Pflanzliche Sekundärprodukte als Inhibitoren von ausgewählten Verdauungsenzymen

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

Tina Buchholz

aus

Stendal

26. März 2017

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.10.2013 bis 18.01.2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
Zweiter Gutachter: apl. Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel

Datum der Disputation: 13.03.2017

Für Phillip

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **V**

Zusammenfassung **VII**

Abstract **IX**

1 Einleitung **1**

1.1 Adipositas und Diabetes mellitus . . . 1

1.1.1 Adipositas . . . 1

1.1.1.1 Klassifikation und Diagnostik der Adipositas . . . 1

1.1.1.2 Therapie der Adipositas . . . 2

1.1.2 Diabetes mellitus . . . 3

1.1.2.1 Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus . . . 3

1.1.2.2 Therapie des Diabetes mellitus . . . 5

1.2 Innovative Therapieansätze zur Behandlung von Adipositas und Typ-2-Diabetes 6

1.2.1 Inhibition wichtiger Enzyme des Verdauungssystems . . . 6

1.2.1.1 Pankreaslipase . . . 8

1.2.1.2 α-Amylasen . . . 9

1.2.1.3 Intestinale α-Glucosidase . . . 11

1.2.1.4 Pankreasproteasen . . . 12

1.2.1.5 Intestinale Alkalische Phosphatase . . . 13

1.2.2 Inhibition der Resorption von Nährstoffen . . . 13

1.2.2.1 Resorption der Kohlenhydrate im Intestinaltrakt . . . 13

1.2.2.2 Resorption der Lipide im Intestinaltrakt . . . 15

1.3 Polyphenole . . . 16

1.3.1 Definition . . . 16

1.3.2 Polyphenole als Inhibitoren von Verdauungsenzymen . . . 16

1.3.2.1 Flavonoide . . . 17

1.3.2.2 Phenolsäuren . . . 18

1.3.2.3 Lignane . . . 20

1.3.3 Polyphenole als Inhibitoren der intestinalen Nährstoffresorption . . . 21

1.3.3.1 Inhibition der intestinalen Glucose-Aufnahme . . . 21

1.3.3.2 Inhibition der intestinalen Fettsäure-Aufnahme . . . 22

1.4 Zielstellung . . . 23

2 Material und Methoden **25**
2.1 Material . . . 25
2.1.1 Chemikalien und Lösungen . . . 25
2.1.1.1 Allgemein . . . 25
2.1.1.2 Zellkultur . . . 26
2.1.1.3 Kits . . . 26
2.1.2 Geräte . . . 27
2.1.2.1 Allgemein . . . 27
2.1.2.2 Zellkultur . . . 27
2.1.2.3 HPLC . . . 28
2.1.2.4 ESI-Q-TOF-MS . . . 29
2.1.3 Verbrauchsmaterialien . . . 29
2.1.3.1 Allgemein . . . 29
2.1.3.2 Zellkultur . . . 29
2.1.4 CaCo-2-Zelllinie . . . 30
2.1.5 Untersuchte Reinstoffe . . . 30
2.1.6 Untersuchtes Pflanzenmaterial . . . 31
2.1.6.1 Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) . . . 31
2.1.6.2 Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin (TEM) . . . 34
2.1.6.3 Pflanzenmaterial aus dem virtuellen Screening (VS) . . . 37
2.2 Methoden . . . 38
2.2.1 Enzymaktivitäts-Assays . . . 38
2.2.1.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Lipaseaktivität . . . 38
2.2.1.2 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Amylaseaktivität . . . 39
2.2.1.3 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Glucosidaseaktivität . . . 40
2.2.1.4 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität . . . 42
2.2.1.5 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Proteaseaktivität . . . 43
2.2.2 Herstellung verschiedener Extrakte aus getrocknetem Pflanzenmaterial . . . 44
2.2.2.1 Methanolische Extrakte . . . 44
2.2.2.2 Wässrige Extrakte . . . 44
2.2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von *Crataegus pinnatifida* Bge. auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration . . . 44
2.2.4 Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie . . . 46
2.2.4.1 Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke . . . 46
2.2.4.2 Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. . . . 48
2.2.5 Untersuchungen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. . . . 49
2.2.6 Proteinchemische Methoden: BCA-Protein-Assay . . . 50

2.2.7 Dockingstudien und 3D-Pharmakophormodellierung der Pankreaslipase . 50
2.2.7.1 Modellierungssoftware 51
2.2.7.2 Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase 51
2.2.8 Zellbiologische Methoden 52
2.2.8.1 Kultivierung der Zellen 52
2.2.8.2 Differenzierung der CaCo-2 Zellen 52
2.2.8.3 Zytotoxizitätstest 53
2.2.8.4 Fluoreszenzbasierte Studien zur Glucoseaufnahme 54
2.2.9 Statistische Methoden 56

3 Ergebnisse und Diskussion 57
3.1 Enzymaktivitäts-Assays 57
3.1.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Lipase-inhibitorischen Aktivität . . . 57
3.1.1.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen 57
3.1.1.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin 58
3.1.1.3 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin 61
3.1.2 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Amylase-inhibitorischen Aktivität 64
3.1.2.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen 64
3.1.2.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin 66
3.1.2.3 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin 68
3.1.3 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Glucosidase-inhibitorischen Aktivität von Reinstoffen 70
3.1.4 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der ALP-inhibitorischen Aktivität von Reinstoffen 72
3.1.5 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Protease-inhibitorischen Aktivität . 74
3.1.5.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen 74
3.1.5.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin 76
3.1.6 Vergleichende Darstellung des Inhibitionspotentials von Reinstoffen und Pflanzenextrakten auf die Aktivität von Verdauungsenzymen 78
3.1.6.1 Inhibitionspotential von Reinstoffen 78
3.1.6.2 Inhibitionspotential von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin 80
3.1.6.3 Inhibitionspotential von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin 81
3.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von *Crataegus pinnatifida* Bge. auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration 83
3.3 Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie 85
3.3.1 Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke 85
3.3.2 Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. 87

3.4 Untersuchungen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. 89
3.5 Dockingstudien und 3D-Pharmakophormodellierung der Pankreaslipase 91
3.5.1 Entwicklung von 3D-Pharmakophormodellen 92
3.5.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoide 94
3.5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von nicht-glykolysierten Flavonoiden 95
3.5.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von glykolysierten Flavonoiden 96
3.5.3 Pharmakophorbasiertes virtuelles Screening von Naturstoffen - *in silico* Identifizierung und *in vitro* Aktivität von Inhibitoren der Pankreaslipase . 97
3.5.3.1 Bestimmung der *in vitro* Aktivität der identifizierten Reinstoffe 98
3.5.3.2 Bestimmung der *in vitro* Aktivität der identifizierten biologischen Quellen 100
3.6 Zellbiologische Methoden 102
3.6.1 Differenzierung der CaCo-2 Zellen 102
3.6.2 Zytotoxizitätstest 103
3.6.3 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Glucoseaufnahme 105
3.6.3.1 Voruntersuchungen 105
3.6.3.2 Einfluss von Reinstoffen 106
3.6.3.3 Einfluss von Pflanzenextrakten 108

4 Schlussfolgerungen **111**

Literaturverzeichnis **115**

Tabellenverzeichnis **133**

Abbildungsverzeichnis **135**

Anhang **139**

Publikationsverzeichnis **147**

Lebenslauf **149**

Danksagung **151**

Eidesstattliche Erklärung **153**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
s.	siehe
var.	Varietät (*varietas*)
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Phe	Phenylalanin
Ser	Serin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
2-NBDG	2-Deoxy-2-[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-Glucose
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUGP	4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid
4-MUO	4-Methylumbelliferyloleat
4-MUP	4-Methylumbelliferylphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
ALP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serum Albumin
dest.	destilliert
DMEM	*Dulbecco's minimal essential medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray Ionisation
FBS	fötales bovines Serum

GH	glycosidische Hydrolasen
GLUT	Glucose Transporter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
IC_{50}	*Inhibitory Concentration* 50 % (Konzentration, bei der das Enzym in seiner Aktivität um 50 % inhibiert ist)
LC	*Liquid Chromatography*
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
MS	*Mass Spectrometry*
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaBu	Natriumbutyrat
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PDB Code	Code der Proteindatenbank
PL	Pankreaslipase
Q-TOF	*quadrupole time-of-flight*
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
SGLT	*Sodium Glucose* Cotransporter
SPL	Schweinepankreaslipase
STZ	Streptozotocin
T2DM	Typ-2-Diabates-Modellgruppe
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TEM	Traditionelle Europäische Medizin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VS	Virtuelles Screening

Das Dezimaltrennzeichen ist das Komma.

Zusammenfassung

Übergewicht und Adipositas sind Hauptrisikofaktoren für die Entstehung chronischer Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2. Seit 1980 hat sich die Zahl der Menschen, die an Adipositas erkrankt sind, weltweit mehr als verdoppelt, sodass die Gesellschaft vor einer immer größer werdenden Herausforderung bezüglich Prävention und Behandlung steht. Unterstützend zu einer diätetischen und bewegungstherapeutischen Behandlung liegt ein innovativer Therapieansatz in der Entwicklung von Inhibitoren der Nährstoffhydrolyse und -resorption. Insbesondere durch eine Hemmung wichtiger Enzyme und Transporter des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels sollen postprandiale Triglycerid- und Glucose-Spiegel im Blut reduziert werden.

Zunächst erfolgte die Entwicklung und Etablierung fluorezenzbasierter Screening-Assays zur Bestimmung der Aktivität essentieller Enzyme des Verdauungssystems. Es konnten insgesamt fünf verschiedene Testsysteme optimiert werden. Dazu zählen die Aktivitätsbestimmung der Pankreaslipase, der pankreatischen α-Amylase, der intestinalen α-Glucosidase, der intestinalen Alkalischen Phosphatase und der Pankreasproteasen. Im Anschluss wurden 23 überwiegend polyphenolische Reinstoffe hinsichtlich einer Aktivitätshemmung der Enzyme analysiert und Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoid-Strukturen abgeleitet. Es konnten Strukturmerkmale identifiziert werden, welche eine Inhibition des jeweiligen Enzyms verstärken oder verringern. Dabei zeigten vor allem die Anzahl und die Position phenolischer Hydroxylgruppen sowie gebundene Zucker einen Einfluss auf die Enzymhemmung.
Weiterhin wurden wässrige und methanolische Extrakte von 60 Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin und der Traditionellen Europäischen Medizin auf eine Inhibition der Pankreaslipase und α-Amylase getestet. Die Pflanze *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) zeigte eine sehr starke Inhibition der analysierten Verdauungsenzyme und wurde anschließend mittels HPLC und ESI-Q-TOF-MS zur Identifikation inhibitorisch wirksamer Inhaltsstoffe näher analysiert. Es konnten die Verbindungen Hibiskussäure und Hibiskussäure-Glucosid eindeutig als aktive Komponenten identifiziert werden. Ein *in silico* Docking von Hibiskussäure an die Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase (PDB-Code: 1ETH) zeigte starke Interaktionen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Ebenfalls zeigte der methanolische Extrakt von *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. (Rosaceae) eine starke Inhibition der enzymatischen Aktivität. Auf Grundlage dieser Beobachtungen folgten im Anschluss tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss dieses Extraktes auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration (Triglyceride, Gesamtcholesterin) im Diabetes mellitus Typ 2-Rattenmodell. Durch die Behandlung konnte eine signifikante Reduzierung der Blutglucose- und Serumlipid-Konzentration erreicht werden.

Auf Grundlage der experimentell ermittelten IC_{50} Werte zur Inhibition der Pankreaslipase sowie weiterer Literaturdaten erfolgte die Entwicklung von 3D-Pharmakophormodellen für ein virtuelles Naturstoffscreening. Es konnten 68 potentiell inhibitorische Verbindungen der Pankreaslipase identifiziert und die Wirksamkeit ausgewählter Verbindungen unter experimentellen Bedingungen getestet werden. Sieben von acht der untersuchten Naturstoffe sowie elf Pflanzenextrakte wurden als Inhibitoren der Pankreaslipase identifiziert.

Untersuchungen zum Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Pflanzenextrakten auf die intestinale Glucoseaufnahme wurden ebenfalls durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein fluoreszenzbasiertes Glucose-Aufnahme Assay im CaCo-2 Zellsystem entwickelt und etabliert. Es wurden insgesamt 19 Reinstoffe und sieben wässrige Pflanzenextrakte analysiert, die jedoch nur einen geringen Einfluss zeigten.

Abstract

Overweight and obesity are leading risc factors for a number of chronic diseases such as diabetes mellitus type 2. Since 1980, the number of people suffering from obesity has more than doubled and prevention and treatment are becoming a major challenge for our society. Supported by dietary and exercise therapies, an innovative therapeutic approach includes the development of inhibitors of nutrient digestion and absorption. In particular, the inhibition of essential enzymes and transporters of the carbohydrate and lipid metabolism is an attractive target for lowering postprandial triglyceride and glucose levels in the blood.

Fluorescence-based screening assays for the determination of the activity of essential enzymes of the digestive system were developed and established in a first stage. A total of five different systems were optimized for activity determination of pancreatic lipase, pancreatic α-amylase, intestinal α-glucosidase, intestinal alkaline phosphatase, and pancreatic proteases. Subsequently, 23 mainly polyphenolic substances were analyzed for enzymatic inhibition and structure-activity relationships of the flavonoid structures were derived. Structural features were identified and recorded to amplify or reduce inhibition of the respective enzyme. In particular, the number and position of phenolic hydroxyl groups as well as bound sugar residues had an influence on enzyme inhibition.

In addition to enzymatic inhibition experiments of pure compounds, aqueous and methanolic extracts from 60 plants of Traditional Chinese Medicine and Traditional European Medicine were tested for anti-lipase and anti-amylase activity. The plant *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) showed a very strong inhibition and was subsequently analyzed by HPLC and ESI-Q-TOF-MS for identification of active compounds. Hibiscus acid and hibiscus acid glucoside were identified. *In silico* docking experiments of hibiscus acid to the crystal structure of porcine pancreatic lipase (PDB code: 1ETH) showed strong interactions with the active site of the enzyme. The methanolic extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. (Rosaceae) also showed a strong inhibition of the enzymatic activities. Therefore, animal experiments were conducted to analyze the effect on fasting blood glucose and serum lipid levels (triglycerides, total cholesterol) using a type 2 diabetes rat model. The treatment resulted in a significant reduction of blood glucose and serum lipid concentrations.

In order to predict the binding mode of pancreatic lipase inhibitors from *in vitro* testing and further literature data, 3D pharmacophore models were created. By subsequent virtual screening of natural product libraries, 68 hits predicted to possess inhibitory activity towards the enzyme were identified. The efficacy of selected compounds was then tested under experimental conditions.

Seven out of eight virtual screening hits as well as eleven plant extracts were identified as pancreatic lipase inhibitors.
Studies on the influence of secondary metabolites and plant extracts on intestinal glucose uptake were carried out. First, a fluorescence-based glucose uptake assay was developed and established in a CaCo-2 cell system. A total of 19 compounds and seven aqueous plant extracts were analyzed, but showed only slight effects.

1 Einleitung

1.1 Adipositas und Diabetes mellitus

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas sowie damit assoziierter Krankheiten hat in Deutschland, aber auch weltweit, in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen. Nachdem das Problem jahrzehntelang auf wohlhabende Industrieländer beschränkt war, beobachtet man in jüngster Zeit einen Anstieg dieser ernährungsbedingten Krankheiten auch in Schwellen- und einigen Entwicklungsländern [1]. Laut der World Health Organisation (WHO) waren im Jahr 2014 1,9 Milliarden Erwachsene übergewichtig, davon 600 Millionen klinisch adipös [1]. Zu den Hauptursachen der Adipositas zählen zum einen genetische Dispositionen, zum anderen ein moderner Lebensstil mit Überernährung sowie mangelnder Bewegung. Andere Ursachen wie endokrine Erkrankungen, pädiatrische Syndrome oder Arzneimittel sind selten [2]. Übergewicht und Adipositas sind Hauptrisikofaktoren für eine Reihe von chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Gefäßerkrankungen, Schlaganfall), Krebs (Endometrium, Brust-und Dickdarm) und Schlaf-Atemstörungen [1, 3, 4].

