbleibender Maximalgeschwindigkeit nach Applikation der Inhibitoren ist charakteristisch für eine kompetitive Hemmung. Die Tendenzen der kompetitiven Hemmung, die bereits für Phlorizin als SGLT-1-Inhibitor beschrieben wurden [213], lassen sich für die Glucose-Aufnahme im gesamten Caco-2-System trotz anderer Transporter erkennen. Wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, wie es für die Glucose-Aufnahme nach Phloretin-Behandlung der Fall war, handelt es sich um eine nicht-kompetitive Hemmung.

In anderen Studien fand die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante oder die Erfassung der einzelnen Phasen des Transporters häufig mit isolierten Nährstofftransportern statt, wodurch die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar sind. Loo *et al.* transfizierten die humane Variante des SGLT-1 in die Oozyten von *Xenopus laevis* DAUDIN bevor sie an den isolierten Transportern weitere Tests durchführten [214]. In der Literatur konnte für einzelne Transporter, wie den SGLT-1 des Kaninchens, ein K_M -Wert 0,4 mM von und ein v_{max} -Wert von 3,0 nmol/min pro mg Protein bestimmt werden [215]. Ähnliche K_M -Werte von 0,1-2 mM konnten auch in anderen Studien für den natriumabhängigen Glucose-Transporter ermittelt werden [216,217]. Der K_M -Wert des GLUT-2 ist mit 42 mM wesentlich höher und zeigt somit eine geringere Affinität zum Substrat Glucose als SGLT-1 [212], was auch nach Zugabe des Phlorizins (SGLT-1-Hemmung) im Caco-2-Modell durch einen höheren K_M -Wert von $94,3 \pm 16,6$ mM im Vergleich zum Wert von $86,4 \pm 40,5$ mM nach Behandlung mit Phloretin (GLUT-2-Hemmung) angedeutet wurde. Zur v_{max} konnten nur wenige vergleichbare Daten in der Literatur gefunden werden. Oftmals unterschieden sich die Werte, weil sich die Ergebnisse auf unterschiedliche Zeiteinheiten oder Mengenangaben, z. B. pro mg Protein oder pro Zelle, bezogen [218].

Die Untersuchungen zur Kinetik waren umfangreich und fehleranfällig, weshalb die erhaltenen K_M - und v_{max} -Werte lediglich die Größenordnung der Glucose-Aufnahme mit und ohne Inhibitoren in Caco-2-Zellen widerspiegelt. Die praktische Durchführung war aufgrund des Zeitverzugs durch Waschschrte nach den Versuchen, die teilweise nur wenige

Sekunden umfassten, nicht leicht umsetzbar. Durch Zugabe sehr hoher Konzentrationen des nicht-radioaktiv markierten Substrates, wurde durch Verschiebung des Verhältnisses weniger ^3H -markierte Glucose aufgenommen und die Messwerte erreichten sehr kleine Zahlenwerte, die vom Kontrollwert (Blank) zu unterscheiden waren, jedoch eine große Messungenauigkeit mit sich brachten. Die Zellexperimente wiesen durch unvermeidbare Unterschiede in der Zellzahl und Absaugverluste während der Waschschriffe experimentelle Schwankungen auf. Es handelte sich um ein wässriges System, in dem sich die verwendeten Inhibitoren aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften auch nach Zugabe von 0,3% DMSO bzw. 1% Ethanol entsprechend schlecht lösten, was zu Messfehlern führen konnte. Außerdem ist abschließend nicht geklärt, ob Phlorizin und Phloretin als strukturell verwandte Substanzen die für die kinetischen Untersuchungen unter Anwesenheit mehrerer Transporter notwendige selektive Hemmwirkung besitzen. Alternativ wurde in anderen Studien zur Bestimmung neuer Inhibitoren natriumfrei gearbeitet, um die Aktivität des natriumabhängigen Glucose-Transporters SGLT-1 auszuschließen [133,219]. Jedoch ist fraglich, inwiefern die Abwesenheit des ubiquitären Natriums sichergestellt werden kann.

4.1.4.4 Die Wahl des Substrats für die Aufnahmestudien

Für Experimente zur Aufnahme und zur Hemmung durch intestinale Glucose-Transporter wurden in anderen Studien bereits verschiedene Substrate eingesetzt. Das häufig eingesetzte Glucose-Analogon O-Methyl-D-Glucose kann in Zellen nicht metabolisiert werden [220], wodurch die Messung nicht durch Spaltung in Abbauprodukte beeinflusst wird [221,222]. Aufgrund ihrer Fluoreszenzfähigkeit, mit der sie nach Absorption in die Zellen gemessen werden, können 2-Desoxy-D-Glucose und 2-Desoxy-2-[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-Glucose (2-NBDG) ebenfalls zur Untersuchung der Aufnahme eingesetzt werden [150,212]. Der Fettsäure-Transport wurde bereits mit fluoreszierenden Substratanaloga, wie z. B. C1-BODIPY-C12, erforscht [117]. Jedoch können die strukturell stark modifizierten Substrate im Gegensatz zum ursprünglichen Molekül zu einer veränderten Aufnahme über Transportproteine führen. Um eine authentische Substrataufnahme zu gewährleisten wurde in der vorliegenden Arbeit mit Tritium-markierter Glucose, Fructose und Palmitinsäure gearbeitet. Die Anwendung von radioaktiv markierten Stoffen in der Forschung und Industrie ist ein Messverfahren, das zu eindeutigen Ergebnissen mit hoher Detektionssensitivität führt [223].

4.2 Der Einfluss von Extrakten auf intestinale Transporter

4.2.1 Methanol als Lösungsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus der Extraktion auf den polyphenolischen Verbindungen, bei denen einige Vertreter, wie z. B. Quercetin, in anderen Studien bereits Aufnahmehemmungen von Monosacchariden in Caco-2-Zellen hervorriefen [3]. Da viele Polyphenole nicht gut wasserlöslich sind [224], wurde neben Wasser auch Methanol als Extraktionsmittel verwendet. Der daraus gewonnene, trockene, methanolfreie Extrakt, wurde konzentrationsabhängig an Enterozyten getestet. Hinsichtlich einer oralen Applikation beim Menschen können aufgrund von Gallensäuren, die der Fettverdauung dienen, auch nicht gut wasserlösliche Stoffe über Mizellbildung vom Darm resorbiert werden [113]. Mittlerweile gibt es auch technologisch immer mehr Ansätze, um die Löslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen zu verbessern. Dazu gehört die Herstellung von Nanosuspensionen [224].

4.2.2 Die Toxizität der verwendeten pflanzlichen Extrakte

Die Herabsetzung der Viabilität, die über die verminderte metabolische Aktivität im MTT-Assay messbar ist, wird häufig mit einer einhergehenden Toxizität der Testsubstanz in Verbindung gebracht. Um eine Verminderung der Substrataufnahme durch eine reduzierte metabolische Aktivität während der radioanalytischen Versuche und eine Schädigung des Verdauungssystems bei oraler Einnahme zukünftig auszuschließen, wurden drei unterschiedliche Extraktkonzentrationen der traditionell verwendeten Pflanzen an Caco-2-Zellen getestet. Insbesondere der methanolische Extrakt von *Cynara cardunculus* L. zeigte mit einer IC_{50} von 0,5 mg/mL eine ähnlich ausgeprägte Zytotoxizität wie der wässrige Extrakt von *Melissa officinalis* L. mit einer IC_{50} von 0,2 mg/mL. Viele der Inhaltsstoffe sind Polyphenole [225,226], die als sekundäre Pflanzenstoffe ihrem Produzenten verschiedene positive Effekte bieten, u. a. Schutz vor UV-Strahlung, Abwehr vor Fressfeinden, Anlockung von Bestäubern etc. [224], wodurch sich ebenfalls die toxischen Wirkungen auf tierische Zellen erklären lassen. Die natürliche Transitzeit der Nahrung im Magen-Darm-Trakt beträgt mehrere Stunden bis Tage [211], weshalb die Inkubationszeit der Extrakte mit den Zellen für den Viabilitätsassay auf 24 h festgelegt wurde.

4.2.3 Die Hemmung intestinaler Transporter durch pflanzliche Extrakte und Naturstoffe

Die intestinale Aufnahme von Palmitinsäure konnte weder vom kommerziell erhältlichen FATP-2-Inhibitor Lipofermata noch von einem der getesteten Extrakte signifikant gehemmt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei FATP-2 um einen Transporter mit untergeordneter Relevanz handelt. Außerdem können passive Diffusionsvorgänge bei lipophilen Substraten wie Palmitinsäure mögliche Hemmungen kompensiert haben (siehe 4.1.4.2). Dabei bleibt es fraglich, ob sich das Caco-2-Zellmodell für solche Untersuchungen am FATP-2 eignet.

Die Blätter von Boldo und Walnuss hemmten sowohl den Glucose- als auch den Fructose-Transport zwischen 30,2 und 52,4% in die Zellen, was auf nicht-glykosylierte Polyphenole wie Catechin-Gerbstoffe als aktive Komponenten hindeutete. Insbesondere für (-)-Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechin wurde bereits in anderen Studien eine Hemmung der Glucose-Aufnahme durch sowohl natriumabhängige als auch natriumunabhängige Transporter beschrieben. Der isolierte sekundäre Pflanzenstoff Epigallocatechingallat bestätigte als 100 µM Lösung nach Testung in der vorliegenden Arbeit die signifikante Hemmung von Glucose- und Fructose-Aufnahme in Caco-2-Zellen. Die Interaktion der Gerbstoffe mit den Transportern beruht auf einer sterischen Hinderung und ist somit relativ unspezifisch, wodurch die Hemmung der Fructose-Aufnahme über GLUT-5 ebenfalls denkbar ist und physiologisch relevant sein kann [124].