1.1.1 Adipositas

1.1.1.1 Klassifikation und Diagnostik der Adipositas

Adipositas ist ein medizinischer Zustand, der durch ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -verbrauch verursacht wird und mit einer eingeschränkten Lebensqualität und einem erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einhergeht [5]. Er wird definiert als eine abnormale oder überschüssige Körperfettansammlung, die eine nachteilige Wirkung auf die Gesundheit haben kann [6]. Gesunde Körperfett-Prozentsätze variieren je nach Alter, Geschlecht und Körperbau-Typ. Ein gesunder Körperfettanteil liegt bei normalgewichtigen Frauen zwischen 25-30 %, bei Männern zwischen 18-23 %. Frauen werden bei einem Körperfettanteil von mehr als 30 % als adipös eingestuft, Männer mit einem Anteil von mehr als 25 % [7]. Ein grobes Maß für die Einteilung von Übergewicht und Adipositas stellt der Body-Mass-Index (BMI) dar. Dieser ist definiert als Quotient des individuellen Körpergewichts in Kilogramm (kg) und dem Quadrat der Körpergröße in Metern (m) [7]. Nach Angaben der WHO gelten Erwachsene mit einem BMI gleich oder mehr als 25 kg/m^2 als übergewichtig und mit einem BMI von 30 kg/m^2 oder höher als adipös. Die genaue Einteilung ist der nachfolgenden Tabelle 1.1 zu entnehmen [8]. Die Daten der Nationalen Verzehrsstudie II (2008, Deutschland) zeigten, dass 37,4 % der Studienteilnehmer übergewichtig waren, 20,8 % klinisch adipös. Der prozentuale Anteil der Gesamtbevölkerung mit

Adipositas (BMI $\geq$ 30) teilt sich dabei auf in 15,1 % mit Adipositas Grad I, 4,1 % mit Adipositas Grad II und 1,5 % mit Adipositas Grad III [9].

Tabelle 1.1: BMI-Tabelle (Einteilung nach WHO)

Kategorie	**BMI [kg/m^2]**	**Risiko für Folgeerkrankungen**
Untergewicht	< 18,5	niedrig
Normalgewicht	18,5 - 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25 - 29,9	gering erhöht
Adipositas Grad I	30 - 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35 - 39,9	hoch
Adipositas Grad III	$\geq$ 40	sehr hoch

Ein erhöhter BMI steht in einem engen Zusammenhang mit einem erhöhten Diabetes-Risiko [2], daher sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen zu empfehlen. Neben dem BMI ist das Fettverteilungsmuster für das metabolische und kardiovaskuläre Gesundheitsrisiko entscheidend. Eine Möglichkeit der Beurteilung stellt die indirekte Erfassung der intraabdominalen bzw. viszeralen Fettmasse durch Messung des Taillenumfanges dar. Bei einem Taillenumfang größer 88 cm bei Frauen bzw. größer 102 cm bei Männern liegt eine abdominale Adipositas vor [2, 5]. Aufgrund der zunehmenden Häufigkeit von Übergewicht und Adipositas sowie damit assoziierter Erkrankungen sind weltweite Versorgungsengpässe und Kostenanstiege in den Gesundheitssystemen zu erwarten. Lange Zeit wurden Übergewicht und Adipositas nicht als Krankheiten anerkannt, obwohl sie typische Beispiele für Erkrankungen darstellen, die sich mit dem Fortschritt der Zivilisation und der damit einhergehenden Veränderung des Lebensstils entwickelt haben. Erst im Jahr 2013 wurde Adipositas von der American Medical Association (AMA) als anerkanntes Krankheitsbild eingestuft [10]. Im deutschen Gesundheitssystem ist Adipositas jedoch bis heute nicht offiziell als Krankheit anerkannt [5].

1.1.1.2 Therapie der Adipositas

Kriterien für eine Behandlungsindikation bei Übergewicht und Adipositas sind ein erhöhter BMI, der Taillenumfang sowie Adipositas-assoziierte Erkrankungen (Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2). Die Grundlage einer jeden Behandlung stellt eine Ernährungs- und Verhaltenstherapie sowie eine Bewegungssteigerung dar. Weiterhin ist eine adjuvante medikamentöse Therapie möglich. Diese wird bei Patienten mit einem BMI > 30 kg/m^2 empfohlen, die mit dem Basisprogramm keine ausreichende Gewichtsabnahme (> 5 % innerhalb von drei bis sechs Monaten) erreichen konnten oder bei denen Erkrankungen vorliegen, die durch das bestehende Übergewicht verschlimmert werden könnten (Gelenkserkrankungen, Herzinsuffizienz) [2]. Zur Adipositas-Therapie werden verschiedene Medikamente angeboten. Doch nur zwei Substanzen, der Pankreaslipase (PL)-Inhibitor Orlistat (Xenical) und der Appetitzügler Sibutramin (Reductil), haben in großen klinischen Langzeitstudien ihre Wirksamkeit bewiesen [11]. Aufgrund starker Nebenwirkungen wurden Sibutramin-haltige Arzneimittel mittlerweile wieder vom Markt genommen. Im Jahr 2015 wurden zwei neue Arzneimittel zur Behandlung von Adipositas neu zugelassen: das

Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1)-Analogon Liraglutid (Saxenda) und das Kombinationspräparat Naltrexon/Bupropion (Mysimba) [12]. Aussagen zu Langzeiteffektivitäten und -sicherheiten stehen jedoch aus, sodass weiterhin ein wichtiger Therapieansatz die Inhibition essentieller Enzyme des Lipidstoffwechsels und die damit einhergehende Reduktion der Lipidaufnahme darstellt. Orlistat (Tetrahydrolipstatin, Abb. 1.1) ist derzeit der einzige klinisch zugelassene PL-Inhibitor in Europa. Es handelt sich hierbei um einen Inhibitor der Pankreaslipase, dem wichtigsten Enzym des Lipidstoffwechsels. Chemisch betrachtet stellt es ein gesättigtes Derivat von Lipstatin, einem natürlichen PL-Inhibitor aus dem Bakterium *Streptomyces toxytricini,* dar [13, 14]. Jedoch ist die Anwendung von Orlistat sehr häufig mit gastrointestinalen Nebenwirkungen wie einem gesteigerten Stuhldrang, Meteorismus und Steatorrhö verbunden [15].

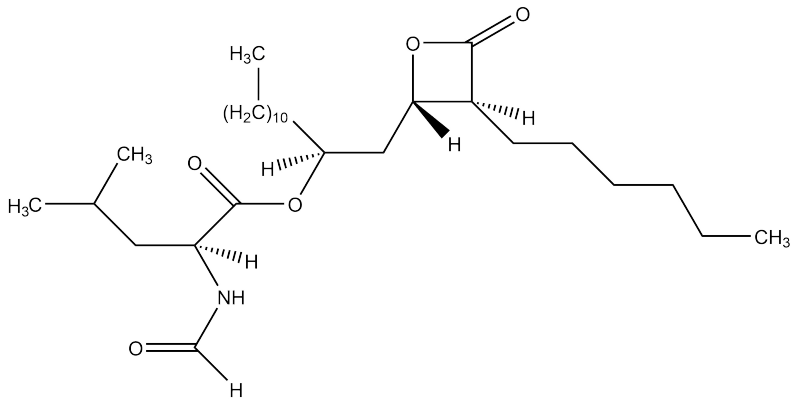


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von Tetrahydrolipstatin (Gebrauchsname: Orlistat)

Das Ziel aktueller Forschungen ist die Entwicklung bzw. Identifizierung von Enzyminhibitoren, die reduzierte Nebenwirkungen bei der Behandlung von Übergewicht und Adipositas zeigen.

1.1.2 Diabetes mellitus

1.1.2.1 Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus

Unter dem Begriff Diabetes mellitus werden metabolische Funktionsstörungen verschiedener Ursachen zusammengefasst, die durch eine chronische Hyperglykämie mit Störungen des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels gekennzeichnet sind. Ursache hierfür ist ein relativer bzw. absoluter Insulinmangel infolge einer ungenügenden Bildung, Sekretion oder Wirkung am Erfolgsorgan [16, 17]. Eine chronische Hyperglykämie ist häufig assoziiert mit Langzeitschäden, Funktionseinschränkungen und Funktionsstörungen verschiedener Organe (Augen, Nieren) sowie des Herz-Kreislauf-Systems [18]. Verschiedene pathogene Prozesse sind an der Entwicklung des Diabetes mellitus beteiligt. Diese reichen von der autoimmunen Zerstörung der β-Zellen des Pankreas mit nachfolgendem absoluten Insulinmangel bis zu einem verminderten Ansprechen der Körperzellen auf das ausgeschüttete Insulin. Im letzerem Fall spricht man von einem relativen Insulinmangel bzw. von einer Insulinresistenz. Die genaue Ursache für eine Insulinresistenz ist derzeit noch Gegenstand intensiver Forschungsarbeit, allerdings sind Übergewicht bzw. Adipositas

als ein wesentlicher Risikofaktor zu nennen. Zu den Symptomen einer Hyperglykämie zählen Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, manchmal in Verbindung mit Polyphagie, Ketonurie sowie verschwommenes Sehen. Beeinträchtigungen des Wachstums im Kindesalter und eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen können Begleiterscheinungen einer chronischen Hyperglykämie sein. Weiterhin sind langfristige Komplikationen in Form einer Retinopathie mit einem potentiellen Verlust des Sehvermögens, einer Nephropathie sowie eine peripheren Neuropathie, mit einem erhöhten Risiko von Fußgeschwüren und Amputationen, möglich [19].

In den meisten Fällen erfolgt die Klassifikation und Einteilung des Diabetes mellitus nach ätiopathogenetischen Kriterien. Hierbei wird nach Diabetes Mellitus Typ 1 und Typ 2 unterschieden. Diabetes mellitus Typ 1 (insulinabhängiger Diabetes mellitus) wird durch einen absoluten Insulinmangel verursacht. 50 - 60 % der Neuerkrankungen treten dabei vor Vollendung des 16. Lebensjahres auf. Eine Früherkennung ist häufig durch serologische Anzeichen bei Risikopatienten möglich. Genetische Marker zeigen hierbei frühzeitig eine Destruktion der Insulin-produzierenden-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas auf, welche durch eine Autoimmunreaktion hervorgerufen wird [19, 20]. Diabetes mellitus Typ 2 (primär nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus), im Folgenden auch als Typ-2-Diabetes bezeichnet, macht ca. 80 - 90 % der Diabetes Erkrankungen aus und beginnt häufig jenseits des 30. - 40. Lebensjahres. Sehr häufig ist die Erkrankung mit Adipositas assoziiert, Autoimmunreaktionen wie beim Typ 1 Diabetes spielen hingegen keine Rolle [20]. Ursache für die Erkrankung ist eine erworbene Insulinresistenz, die jedoch häufig schleichend und über Jahre unbemerkt verläuft. Während dieser asymptomatischen Periode ist es möglich, Unregelmäßigkeiten im Kohlenhydratstoffwechsel durch Messung des Nüchtern-Blutzuckers bzw. nach oraler Verabreichung einer Glucosebelastung (75 g oraler Glucosetoleranztest: oGTT) zu bestimmen [19]. Die Kriterien für eine Erkrankung sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Zur Diagnose eines Diabetes mellitus ist die Überschreitung einer der genannten Werte ausreichend, jedoch müssen Zustände, die zu einer Verfälschung des HbA1c-Wertes führen können, ausgeschlossen werden (Hämoglobinvarianten, hämolytische Anämie, Eisenmangelanämie, Schwangerschaft) [21].

Tabelle 1.2: Kriterien zur Diagnostik eines Diabetes mellitus [21]

Diagnose-Kriterium	**Konzentration im venösen Plasma**
HbA1c	$\geq$ 6,5 % ($\geq$ 48 mmol/mol)
Gelegenheits-Plasmaglucosewert	$\geq$ 200 mg/dL ($\geq$ 11,1 mmol/L)
Nüchtern-Plasmaglucose	$\geq$ 126 mg/dL ($\geq$ 7,0 mmol/L)
oGTT-2-h-Wert im venösen Plasma	$\geq$ 200 mg/dL ($\geq$ 11,1 mmol/L)

Die Vorstufe eines manifestierten Diabetes mellitus wird als Prädiabetes bezeichnet. Es liegt bereits eine beginnende Stoffwechselstörung vor, die durch eine Insulinresistenz sowie eine gestörte Glucosetoleranz gekennzeichnet ist. Die Blutzuckerwerte sind nur leicht erhöht. Eine abnorme Nüchternglucose wird durch einen Glucosewert von 100 - 125 mg/dL (5,6 mmol/L - 6,9 mmol/L) im venösen Plasma charakterisiert, eine gestörte Glucosetoleranz durch eine 2-h-Plasmaglucose

im oGTT im Bereich von 140-199 mg/dL (7,8 - 11,0 mmol/L) bei Nüchtern-Glucosewerten kleiner 126 mg/dL (< 7,0 mmol/L) [21].

1.1.2.2 Therapie des Diabetes mellitus

Beim Vorliegen eines Typ 1 Diabetes mellitus muss das fehlende körpereigene Insulin ersetzt werden. Dies erfolgt durch eine intensivierte Insulintherapie bzw. durch eine Insulinpumpentherapie. Bei der intensivierten Insulintherapie erfolgt täglich das ein- oder mehrmalige Spritzen eines kurzwirkenden Insulins (Normalinsulin), eines Verzögerungsinsulins bzw. eines langwirkenden Insulinanalogons. Bei der Insulinpumpentherapie wird ein kurzwirkendes Insulin bzw. ein langwirkendes Insulinanalogon verwendet. Dieses wird zur Basisversorgung kontinuierlich durch die Insulinpumpe ins Unterhautfettgewebe abgegeben [22].
Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 ist vielschichtiger. Als Grundlage einer jeden Behandlung erfolgt zunächst eine lebensstilmodifizierende, medikamentöse Basistherapie. Diese umfasst eine Schulung des Patienten, eine Ernährungstherapie, eine Steigerung der körperlichen Aktivität und Nichtrauchen sowie Stressbewältigungsstrategien [18]. Häufig ist jedoch eine unterstützende Pharmakotherapie notwendig, wenn die mit der Basistherapie gesetzten Ziele innerhalb von 3 bis 6 Monaten nicht erreicht werden. Zur medikamentösen Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 werden zunächst orale Antidiabetika eingesetzt. Diese lassen sich funktional in die folgenden Gruppen einteilen (Rote Liste 2016):

- α-Glucosidasehemmer (Acarbose: Glucobay®)
- Biguanid-Derivate (Metformin: Glucophage®, MetfoLiquid GeriaSan)
- Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren (JANUVIA®, Onglyza®, Xelevia®)
- Glinide (Repaglinid: NovoNorm®, andere Glinide: STARLIX®)
- Sulfonylharnstoff-Derivate (Diamicron Uno®)
- Andere Antidiabetika außer Insuline (Actos®, BYETTA®, Jardiance®)

Als Mittel der ersten Wahl wird das Biguanid-Derivat Metformin (Abb. 1.2) in der Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus eingesetzt. Metformin führt zu einer günstigen Beeinflussung der Plasmaglucoseeinstellung, des Gewichts, der Lipidwerte, der Insulinämie und des diastolischen Blutdruckes. Der vollständige Wirkmechanismus ist jedoch nicht bekannt.