Die stärkste Reduzierung der Glucose-Aufnahme um $82,8 \pm 4,3\%$ erzeugte eine Lösung mit 1 mg/mL des methanolischen Extrakts von Weißkohlblättern. Zubereitungen aus *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *alba* werden in der Literatur antihypertensive, antikanzerogene, antioxidative und antidiabetische Eigenschaften zugesprochen [227]. Im Kohl enthaltene organische Säuren, Glucosinolate und Polyphenole [172,173] wurden im Zell-Assay auf ihre Wirkungen in Caco-2-Zellen getestet. Die Flavonoid-Aglyka Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin riefen keine Hemmung der Glucose-Aufnahme, jedoch eine signifikante Verminderung der Fructose-Aufnahme hervor, die vorwiegend über GLUT-Transporter abgewickelt wird. Die Ergebnisse anderer Studien beschrieben die Hemmung von GLUT-2 durch Flavonoid-Aglyka [124]. Eventuell wurde eine Hemmung des GLUT-2 für den Transport von Glucose durch SGLT-1 kompensiert, wodurch nach Zugabe von Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin in Caco-2-Zellen kein signifikanter Effekt gemessen werden konnte. Die Hemmwirkung isolierter getesteter Naturstoffe war mittelmäßig stark ausgeprägt (25,8 - 41,3%). Jedoch sind in Extrakten Stoffgemische enthalten, die durch Zusammenwirken einzelner Effekte (Synergismus) durchaus eine hohe Gesamthemmung von Glucose und Fructose im Gastrointestinaltrakt erreichen können.

In anderen Arbeiten wurden die antidiabetischen Wirkungen von *Brassica oleraceae var. capitata* L. f. *alba* wie z. B. die Herabsetzung der postprandialen Hyperglykämie vor allem auf die Hemmung der intestinalen Enzyme α -Glucosidase und α -Amylase zurückgeführt [120,227]. Über die Verminderung der Glucose, Fructose oder Palmitinsäure-Aufnahme durch Hemmung intestinaler Transporter nach Anwendung von *Brassica*-Zubereitungen ist in der Literatur wenig bekannt. Der Angriff an verschiedenen Zielorten im menschlichen Körper kann pharmakologisch von Vorteil sein. Multi-Target-Drogen weisen bei gleicher Dosierung aufgrund synergistischer und additiver Effekte häufig eine stärkere Wirkung und weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen im Vergleich zu Single-Target-Therapeutika auf [120].

Am Zielort im Darm existieren neben den oral zugeführten Polyphenolen auch die vom körpereigenen Mikrobiom metabolisierten Verbindungen, die ebenfalls einen Einfluss auf Resorptionsvorgänge zeigen können. Zur Wirkung von Metaboliten auf intestinale Glucose- und Fructose-Transporter ist nicht viel bekannt. Urolithin A entsteht nach Umsetzung von Ellagitanninen durch körpereigene Bakterien im Darm [175,228] und wurde auf seine Hemmwirkung intestinaler Monosaccharid-Transporter getestet. Es zeigte keine Hemmung der Glucose-Transporter, jedoch mit $41,3^* \pm 6,9\%$ die stärkste Hemmung von Fructose im Vergleich zu den nicht metabolisierten, sekundären Pflanzenstoffen. In anderen Studien zeigte Urolithin A in der Leberzelllinie HEP-G2 eine Hemmung der Glucose-Aufnahme, die in dieser Krebszelllinie vorwiegend über GLUT-Transporter gewährleistet wird [229]. Möglicherweise hemmt Urolithin A hauptsächlich GLUT-Transporter, was auch den starken inhibitorischen Effekt auf die Fructose-Aufnahme bestätigt, die in Caco-2-Zellen über GLUT-2 und GLUT-5 abläuft [3]. Eine Hemmung des GLUT-2 für Glucose wurde vermutlich mithilfe des SGLT-1 kompensiert und war deshalb nicht mehr signifikant.

Mithilfe massenspektrometrischer Methoden wurden die Inhaltsstoffe des methanolischen Weißkohl-Extrakts, insbesondere von Fraktion 2, identifiziert. Obwohl zur Extrakterstellung die wenig Zucker enthaltenden Blätter des Kohls verwendet wurden, konnten $61,4 \mu\text{M}$ Hexosen in der getesteten Konzentration des methanolischen Extrakts nachgewiesen werden. Unter Einbeziehung der verwendeten Menge der radioaktiv-markierten Glucose von 2 nM , die mit $0,001 \mu\text{M}$ nicht-radioaktiver Glucose für die Versuche supplementiert war, ist die im Extrakt enthaltene Konzentration ausreichend, um die Messung zu beeinflussen. Durch Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des nicht-radioaktiven Materials, wurde eine kleinere Menge des ^3H -markierten Substrats aufgenommen, wodurch sich das Messsignal verringerte und eine Hemmung der Substrataufnahme suggerierte. Während der Zerkleinerung des ursprünglichen Drogenmaterials kam es zur Freisetzung von Enzymen, u. a. der Myrosinase, die

Senföglykoside je nach Verbindung einerseits in Isothiocyanate, Nitrile, Cyanoepithioalkane und Thiocyanate und andererseits in Schwefel, Sulfat und Glucose spaltet [230]. In den Blättern des Weißkohls sind ebenfalls Polysaccharide, wie z. B. Pektin und Hemicellulose enthalten, bei deren Spaltung kleinere Moleküle wie Tri-, Di- oder Monosaccharide entstehen [231]. Trotzdem kann durch den Weißkohl-Extrakt eine Hemmung intestinaler Transporter hervorgerufen worden sein, die von der Pseudohemmung überlagert und in unserem Modellsystem nicht festgestellt werden konnte. Aus diesem Grund sollten weitere Experimente mit überarbeiteten Techniken durchgeführt werden.

Die Abtrennung von Monosacchariden aus Extrakten wurde bereits in Studien z. B. mithilfe der Festphasenextraktion umgesetzt [219]. Jedoch werden bei diesen Methoden die betrachteten Substanzen häufig unvollständig und weitere Stoffe ebenfalls entfernt. Nicht-radioaktives Substrat mit Konzentrationen im pM-Bereich kann bereits die Aufnahme der radioaktiv markierten Monosaccharide beeinflussen. Durch die kontrollierte Zugabe des nicht-radioaktiven Substrates in hoher Konzentration zum ^3H -markierten Substrat können, wie unter 4.1.2.1 besprochen, kleine Konzentrationen an Hexosen in den Extrakten vernachlässigt werden (Isotopenverdünnungsmethode). Allerdings konnte diese Verfahrensweise im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden, weil die Werte dann zu gering für eine mathematisch-statistische Auswertung waren. Vermutlich lassen sich die Messsignale unter Verwendung einer stärkeren spezifischen Aktivität der Substrate bzw. durch den Wechsel der radioaktiven Markierung von Tritium zu einem stärkeren Strahler erhöhen, z. B. dem Radioisotop von Kohlenstoff ^{14}C .

5 Fazit

Entsprechend der Zielstellung der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des Charakterisierungsprozesses des Zell-Modells die Expression der Transportproteine SGLT-1, GLUT-2, GLUT-5, FATP-2 und FATP-4 über den Verlauf von 21 Tagen nach Konfluenz nachgewiesen und die Substrataufnahme mit ^3H -markierten Substraten über 15-21 Tage untersucht.

Ein zuverlässiger Zusammenhang zwischen der Expression der Transporter und ihrer Funktionalität in Caco-2-Zellen, die an der Substrataufnahme gemessen wurde, hat sich nicht bestätigt.

Die Zugabe von Natriumbutyrat ins Nährmedium der Zellen zur Beschleunigung der Differenzierung der Caco-2-Zellen erforderte zusätzliche Arbeitsschritte, führte jedoch zu keiner schneller eintretenden Funktionalität der Transporter im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Zellen werden möglicherweise durch unerwartete Effekte verändert, was eine erneute Charakterisierung erfordert. Zusammenfassend wird die Zugabe von Natriumbutyrat für weitere Experimenten nicht empfohlen.

Die Ergebnisse der auf Eis durchgeführten Studien zur passiven Diffusion legen nahe, dass einige Transporter im Caco-2-Modell durchaus eine Aktivität bei Temperaturen $< 4^\circ\text{C}$ aufweisen, wobei die Aufnahme, wie im Fall von Glucose, sogar verstärkt stattfindet. Es zeigte sich, dass die Methode zur Messung der passiven Diffusion von Glucose, Fructose und Palmitinsäure auf Eis nicht geeignet ist und wird daher für zukünftige Untersuchungen diesbezüglich nicht empfohlen.

Die kinetischen Untersuchungen zur Glucose-Aufnahme mit und ohne SGLT-1-Inhibitor Phlorizin und GLUT-2-Inhibitor Phloretin halfen bei der weiteren Charakterisierung des Caco-2-Modells.

Im Ergebnis wurde ein Zell-Assay unter Verwendung von radioaktiv markierten Substraten für die Glucose-Aufnahme an Tag 3 und die Fructose-Aufnahme an Tag 15 nach Konfluenz in Caco-2-Zellen entwickelt. Für zukünftige Untersuchungen zur Glucose-Aufnahme können demnach die Zellen wesentlich früher eingesetzt werden als bisher angenommen.

Aus verschiedenen Gründen, zu denen vermutlich besonders die Kompensation durch passive Diffusion gehört, konnte die Eignung des Caco-2-Modells für Untersuchungen zur Aufnahme von langkettigen, gesättigten Fettsäuren und zur Suche nach neuen Inhibitoren der Fettsäure-Transporter nicht bestätigt werden.