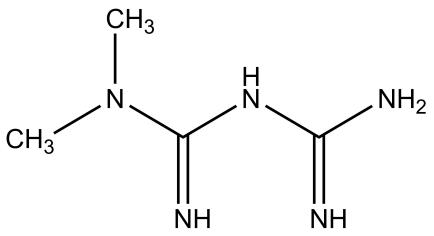


Abbildung 1.2: Chemische Struktur von Metformin

Beim Vorliegen einer Metformin-Unverträglichkeit bzw. bei Kontraindikationen wird auf andere Antidiabetika zurückgegriffen. Ein Beispiel ist der α-Glucosidasehemmer Acarbose. Es handelt sich hierbei um ein Pseudotetrasaccharid (Abb.1.3), welches aus Bakterien der Gattungen *Actinoplanes* und *Streptomyces* gewonnen wird [23]. Es ist in der Lage, essentielle Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels (α-Amylase, α-Glucosidase) zu hemmen und verhindert somit die Hydrolyse von Oligo-, Tri- und Disacchariden zu Glucose. Ein verminderter postprandialer Blutzuckeranstieg ist die Folge [24].

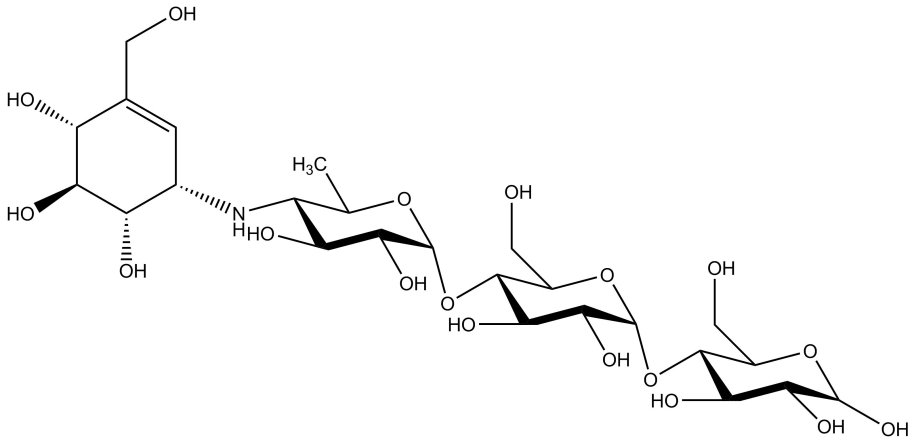


Abbildung 1.3: Chemische Struktur von Acarbose

Die Verwendung von Acarbose ist jedoch häufig mit gastrointestinalen Nebenwirkungen (vermehrte Darmperistaltik, Flatulenz, Diarrhö) verbunden [25]. Die Charakterisierung und Entwicklung neuer Enzyminhibitoren des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels mit reduzierten Nebenwirkungen ist derzeit Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Insbesondere die Verwendung von pflanzlichen Ressourcen als potenzielle Plattform für die Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneistoffe hat sich in diesem Zusammenhang zu einem relevanten Forschungsfeld entwickelt. Häufig ist mit Fortschritt des Krankheitsverlaufs unter einer Ernährungstherapie und einer pharmakologischen Monotherapie durch Nachlassen der Insulinsekretion eine Kombinationstherapie notwendig [18]. Wenn jedoch durch Lebensstiländerungen sowie eine Therapie mit oralen Antidiabetika das individuelle Therapieziel nicht erreicht werden kann bzw. Kontraindikationen vorliegen, ist eine, zumindest temporäre, Insulintherapie unumgänglich.

1.2 Innovative Therapieansätze zur Behandlung von Adipositas und Typ-2-Diabetes

1.2.1 Inhibition wichtiger Enzyme des Verdauungssystems

Verdauungsenzyme katalysieren die hydrolytische Spaltung von Lipiden, Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren aus der Nahrung in resorbierbare Komponenten. Sie können, basierend auf ihren Substraten, den folgenden vier Gruppen zugeteilt werden [26]:

- Lipasen (z.B. Pankreaslipase, Zungengrundlipase, Lipoproteinlipase)
- Glycosidasen (z.B. α-Amylase, β-Amylase, α-Glucosidase)
- Proteasen (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin)
- Nucleasen (DNAase, RNAase)

Alle Enzyme können der Enzymklasse III der Enzyme Commission (EC)-Klassifikation, den Hydrolasen, zugeordnet werden. Hinsichtlich einer Therapie von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 ist vorallem die Inhibition der pankreatischen Lipase und α-Amylase von entscheidender Bedeutung. Ziel ist eine verminderte bzw. verzögerte Hydrolyse von mit der Nahrung aufgenommenen Makronährstoffen (Lipide, Kohlenhydrate, Proteine) und eine damit einhergehende Reduzierung postprandialer Trigylcerid- und Glucosekonzentrationen im Blut. Die wichtigsten Ansatzpunkte einer solchen Therapie sind in der nachfolgenden Abbildung 1.4 dargestellt.

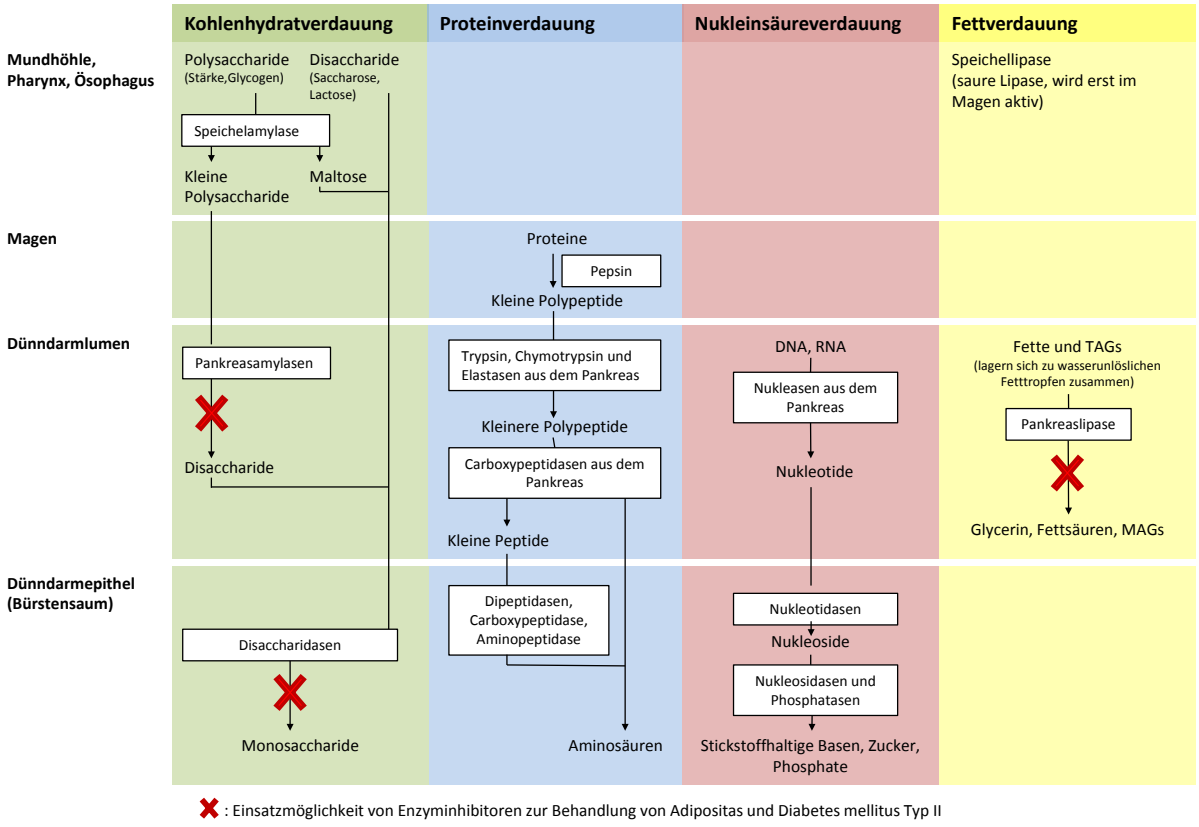


Abbildung 1.4: Einsatzmöglichkeiten von Enzyminhibitoren als Therapieansatz zur Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2. DNA: Desoxyribonukleinsäure, RNA: Ribonukleinsäure, TAGs: Triacylglyceride, MAGs: Monoacylglyceride (Abb. modifiziert nach [27]).

Die bereits als Arzneimittel zugelassenen Enzyminhibitoren weisen zum Teil starke Nebenwirkungen auf [15, 25]. Daher ist das Ziel aktueller Forschungen die Entwicklung und Identifizierung von Verbindungen, die eine reversible Inhibition der Enzyme und damit lediglich eine Retardierung des Verdauungsprozesses bewirken. Auf diese Weise werden postprandiale Triglycerid-

und Glucose-Spiegel im Blut reduziert und energiereiche Nährstoffe (Lipide, Kohlenhydrate) können distale Bereiche des Dünndarms (*Ileum*) erreichen, wo der sogenannte *ileal brake* ausgelöst wird [28,29]. Der Begriff *ileal brake* bezeichnet den Rückkopplungs-Mechanismus, welcher die gastrische Entleerung und die duodenale-jejunale Motilität verlangsamt bzw. „bremst". Die Hormone Peptid YY (PYY) und Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1) sind die wahrscheinlichsten Mediatoren dieses Mechanismus. Als Folge ist die Nahrungsaufnahme reduziert und der Sättigungsspiegel erhöht [30].

1.2.1.1 Pankreaslipase

Die Pankreaslipase (Pankreas-Triacylglycerid-Hydrolase (EC 3.1.1.3)) ist ein wichtiges Enzym des Fettstoffwechsels, das im Dünndarm von Säugetieren für die Spaltung von aufgenommenen Nahrungsfetten essentiell ist. Sie wird in den Drüsenzellen des Pankreas produziert und über den *Ductus pancreaticus* in das Duodenum sezerniert [31,32]. Bei der humanen Pankreaslipase (HPL, Tab. 1.3) handelt es sich um ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 52 kDa, welches aus einem 16 Aminosäuren großen Signalpeptid und dem eigentlichen Protein (449 Aminosäuren) aufgebaut ist [31].

Tabelle 1.3: Allgemeine Daten zur Pankreaslipase [33]

Bezeichnung	**Pankreaslipase** **Pankreas-Triacylglycerid-Hydrolase (EC 3.1.1.3)**
Wirkungsspezifität	Hydrolytische Esterspaltung
Sequenz	465 Aminosäuren: 1-16 Signalpeptid, 17-465 Kettenlänge
Molare Masse	52 kDa
Isoelektrischer Punkt	6,27
Substrate	TAGs, DAGs, MAGs
Zwischenprodukte	DAGs, MAGs
Produkte	DAGs, MAGs, freie Fettsäuren
Cofaktor	Co-Lipase

Die Polypeptidkette besteht aus einer N-terminalen Domäne (Aminosäure 1-336) und einer C-terminalen Domäne (Aminosäure 337-449). Während die C-terminale Domäne für die Bindung der Co-Lipase verantwortlich ist, ist die N-terminale Domäne katalytisch aktiv [31, 34]. Die Pankreaslipase ist eine Serinesterase, die eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin (152), Asparaginsäure (176) und Histidin (263) besitzt [34]. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. Zunächst erfolgt ein nukleophiler Angriff des Serins an das jeweilige Substrat, infolgedessen ein tetraedisches Zwischenprodukt gebildet wird. Durch Abspaltung eines Alkohols entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex. Das freiwerdende Proton des Serins wird vom Imidazolring des Histidins aufgenommen. Es erfolgt ein erneuter nukleophiler Angriff an den Acyl-Enzym-Komplex unter Bildung eines zweiten tetraedischen Intermediats, welches im Anschluss in das Produkt Fettsäure und das ursprüngliche Enzym zerfällt [35]. Das Serin (152) ist dabei essentiell für die hydrolytische Aktivität des Enzyms. Für die volle

Funktionsfähigkeit des Enzyms ist die Co-Lipase als Cofaktor notwendig. Bei der Co-Lipase handelt es sich um ein nicht-enzymatisches Protein mit einem Molekulargewicht von 10 kDa, das aus 100 Aminosäuren aufgebaut ist. Es wird als Pro-Co-Lipase sezerniert und durch tryptische Spaltung eines N-terminalen Pentapeptids (Enterostatin) in seine aktive Form überführt [36].

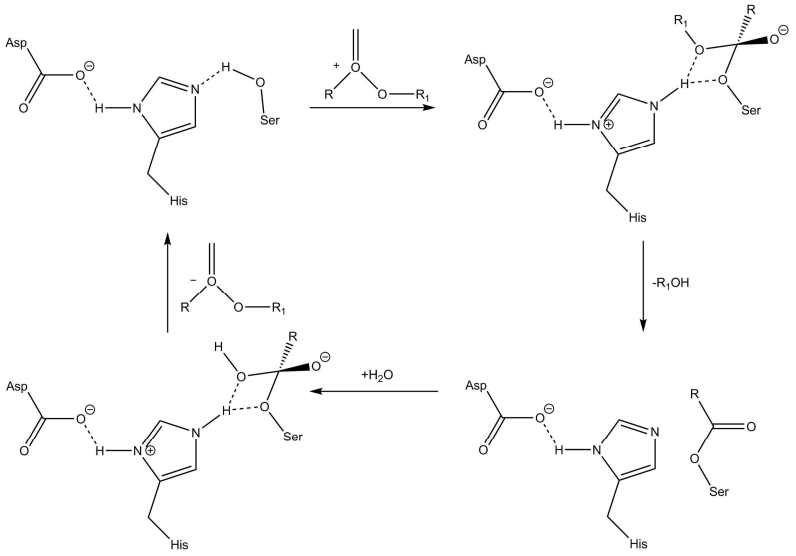


Abbildung 1.5: Mechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse von Esterbindungen [35]

Mit Eingang des Chymus in das Duodenum wird die Sekretion von verschiedenen Hormonen des Intestinaltraktes (Cholecystokinin, Secretin) induziert. Daraufhin werden Gallensalze und Pankreasenzyme in den Dünndarm abgegeben [37]. Der Anteil an aufgenommenen Nahrungsfetten beträgt bei einer typischen westlichen Ernährung 42 %, wobei Triacylglyceride (TAGs) mit einem Anteil von 90 % die Hauptkomponente darstellen. Die HPL hydrolysiert 40 bis 70 % der aufgenommenen TAGs und stellt somit ein wichtiges Target für die Behandlung von Übergewicht und Adipositas dar [34].

1.2.1.2 α-Amylasen

Die α-Amylasen (α-1,4-D-Glukan-4-Glukanohydrolasen (EC 3.2.1.1)) stellen eine Enzymfamilie dar, welche die Hydrolyse von α-D-(1→4)-Glukan-Verbindungen der Stärke, des Glykogens und anderen Polysacchariden katalysieren. Das Enzym nimmt hierbei eine Schlüsselrolle im Kohlenhydratstoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ein [38]. Zu den Verdauungsenzymen gehörend, werden die α-Amylasen im menschlichen Organismus in den Drüsenzellen des Pankreas (pankreatische α-Amylase: AMY2A, AMY2B, Tab. 1.4) sowie den Speicheldrüsen *Parotis*, *Glandula submandibularis* und *Glandula sublingualis* (Speichel-α-Amylase: AMY1A, AMY1B, AMY1C) gebildet und in das Duodenum beziehungsweise die Mundhöhle sezerniert [39]. Mit Aufnahme der Nahrung in die Mundhöhle erfolgt die Freisetzung von α-Amylasen aus den Speicheldrüsen, deren Wirkung jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Nahrungsbrei gelangt in den Magen, wo die Enzymaktivität aufgrund des sauren pH-Wertes sehr schnell eingestellt wird. Mit

Eintritt des Chymus in das Duodenum werden komplexe Polysaccharide durch die pankreatische α-Amylase in Di- und Oligosaccharide hydrolisiert [40].

Tabelle 1.4: Allgemeine Daten zur pankreatischen α-Amylase [41]

Bezeichnung	**Pankreas-Amylase** **α-1,4-D-Glukan-4-Glukanohydrolase (EC 3.2.1.1)**
Wirkungsspezifität	Hydrolyse von α-D-(1→4)-Glukan-Verbindungen
Sequenz	511 Aminosäuren: 1-15 Signalpeptid, 16-511 Kettenlänge
Isoformen	AMY2A, AMY2B
Molare Masse	58 kDa
Isoelektrischer Punkt	6,47
Substrate	Oligo- und Polysaccharide
Zwischenprodukte	Dextrine
Produkte	Maltose, Glucose, verzweigte Oligosaccharide
Cofaktor	Ca^{2+}

Die humane, pankreatische α-Amylase besitzt ein Molekulargewicht von 58 kDa und besteht aus drei Domänen, die als A, B und C bezeichnet werden. Die Domäne A umfasst die Aminosäuren 1-99 sowie 169-404 und trägt die aktiven Seitenreste Asp (197), Glu (233) und Asp (300). Des Weiteren beinhaltet sie Chlorid-Ionen-Bindungsstellen (Arg (195), Asn (298), Arg (337)). Die Domäne B (Aminosäure 100-168) enthält hingegen Calcium-Ionen-Bindungsstellen an den Positionen Asn (100), Arg (158), Asp (167) und His (201). Domäne C (Aminosäure 405-496) besteht aus antiparallellen β-Strukturen und ist nur lose mit den Domänen A und B verbunden [42]. Der katalytische Reaktionsmechanismus der α-Amylasen ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

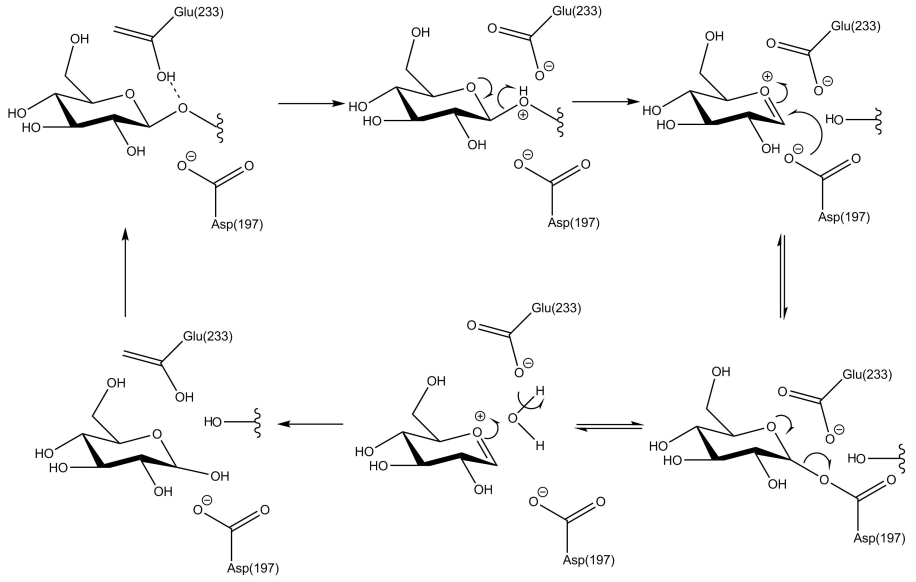


Abbildung 1.6: Reaktionsmechanismus der α-Amylase

Im ersten Schritt erfolgt die Protonierung des glykosidischen Sauerstoffs durch Glu (233). Anschließend wird ein nukleophiler Angriff des Asp (197) an Position C1 des Zuckerrestes durchgeführt.

Es folgen der Abgang des reduzierenden Endes des Substrates und die Bildung eines kovalenten Glycosyl-Enzym-Zwischenproduktes. Ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert die kovalente Bindung des gebildeten Zwischenproduktes und beendet nach Regenerierung der ursprünglichen Protonierungszustände den katalytischen Zyklus. α-Amylasen repräsentieren den wichtigsten Vertreter der Familie 13 der glycosidischen Hydrolasen (GH13), können jedoch vereinzelt auch GH57 und GH119 zugeordnet werden. Ein Vorkommen in GH126 wird aktuell noch diskutiert [43–45]. Über die dreidimensionale Struktur der Familie 13 existieren bereits zahlreiche Untersuchungen [46]. Alle Familie 13 Amylasen, zu denen die pankreatische α-Amylase zuzuordnen ist, besitzen eine Domänenstruktur, bestehend aus einem zentralen (β/α)8-Barrel, das an gegenüberliegenden Seiten um eine kleine unregelmäßige β-Domäne B sowie ein β-Faltblatt am C-Terminus erweitert ist [47].
Aufgrund ihrer essentiellen Funktion im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, stellt die Hemmung der pankreatischen α-Amylase und die damit einhergehende Verminderung der Resorption von Kohlenhydraten ein wichtiges Target für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ II dar.

1.2.1.3 Intestinale α-Glucosidase

Die intestinale α-Glucosidase, alternativ auch als Maltase-Glucoamylase (Maltase (EC 3.2.1.20) und Glucoamylase (EC 3.2.1.3)) bezeichnet, ist ein essentielles Enzym für die Verdauung von linearkettigen Kohlenhydraten. Es katalysiert die Hydrolyse von terminalen (1→4)-α-D-Glucoseresten der nicht-reduzierenden Enden unter Freisetzung von α-D-Glucose [48, 49]. Bei der humanen α-Glucosidase handelt es sich um ein Protein, das aus 1857 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 210 kDa besitzt (Tab. 1.5) [50].

Tabelle 1.5: Allgemeine Daten zur intestinalen α-Glucosidase (Maltase-Glucoamylase) [50]

Bezeichnung	**Intestinale α-Glucosidase Intestinale Maltase-Glucoamylase (Maltase (EC 3.2.1.20) und Glucoamylase (EC 3.2.1.3))**
Wirkungsspezifität	Hydrolyse von α-D-(1→4)-Glykosidbindungen
Sequenz	1857 Aminosäuren
Isoformen	MGAM
Molare Masse	210 kDa
Isoelektrischer Punkt	5,27
Substrate	terminale,α-D-(1→4) verbundene Glucosereste
Produkte	α-D-Glucose

Das Enzym ist an der Bürstensaummembran des vorderen Dünndarmabschnittes lokalisiert und besitzt zwei katalytische Untereinheiten: eine N-terminale Untereinheit, die zur Membranseite gerichtet ist, und eine C-terminale Untereinheit, die lumenseitig ausgerichtet ist. Beide katalytische Untereinheiten sind der Familie 31 der GH zuzuordnen [51].
Mit Eintritt des Chymus in das Duodenum erfolgt zunächst die Hydrolyse von komplexen Polysacchariden durch die pankreatische α-Amylase. Die gebildeten Di- und Oligosaccharide können

jedoch nicht absorbiert werden. Erst durch die an der Bürstensaummembran des proximalen Jejunums lokalisierten α-Glucosidasen erfolgt die Hydrolyse der Di-und Oligisaccharide in resorbierbare Monosaccharide. Die meisten Kohlenhydrate werden im vorderen Abschnitt des Jejunums verdaut, nur wenige erreichen das distale Jejunum oder das Ileum. Dementsprechend gering ist die Konzentration an α-Glucosidasen in dieser Region [40].
Aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei der Hydrolyse von Kohlenhydraten kommt der intestinalen α-Glucosidase eine Schlüsselfunktion in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zu. Bereits zugelassen sind die α-Glucosidase-Inhibitoren Acarbose (Glucobay®) und Miglitol (Diastabol®). Ihre Anwendung ist jedoch mit unerwünschten gastrointestinalen Nebenwirkungen verbunden.

1.2.1.4 Pankreasproteasen

Der größte Teil des Abbaus von Proteinen bzw. Polypeptiden im Dünndarm erfolgt durch die katalytische Aktivität der Serin-Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Diese Enzyme werden als inaktive Vorstufen (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proelastase) in den Drüsenzellen des Pankreas produziert und gespeichert. Erst mit Sezernierung der Vorstufen in den Dünndarm, erfolgt deren Aktivierung durch eine selektive, proteolytische Spaltung [52]. In der nachfolgenden Tabelle 1.6 sind die allgemeinen Daten der drei Enzyme zusammengefasst [53–55].

Tabelle 1.6: Allgemeine Daten zu den Pankreasproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase [53–55]

Bezeichnung	**Trypsin (EC 3.4.21.4)**	**Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)**	**Pankreas-Elastase (EC 3.4.21.74) Chymotrypsinartige Elastase 2A**
Wirkungsspezifität	Endopeptidase	Endopeptidase	Endopeptidase
Sequenz	247 Aminosäuren: 1-15 Signalpeptid, 16-23 Propeptid, 24-247 Kettenlänge	263 Aminosäuren: 1-18 Signalpeptid, 19-263 Kettenlänge	269 Aminosäuren: 1-16 Signalpeptid, 17-28 Propeptid, 29-269 Kettenlänge
Isoformen	PRSS1/2/3/4	CTRB1/2	CELA2A
Molare Masse	27 kDa	28 kDa	29 kDa
Isoelektrischer Punkt	6,08	6,79	8,80
Substrate	Arg-, Lys-Bindungen	Tyr-, Trp-, Phe-, Leu-Bindungen	Elastin
Produkte	AS, Peptide	AS, Peptide	Elastin-Bruchstücke
Cofaktor	Ca^{2+}	-	-

Die Enzyme haben eine gemeinsame Enzymvorstufe und weisen daher eine große strukturelle Ähnlichkeit auf. Jedes der Enzyme besitzt zwei Domänen, in deren Mitte das aktive Zentrum lokalisiert ist. Aufgrund ihres Wirkmechanismus mit einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin, werden sie funktionell den Serinproteasen zugeordnet [52].

1.2.1.5 Intestinale Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatasen (EC 3.1.3.1) sind Enzym-Dimere, welche Phosphorsäuremonoester zu Phosphat und einem Alkohol unter Freisetzung von Protonen hydrolysieren können [56]. Bei der intestinalen Alkalischen Phosphatase (IAP, Tab. 1.7) handelt es sich um ein Protein mit einer Molaren Masse von 57 kDa, das aus 528 Aminosäuren aufgebaut ist [57]. Das Enzym besitzt eine Vielzahl von Funktionen, unter anderem ist es an der Regulation der Bicarbonat-Sekretion und des pH-Wertes im Duodenum beteiligt [58].

Tabelle 1.7: Allgemeine Daten zur intestinalen Alkalischen Phosphatase [57]

Bezeichnung	**Intestinale Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)**
Wirkungsspezifität	Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern
Sequenz	528 Aminosäuren: 1-19 Signalpeptid, 20-503 Kettenlänge, 504-528 Propeptid
Isoformen	ALPI
Molare Masse	57 kDa
Isoelektrischer Punkt	5,53
Substrate	Phosphorsäuremonoester
Produkte	Phosphat, Alkohol
Cofaktor	Mg^{2+}, Zn^{2+}

Die intestinale Alkalische Phosphatase gehört zu den Resorptionsenzymen des Verdauungstraktes [59]. Eine wesentliche regulatorische Funktion wird ihr bei der Resorption von Fetten im vorderen Dünndarmtrakt zugeschrieben. Es konnten steigende IAP-Konzentrationen in Lymphe und Serum nach einer fettreichen Mahlzeit dokumentiert werden [56]. Eine Bewertung des Enzyms hinsichtlich seiner Rolle bei der Entstehung von Übergewicht und Adipositas steht bislang noch aus.

1.2.2 Inhibition der Resorption von Nährstoffen

Neben der Inhibition wichtiger Enzyme des Verdauungssystems liegt ein weiterer innovativer Ansatz zur Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 in der Inhibition der Nährstoffresorption. Insbesondere die verminderte Resorption von energiereichen Nährstoffen (Lipide, Kohlenhydrate) und die damit einhergehende Reduzierung des postprandialen Anstiegs von Triglycerid- und Glucose-Konzentrationen im Blut stellen einen vielversprechenden Therapieansatz dar.

1.2.2.1 Resorption der Kohlenhydrate im Intestinaltrakt

Im Dünndarmlumen wird der Großteil der mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate durch Pankreas-Amylasen sowie an der Bürstensaummembran lokalisierte Glucosidasen zu Monosacchariden gespalten. In erster Linie entstehen dabei die Monosaccharide Glucose, Galactose und Fructose [60]. Die so gebildete Glucose wird vor allem über einen Na^{+}-abhängigen

sekundär-aktiven Symport (SGLT1, *Sodium Glucose* Cotransporter 1) oder bei hohen Glucose Konzentrationen über den Glucose Transporter 2 (GLUT2) durch Diffusion aus dem Darmlumen in die Darmzelle aufgenommen. Die Aufnahme von Galactose erfolgt ebenfalls über SGLT1, die von Fructose über Glucose Transporter 5 (GLUT5) in die Zelle (Abb. 1.7). Über basolateral lokalisierte GLUT2 und GLUT5 Transporter gelangen die Monosaccharide aus den Enterocyten ins Pfortaderblut und somit zur Leber [60, 61].

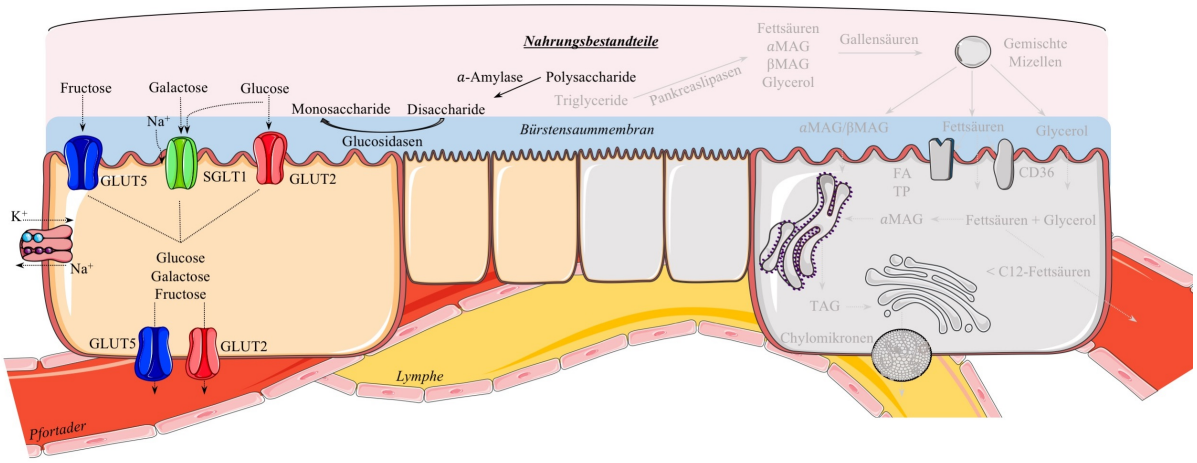


Abbildung 1.7: Verdauung und Resorption von Kohlenhydraten im Intestinaltrakt (linke Seite): Durch Hydrolyse der mit der Nahrung aufgenommenen Polysaccharide entstehen die Monosaccharide Glucose, Galactose und Fructose. Die gebildete Glucose wird über SGLT1 oder bei hohen Glucose Konzentrationen über GLUT2 aufgenommen. Die Aufnahme von Galactose erfolgt ebenfalls über SGLT1, die von Fructose über GLUT5 in den Enterocyten. Über basolateral lokalisierte GLUT2 und GLUT5 Transporter gelangen die Monosaccharide ins Pfortaderblut und somit zur Leber [60, 61]. GLUT: Glucose Transporter, Na^+: Natrium-Ion.