Um die intestinale Energieaufnahme zu modellieren und somit u. a. Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 vorzubeugen, wurden methanolische und wässrige Extrakte aus 38 ausgewählten Pflanzen auf eine Verringerung der Aufnahme

von Glucose, Fructose und Palmitinsäure durch Hemmung von intestinalen Transportern getestet (Screening). Zur Sicherstellung der Nahrungsaufnahme des Organismus, exprimiert der Darm mehrere Transporter zur Aufnahme des gleichen Substrats. Aufgrund daraus resultierender komplexer Kompensationseffekte stellt die Suche nach Inhibitoren von intestinalen Transportern für die untersuchten Substrate eine Herausforderung dar.

Nach dem Screening der Pflanzen und einer phytochemischen Untersuchung des wirksamen methanolischen Extrakts vom Weißkohl (*Brassica oleraceae var. capitata* L. f. *alba*), stellte sich heraus, dass darin enthaltene Hexosen, vermutlich auch Glucose und Fructose, eine reduzierte Aufnahme radioaktiv markierter Glucose bzw. Fructose hervorriefen. Sie suggerierten damit eine Hemmung intestinaler Transporter (Pseudohemmung).

Möglicherweise kommt die Gesamthemmung der Glucose-Aufnahme in Caco-2-Zellen auch durch weitere enthaltene sekundäre Pflanzenstoffe zustande, wie z. B. Polyphenole. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit eine tatsächliche Hemmung nicht von der Pseudohemmung unterschieden werden.

Durch die Anwendung vielfältiger Untersuchungsmethoden konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit das Caco-2-Zell-Modell genauer charakterisiert und zusätzlich die Grenzen dieses Zellmodells aufgezeigt werden. Es zeigte sich auch, dass bei der Interpretation von Screenings mit pflanzlichen Extrakten zur Aufnahmemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure, die mit radioaktiv markierten Substraten durchgeführt werden, eine kritische Betrachtung notwendig und angemessen ist (Pseudohemmung, passive Diffusion).

Zur Vermeidung der Pseudohemmung in weiteren Studien mit radioaktiv markierter Glucose und Fructose wird für Zell-Modelle empfohlen, den Einfluss der in Pflanzenextrakten enthaltenen Hexosen vorher durch eine vollständige Abtrennung der Monosaccharide auszuschließen oder die für die radioaktiven Messungen verwendete Methode anzupassen. Das kann durch Verwendung einer höheren spezifischen Aktivität des Markierungs-Isotops bei gleichzeitiger Zugabe einer wesentlich höheren Konzentration des nicht-radioaktiv markierten Substrats erreicht werden, als in den Extrakten natürlich enthalten ist.

Die Caco-2-Zelllinie ist bis heute ein bewährtes, artifizielles Modell für Untersuchungen der intestinalen Barriere. Trotz einer standardisierten Kultivierung weisen Caco-2-Zellen eine große Heterogenität in Abhängigkeit von ihrer Herkunft und der Ausprägung ihrer Zell-Passagierung auf. Die Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien lassen sich dadurch nur schwer miteinander vergleichen bzw. reproduzieren. Wie bereits diskutiert wurde, ist das angewendete Zellmodell nur eingeschränkt für Transportstudien der untersuchten Substrate geeignet.

Zur Vermeidung der Heterogenität von Tumor-Zelllinien stellt die Anwendung anderer Methoden und die Etablierung von intestinalen Zelllinien, die gezielt mit z. B. Viren, Transfektion oder retroviralvermittelten Gentransfer immortalisiert wurden, perspektivisch einen vielversprechenden Ansatz dar [232]. Neuartige Zelllinien, wie z. B. 2/4/A1 oder tsFHI, wurden mithilfe eines temperatursensitiven, mutierten Onkogens bedingt immortalisiert. Dadurch wird eine kontrollierte Differenzierung von Monolayern und die Inaktivierung der Onkogene bei speziellen Temperaturen gewährleistet [233,234]. Zur Charakterisierung dieser Zellmodelle und zur Beurteilung der Eignung für Studien auf der Suche nach neuen Inhibitoren für intestinale Transporter sind weitere Untersuchungen notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Milner, J.A.: Functional foods and health promotion. *Journal of Nutrition* 1999, 129, 1395s-1397s.
2. Yapijakis, C.: Hippocrates of Kos, the Father of Clinical Medicine, and Asclepiades of Bithynia, the Father of Molecular Medicine. 2009, 23, 507-514.
3. Schreck, K.; Melzig, M.F.: Intestinal Saturated Long-Chain Fatty Acid, Glucose and Fructose Transporters and Their Inhibition by Natural Plant Extracts in Caco-2 Cells. *Molecules* 2018, 23.
4. Leeder, S.R.: The history of insulin: the mystery of diabetes. *The Medical Journal of Australia* 2013, 199, 227.
5. Ahmed, A.M.: History of diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal* 2002, 23, 373-378.
6. Reaven, G.M.: Insulin-independent diabetes mellitus: Metabolic characteristics. *Metabolism: Clinical and Experimental* 1980, 29, 445-454.
7. Reaven, G.M.: Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* 1988, 37, 1595-1607.
8. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014, 37, S81-S90.
9. Bundesgesundheitsministerium, D.: Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. Online verfügbar:
<https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html> (Zugriff am 7. Mai 2020).
10. Reaven, G.M.; Olefsky, J.M.: The Role of Insulin Resistance in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. In *Advances in Metabolic Disorders*, Miller, M., Bennett, P.H., Eds.; Elsevier: 1978; Volume 9, pp. 313-331.
11. Grundy, S.M.: Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998, 67, 563s-572s.
12. Calder, P.C.: Long-chain fatty acids and inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012, 71, 284-289.
13. Schaffer, J.E.: Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology* 2003, 14, 281-287.
14. Palomer, X.; Pizarro-Delgado, J.; Barroso, E.; Vázquez-Carrera, M.: Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2018, 29, 178-190.
15. Sears, B.; Perry, M.: The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids in Health and Disease* 2015, 14, 121-121.
16. Yazıcı, D.; Sezer, H.: Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. In *Obesity and Lipotoxicity*, Engin, A.B., Engin, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 277-304.
17. Wellen, K.E.; Hotamisligil, G.S.: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 2003, 112, 1785-1788.
18. Hannou, S.A.; Haslam, D.E.; McKeown, N.M.; Herman, M.A.: Fructose metabolism and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation* 2018, 128, 545-555.
19. Stanhope, K.L.; Schwarz, J.M.; Keim, N.L.; Griffen, S.C.; Bremer, A.A.; Graham, J.L.; Hatcher, B.; Cox, C.L.; Dyachenko, A.; Zhang, W.; et al.: Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *Journal of Clinical Investigation* 2009, 119, 1322-1334.
20. Stanhope, K.L.: Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2016, 53, 52-67.
21. Singh, R.; Barden, A.; Mori, T.; Beilin, L.: Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001, 44, 129-146.

22. RKI: Diabetes mellitus. Online verfügbar: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html (Zugriff am 15. Mai 2020).
23. WHO: Diabetes. Online verfügbar: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (Zugriff am 07. Mai 2020).
24. Taskinen, M.-R.; Packard, C.J.; Borén, J.: Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2019, *11*, 1987.
25. Zheng, Y.; Scow, J.S.; Duenes, J.A.; Sarr, M.G.: Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: Role of GLUT2. *Surgery* 2012, *151*, 13-25.
26. WHO: *Global Report on Diabetes*; 978 92 4 156525 7; France, 2016.
27. Danne, T.; Ziegler, R.: Diabetes bei Kindern und Jugendlichen *Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes* 2014.
28. Hannon, T.S.; Rao, G.; Arslanian, S.A.: Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005, *116*, 473-480.
29. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMV): *Nationale VersorgungsLeitlinien Therapie des Typ-2-Diabetes*; 2013, zuletzt geändert November 2014.
30. Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.: The metabolic syndrome. *The Lancet* 2005, *365*, 1415-1428.
31. Pausova, Z.: From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2006, *15*, 173-178.
32. Klop, B.; Elte, J.W.; Cabezas, M.C.: Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* 2013, *5*, 1218-1240.
33. Attallah, H.; Friedlander, A.L.; Hoffman, A.R.: Visceral obesity, impaired glucose tolerance, metabolic syndrome, and growth hormone therapy. *Growth Hormone and IGF Research* 2006, *16*, 62-67.
34. WHO: Obesity and overweight. Online verfügbar: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Zugriff am 15. Mai 2020).
35. RKI: Übergewicht und Adipositas. Online verfügbar: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht_Adipositas/Uebergewicht_Adipositas_node.html (Zugriff am 15. Mai 2020).
36. countrymeters: Weltbevölkerung - Weltbevölkerungsuhr. Online verfügbar: <https://countrymeters.info/de/World> (Zugriff am 13. April 2022).
37. Gesellschaft, D.A.: Definition. Online verfügbar: <https://adipositas-gesellschaft.de/index.php?id=39> (Zugriff am 15. May 2020).
38. Liberopoulos, E.N.; Tsouli, S.; Mikhailidis, D.P.; Elisaf, M.S.: Preventing type 2 diabetes in high risk patients: an overview of lifestyle and pharmacological measures. *Current Drug Targets* 2006, *7*, 211-228.
39. Kosaka, K.; Noda, M.; Kuzuya, T.: Prevention of type 2 diabetes by lifestyle intervention: a Japanese trial in IGT males. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005, *67*, 152-162.
40. Berg, A.; Bischoff, S.C.; Colombo-Benkmann, M.; Ellrott, T.; Hauner, H.; Heintze, C.; Kanthak, U.; Kunze, D.; Stefan, N.; Teufel, M.; et al.: *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur "Prävention und Therapie der Adipositas"*; DAG e.V., DDG, DGE, DGEM e.V.: 2014.
41. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Menzel, S.; Ruth, P.: *Mutschler Arzneimittelwirkungen Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Toxikologie*, 10. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, Deutschland, 2013.
42. Walker, K.Z.; O'Dea, K.; Gomez, M.; Girgis, S.; Colagiuri, R.: Diet and exercise in the prevention of diabetes. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 2010, *23*, 344-352.
43. Fioretto, P.; Zambon, A.; Rossato, M.; Busetto, L.; Vettor, R.: SGLT2 Inhibitors and the Diabetic Kidney. *Diabetes Care* 2016, *39*, S165-S171.

44. Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R.: The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 2001, *109 Suppl 1*, 69-75.
45. Schreck, K.; Melzig, M.F.: Traditionally Used Plants in the Treatment of Diabetes Mellitus: Screening for Uptake Inhibition of Glucose and Fructose in the Caco2-Cell Model. *Frontiers in Pharmacology* 2021, *12*.
46. Gilani, A.H.; Atta ur, R.: Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, *100*, 43-49.
47. Sanae, F.; Miyamoto, K.-i.; Sawanishi, H.; Kizu, H.; Tomimori, Y.; Sun, J.-n.; Sun, X.-h.: Hypoglycaemic Effects of Shokatsu-Cha (Xiao-Ke-Ca) in Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. *Phytotherapy Research* 1996, *10*, 127-130.
48. Al-Aboudi, A.; Afifi, F.U.: Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: a review of scientific evidence. *Pharmaceutical Biology* 2011, *49*, 221-239.
49. Idm'hand, E.; Msanda, F.; Cherifi, K.: Ethnopharmacological review of medicinal plants used to manage diabetes in Morocco. *Clinical Phytoscience* 2020, *6*, 18.
50. Rizvi, S.I.; Mishra, N.: Traditional Indian Medicines Used for the Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2013, *2013*, 712092.
51. Swanston-Flatt, S.K.; Flatt, P.R.; Day, C.; Bailey, C.J.: Traditional dietary adjuncts for the treatment of diabetes mellitus. *Proceedings of the Nutrition Society* 1991, *50*, 641-651.
52. Eidi, A.; Eidi, M.; Esmaeili, E.: Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2006, *13*, 624-629.
53. Banjari, I.; Misir, A.; Šavikin, K.; Jokić, S.; Molnar, M.; De Zoysa, H.K.S.; Waisundara, V.Y.: Antidiabetic Effects of *Aronia melanocarpa* and Its Other Therapeutic Properties. *Frontiers in Nutrition* 2017, *4*.
54. Ribnicky, D.M.; Poulev, A.; Watford, M.; Cefalu, W.T.; Raskin, I.: Antihyperglycemic activity of Tarralin, an ethanolic extract of *Artemisia dracunculoides* L. *Phytomedicine* 2006, *13*, 550-557.
55. Katemo, M.; Mpiana, P.T.; Mbala, B.M.; Mihigo, S.O.; Ngbolua, K.N.; Tshibangu, D.S.T.; Koyange, P.R.: Ethnopharmacological survey of plants used against diabetes in Kisangani city (DR Congo). *Journal of Ethnopharmacology* 2012, *144*, 39-43.
56. Shah, M.A.; Sarker, D.M.M.R.; Inamdar, M.: Antidiabetic Potential of *Brassica Oleracea* Var. *Italica* in Type 2 Diabetic Sprague Dawley (SD) Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2016, *8*, 462-469.
57. Kataya, H.A.H.; Hamza, A.A.: Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2008, *5*, 281-287.
58. Assad, T.; Khan, R.A.; Feroz, Z.: Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activity of methanol extract of *Brassica oleracea*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2014, *12*, 648-653.
59. Gomes, A.; Vedasiromoni, J.R.; Das, M.; Sharma, R.M.; Ganguly, D.K.: Anti-hyperglycemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 1995, *45*, 223-226.
60. Han, Q.; Yu, Q.-y.; Shi, J.; Xiong, C.-y.; Ling, Z.-j.; He, P.-m.: Molecular characterization and hypoglycemic activity of a novel water-soluble polysaccharide from tea (*Camellia sinensis*) flower. *Carbohydrate Polymers* 2011, *86*, 797-805.
61. Wang, X.; Liu, Q.; Zhu, H.; Wang, H.; Kang, J.; Shen, Z.; Chen, R.: Flavonols from the *Camellia sinensis* var. *assamica* and their hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2017, *7*, 342-346.
62. Rtibi, K.; Selmi, S.; Grami, D.; Amri, M.; Eto, B.; El-benna, J.; Sebai, H.; Marzouki, L.: Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017, *93*, 522-528.
63. Naim, M., Amjad, F., Sultana, S., Islam, S., Hossain, M., Begum, R., Rashid, M., & Amran, M.: Comparative Study of Antidiabetic Activity of Hexane-Extract of

- Lemon Peel (Limon citrus) and Glimepiride in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* 2012, 131-134.
64. Campos-Florian, J.; Bardales-Valdivia, J.; Caruajulca-Guevara, L.; Cueva-Llanos, D.: Anti-diabetic effect of *Coffea arabica*, in alloxan-induced diabetic rats. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2013, 25, 772+.
65. Ma, W.; Wang, K.-J.; Cheng, C.-S.; Yan, G.-q.; Lu, W.-L.; Ge, J.-F.; Cheng, Y.-X.; Li, N.: Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 153, 840-845.
66. Li, W.L.; Zheng, H.C.; Bukuru, J.; De Kimpe, N.: Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, 92, 1-21.
67. He, K.; Song, S.; Zou, Z.; Feng, M.; Wang, D.; Wang, Y.; Li, X.; Ye, X.: The Hypoglycemic and Synergistic Effect of Loganin, Morroniside, and Ursolic Acid Isolated from the Fruits of *Cornus officinalis*. *Phytotherapy Research* 2016, 30, 283-291.
68. Dehghani, S.; Mehri, S.; Hosseinzadeh, H.: The effects of *Crataegus pinnatifida* (Chinese hawthorn) on metabolic syndrome: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2019, 22, 460-468.
69. Jagtap, A.G.; Patil, P.B.: Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by *Cuminum cyminum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48, 2030-2036.
70. Tahraoui, A.; El-Hilaly, J.; Israili, Z.H.; Lyoussi, B.: Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 110, 105-117.
71. P. Nazni, T.P.V., P. Alagianambi and M. Amirthaveni: Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of *Cynara Scolymus* among Selected Type 2 Diabetic Individuals. *Pakistan Journal of Nutrition* 2006, 5, 147-151.
72. Heidarian, E.; Soofiniya, Y.: Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011, 5, 2717-2723.
73. He, X.; Wang, J.; Li, M.; Hao, D.; Yang, Y.; Zhang, C.; He, R.; Tao, R.: *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 151, 78-92.
74. Lee, M.-K.; Kim, M.-J.; Cho, S.-Y.; Park, S.A.; Park, K.-K.; Jung, U.J.; Park, H.-M.; Choi, M.-S.: Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005, 67, 22-28.
75. Park, S.A.; Choi, M.-S.; Kim, M.-J.; Jung, U.J.; Kim, H.-J.; Park, K.-K.; Noh, H.J.; Park, H.-M.; Park, Y.B.; Lee, J.-S.; et al.: Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 107, 412-417.
76. Kim, H.Y.; Moon, B.H.; Lee, H.J.; Choi, D.H.: Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, 93, 227-230.
77. Peng, C.-H.; Chyau, C.-C.; Chan, K.-C.; Chan, T.-H.; Wang, C.-J.; Huang, C.-N.: *Hibiscus sabdariffa* Polyphenolic Extract Inhibits Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Glycation-Oxidative Stress while Improving Insulin Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59, 9901-9909.
78. de Freitas Junior, L.M.; de Almeida, E.B., Jr.: Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. *American journal of translational research* 2017, 9, 2050-2064.
79. Kang, Y.-R.; Lee, H.-Y.; Kim, J.-H.; Moon, D.-I.; Seo, M.-Y.; Park, S.-H.; Choi, K.-H.; Kim, C.-R.; Kim, S.-H.; Oh, J.-H.; et al.: Anti-obesity and anti-diabetic effects of

- Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Laboratory Animal Research* 2012, 28, 23-29.
80. Hosseini, S.; Jamshidi, L.; Mehrzadi, S.; Mohammad, K.; Najmizadeh, A.R.; Alimoradi, H.; Huseini, H.F.: Effects of *Juglans regia* L. leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 152, 451-456.
81. Olatunji, O.J.; Chen, H.; Zhou, Y.: Effect of the Polyphenol Rich Ethyl Acetate Fraction from the Leaves of *Lycium chinense* Mill. on Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Diabetes Mellitus in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Chemistry & Biodiversity* 2017, 14, e1700277.
82. Schulze, C.; Bangert, A.; Kottra, G.; Geillinger, K.E.; Schwanck, B.; Vollert, H.; Blaschek, W.; Daniel, H.: Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 2014, 58, 1795-1808.
83. Sugiyama, H.; Akazome, Y.; Shoji, T.; Yamaguchi, A.; Yasue, M.; Kanda, T.; Ohtake, Y.: Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 4604-4609.
84. Shakeri, A.; Sahebkar, A.; Javadi, B.: *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2016, 188, 204-228.
85. Hasanein, P.; Riahi, H.: Antinociceptive and Antihyperglycemic Effects of *Melissa officinalis* Essential Oil in an Experimental Model of Diabetes. *Medical Principles and Practice* 2015, 24, 47-52.
86. Asadi, A.; Shidfar, F.; Safari, M.; Hosseini, A.F.; Fallah Huseini, H.; Heidari, I.; Rajab, A.: Efficacy of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) extract on glycemic control and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, clinical trial. *Phytotherapy Research* 2019, 33, 651-659.
87. Yellanur Konda, P.; Egi, J.Y.; Dasari, S.; Katepogu, R.; Jaiswal, K.K.; Nagarajan, P.: Ameliorative effects of *Mentha aquatica* on diabetic and nephroprotective potential activities in STZ-induced renal injury. *Comparative Clinical Pathology* 2020, 29, 189-199.
88. Grover, J.K.; Yadav, S.P.: Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, 93, 123-132.
89. Bamosa, A.O.; Kaatabi, H.; Lebdaa, F.M.; Elq, A.M.; Al-Sultanb, A.: Effect of *Nigella sativa* seeds on the glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 2010, 54, 344-354.
90. Neves, J.M.; Matos, C.; Moutinho, C.; Queiroz, G.; Gomes, L.R.: Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 2009, 124, 270-283.
91. Eidi, A.; Eidi, M.; Darzi, R.: Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytotherapy Research* 2009, 23, 347-350.
92. Prasanna, R.; Ashraf, E.A.; Essam, M.A.: Chamomile and oregano extracts synergistically exhibit antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and renal protective effects in alloxan-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2017, 95, 84-92.
93. Park, S.J.; Nam, J.; Ahn, C.W.; Kim, Y.: Anti-diabetic properties of different fractions of Korean red ginseng. *Journal of Ethnopharmacology* 2019, 236, 220-230.
94. Vuksan, V.; Sung, M.-K.; Sievenpiper, J.L.; Stavro, P.M.; Jenkins, A.L.; Di Buono, M.; Lee, K.-S.; Leiter, L.A.; Nam, K.Y.; Arnason, J.T.; et al.: Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2008, 18, 46-56.

95. Jang, Y.Y.; Song, J.H.; Shin, Y.K.; Han, E.S.; Lee, C.S.: Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 2000, 42, 361-371.
96. Buchholz, T.; Melzig, M.F.: Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus - Screening for Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibition. *Phytotherapy Research* 2016, 30, 260-266.
97. Prasain, J.K.; Peng, N.; Rajbhandari, R.; Wyss, J.M.: The Chinese Pueraria root extract (Pueraria lobata) ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in obese mice. *Phytomedicine* 2012, 20, 17-23.
98. Bagri, P.; Ali, M.; Aeri, V.; Bhowmik, M.; Sultana, S.: Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 2009, 47, 50-54.
99. Lee, Y.-H.; Jung, M.G.; Kang, H.B.; Choi, K.-C.; Haam, S.; Jun, W.; Kim, Y.-J.; Cho, H.Y.; Yoon, H.-G.: Effect of anti-histone acetyltransferase activity from Rosa rugosa Thunb. (Rosaceae) extracts on androgen receptor-mediated transcriptional regulation. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 118, 412-417.
100. Liu, L.; Tang, D.; Zhao, H.; Xin, X.; Aisa, H.A.: Hypoglycemic effect of the polyphenols rich extract from Rose rugosa Thunb on high fat diet and STZ induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 200, 174-181.
101. Bakirel, T.; Bakirel, U.; Keleş, O.Ü.; Ülgen, S.G.; Yardibi, H.: In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 116, 64-73.
102. Behradmanesh, S.; Derees, F.; Rafieian-Kopaei, M.: Effect of Salvia officinalis on diabetic patients. *Journal of renal injury prevention* 2013, 2, 51-54.
103. Eidi, A.; Eidi, M.: Antidiabetic effects of sage (Salvia officinalis L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2009, 3, 40-44.
104. Bachrach, Z.Y.: Ethnobotanical studies of Sarcopoterium spinosum in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences* 2007, 55, 111-114.
105. Smirin, P.; Taler, D.; Abitbol, G.; Brutman-Barazani, T.; Kerem, Z.; Sampson, S.R.; Rosenzweig, T.: Sarcopoterium spinosum extract as an antidiabetic agent: In vitro and in vivo study. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 129, 10-17.
106. Elyasiyan, U.; Nudel, A.; Skalka, N.; Rozenberg, K.; Drori, E.; Oppenheimer, R.; Kerem, Z.; Rosenzweig, T.: Anti-diabetic activity of aerial parts of Sarcopoterium spinosum. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017, 17, 356.
107. Khathi, A.; Serumula, M.R.; Myburg, R.B.; Van Heerden, F.R.; Musabayane, C.T.: Effects of Syzygium aromaticum-Derived Triterpenes on Postprandial Blood Glucose in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Following Carbohydrate Challenge. *PloS One* 2013, 8, e81632.
108. Ekoh, S.N.; Akubugwo, E.I.; Ude, V.C.; Edwin, N.: Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of spices (Thymus vulgaris, Murraya koenigii, Ocimum gratissimum and Piper guineense) in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biosciences (IJB)* 2014, 4, 179-187.
109. Helmstaedter, A.: Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin. *Die Pharmazie* 2007, 62, 717-720.
110. Sidorova, Y.; Shipelin, V.; Mazo, V.; Zorin, S.; Petrov, N.; Kochetkova, A.: Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Vaccinium myrtillus L. leaf and Phaseolus vulgaris L. seed coat extracts in diabetic rats. *Nutrition* 2017, 41, 107-112.
111. Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.; Sun, S.; Canning, C.; Zhou, K.: Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & metabolism* 2010, 7, 71-71.
112. Mancini, A.; Imperlini, E.; Nigro, E.; Montagnese, C.; Daniele, A.; Orrù, S.; Buono, P.: Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* 2015, 20, 17339-17361.

113. Löffler G., P.P.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2003.
114. Hamilton, J.A.: Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1999, 60, 291-297.
115. EMA: Zynquista. Online verfügbar:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zynquista#product-information-section> (Zugriff am 24. März 2022).
116. Zou, T.-B.; Feng, D.; Song, G.; Li, H.-W.; Tang, H.-W.; Ling, W.-H.: The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-o- β -glucoside in Caco-2 cells. *Nutrients* 2014, 6, 4165-4177.
117. Sandoval, A.; Chokshi, A.; Jesch, E.D.; Black, P.N.; Dirusso, C.C.: Identification and characterization of small compound inhibitors of human FATP2. *Biochemical Pharmacology* 2010, 79, 990-999.
118. Black, P.N.; Ahowesso, C.; Montefusco, D.; Saini, N.; DiRusso, C.C.: Fatty Acid Transport Proteins: Targeting FATP2 as a Gatekeeper Involved in the Transport of Exogenous Fatty Acids. *Medchemcomm* 2016, 7, 612-622.
119. Maljaars, P.W.; Peters, H.P.; Mela, D.J.; Masclee, A.A.: Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review. *Physiology and Behavior* 2008, 95, 271-281.
120. Csermely, P.; Ágoston, V.; Pongor, S.: The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends in Pharmacological Sciences* 2005, 26, 178-182.
121. Teuscher, E.; Melzig, M.F.; Lindequist, U.: *Biogene Arzneimittel - Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 7. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2012.
122. Cutrim, C.S.; Cortez, M.A.S.: A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 2018, 71, 564-578.
123. Sun, C.; Zhao, C.; Guven, E.C.; Paoli, P.; Simal-Gandara, J.; Ramkumar, K.M.; Wang, S.; Buleu, F.; Pah, A.; Turi, V.; et al.: Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities. *Food Frontiers* 2020, 1, 18-44.
124. Johnston, K.; Sharp, P.; Clifford, M.; Morgan, L.: Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2005, 579, 1653-1657.
125. Kottra, G.; Daniel, H.: Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007, 322, 829.
126. Kwon, O.; Eck, P.; Chen, S.; Corpe, C.P.; Lee, J.-H.; Kruhlak, M.; Levine, M.: Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The FASEB Journal* 2007, 21, 366-377.
127. Chen, C.H.; Hsu, H.J.; Huang, Y.J.; Lin, C.J.: Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters. *Planta Medica* 2007, 73, 348-354.
128. Rousset, M.: The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986, 68, 1035-1040.
129. Chantret, I.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brattain, M.G.; Zweibaum, A.: Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Research* 1988, 48, 1936-1942.
130. Meunier, V.; Bourrié, M.; Berger, Y.; Fabre, G.: The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* 1995, 11, 187-194.
131. Mahraoui, L.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Zweibaum, A.; Rousset, M.; Brot-Laroche, E.: Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2,

- GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochemical Journal* 1994, 298, 629-633.
132. Sandoval, A.; Fraisl, P.; Arias-Barrau, E.; DiRusso, C.C.; Singer, D.; Sealls, W.; Black, P.N.: Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008, 477, 363-371.
133. Alzaid, F.; Cheung, H.M.; Preedy, V.R.; Sharp, P.A.: Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. *PloS One* 2013, 8, e78932.
134. Mahraoui, L.; Rousset, M.; Dussaulx, E.; Darmoul, D.; Zweibaum, A.; Brot-Laroche, E.: Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *American Journal of Physiology* 1992, 263, G312-318.
135. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F.: The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 2005, 21, 1-26.
136. Hidalgo, I.J.; Raub, T.J.; Borchardt, R.T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989, 96, 736-749.
137. Roser, S.A.: Einfluss kurzketziger Fettsäuren und mikrobieller Fermentationsprodukte neuartiger Oligosaccharide auf Cytotoxizität, Proliferation und Apoptose von humanen Colocarcinom-Zelllinien. Universität Hohenheim, 2005.
138. Mariadason, J.M.; Barkla, D.H.; Gibson, P.R.: Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *American Journal of Physiology* 1997, 272, G705-G712.
139. Cummings, J.H.: Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981, 22, 763-779.
140. Hague, A.; Paraskeva, C.: The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *European Journal of Cancer Prevention* 1995, 4, 359-364.
141. Ryu, S.H.; Kaiko, G.E.; Stappenbeck, T.S.: Cellular differentiation: Potential insight into butyrate paradox? *Molecular & cellular oncology* 2018, 5, e1212685.
142. Vinolo, M.A.; Rodrigues, H.G.; Hatanaka, E.; Sato, F.T.; Sampaio, S.C.; Curi, R.: Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2011, 22, 849-855.
143. Hudcovic, T.; Kolinska, J.; Klepetar, J.; Stepankova, R.; Rezanka, T.; Srutkova, D.; Schwarzer, M.; Erban, V.; Du, Z.; Wells, J.M.; et al.: Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical and Experimental Immunology* 2012, 167, 356-365.
144. Vinolo, M.A.R.; Rodrigues, H.G.; Nachbar, R.T.; Curi, R.: Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* 2011, 3, 858-876.
145. Canani, R.B.; Costanzo, M.D.; Leone, L.; Pedata, M.; Meli, R.; Calignano, A.: Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* 2011, 17, 1519-1528.
146. Sauer, J.; Richter, K.K.; Pool-Zobel, B.L.: Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2007, 18, 736-745.
147. Bai, Z.; Zhang, Z.; Ye, Y.; Wang, S.: Sodium butyrate induces differentiation of gastric cancer cells to intestinal cells via the PTEN/phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cell Biology International* 2010, 34, 1141-1145.