Eine Verringerung der Glucoseaufnahme in die Darmzelle durch Inhibition der apikal lokalisierten Glucose Transporter SGLT1 und GLUT2 ist daher ein potentielles Ziel bei der Entwicklung neuer diätetischer oder pharmakologischer Therapieansätze zur Behandlung des Typ-2-Diabetes. Durch eine reduzierte Glucoseresorption sollen postprandiale Blutzuckerspitzen vermieden und damit das Risiko für Folgeerkrankungen verringert werden. Aktuell sind bereits einige Inhibitoren des *Sodium Glucose* Cotransporter 2 (SGLT2) als Arzneistoff zugelassen. Dapagliflozin (Forxiga®) erhielt im Jahr 2012 als erster Wirkstoff eine Zulassung auf dem europäischen Markt [62, 63]. Diese sogenannten SGLT2-Hemmer sind reversible, hochpotente und selektiv kompetetive Inhibitoren des SGLT2. Ihre Funktionsweise beruht auf einer insulinunabhängigen Verstärkung der renalen Glucoseausscheidung und ermöglicht damit eine verbesserte Blutzuckerkontrolle [64]. Der Einsatz von SGLT1-Inhibitoren und eine Verminderung der Glucoseaufnahme bereits im Dünndarm ist ein potentieller Therapieansatz, der jedoch auch in Hinsicht auf zu erwartende Nebenwirkungen (v.a. osmotische Diarrhöen) derzeit stark diskutiert wird.

1.2.2.2 Resorption der Lipide im Intestinaltrakt

Während der Hydrolyse der mit der Nahrung aufgenommenen Lipide im vorderen Dünndarmabschnitt (Duodenum) werden vor allem Monoacylglyceride (MAGs) und freie Fettsäuren gebildet. Das zur Spaltung essentielle Enzym PL kann dabei nur effektiv wirken, wenn Gallensäuren als Emulgatoren zur Verfügung stehen. Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit werden die gebildeten Fettsäuren und MAGs mit Gallensäuren zu wasserlöslichen Mizellen zusammengefasst. In dieser Form werden die Fettspaltprodukte zur Bürstensaummembran transportiert, wo die Mizellen wieder in ihre verschiedenen Bestandteile zerfallen. Ihr Inhalt wird anschließend entweder passiv oder bei freien Fettsäuren auch Carrier-vermittelt durch die Phospholipidmembran in die Enterocyten aufgenommen (Abb. 1.8) [65].

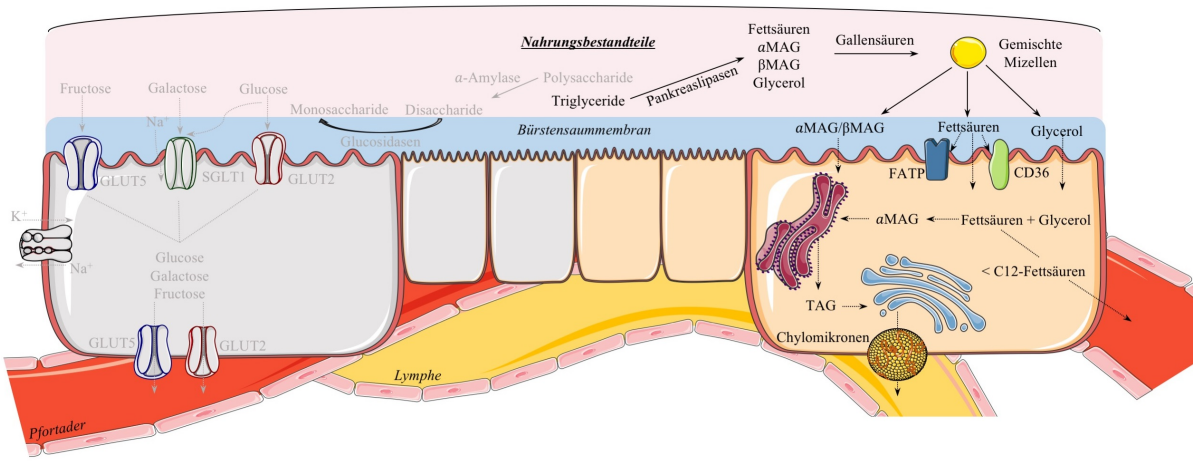


Abbildung 1.8: Verdauung und Resorption von Triacylglyceriden im Intestinaltrakt (rechte Seite): Aufgenommene Nahrungslipide (>90 % TAGs) werden durch das Enzym PL zu MAGs, freien Fettsäuren und Glycerol hydrolisiert. Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit werden die gebildeten Spaltprodukte mit Gallensäuren zu gemischten Mizellen zusammengefasst. Mit Erreichen des Bürstensaums zerfallen die Mizellen wieder in ihre verschiedenen Bestandteile. MAGs und Glycerol werden passiv, freie Fettsäuren auch Carrier-vermittelt (FATP, CD36) in den Enterocyten aufgenommen. Kurzkettige Fettsäuren (C<12) gelangen direkt in die Pfortader und werden von dort zur Leber transportiert. Langkettige Fettsäuren (C>12) und MAGs werden erneut zu TAGs reverestert. In dieser Form werden sie in Chylomikronen eingebaut und erreichen die Lymphgefäße [65, 66]. MAG: Monoacylglycerid, TAG: Triacylglycerid, FATP: *fatty acid transport protein*; CD36: *cluster of differentiation.*

Für die Carrier-vermittelte Fettsäureaufnahme stehen das Fettsäuretransportprotein (*fatty acid transport protein*, FATP) und die Fettsäuretranslokase (*fatty acid translocase*, FAT), häufig auch als CD36 (*cluster of differentiation* 36) bezeichnet, zur Verfügung [65]. Kurzkettige Fettsäuren (C<12) gelangen im Anschluss direkt in die Pfortader und werden von dort zur Leber transportiert. Langkettige Fettsäuren (C>12) und MAGs werden hingegen erneut zu TAGs reverestert. In dieser Form werden sie in Chylomikronen eingebaut und erreichen die Lymphgefäße [66].
Ein möglicher Therapieansatz besteht in der partiellen Inhibition der Resorption der gebildeten Fettspaltprodukte (freie Fettsäuren, MAGs). Als Angriffspunkt könnten hierbei die Carrier-Proteine FATP und CD36 dienen. Auch hier ist jedoch die Problematik gastrointestinaler Nebenwirkungen (Steatorrhoen, Flatulenzen) zu berücksichtigen.

1.3 Polyphenole

1.3.1 Definition

Polyphenole gehören zu den Sekundärstoffwechselmetaboliten und stellen einen wichtigen Bestandteil von Pflanzen dar [67]. Chemisch betrachtet handelt es sich um aromatische Verbindungen mit mindestens zwei direkt an den aromatischen Ring gebundenen Hydroxylgruppen. Die Grundstruktur aller Polyphenole lässt sich vom klassischen Phenol, dem Monohydroxybenzol, ableiten. Den höchsten Anteil an Polyphenolen findet man in den Blättern und Früchten der Pflanzen. Sie dienen zum Schutz vor Fraßfeinden, UV-Licht sowie zur Anlockung von Bestäubern (Blütenfarbstoffe, Farbpigmente) [67, 68]. Eine besondere Rolle kommt dabei ihrer Wirkung als Antioxidans und Radikalfänger zu, da sie wichtige Biomoleküle wie DNA und Strukturproteine vor der Schädigung durch freie Radikale schützen können [67]. Zu den Polyphenolen zählen Flavonoide, Phenolsäuren, Lignane, Stilbene sowie Gerbstoffe. Letztere lassen sich in die Unterklassen der Gallotannine und Catechingerbstoffe differenzieren [69, 70].
In einer Vielzahl von Studien konnte bereits die günstige Wirkung von Polyphenolen auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel nachgewiesen werden [71–73]. Sie sind in der Lage, wichtige Enzyme des Stoffwechsels, wie die PL, die Lipoproteinlipase (LPL), α-Amylasen und die Glycerophosphatdehydrogenase (GPDH), zu inhibieren [74, 75]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass polyphenolreiche Extrakte das Körpergewicht, den Körperfettanteil, den Gehalt an freien Fettsäuren im Plasma und eine Leberlipidakkumulation senken können [71].

1.3.2 Polyphenole als Inhibitoren von Verdauungsenzymen

Eine wichtige Strategie bei der Suche nach Arzneistoffen zur Behandlung von Adipositas und damit assoziierter Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2 beinhaltet das Screening von potentiellen PL und α-Amylase Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs. Ziel ist die Entwicklung und Identizierung von Verbindungen, die eine reversible Inhibition der Enzyme und damit lediglich eine Retardierung des Verdauungsprozesses bewirken. Auf diese Weise können postprandiale Triglycerid- und Glucose-Spiegel im Blut reduziert und der Rückkopplungs-Mechanismus *ileal-brake* induziert werden.

Eine Vielzahl von natürlichen bioaktiven Substanzen ist bereits hinsichtlich ihrer Wirkung auf verschiedene Stoffwechselerkrankungen untersucht worden. Dabei zeigte insbesondere die Stoffklasse der Polyphenole ein hohes Potential [34]. Es wurde unter anderem die hemmende Wirkung von Tanninen auf die Aktivität von Proteasen in zahlreichen Studien [76–78] nachgewiesen. Sie sind in der Lage, unlösliche oder lösliche Komplexe mit Proteinen durch eine unspezifische Bindung an deren Oberfläche zu bilden [76]. Hinsichtlich einer PL und α-Amylase inhibitorischen Aktivität sind jedoch vorallem die Stoffgruppen der Flavonoide, Phenolsäuren und Lignane Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten [79].

1.3.2.1 Flavonoide

Flavonoide repräsentieren die umfangreichste Klasse von polyphenolischen Verbindungen in der menschlichen Ernährung. Sie sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet, wobei Kaempferol und Quercetin sowie deren Glykoside am häufigsten vertreten sind [69, 80]. Flavonoide schützen die Pflanze vor schädlichen äußeren Einflüssen, daher sind die höchsten Konzentrationen in den äußeren Blättern sowie den Schalen der Pflanzen zu finden. Sie leiten sich chemisch vom Grundgerüst des Flavans ab und bestehen aus zwei aromatischen Ringen, die durch einen Tetrahydropyran-Ring verbunden sind (Abb. 1.9) [80].

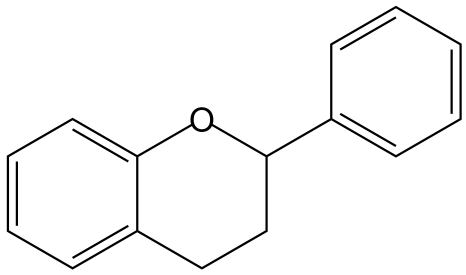


Abbildung 1.9: Grundstruktur der Flavonoide: das Flavan (2-Phenylchroman)

Flavonoide können in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden: Chalkone, Dihydrochalcone, Aurone, Flavone, Flavonole, Dihydroflavonole, Flavanone, Flavanole, Anthocyanidine, Leukoanthocyanidine, Proanthocyanidine, Biflavonoide und Isoflavonoide [81]. Die Klassifikation basiert dabei auf dem Grad der Oxidation des C-Rings, der Hydroxylierungsmuster der Ringstruktur und der Substitution der C3-Position [80]. Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Flavonoiden sind Zwiebeln, Hülsenfrüchte, Brokkoli, Beerenfrüchte und Orangensaft [82].
Bei der Suche nach effektiven neuen Arzneistoffen zur Behandlung von Übergewicht und assoziierten Erkrankungen wurde bereits eine Vielzahl von Pflanzen in Hinsicht auf eine PL inhibitorische Aktivität untersucht. In der nachfolgenden Tabelle 1.8 sind aus Pflanzenextrakten identifizierte und teilweise isolierte Flavonoide, die eine Inhibition der PL zeigten, aufgeführt. Es handelt sich hierbei um eine reduzierte Auswahl. Die vollständige Tabelle kann der Übersichtsarbeit von Buchholz und Melzig (2015) entnommen werden [79].

Tabelle 1.8: Vergleich von Flavonoiden pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) [79]

Pflanze	**Aktive Verbindung**	**Pflanzenfamilie**	**IC_{50}(aktive Verbindung)**	**Ref.**
Alpinia galangal (L.) WILLD.	Galangin	Zingiberaceae	178,4 mM	[83]
Camellia sinensis (L.) KUNTZE	(-)-Catechin 3-O-gallat	Theaceae	0,543 µM	[84]
	(-)-Epigallocatechin	Theaceae	128 µM	[85]
	(-)-Epigallocatechin 3,5-di-O-gallat	Theaceae	0,098 µM	[84]
	(-)-Gallocatechin 3,5-di-O-gallat	Theaceae	0,213 µM	[84]

Camellia sinensis (L.) KUNTZE	(-)-Gallocatechin 3-O-gallat	Theaceae	0,437 µM	[84]
	Theaflavin	Theaceae	0,106 µM	[84]
	Theaflavin 3'-O-gallat	Theaceae	0,112 µM	[84]
Chamaecrista nomame (SIEBER) OHASHI	Luteolin	Leguminosae	7,1 µM	[86]
Citrus reticulata BLANCO	Hesperidin	Rutaceae	52,4 µM	[87]
	Neohesperidin	Rutaceae	75,3 µM	[87]
Eremochloa ophiuroides (MUNRO) HACK.	Isoorientin	Poaceae	44,6 µM	[88]
	Isoorientin 2-O-α-L-rhamnosid	Poaceae	18,5 µM	[88]
Intsia palembanica MIQ.	Fustin	Leguminosae	13.7 µM	[89]
	(-)-Robidanol	Leguminosae	100,2 µM	[89]
Nelumbo nucifera GAERTN.	Kaempferol-3-O-β-D-glucuronid	Nelumbonaceae	94,0 µM	[90]
	Quercetin-3-O-β-D-glucuronid	Nelumbonaceae	135,01 µM	[90]
Vitis rotundifolia MICHX.	(+) Catechin	Vitaceae	3,42 mM	[91]

1.3.2.2 Phenolsäuren

Phenolsäuren sind, neben den Flavonoiden, eine der am häufigsten untersuchten Klassen von Sekundärmetaboliten in Hinblick auf eine PL inhibitorische Aktivität. Die Grundstruktur der Phenolsäuren wird durch eine Hydroxybenzoesäure oder Hydroxyzimtsäure gebildet. Sie treten als freie Säuren, Ester, Glykoside oder gebundene Komplexe auf. Sie sind im Pflanzenreich weit verbreitet und haben eine antioxidative, anti-kanzerogene und antimikrobielle Wirkung [92]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass einige Verbindungen eine hemmende Wirkung auf die PL Aktivität besitzen.

Hydroxyzimtsäuren Hydroxyzimtsäuren sind die Hydroxyderivate der Zimtsäure und bestehen aus einem C6-C3-Gerüst (Abb. 1.10). Sie kommen ubiquitär in Früchten sowie anderen Pflanzenteilen vor. Wichtige Vertreter sind die *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Sinapinsäure [93–95]. Nahrungsmittel mit einem hohen Gehalt an Hydroxyzimtsäuren sind bestimmte Gemüsesorten (Spinat, Salate, Kartoffeln), Obst (Äpfel, Blaubeeren), Kaffee und Getreide [96].