148. Litvak, D.A.; Evers, B.M.; Hwang, K.O.; Hellmich, M.R.; Ko, T.C.; Townsend, C.M.: Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery* 1998, *124*, 161-170.
149. Lyman, G.H.; Preisler, H.D.; Papahadjopoulos, D.: Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukaemic cell differentiation. *Nature* 1976, *262*, 360-363.
150. Buchholz, T.: Pflanzliche Sekundärprodukte als Inhibitoren von ausgewählten Verdauungsenzymen. Freie Universität Berlin, 2017.
151. Jumarie, C.; Malo, C.: Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 1991, *149*, 24-33.
152. Schrimpf, G.H., (Ed.) *Gentechnische Methoden*. 3. ed.; Spektrum, Akad. Verlag Heidelberg, 2002.
153. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, *227*, 680-685.
154. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992, *24*, 145-149.
155. Moritz, C.P.: 40years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics* 2020, *212*, 103575.
156. Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R.: Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 2000, *51*, 415-439.
157. Rongen, H.A.; Hoetelmans, R.M.; Bult, A.; van Bennekom, W.P.: Chemiluminescence and immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1994, *12*, 433-462.
158. Durrant, I.: Light-based detection of biomolecules. *Nature* 1990, *346*, 297-298.
159. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.L.; Cloos, J.: Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Cree, I.A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 237-245.
160. Ciapetti, G.; Cenni, E.; Pratelli, L.; Pizzoferrato, A.: In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993, *14*, 359-364.
161. Stockert, J.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R.; Villanueva, A.: *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*; 2012; Volume 114, pp. 785-796.
162. Shoemaker, M.; Cohen, I.; Campbell, M.: Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, *93*, 381-384.
163. Latt, S.A.; Wohlleb, J.C.: Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 1975, *52*, 297-316.
164. Hard, T.; Fan, P.; Kearns, D.R.: A fluorescence study of the binding of hoechst 33258 and DAPI to halogenated DNAs. *Photochemistry and Photobiology* 1990, *51*, 77-86.
165. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goetze, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985, *150*, 76-85.
166. RCT: HPLC – Eine Methode für die biochemische Forschung. Online verfügbar: <https://www.rct-online.de/magazin/hplc-biochemische-forschung/> (Zugriff am 24. Februar 2022).
167. Schreck, K.; Melzig, M.F.: The expression of selected intestinal glucose, fructose and long-chain fatty acid transporters investigated in Caco-2 cells. *Planta Medica* 2019, *85*, P-491.
168. Lacombe, O.; Woodley, J.; Solleux, C.; Delbos, J.-M.; Boursier-Neyret, C.; Houin, G.: Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, *23*, 385-391.

169. Takano, M.; Kimura, E.; Suzuki, S.; Nagai, J.; Yumoto, R.: Human erythrocyte nucleoside transporter ENT1 functions at ice-cold temperatures. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2010, *25*, 351-360.
170. Hamilton, J.A.; Johnson, R.A.; Corkey, B.; Kamp, F.: Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *Journal of Molecular Neuroscience* 2001, *16*, 99-108; discussion 151-107.
171. Gu, Y.: The cytotoxicity of extract preparations and their influence on ALP-activity as a differentiation marker in the Caco-2 cell model. Berlin, F.U., 2021.
172. Baenas, N.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C.: Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, *60*, 11409-11420.
173. Sousa, C.; Valentão, P.; Rangel, J.; Lopes, G.; Pereira, J.A.; Ferreres, F.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.: Influence of Two Fertilization Regimens on the Amounts of Organic Acids and Phenolic Compounds of Tronchuda Cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *costata* DC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, *53*, 9128-9132.
174. Cartea, M.E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P.: Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* 2010, *16*, 251-280.
175. Garcia, M.; Vaillant, F.: Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014, *54*, 1584-1598.
176. March, R.E.; Stadey, C.J.: A tandem mass spectrometric study of saccharides at high mass resolution. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005, *19*, 805-812.
177. Calvano, C.D.; Cataldi, T.R.I.; Kögel, J.F.; Monopoli, A.; Palmisano, F.; Sundermeyer, J.: Structural Characterization of Neutral Saccharides by Negative Ion MALDI Mass Spectrometry Using a Superbasic Proton Sponge as Deprotonating Matrix. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2017, *28*, 1666-1675.
178. Bio-Rad-Laboratories: Western blot: Antibody considerations Online verfügbar: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-monoclonal-vs-polyclonal-antibodies.html> (Zugriff am 18. November, 2021).
179. Mishra, M.; Tiwari, S.; Gomes, A.V.: Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics* 2017, *14*, 1037-1053.
180. Bass, J.J.; Wilkinson, D.J.; Rankin, D.; Phillips, B.E.; Szewczyk, N.J.; Smith, K.; Atherton, P.J.: An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* 2017, *27*, 4-25.
181. Abcam: Western blot troubleshooting tips Online verfügbar: <https://www.abcam.com/protocols/western-blot-troubleshooting-tips> (Zugriff am 4. April 2020).
182. Mueckler, M.; Thorens, B.: The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 2013, *34*, 121-138.
183. Schmitz, J.; Preiser, H.; Maestracci, D.; Ghosh, B.K.; Cerda, J.J.; Crane, R.K.: Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973, *323*, 98-112.
184. Mahraoui, L.; Rousset, M.; Dussaulx, E.; Darmoul, D.; Zweibaum, A.; Brot-Laroche, E.: Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1992, *263*, G312-G318.
185. Helliwell, P.A.; Richardson, M.; Affleck, J.; Kellett, G.L.: Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *The Biochemical journal* 2000, *350 Pt 1*, 163-169.

186. Stahl, A.; Hirsch, D.J.; Gimeno, R.E.; Punreddy, S.; Ge, P.; Watson, N.; Patel, S.; Kotler, M.; Raimondi, A.; Tartaglia, L.A.; et al.: Identification of the Major Intestinal Fatty Acid Transport Protein. *Molecular Cell* 1999, 4, 299-308.
187. Blackburn, C.; Guan, B.; Brown, J.; Cullis, C.; Condon, S.M.; Jenkins, T.J.; Peluso, S.; Ye, Y.; Gimeno, R.E.; Punreddy, S.; et al.: Identification and characterization of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2006, 16, 3504-3509.
188. Kellett, G.L.; Helliwell, P.A.: The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochemical Journal* 2000, 350 Pt 1, 155-162.
189. Steffansen, B.; Pedersen, M.D.L.; Laghmoch, A.M.; Nielsen, C.U.: SGLT1-Mediated Transport in Caco-2 Cells Is Highly Dependent on Cell Bank Origin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017, 106, 2664-2670.
190. Wilding, J.L.; Bodmer, W.F.: Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research* 2014, 74, 2377-2384.
191. Roschke, A.V.; Tonon, G.; Gehlhaus, K.S.; McTyre, N.; Bussey, K.J.; Lababidi, S.; Scudiero, D.A.; Weinstein, J.N.; Kirsch, I.R.: Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Research* 2003, 63, 8634-8647.
192. Chantret, I.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brot-Laroche, E.; Zweibaum, A.; Rousset, M.: Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science* 1994, 107 (Pt 1), 213-225.
193. Mahraoui, L.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Zweibaum, A.; Rousset, M.; Brot-Laroche, E.: Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochemical Journal* 1994, 298 Pt 3, 629-633.
194. Brot-Laroche, E.: Differential regulation of the fructose transporters GLUT2 and GLUT5 in the intestinal cell line Caco-2. *Proceedings of the Nutrition Society* 1996, 55, 201-208.
195. Mesonero, J.; Mahraoui, L.; Matosin, M.; Rodolosse, A.; Rousset, M.; Brot-Laroche, E.: Expression of the hexose transporters GLUT1-GLUT5 and SGLT1 in clones of Caco-2 cells. *Biochemical Society Transactions* 1994, 22, 681-684.
196. Tobin, V.; Le Gall, M.; Fioramonti, X.; Stolarczyk, E.; Blazquez, A.G.; Klein, C.; Prigent, M.; Serradas, P.; Cuif, M.H.; Magnan, C.; et al.: Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 2008, 57, 555-562.
197. Matosin, M.; Allison, G.; Ilundain, A.; Shirazi-Beechey, S.P.; Brot-Laroche, E.: GLUT1 to 5 & SGLT1 expression in thyroid-hormone-treated Caco-2 cells. *Biochemical Society Transactions* 1996, 24, 238S-238S.
198. Cooper, G.M.: *The Cell - A molecular approach*, 2. ed.; Sinauer Associates: Sunderland (MA), 2000.
199. Chang, T.-C.; Huang, S.-F.; Yang, T.-C.; Chan, F.-N.; Lin, H.-C.; Chang, W.-L.: Effect of Ginsenosides on Glucose Uptake in Human Caco-2 Cells Is Mediated through Altered Na⁺/Glucose Cotransporter 1 Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 1993-1998.
200. Kipp, H.; Khoursandi, S.; Scharlau, D.; Kinne, R.K.H.: More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. 2003, 285, C737-C749.
201. Hague, A.; Manning, A.M.; Hanlon, K.A.; Hart, D.; Paraskeva, C.; Huschtscha, L.I.: Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: Implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *International Journal of Cancer* 1993, 55, 498-505.
202. Zhou, Q.; Dalgard, C.L.; Wynder, C.; Doughty, M.L.: Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *BMC Neuroscience* 2011, 12, 50.

203. McIntyre, A.; Gibson, P.R.; Young, G.P.: Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 1993, *34*, 386-391.
204. Whittaker, S.R.; Mallinger, A.; Workman, P.; Clarke, P.A.: Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* 2017, *173*, 83-105.
205. Labware, C.D.: Corning®Biocoat™ Intestinal Epithelium Differentiation Media Pack. Online verfügbar: https://certs-ecatalog.corning.com/life-sciences/certs/355058_9266020.pdf (Zugriff am 15. März 2022).
206. Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Glei, M.: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009, *682*, 39-53.
207. Clarke, J.M.; Young, G.P.; Topping, D.L.; Bird, A.R.; Cobiac, L.; Scherer, B.L.; Winkler, J.G.; Lockett, T.J.: Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 2012, *33*, 197-202.
208. Leonel, A.J.; Alvarez-Leite, J.I.: Butyrate: implications for intestinal function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2012, *15*, 474-479.
209. Koprinarova, M.; Botev, P.; Russev, G.: Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair* 2011, *10*, 970-977.
210. Cooper, R.A.: Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *Journal of Supramolecular Structure* 1978, *8*, 413-430.
211. Cummings, J.; Jenkins, D.; Wiggins, H.J.G.: Measurement of the mean transit time of dietary residue through the human gut. *Gut* 1976, *17*, 210-218.
212. Walmsley, A.R.; Barrett, M.P.; Bringaud, F.; Gould, G.W.: Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends in Biochemical Sciences* 1998, *23*, 476-481.
213. Raja, M.; Kinne, R.K.: Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie* 2015, *115*, 187-193.
214. Loo, D.D.; Hazama, A.; Supplisson, S.; Turk, E.; Wright, E.M.: Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, *90*, 5767-5771.
215. Vayro, S.; Lo, B.; Silverman, M.: Functional studies of the rabbit intestinal Na⁺/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na⁺-activation of the carrier. *Biochemical Journal* 1998, *332* (Pt 1), 119-125.
216. Wright, E.M.; Martín, M.G.; Turk, E.: Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 2003, *17*, 943-956.
217. Wright, E.M.; Loo, D.D.F.; Hirayama, B.A.: Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiological Reviews* 2011, *91*, 733-794.
218. Uldry, M.; Ibberson, M.; Hosokawa, M.; Thorens, B.: GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters* 2002, *524*, 199-203.
219. Manzano, S.; Williamson, G.: Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010, *54*, 1773-1780.
220. ChEBI: 3-O-methyl-D-glucose. 2013.
221. Tomimatsu, T.; Horie, T.: Enhanced absorption of 3-O-methyl-D-glucose through the small intestine of rats administered retinyl palmitate. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 2000, *107*, 349-360.
222. El-Zein, O.M.; Kreydiyyeh, S.I.: Effect and mechanism of action of pine bark extract on glucose uptake by Caco-2 cells. *The FASEB Journal* 2010, *24*, 528.522-528.522.

223. Pant, H.J.; Kundu, A.; Nigam, K.D.P.: Radiotracer applications in chemical process industry *Reviews in Chemical Engineering* 2001, 17, 165-252.
224. Kaur, H.; Kaur, G.: A Critical Appraisal of Solubility Enhancement Techniques of Polyphenols. *Journal of pharmaceuticals (Cairo)* 2014, 2014, 180845.
225. Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bourouai, N.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Abdelly, C.: Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol* 2008, 331, 372-379.
226. Carnat, A.P.; Carnat, A.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L.: The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1998, 72, 301-305.
227. Uuh-Narvaez, J.J.; Segura-Campos, M.R.: Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*): A food with functional properties aimed to type 2 diabetes prevention and management. *Journal of Food Science* 2021, 86, 4775-4798.
228. Espín, J.C.; González-Barrio, R.; Cerdá, B.; López-Bote, C.; Rey, A.I.; Tomás-Barberán, F.A.: Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 10476-10485.
229. Kerimi, A.; Jailani, F.; Williamson, G.: Modulation of cellular glucose metabolism in human HepG2 cells by combinations of structurally related flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research* 2015, 59, 894-906.
230. Bones, A.M.; Rossiter, J.T.: The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* 1996, 97, 194-208.
231. Samuelson, A.B.; Westereng, B.; Yousif, O.; Holtekjølen, A.K.; Michaelsen, T.E.; Knutsen, S.H.: Structural features and complement-fixing activity of pectin from three *Brassica oleracea* varieties: white cabbage, kale, and red kale. *Biomacromolecules* 2007, 8, 644-649.
232. Geller, H.M.; Quiñones-Jenab, V.; Poltorak, M.; Freed, W.J.: Applications of immortalized cells in basic and clinical neurology. *Journal of Cellular Biochemistry* 1991, 45, 279-283.
233. Tavelin, S.; Milovic, V.; Ocklind, G.; Olsson, S.; Artursson, P.: A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drug transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999, 290, 1212-1221.
234. Quaroni, A.; Beaulieu, J.F.: Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997, 113, 1198-1213.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Ausgewählte Pflanzen, die als antidiabetische Arzneimittel traditionell u. a. in den aufgeführten Ländern bis heute angewendet werden und ihre antidiabetischen Effekte, die in Studien gemessen wurden, sowie die diskutierten, aktiven Inhaltsstoffe	8
Tabelle 2.	Die Molekülmassen intestinaler Transporter und die Parameter zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese, zu denen die verwendete Konzentration des Acrylamids für die Gelherstellung, das Applikationsvolumen und die Proteinbeladung der Geltaschen zählen.	37
Tabelle 3.	Die Zusammensetzung der Puffer zur Durchführung der Gelelektrophorese.....	38
Tabelle 4.	Schemata für die Probenbeladung des (a) ersten und (b) zweiten Gels für die Gelelektrophorese.	38
Tabelle 5.	Zusammensetzung der verschiedenen Puffer für den Western-Blot	40
Tabelle 6.	Die experimentellen Bedingungen für die Versuche mit dem FATP2-Inhibitor Lipofermata.	44
Tabelle 7.	Parametereinstellungen für die präparative HPLC.....	46
Tabelle 8.	Lösungsmittelgradienten für die präparative HPLC.	47
Tabelle 9.	Einstellungen für die MS-Messungen mit dem QQQ und Q-TOF.....	48
Tabelle 10.	Parameter für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung von Fraktion 1-9 und der LC-Q-TOF-MS-Messung von Fraktion 2.	48
Tabelle 11.	Lösungsmittelgradienten für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung von Fraktion 1-9 und der LC-Q-TOF-MS-Messung von Fraktion 2.	49
Tabelle 12.	Einstellungen für die QQQ-MS-Messungen von Referenzsubstanzen.	49
Tabelle 13.	Parameter für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung, zur Quantifizierung von Hexosen.....	50
Tabelle 14.	Lösungsmittelgradienten für die chromatographische Auftrennung im Rahmen der LC-QQQ-MS-Messung zur Quantifizierung von Hexosen.....	50
Tabelle 15.	Aufnahmehemmung von Palmitinsäure nach Applikation von 0,3% DMSO und dem FATP-2-Inhibitor Lipofermata unter verschiedenen Bedingungen am Tag 3 nach Konfluenz.....	67
Tabelle 16.	Ergebnisse aus dem MTT-Assay zur Zytotoxizität von methanolischen Pflanzenextrakten.....	69
Tabelle 17.	Ergebnisse aus dem MTT-Assay zur Zytotoxizität von wässrigen Pflanzenextrakten.....	74
Tabelle 18.	Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure mit methanolischen Extrakten in Caco-2-Zellen.....	80
Tabelle 19.	Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose, Fructose und Palmitinsäure mit wässrigen Extrakten in Caco-2-Zellen	84
Tabelle 20.	Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmung von Glucose und Fructose durch die Fraktionen 1-9 in einer Konzentration von je 50 µg/mL.....	90
Tabelle 21.	Testergebnisse der LC-QQQ-MS-Messung mit Referenzsubstanzen zur Identifizierung von Inhaltsstoffen in den Fraktionen 1-9 des methanolischen Weißkohl-Extrakts.	91
Tabelle 22.	Untersuchungsergebnisse zur Aufnahmehemmungen von Glucose und Fructose durch 100 µM Lösungen isolierter Naturstoffe	93