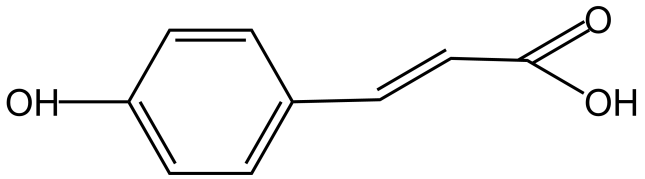


Abbildung 1.10: Grundstruktur der *p*-Hydroxyzimtsäuren

In Tabelle 1.9 sind aus verschiedenen Pflanzenextrakten isolierte bzw. charakterisierte Hydroxyzimtsäuren mit einer PL inhibitorischen Aktivität dargestellt. Insbesondere die Extrakte von

Ligularia fischeri (LEDEB.) TURCZ. (Compositae), *Litchi chinensis* SONN. (Sapindaceae) und *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) waren inhibitorisch sehr aktiv. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der Ergebnisse, dass Verbindungen mit einer Methoxygruppe schwächere Inhibitoren sind. Auch die Position der Hydroxylgruppen spielt anscheinend eine entscheidene Rolle. So zeigten Hydroxylgruppen in *ortho*-Stellung eine stärkere Inhibition als solche in *para*-Stellung.

Tabelle 1.9: Vergleich von Hydroxyzimtsäuren pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) [79]

Pflanze	**Aktive Verbindung**	**Pflanzenfamilie**	**IC_{50}(aktive Verbindung)**	**Ref.**
Echium vulgare L.	Chlorogensäure	Boraginaceae	k.A.	[97]
Filipendula camtschatica	2-O-Caffeoyl-4-O-galloyl-L-threonsäure	Rosaceae	26,00 µM	[98]
(PALL.) MAXIM.	3-O-Caffeoyl-4-O-galloyl-L-threonsäure	Rosaceae	246,00 µM	[98]
Ligularia fischeri	3,4-di-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	33,2 µM	[99]
(LEDEB.) TURCZ.	3,5-di-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	40,4 µM	[99]
	4,5-di-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	12,7 µM	[99]
	4-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	253,3 µM	[99]
	5-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	286,5 µM	[99]
	5-O-Caffeoylchinasäure	Compositae	304,8 µM	[99]
Litchi chinensis SONN.	Kaffeesäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	Ferulasäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	p-Coumarinsäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	Sinapinsäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
Rosmarinus officinalis L.	Kaffeesäure	Lamiaceae	180,9 µM	[101]
	Caftarsäure	Lamiaceae	272,4 µM	[101]
	Rosmarinsäure	Lamiaceae	347,5 µM	[101]

Neben den aus Pflanzen isolierten Hydroxybenzoesäuren, konnten durch Karamać *et al.* (1996) ebenfalls eine PL inhibitorische Wirkung für die Reinsubstanzen *p*-Coumarinsäure (IC_{20}: 10 µM) und Zimtsäure (IC_{20}: 10 µM) nachgewiesen werden [102].

Hydroxybenzoesäuren Hydroxybenzoesäuren sind phenolische C6-C1-Verbindungen. Sie bestehen aus einem Benzolring mit einer zusätzlichen Carboxy- und Hydroxygruppe als Substituenten (Abb. 1.11).

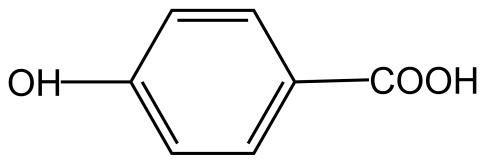


Abbildung 1.11: Grundstruktur der *p*-Hydroxybenzoesäuren

Sie kommen hauptsächlich in Form von Estern oder Glykosiden vor. Häufige Vertreter sind Vanillinsäure, Salicylsäure und Gentisinsäure [103]. Hydroxybenzosäuren kommen vermehrt in roten Früchten, Karotten, Zwiebeln und Grapefruits vor [104, 105]. In der nachfolgenden Tabelle 1.10 sind aus Pflanzenextrakten analysierte Hydroxybenzoesäuren aufgeführt, die eine Inhibition der PL zeigten. Vor allem waren Hydroxybenzosäuren aus den Extrakten von *Eryngium bornmuelleri* NÁBĚLEK (Apiaceae) und *Litchi chinensis* SONN. (Sapindaceae) aktiv.

Tabelle 1.10: Vergleich von Hydroxybenzoesäuren pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) [79]

Pflanze	**Aktive Verbindung**	**Pflanzenfamilie**	**IC_{50}(aktive Verbindung)**	**Ref.**
Anemarrhena asphodeloides BUNGE	Vanillinsäure	Asparagaceae	k.A.	[106]
Eryngium bornmuelleri NÁBĚLEK	Hydroxybenzoesäure-O-hexosid	Apiaceae	k.A.	[107]
Litchi chinensis SONN.	Gentisinsäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	p-Anissäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	Syringasäure	Sapindaceae	k.A.	[100]
	Vanillinsäure	Sapindaceae	k.A.	[100]

Karamać *et al.* (1996) konnten weiterhin eine PL inhibitorische Wirkung für die Reinsubstanzen Benzoesäure (IC_{22}: 10 µM), *p*-Hydroxybenzoesäure (IC_{21}: 10 µM), Protocatechusäure (IC_{12}: 10 µM) und Saliylsäure (IC_{25}: 10 µM) nachweisen [102]. Ein direkter Vergleich zeigt, dass Derivate von Hydroxybenzoesäuren die PL scheinbar weniger stark hemmen als Hydroxyzimtsäurederivate.

1.3.2.3 Lignane

Lignane zeichnen sich chemisch durch dimere Phenylpropanoid-Einheiten aus, die durch die zentralen Kohlenstoffatome ihrer Seitenketten verbunden sind (Abb. 1.12). Sie liegen in der Regel frei oder glykosidisch gebunden vor und dienen der Pflanze hauptsächlich als Abwehrstoffe. Nach der oralen Einnahme von Lignan-Vorläufern werden sie im Organismus in ihre aktive Form metabolisiert. Lignan-Vorläufer werden in einer Vielzahl von pflanzlichen Lebensmitteln wie Leinsamen, Sesam, Hülsenfrüchte, Vollkornprodukte (Roggen, Hafer, Gerste), Früchte (Beeren) und verschiedenen Gemüsen gefunden [105, 108, 109].

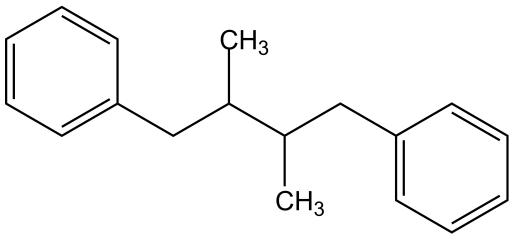


Abbildung 1.12: Grundstruktur von Dibenzylbutan (Lignan)

In Tabelle 1.11 sind identifizierte Lignan-Verbindungen (4 Sesquilignane, 1 Lignan) mit einer PL inhibitorischen Aktivität aufgeführt. Alle Verbindungen wurden aus *Fraxinus rhynchophylla*

HANCE (Oleaceae) isoliert und analysiert. Die stärkste Inhibition (76 %) zeigte dabei die Verbindung Ficusesquilignan bei einer Konzentration von 171 µM.

Tabelle 1.11: Vergleich von Lignanen pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) [79]

Pflanze	**Aktive Verbindung**	**Pflanzenfamilie**	**IC (aktive Verbindung)**	**Ref.**
Fraxinus rhynchophylla HANCE	Dihydrodehydrodiconiferyl Alkohol	Oleaceae	IC_{78}: 278 µM	[110]
	Ficusesquilignan	Oleaceae	IC_{76}: 171 µM	[110]
	Hedyotol C	Oleaceae	IC_{72}: 171 µM	[110]
	Acernikol	Oleaceae	IC_{62}: 171 µM	[110]
	Dihydrobuddlenol B	Oleaceae	IC_{62}: 171 µM	[110]

Die Ergebnisse legen nahe, dass polyphenolische Verbindungen eine potentielle Quelle für pflanzliche Inhibitoren darstellen. Vor allem aus *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE (Theaceae) konnten zahlreiche Catechin- und Epicatechinderivate als PL Inhibitoren identifiziert und isoliert werden. Ein struktureller Vergleich zeigt, dass die Anzahl und die Position phenolischer Hydroxylgruppen einen hohen Einfluss auf das inhibitorische Potential haben. Weiterhin zeigten nicht-veresterte Flavan-3-ole wie (+)-Catechin und (-)-Epicatechin eine geringere Inhibierung als Flavan-3-ol-Ester. Der Einfluss des Polymerisationsgrades ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung.

Diese Ergebnisse dienten als eine erste Grundlage für die Suche nach natürlichen Strukturen mit inhibitorischer Aktivität. Durch zahlreiche Screening-Verfahren sowie die Verwendung von computerbasierten Modellierungsversuchen wird versucht, neue potentielle therapeutische Arzneistoffe für die Behandlung von Adipositas sowie assoziierten Erkrankungen zu identifizieren.

1.3.3 Polyphenole als Inhibitoren der intestinalen Nährstoffresorption

Über die Rolle von Polyphenolen als potentielle Inhibitoren der Transporter-vermittelten, intestinalen Glucose- und Fettsäure-Resorption ist bisher wenig bekannt. Dennoch konnte bereits in einigen Studien eine hemmende Wirkung, vor allem von Verbindungen aus der Stoffgruppe der Flavonoide, nachgewiesen werden.

1.3.3.1 Inhibition der intestinalen Glucose-Aufnahme

Eine Inhibition des intestinalen Transporters SGLT1 durch polyphenolische Verbindungen aus grünem Tee wurde erstmals durch Kobayashi *et al.* (2000) beschrieben [111]. Insbesondere Polyphenole, die Gallat-Gruppen im Molekül tragen (Epicatechingallat, Epigallocatechingallat), zeigten eine verstärkte Inhibition des Proteins. Der Nachweis einer Struktur-abhängigen Inhibition von SGLT1 durch glykolisierte und nicht-glykolisierte Flavonoide konnte 2007 durch Kottra und Daniel gezeigt werden [112]. Basierend auf vorangegangenen Studienergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Flavonoide auf zwei verschiedene Arten an den intestinalen Transporter SGLT1 binden können: bei glykolisierten Flavonoiden erfolgt die Bindung durch die

Zuckereinheit des Moleküls, bei nicht-glykolisierten Flavonoiden sind andere Teile des Moleküls, vor allem der aromatische Rest, beteiligt.
Eine Inhibition von GLUT2 wurde erstmals von Song *et al.* (2002) beschrieben. Mit ihrer Arbeit konnten sie eine reversible, nicht-kompetetive Hemmung von GLUT2 durch das Flavonoid Quercetin nachweisen [113]. Die intestinalen Transporter SGLT1 und GLUT5 konnten hingegen nicht in ihrer Aktivität gehemmt werden. Die Inhibition von GLUT2 durch Quercetin wurde von Kwon *et al.* (2007) bestätigt. Zusätzlich konnte eine nicht-kompetetive Inhibition durch die Flavonole Myricetin und Fisetin sowie das Flavonoid Isoquercitrin nachgewiesen werden [114].

1.3.3.2 Inhibition der intestinalen Fettsäure-Aufnahme

Eine direkte Inhibition wichtiger, intestinaler Fettsäuretransporter (CD36, FATP) durch polyphenolische Verbindungen konnte bisher nicht beschrieben werden. Sugiyama *et al.* (2007) berichteten zwar von einer Inhibition der intestinalen TAG Resorption durch oligomere Procyanidine aus Äpfeln [115], führten diese verminderte Resorption jedoch auf eine Inhibition der pankreatischen Lipase und einer damit reduzierten Spaltung der TAGs zurück. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Klaus *et al.* (2005) beschrieben. Es konnte eine verminderte Energieabsorption bei Gabe des Flavonoids Epigallocatechingallat im *in vivo* Mausmodell gezeigt werden, die jedoch ebenfalls durch eine Inhibition der Nährstoffhydrolyse bedingt war [116].

1.4 Zielstellung

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas hat in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen, sodass die Gesellschaft vor einer immer größer werdenden Herausforderung bezüglich Prävention und Behandlung steht. Ein vielversprechender Therapieansatz stellt dabei die Entwicklung von Inhibitoren der Hydrolyse und der Resorption von Nährstoffen dar. Die damit einhergehende Reduktion der Energiezufuhr kann zu einer erheblichen Verbesserung des Gesundheitszustandes beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die Aktivität verschiedener Verdauungsenzyme sowie wichtiger Nährstofftransporter. Die Studien umfassten dabei die folgenden Hauptziele:

- Entwicklung und Etablierung fluoreszenzbasierter Screening-Assays zur Bestimmung der Aktivität essentieller Verdauungsenzyme (Pankreaslipase, pankreatische α-Amylase, intestinale α-Glucosidase, intestinale Alkalische Phosphatase und Pankreasproteasen)
- Untersuchungen zum Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Pflanzenextrakten auf die Aktivität der zuvor genannten Verdauungsenzyme und Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen
- Entwicklung und Etablierung eines fluoreszenzbasierten Glucose-Aufnahme Assays im CaCo-2 Zellsystem
- Untersuchungen zum Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Pflanzenextrakten auf die intestinale Glucoseaufnahme

Darüber hinaus sollte eine Modellierung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bekannter Pankreaslipase Inhibitoren durch *in silico* Studien sowie ein pharmakophorbasiertes virtuelles Screening zur Identifikation unbekannter Inhibitoren durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1.1 Allgemein

Chemikalie	**Hersteller**
Acarbose, $\geq$ 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Acetonitril, HPLC Grade	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Hoffmann-La Roche, 4012 Basel, Switzerland
Albumin Fraktion V, from bovine serum, $\geq$ 98 %	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Ammoniaklösung Supra, Qualität Rotipuran S, 20%	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Calciumchlorid (Dihydrat)	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Fructose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
D-Glucose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Kaliumchlorid	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Lösliche Stärke nach Zulkowsky	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Maltoheptaose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
Maltopentaose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
D-Maltose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
Maltotriose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
Methanol, HPLC Grade	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
2-Methoxyethanol	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid (4-MUGP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
4-Methylumbelliferylphosphat (4-MUP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Miglitol	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Germany

Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Natriumhydroxid Plättchen	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Orlistat, $\geq$ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Pankreatin Pulver, Ph. Eur. 6.3	Caesar & Loretz GmbH, 40702 Hilden, Germany
Saccharose	Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany
Salzsäure 37 %	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Triton-X 100	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany

2.1.1.2 Zellkultur

Chemikalie	**Hersteller**
L-Alanyl-L-Glutamin-Lösung (200 mM),	Biochrom GmbH, 12247 Berlin, Germany
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
DMEM-Flüssigmedium ohne D-Glucose, ohne L-Glutamin (3,7 g/L $NaHCO_3$)	Biochrom GmbH, 12247 Berlin, Germany
DMEM-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (3,7 g/L $NaHCO_3$, 4,5 g/L D-Glucose)	Biochrom GmbH, 12247 Berlin, Germany
FBS Superior	Biochrom GmbH, 12247 Berlin, Germany
Natriumbutyrat	Cayman Chemical Company, 48108 Ann Arbor, USA
PBS-Lösung ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}	Biochrom GmbH, 12247 Berlin, Germany
Phloridzin-Dihydrat, from apple wood, $\geq$ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
TrypLE™ Express	Life Technologies GmbH, 64293 Darmstadt, Germany

2.1.1.3 Kits

Kit	**Hersteller**
EnzChek® Protease Assay Kit, green fluorescence (E6638)	Thermo Fisher Scientific, 02451 Waltham, USA
EnzChek® Ultra Amylase Assay Kit (E33651)	Thermo Fisher Scientific, 02451 Waltham, USA
Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit (600470)	Cayman Chemical Company, 48108 Ann Arbor, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225)	Thermo Fisher Scientific, 02451 Waltham, USA