Tabelle 23. Ergebnisse der LC-Q-TOF-MS-Messungen zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in Fraktion 2 des methanolischen Extrakts von Weißkohl. 94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Strukturformeln des (a) SGLT-1-Inhibitors Sotagliflozin, (b) FATP2-Inhibitors Lipofermata, (c) SGLT-1-Inhibitors Phlorizin und (d) GLUT-2-Inhibitors Phloretin.	15
Abbildung 2.	Ausgewählte Strukturformeln von Polyphenolen, die intestinale Transporter für Glucose und Fructose hemmen.	17
Abbildung 3.	Zeitstrahl zur Probennahme für den Western-Blot an Tag 1, 2, 3, 4, 6, 15 und 21 nach Zellkonfluenz.	35
Abbildung 4.	Vorgehensweise bei den Experimenten zur Expression von Transportproteinen aus Caco-2-Zellen.	36
Abbildung 5.	Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung von Caco-2-Zellen nach Hämatoxylin-Anfärbung an den ersten vier Tagen nach Konfluenz (a) ohne Natriumbutyrat und (b) mit Natriumbutyrat.	53
Abbildung 6.	Chemilumineszierende Proteinbanden des β -Actins mit einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa nach 30 s Belichtungszeit.	55
Abbildung 7.	Chemilumineszierende Proteinbanden des SGLT-1 nach 8 min Belichtungszeit.	55
Abbildung 8.	Die Expression von SGLT-1 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung.	56
Abbildung 9.	Chemilumineszierende Proteinbanden des GLUT-2 nach 8 min Belichtungszeit.	57
Abbildung 10.	Chemilumineszierende Proteinbanden des GLUT-5 nach 30 s Belichtungszeit.	57
Abbildung 11.	Die Expression von GLUT-5 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung.	58
Abbildung 12.	Chemilumineszierende Proteinbanden des FATP-2 nach 8 min Belichtungszeit.	58
Abbildung 13.	Chemilumineszierende Proteinbanden des FATP-4 nach 3 min Belichtungszeit.	59
Abbildung 14.	Die Expression von FATP-4 über 21 Tage in Caco-2-Zellen mit und ohne Natriumbutyrat-Behandlung.	59
Abbildung 15.	Aufnahme von Glucose über 15 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration des radioaktiv markierten Substrats und unter Zugabe von 0,1 pM-100 μ M nicht-radioaktiver Glucose.	61
Abbildung 16.	Aufnahme von Fructose über 21 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration der radioaktiv markierten Fructose (r.-Fructose) und unter Zugabe von 0,1 pM-100 μ M nicht-radioaktiven Substrats.	61
Abbildung 17.	Aufnahme von Palmitinsäure über 21 Tage in Caco-2-Zellen bei gleichbleibender Konzentration der radioaktiv markierten Palmitinsäure (r.-Palmitinsäure) und unter Zugabe von 0,1 pM-100 μ M nicht-radioaktiven Substrats.	62
Abbildung 18.	Die Aufnahme von (a) Glucose, (b) Fructose und (c) Palmitinsäure mit und ohne das Differenzierungsreagenz Natriumbutyrat über 15 – 21 Tage in Caco-2-Zellen.	63
Abbildung 19.	Die Aufnahme von (a) Glucose, (b) Fructose, (c) Palmitinsäure nach 1 h und (d) Palmitinsäure nach 10 min Inkubationszeit mit dem Substrat in Caco-2-Zellen bei 37°C und auf Eis.	64
Abbildung 20.	Die methanolischen Extrakte der dargestellten Pflanzen zeigten in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität.	73

Abbildung 21. Die wässrigen Extrakte der dargestellten Pflanzen zeigten in einer Konzentration von 1 mg/mL eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität.....	78
Abbildung 22. Signifikante Ergebnisse zur Aufnahmehemmung von (a) Glucose mit methanolischen Extrakten, (b) Glucose mit wässrigen Extrakten und (c) Fructose mit methanolischen Extrakten aus den Tab. 18-19.....	88
Abbildung 23. Chromatogramme nach Auftrennung mit der präparativen HPLC und anschließender UV/VIS-Detektion bei (a) 230 nm und (b) 330 nm.	89
Abbildung 24. ESI-Q-TOF-MS-Spektrum im (a) negativen Modus und (b) positiven Modus gemessen.....	96
Abbildung 25. TIC-SIM-MS-Spektren von der Referenzsubstanz Glucose mit einer Retentionszeit von 0,40 min (a.1) nicht integriert und (a.2) integriert und Fraktion 2 mit einer Retentionszeit von 0,39 min (b.1) nicht integriert und (b.2) integriert.	97
Abbildung 26. Linearer Kalibrierbereich mit $R=0,9954$ zur Quantifizierung der Hexosen im methanolischen Extrakt von <i>Brassica oleraceae var. capitata</i> L. f. <i>alba</i>	98

Publikationsverzeichnis

Artikel in Fachzeitschriften

Schreck, K.; Melzig, M.F.: Intestinal Saturated Long-Chain Fatty Acid, Glucose and Fructose Transporters and Their Inhibition by Natural Plant Extracts in Caco-2 Cells. *Molecules* 2018, 23.

Schreck, K.; Melzig, M.F.: Correction: Schreck, K. and Melzig, M.F. Intestinal Saturated Long-Chain Fatty Acid, Glucose and Fructose Transporters and their Inhibition by Natural Plant Extracts in Caco-2 Cells. *Molecules*, 2018, 23, 2544. *Molecules* 2018, 23.

Schreck, K.; Melzig, M.F.: Traditionally Used Plants in the Treatment of Diabetes Mellitus: Screening for Uptake Inhibition of Glucose and Fructose in the Caco2-Cell Model. *Frontiers in Pharmacology* 2021, 12.

Poster

Schreck, K.; Melzig, M.F.: The expression of selected intestinal glucose, fructose and long-chain fatty acid transporters investigated in Caco-2 cells. *Planta Medica* 2019, 85, P-491.

Danksagung

Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit wäre ohne die umfangreiche Anleitung, Unterstützung und Zusammenarbeit im Hochschulkollegium, mit Freunden und meiner Familie nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Melzig für die Übergabe des spannenden Themas und die umfassende Betreuung. Vielen Dank für die fachlichen Diskussionen, die meinen Blick für das Wesentliche geschärft haben!

Herrn Prof. Dr. Harshadrai Rawel danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Als willkommene Abwechslung zum Laboralltag und lehrreiche Aufgabe durfte ich mit Herrn Dr. Stefan Böttger die Lehre „Arzneipflanzenexkursionen und Bestimmungsübungen“ und „Pharmazeutische Biologie II - Pflanzliche Drogen“ mit kollabierten Gliederhaaren, Calcium-Oxalat-Würfeln, Nektarschuppen und Doppelachänen begleiten. Kein Praktikum hätte mir mehr Spaß bereitet! Stefan, vielen Dank für die schöne, gemeinsame Zeit und den Shuttle zur großen Mensa in unseren Pausen! Lieben Dank auch an die anderen Assistenten Lisa, Sonja, Lars, Mark und Alex für die angenehmen und humorvollen Nachmittage!

Mein Dank gilt Lars Putscher, der mich mit Tee und Yoga bei der Fehlersuche in den Texten meiner Arbeit unterstützt hat!

Ich möchte mich bei allen Kollegen des Arbeitskreises von Prof. Melzig für Hilfe, Rat und Motivation bedanken! Ich erinnere mich gerne an unseren gemeinsamen wissenschaftlichen Kongress in Innsbruck und die Weihnachtsfeier im Gewächshaus zurück!

Dr. Simko Sama wies mich in die faszinierende Welt der Zellkulturen ein und Jakob Piwowarski von der Medical University of Warsaw, Poland, gab mir wertvolle Hinweise für die Durchführung von Western-Blots. Vielen Dank dafür!

Herr PD Dr. Alexander Weng betreute und unterstützte mich bei der Weiterbildung zur Fachapothekerin für Toxikologie und Ökologie, wofür ich mich herzlich bedanken möchte. Hardy, mit dir zusammen machten die Fachgespräche und die Seminare, für die wir bis nach Göttingen, München und Mainz reisten, noch mehr Spaß!

Vielen Dank auch an Markus Tiemann und den Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Rademann für die willkommene Ablenkung und die humorvollen Unterhaltungen in unseren kleinen Laborpausen!

Vielen Dank an Prof. Sebastian Granica von der Medical University of Warsaw, Poland, für die Bereitstellung des Urolithin A und an Herrn Dr. Serhat Sezai Çiçek vom Institut für Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität in Kiel für die Überlassung des pflanzlichen Untersuchungsmaterials.

Ich möchte mich für die Unterstützung und Bereitstellung der radioaktiven Räumlichkeiten beim Arbeitskreis Prof. Dr. M. Schäfer-Korting i. R. und Prof. Dr. B. Kleuser bedanken!

Vielen Dank an die Strahlenschutzbeauftragte Silke Bergemann. Mit deiner ruhigen Art Probleme zu lösen, hast du mich in stressigen Situationen unterstützt. Es hat mir immer viel Spaß gemacht mit dir Ordnung im Labor zu schaffen!

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Fabian Schumacher für die Unterstützung bei den LC-MS-Messungen und für die hilfreichen Hinweise bei der Auswertung der Daten bedanken!

Die motivierten Studentinnen, die ich im Rahmen der Promotion betreuen durfte, unterstützten mich bei der Durchführung meiner Arbeit. Vielen Dank an die Erasmus-Studentin Zineb Filali-Baba, die Master-Studentin Yi Gu und die Wahlpflichtpraktikantinnen Hanna Rulff, Katja Gramzow, Marla Dubau und Therese Baum für eurer Interesse an meiner Arbeit und die wertvolle Hilfe!

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die schönen Urlaube und Feste, bei denen ich Kraft und Inspiration für die vorliegende Arbeit sammeln konnte.

Meiner Mutter Sabine und meinem Freund Konrad danke ich besonders für die Anmerkungen und die zielorientierte Kritik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank für eurer offenes Ohr und den stetigen Glauben an mich. Eure Liebe ist das schönste Geschenk, was es gibt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 21.04.2022

Katharina Schreck