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 Allgemein

Gerät	**Hersteller**
Analysenwaage Sartorius analytic AC210P	Sartorius, 37075 Göttingen, Germany
Analysenwaage Sartorius CP2245-OCE	Sartorius, 37075 Göttingen, Germany
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, 37520 Osterode am Harz, Germany
Heizbad	Daglef Patz, 24601 Wankendorf, Germany
Heizpilz	Thermocoax Isopad GmbH, 69126 Heidelberg, Germany
Kolbenhubpipetten Eppdendorf Research plus	Eppendorf AG, 20249 Hamburg, Germany
Magnetrührer IKA Combimag RCH	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, 79219 Staufen, Germany
Mehrkanalpipette Transferpette-8	Brand GmbH + Co KG, 97877 Wertheim, Germany
Membran-Vakuumpumpe CVC2	Vacuubrand GmbH & Co. KG, 97877 Wertheim, Germany
Mikroplattenreader Tecan Infinite F200	Tecan Group, 8708 Männedorf, Switzerland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, 14163 Berlin, Germany
Reinstwasseranlage Labostar UV 2	Siemens AG Wasseraufbereitung, 22885 Barsbüttel, Germany
Repetierpipette Multipette plus	Eppendorf AG, 20249 Hamburg, Germany
Rotationsverdampfer RV 10 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, 79219 Staufen, Germany
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, 11716 Bohemia, New York, USA
Ultraschallbad Sonorex RK 100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, 12207 Berlin, Germany
Universalmühle M20	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, 79219 Staufen, Germany
Zentrifuge mit Kühlung Allegra X-30R	Beckman Coulter, 47807 Krefeld, Germany
Zentrifuge Z 233 M-2	Hermle Labortechnik GmbH, 78564 Wehingen, Germany

2.1.2.2 Zellkultur

Gerät	**Hersteller**
Inkubator Biosafe plus	INTEGRA Biosciences AG, 7205 Zizers, Switzerland
Kamera Canon EOS 650D	Canon, Tokio, Japan
Pipettierhilfe RF 3000	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Präzisionsheizplatte PZ 28-1	Harry Gestigkeit GmbH, 40489 Düsseldorf, Germany
Sicherheitswerkbank Tecnoflow	INTEGRA Biosciences AG, 7205 Zizers, Switzerland
Tischmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, 35580 Wetzlar, Germany
Kompaktes Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, 85764 Oberschleißheim, Germany

Zählkammer nach Neubauer	Brand GmbH + Co KG, 97877 Wertheim, Germany

2.1.2.3 HPLC

HPLC-Shimadzu System (Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke):

Gerät	**Hersteller**
Auto Sampler prominence SIL-20AC	Shimadzu Corporation, Japan
Column oven prominence CTO-20AC	
Degasser prominence DGU-20A5	
Detector ELSD-LT II	
Liquid Chromatograph prominence LC-20AD	
Säule: Waters; XBridgeAmide 3,5 µm; 3,0 x 250 mm	Waters Corporation, USA
Vorsäule: Waters; XBridgeAmide 3,5 µm; 4,6 x 20 mm	Waters Corporation, USA

Präparatives HPLC-Shimadzu System (Charakterisierung des Extrakts von Hibiscus sabdariffa L.):

Gerät	**Hersteller**
Controller CBM-20A	Shimadzu Corporation, Japan
Solvent delivery pump LC-8A	
Reservoir selection valve FCV-130AL	
Detektor SPD-20AV	
Säule: Phenomenex; Kinetex 5 µm XB-C18 100 Å; 4,6 x 250 mm	Phenomenex Inc., USA

HPLC-Knauer System (Charakterisierung des Extrakts von Hibiscus sabdariffa L.):

Gerät	**Hersteller**
LPG Pump P-1/M-1 PLATINblue HPLC Plus	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Germany
Diode Array Detector PLATINblue PDA-1	
Auto Sampler PLATINblue AS-1	
Column oven PLATINblue T-1	
Säule: Phenomenex; Kinetex 5 µm XB-C18 100 Å; 4,6 x 250 mm	Phenomenex Inc., USA

2.1.2.4 ESI-Q-TOF-MS

ESI-Q-TOF-MS System (Charakterisierung des Extrakts von Hibiscus sabdariffa L.):

Gerät	**Hersteller**
Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS	Agilent Technologies, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

2.1.3.1 Allgemein

Material	**Hersteller**
Microplatten 96-Well (schwarz, F96 MicroWell)	Nunc A/S Plastfabrikation, 4000 Roskilde, Denmark
Microplatten 96-Well (transparent, F-Boden)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Petrischalen (ohne Nocken, ø 90 mm)	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Reaktionsgefäße (PP; 1,5 mL; 2,0 mL)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Repetierspitzen Combitips plus (1 mL; 5 mL; 10 mL)	Eppendorf AG, 20249 Hamburg, Germany
Universal tips blue 100-1000 µL	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Universal tips yellow 2-200 µL	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Zentrifugenröhrchen (steril, PP, 15 mL; 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany

2.1.3.2 Zellkultur

Material	**Hersteller**
Cellstar Microplatten 6-Well (transparent, F-Boden, steril)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
Cellstar Microplatten 12-Well (transparent, F-Boden, steril)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
Cellstar Microplatten 96-Well (transparent, F-Boden, steril)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
Cellstar Serological Pipette (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
Kryoröhrchen (2 mL, steril)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
Microplatten 96-Well (schwarz, transparenter F-Boden, steril)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Spritzenvorsatzfilter (steril, 0, 22 µm, ø 13 mm, Nylonmembran)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Zellkulturflaschen (Gasaustauschfilter, 25 cm^2; 75 cm^2)	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany

2.1.4 CaCo-2-Zelllinie

Die Zelllinie CaCo-2 (ACC-169) stellt eine permanente, humane Zelllinie dar, die 1974 aus dem primären Kolontumor (Adenokarzinom) eines 72-jährigen kaukasischen Mannes in Kultur gebracht wurde. Aufgrund ihrer spontanen Differenzierung zu Enterocyten-ähnlichen Zellen, wird die Zellinie sehr häufig für *in vitro* Studien des Intestinaltraktes verwendet. Die mit der Bürstensaum assoziierten Hydrolasen (Alkalische Phosphatase, Sucrose-Isomaltase, u.a.) zeigen dabei Aktivitäten, die denen von Dünndarmzellen gleichkommen [117]. Die Differenzierung der CaCo-2-Zellen ist ein wachstumsbezogener Prozess. Während der exponentiellen Wachstumsphase sind die Zellen undifferenziert und beginnen erst mit Erreichen der Konfluenz mit der Differenzierung [117]. Eine gesteigerte Enzymaktivität wird dabei häufig als Faktor für den Fortschritt der Differenzierung herangezogen [118].

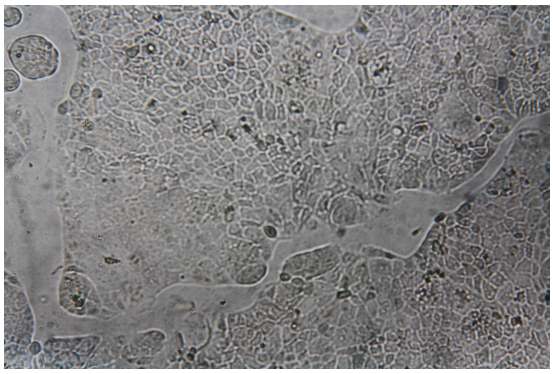


Abbildung 2.1: Lichtmikroskopische Aufnahme undifferenzierter CaCo-2-Zellen bei 100-facher Vergrößerung

Die in dieser Arbeit verwendeten CaCo-2 Zellen (Abb. 2.1) wurden vom Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen und gemäß den Empfehlungen kultiviert [119].

2.1.5 Untersuchte Reinstoffe

Die Strukturformeln der untersuchten Reinstoffe sind im Anhang (Tab. A.1) aufgeführt.

Reinstoff	**Molmasse [g/mol]**	**Hersteller**
Apigenin, 98 %	270,24	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Apigenin-7-glucosid	432.38	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Chinasäure, > 99 %	192,17	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Chlorogensäure, 97 %	354,32	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Chrysin	254,20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany
Ferulasäure, > 98 %	194,19	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Fisetin, rein	286,24	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Gallussäure, 99,5 %	Hydrat: 188,13	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
2-Hydroxyzimtsäure, 97 %	164,16	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany

4-Hydroxyzimtsäure, > 98 %	164,16	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany
Isoferulasäure	194,19	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Isorhamnetin	316,27	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Kaempferol, > 96 %	286,24	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Kaffeesäure, > 97 %	180,16	Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland
Myricetin, rein	318,20	Serva Feinbiochemika GmbH, 69115 Heidelberg, Germany
Naringenin	272,26	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Quercetin, > 95 %	302.24	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany
Quercitrin	Dihydrat: 484,42	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Rhaponticin	420,39	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany
Rosmarinsäure	360,34	k.A.
Rutin	610,52	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Sinapinsäure, > 97 %	224,22	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany
Verbascosid	624.60	Phytolab GmbH, 91487 Vestenbergsgreuth, Germany
ZINC04252577	284,31	Mcule, Inc. 94301 Palo Alto, USA
ZINC09050354	453,45	
ZINC04046682	287,25	
ZINC05730067	267,74	
ZINC03669836	282,37	
ZINC00108368	340,38	
ZINC00141040	274,27	
ZINC03843271	286,32	MolMall Sarl, 1027 Lonay, Switzerland

2.1.6 Untersuchtes Pflanzenmaterial

2.1.6.1 Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM)

Das untersuchte Pflanzenmaterial der TCM wurde von YI-KANG Pharmacy (Yangling, China) im März 2014 erworben. Die wässrigen und methanolischen Extrakte wurden an der Northwest A&F University (Yangling, China) hergestellt und im Anschluss an der Freien Universität Berlin (Berlin, Germany) hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials analysiert. Es wurden nur Pflanzen analysiert, die in der TCM bei Erkrankungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels Anwendung finden.

Lateinischer Name	**Deutscher Name**	**Pflanzenfamilie**	**Herkunfts-provinz**	**Untersuchter Pflanzenteil**	**Beschriebener Effekt**	**Ref.**
Aconitum carmichaelii Eebx.	Chinesischer Eisenhut	Ranunculaceae	Sichuan	Wurzel	Blutglucose ↓	[120]
Agastache rugosus (Fisch.et Mey.) O. Ktze	Koreanische Minze	Lamiaceae	Hunan	Oberirdischer Pflanzenteil	Cholesterol ↓, TAGs ↓	[121]
Alisma orientale (Sam.) Juzep.	-	Alismataceae	Sichuan	Tuber	Antidiabetischer Effekt	[122]
Anamarrhena asphodeloides Bge.	-	Asparagaceae	Hebei	Rhizom	Antidiabetischer Effekt	[122]
Angelica sinensis (Oliv.) Diels	Engelwurz	Apiaceae	Gansu	Wurzel	Nüchternblutzucker ↓, Cholesterol ↓, TAGs ↓	[123]
Artactylodes macrocephala Koidz.	Großköpfiges Speichelkraut	Compositae	Zhejiang	Rhizom	Antidiabetischer Effekt	[122]
Asparagus cochinchinensis (Lour.) Merr.	-	Asparagaceae	Sichuan	Earthnut	Antidiabetischer Effekt	[122]
Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.	Tragant	Fabaceae	Neimenggu	Wurzel	Antidiabetischer Effekt, Nüchternblutzucker ↓	[122] [124]
Aucklandia lappa Decne.	-	Compositae	Guangxi	Wurzel	Adipogenese ↓	[125]
Carthamus tinctorius L.	Färberdistel	Asteraceae	Xinjiang	Corolla	Nüchternblutzucker ↓, Cholesterol ↓, LDL ↓, VLDL ↓	[126]
Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf.	Glockenblume	Campanulaceae	Gansu	Wurzel	Blutglucose ↓	[127]
Coptis chinensis Franch.	Chinesischer Goldfaden	Ranunculaceae	Sichuan	Rhizom	Antidiabetischer Effekt	[122]
Crataegus pinnatifida Bge. var. *major* N.E.Br.	Fiederblatt-Weißdorn	Rosaceae	Shandong	Frucht	Antidiabetischer Effekt	[128]
Curcuma wenyujin Chen et Ling	-	Zingiberaceae	Shaanxi	Earthnut	Antidiabetischer Effekt	[129]
Cyathula officinalis Kuan	-	Amaranthaceae	Sichuan	Wurzel	Antidiabetischer Effekt	[129]
Dioscorea opposite Thunb.	Chinesischer Yams	Dioscoreaceae	Henan	Rhizom	Antidiabetischer Effekt	[122]
Gardenia jasminoides Ellis	Gardenie	Rubiaceae	Sichuan	Frucht	Cholesterol ↓, TAGs ↓, Inhibition PL	[130]
Glycyrrhiza uralensis Fisch.	Chinesisches Süßholz	Fabaceae	Gansu	Rhizom	Nüchternblutzucker ↓,	[124]
Leomurus japonicas Houtt.	Chinesisches Herzgespann	Lamiaceae	Henan	Kraut	Antidiabetischer Effekt	[129]
Ligusticum chuanxiong Hort.	-	Apiaceae	Sichuan	Rhizom	Antidiabetischer Effekt	[127]
Lycium barbarum L.	Gemeiner Bocksdorn	Solanaceae	Ningxia	Frucht	Nüchternblutzucker ↓, TAGs ↓, HDL ↑	[124]
Lycopus lucidus Turcz. var. Hirtus Regel	-	Lamiaceae	Sichuan	Stängel, Blätter	Blutglucose ↓, Cholesterol ↓, TAGs ↓,	[131]

Lateinischer Name	**Deutscher Name**	**Pflanzenfamilie**	**Herkunfts-provinz**	**Untersuchter Pflanzenteil**	**Beschriebener Effekt**	**Ref.**
Ophiopogon japonicas (L.f) Ker-gawl.	Japanischer Schlangenbart	Asparagaceae	Shaanxi	Earthnut	Antidiabetischer Effekt	[122]
Paeonia lactiflora Pall.	Chinesische Pfingstrose	Paeoniaceae	Gansu	Wurzel	Antidiabetischer Effekt	[127]
Phellodendron chinense Schneid.	Korkbaum	Rutaceae	Hebei	Rinde	Antidiabetischer Effekt	[129]
Polygonatum kingianum Coll. et Hemsl.	Weißwurz	Asparagaceae	Sichuan	Rhizom	Antihyperglykämischer Effekt	[132]
Poria cocos (Schw.) Wolf	-	-	Guangxi	Sklerotium	Antidiabetischer Effekt	[122]
Pueraria lobata (Willd.) Ohwi	Kudzu	Fabaceae	Shaanxi	Wurzel	Antidiabetischer Effekt	[122]
Rehmannia glutinosa Libosch	Braunwurz	Plantaginaceae	Henan	Earthnut	Antidiabetischer Effekt	[122]
Scrophularia ningpoensis Hemsl.	Chinesische Braunwurz	Scrophulariaceae	Sichuan	Wurzel	Antidiabetischer Effekt	[122]
Scutellaria baicalensis Georgi	Baikal-Helmkraut	Lamiaceae	Gansu	Wurzel	Antidiabetischer Effekt	[127]
Trichosanthes kirilowii Maxim.	Chinagurke	Curcurbitaceae	Hebei	Wurzel	Antihyperglykämischer Effekt	[132]

TAG: Triacylglycerid, LDL: Low Density Lipoprotein, VLDL: Very Low Density Lipoprotein

2.1.6.2 Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin (TEM)

Die analysierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile wurden von Kräuter Schulte Aktiv Kräuter Drogerie e.K. (Gernsbach, Germany) bezogen. Es wurden Pflanzen untersucht, denen in der Literatur eine positive Wirkung bei der Behandlung von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechselstörungen zugeschrieben wurde.

Lateinischer Name	**Deutscher Name**	**Pflanzenfamilie**	**Untersuchter Pflanzenteil**	**Beschriebener Effekt**	**Ref.**
Allium sativum L.	Knoblauch	Amaryllidaceae	Zwiebel	Serumglucose ↓, TAGs ↓	[133]
Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot	Schwarze Apfelbeere	Rosaceae	Frucht	Erhöhte Insulinsensitivität	[134]
Artemisia dracunculus L.	Estragon	Compositae	Blätter	Blutglucose ↓	[135]
Ceratonia siliqua L.	Johannisbrotbaum	Leguminosae	Samen	Lipidsenkende Wirkung	[136]
Cinnamomum cassia (L.) Presl	Chinesischer Zimtbaum	Lauraceae	Rinde	Insulinähnlicher Effekt	[137]
Crataegus laevigata (Poir.) DC.	Zweigriffeliger Weißdorn	Rosaceae	a) Scheinfrucht b) Blätter und Blüten	TAGs ↓, LDL ↓, VLDL ↓	[135]
Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.	Guarbohne	Leguminosae	Guarkernmehl	Kohlenhydratresorption ↓	[138]
Cynara cardunculus L.	Artischocke	Compositae	Kraut	Inhibition der α-Amylase	[17]
Echium vulgare L.	Gewöhnlicher Natternkopf	Boraginaceae	Kraut	Inhibition der PL	[79, 97]
Hibiscus sabdariffa L.	Roselle	Malvaceae	Blüten	Inhibition der α-Amylase	[139]
Melissa officinalis L.	Zitronenmelisse	Lamiaceae	Blätter	Inhibition der α-Amylase	[140]
Mentha aquatica L.	Wasserminze	Lamiaceae	Blätter	Inhibition der PL	[79, 97]
Nigella sativa L.	Schwarzkümmel	Ranunculaceae	Frucht	Gewichtsreduktion, TAGs ↓, LDL ↓	[141]
Olea europaea L.	Olivenbaum	Oleaceae	Blätter	Blutglucose ↓, Insulinlevel im Blut ↓	[142]
Opuntia ficus-indica (L.) Mill.	Feigenkaktus	Cactaceae	Blüten	Glucoseresorption ↓	[143]
Panax ginseng Mey	Koreanischer Ginseng	Araliaceae	Wurzel	Insulinsensitivität ↑, erhöhte Glucoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen	[144]
Peumus boldus Molina	Boldo	Monimiaceae	Blätter	Blutglucose ↓	[137]
Phaseolus vulgaris L.	Gartenbohne	Leguminosae	Hülsen	Inhibition der α-Amylase	[145, 146]
Potentilla aurea L.	Gold-Fingerkraut	Rosaceae	Kraut	Insulinähnlicher Effekt	[138, 145]
Punica granatum L.	Granatapfelbaum	Lythraceae	a) Samen b) Hülsen	Blutglucose ↓, TAGs ↓, Cholesterol ↓	[147]
Rosmarinus officinalis L.	Rosmarin	Lamiaceae	Blätter	Inhibition der PL	[79, 101]
Sarcopoterium spinosum (L.) Spach	Dorniger Becherstrauch	Rosaceae	Wurzel	Insulinproduktion ↑	[145]

Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	Gewürznelken-Baum	Myrtaceae	Blütenknospen	Erhöhung der Insulinaktivität	[142]
Tamarindus indica L.	Tamarindenbaum	Leguminosae	Hülsen	Inhibition der α-Amylase	[140]
Trigonella foenum-graecum L.	Bockshornklee	Leguminosae	Samen	Blutglucose ↓, Cholesterol ↓, Insulinlevel ↑	[136, 148]
Vaccinium myrtillus L.	Heidelbeere	Ericaceae	Frucht	Blutglucose ↓	[135, 138]
Vitis vinifera L.	Weinrebe	Vitaceae	Samen	TAGs ↓, LDL ↓	[135]
Zingiber officinale Roscoe	Ingwer	Zingiberaceae	Rhizom	Erhöhte, insulinabh. Glucoseaufnahme in Adipocyten	[142]

TAG: Triacylglycerid, LDL: Low Density Lipoprotein, VLDL: Very Low Density Lipoprotein

2.1.6.3 Pflanzenmaterial aus dem virtuellen Screening (VS)

Die im Rahmen des VS untersuchten Pflanzen stammen zum Großteil aus dem Botanischen Garten der Freien Universität Berlin (Berlin, Germany). Die Akzessionsnummern der Pflanzen des Botanischen Gartens sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben. Die Pflanzenteile von *Morus alba* L., *Glycyrrhiza glabra* L., und *Marrubium vulgare* L. wurden hingegen von Kräuter Schulte Aktiv Kräuter Drogerie e.K. (Gernsbach, Germany) bezogen.

Lateinischer Name	**Deutscher Name**	**Pflanzenfamilie**	**Untersuchter Pflanzenteil**	**Akzessionsnr.**
Acacia decora RCHB.F.	Zierliche Akazie	Leguminosae	Oberird. Teil	006049114
Acacia longifolia (ANDREWS) WILLD.	Langblättrige Akazie	Leguminosae	Oberird. Teil	006059114
Acacia melanoxylon R.BR.	Schwarzholz-Akazie	Leguminosae	Oberird. Teil	198028614
Acacia rostellifera BENTH.	Geschnäbelte Akazie	Leguminosae	Oberird. Teil	098019474
Acacia verticillata (L'HER.) WILLD.	Quil-Akazie	Leguminosae	Oberird. Teil	142697914
Cryptomeria japonica (THUNB. ex L.F.) D.DON	Sicheltanne	Cupressaceae	Blätter	103737480
Glycyrrhiza glabra L.	Echtes Süßholz	Leguminosae	Wurzel	käuflich erworben
Hypericum hookerianum WIGHT et ARN.	Johanniskraut	Hypericaceae	Sprossachse	024041070
Marrubium vulgare L.	Gewöhnlicher Andorn	Lamiaceae	Kraut	käuflich erworben
Maytenus boaria MOLINA	Chilenischer Kerzenbaum	Celastraceae	Blätter	148039510
Morus alba L.	Weiße Maulbeere	Moraceae	Sprossachse	käuflich erworben

2.2 Methoden

Alle im Rahmen der Versuche hergestellten Puffer und Lösungen wurden mit analytisch reinem Wasser (0,055 µS/cm bei 25 °C, zusätzlich filtriert durch einen 0,2 µm Filter) hergestellt, das der zuvor genannten Reinstwasseranlage entnommen wurde.

2.2.1 Enzymaktivitäts-Assays

2.2.1.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Lipaseaktivität

Zur Bestimmung der Aktivität von Schweinepankreas-Lipase und zur Beurteilung des Lipase-inhibitorischen Potentials von Reinstoffen bzw. Pflanzenextrakten wurde ein fluoreszenzbasiertes *in vitro* Enzymassay verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem fluorogenen Substrat 4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO) versetzt und über einen definierten Zeitraum vermessen. In Anwesenheit einer aktiven Lipase wird das Substrat in 4-Methylumbelliferon (4-MU, Abb. 2.2) gespalten, welches bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm fluorimetrisch erfasst werden kann. Als Positivkontrolle wurde der synthetische PL Inhibitor Orlistat eingesetzt.

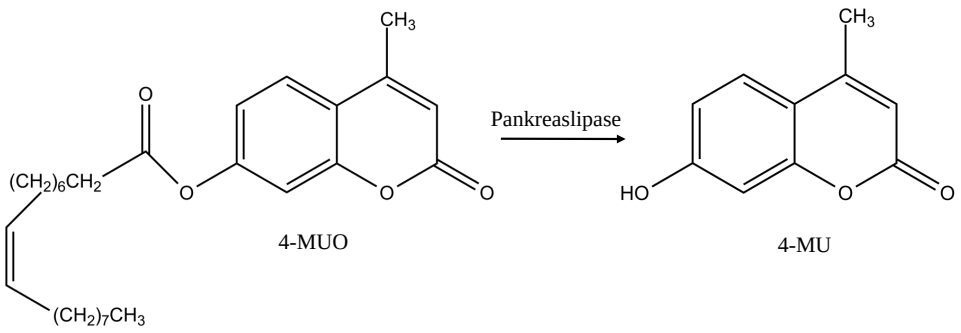


Abbildung 2.2: Prinzip des Lipase Aktivitätsassays: Bei Vorhandensein einer aktiven Lipase wird das Substrat 4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO) zum stark fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (4-MU) umgesetzt.

Das Assay basiert auf einer Methode von Sergent *et al.* (2012) und wurde für diese Arbeit leicht modifiziert [149]. Es wurden jeweils 25 µL Probenlösung (Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt in 100 % DMSO) mit 25 µL Enzymlösung (0,5 mg/mL, Schweinepankreaslipase aus Pankreatinpulver) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Für jeden Versuchsansatz wurde eine 100 %-Aktivitätskontrolle mitgeführt, in der anstelle von Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt 25 µL 100 % DMSO zugesetzt wurden. Nachfolgend wurden 50 µL 0,5 mM 4-MUO zu den Ansätzen pipettiert. Die Proben wurden unter Verwendung eines Infinite F200 Microplate Readers (Tecan Group Ltd., Schweiz) bei 37 °C in 1-min-Intervallen über einen Zeitraum von 35 min vermessen (Ex/Em = 360nm/465nm). Zur Auswertung wurden die letzten 20 Messwerte herangezogen. Die Bestimmung des inhibitorischen Potentials der eingesetzten Pflanzenextrakte bzw. Reinstoffe erfolgte über eine lineare Interpolation und einem Vergleich der Änderung der gemessenen relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU) pro Minute.

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Lösungen für das Lipase-Aktivitätsassay

	Zusammensetzung
TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)	13 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 150 mM Natriumchlorid 1,3 mM Calciumchlorid
Enzymlösung (Schweinepankreaslipase aus Pankreatinpulver)	0,5 mg/mL Pankreatin in 10 % DMSO in 13 mM TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)
4-MUO Substratlösung	0,5 mM 4-Methylumbelliferyloleat in 6 % (v/v) 2-Methoxyethanol in dest. Wasser
Reinstoffe	Einwaage in 100 % DMSO
Pflanzenextrakte	Einwaage in 100 % DMSO

2.2.1.2 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Amylaseaktivität

Zur Bestimmung der α-Amylaseaktivität wurde das *EnzChek® Ultra Amylase Assay Kit* (E33651) der Firma Molecular Probes™verwendet. Dieses *in vitro* Enzymassay basiert auf der hydrolytischen Spaltung des modifizierten Stärkesubstrats *DQ starch from corn, BODIPY FL conjugate*. Das Stärkederivat ist mit dem Fluoreszenz-Farbstoff BODIPY FL in so hoher Konzentration markiert, dass die Fluoreszenz zunächst gequencht wird. Erst bei Umsetzung des Subtrates durch ein aktives Enzym erfolgt die Aufhebung des Quenchings und es werden stark fluoreszierende Fragmente gebildet, die bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm detektiert werden können. Der gemessene Fluoreszenzanstieg ist dabei proportional der α-Amylaseaktivität. Als Positivkontrolle der Amylase-Inhibition wurde Acarbose eingesetzt.

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen für das α-Amylase-Aktivitätsassay

	Zusammensetzung
TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)	13 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 150 mM Natriumchlorid 1,3 mM Calciumchlorid
Substrat Solvent (pH = 4,0)	50 mM Natriumacetat
Enzymlösung (Schweinepankreaslipase aus Pankreatinpulver)	1,25 µg/mL Pankreatin in 10 % (v/v) DMSO in 13 mM TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)
DQ starch from corn, BODIPY FL Konjugat (= Substratlösung)	200 µg/mL BODIPY-FL Substratlösung in 2 % (v/v) Substrat Solvent (pH = 4,0) in 13 mM TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)
Reinstoffe	Einwaage in 100 % DMSO
Pflanzenextrakte	Einwaage in 100 % DMSO

Zur Bestimmung der α-Amylase Aktivität bzw. deren Inhibition durch Reinstoffe und Pflanzen-

extrakte wurden jeweils 25 µL Probenlösung (in 100 % DMSO) mit 25 µL Enzymlösung (1,25 µg/mL, Schweinepankreasamylase aus Pankreatinpulver) versetzt und 15 min vorinkubiert. Die 100 %-Aktivitätskontrolle enthielt anstelle des Reinstoffs bzw. Pflanzenextrakts 25 µL 100 % DMSO. Zum Start der Reaktion wurden 50 µL der BODIPY-FL Substratlösung (200 µg/mL) zu den Ansätzen pipettiert. Die Vermessung (Ex/Em = 485/535nm) und Auswertung der Proben erfolgte analog der unter 2.2.1.1 genannten Bedingungen.

2.2.1.3 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Glucosidaseaktivität

Zur Bestimmung der α-Glucosidaseaktivität wurde ein fluoreszenzbasiertes *in vitro* Enzymassay verwendet. Die Methode beruht auf der enzymatischen Spaltung des fluorogenen Substrates 4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid (4-MUGP). In Anwesenheit eines aktiven Enyzms entsteht das stark fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU, Ex/Em = 360/465nm, Abb. 2.3). Miglitol wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

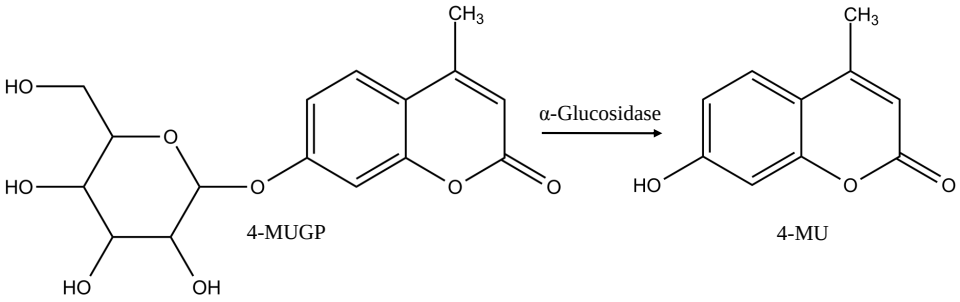


Abbildung 2.3: Reaktionsprinzip des α-Glucosidase-Aktivitätsassays: Bei Vorhandensein einer aktiven α-Glucosidase wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid (4-MUGP) zum stark fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (4-MU) umgesetzt

Zur Isolierung einer aktiven Enzymsuspension aus Schweinedarm wurden die ersten 5 m des vorderen Dünndarmabschnittes eines frisch geschlachteten Hausschweins (*Sus scrofa domestica* Linnaeus) verwendet. Die Darmabschnitte wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung (Teltow Ruhlsdorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Bis zur Verwendung wurde der Dünndarm in eiskaltem Krebs-Henseleit Puffer (pH = 7,4) gelagert. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden unter Eiskühlung durchgeführt. Der Dünndarmabschnitt wurde zunächst in etwa 10 cm lange Stücke zerteilt und anschließend von Innen und Außen mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Eventuell vorhandene Nahrungsreste wurden dabei entfernt. Die Stücke wurden längs aufgeschnitten und von Innen nochmals vorsichtig mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Im Anschluss wurden die Dünndarmabschnitte auf Styropor aufgespannt. Unter Verwendung eines scharfen Glasspatels wurde die oberste Mukosaschicht abgekratzt und in jeweils 5 mL HEPES-Puffer (pH = 7,12) resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellfragmente und zur Freisetzung der Enzyme aus ihren Kompartimenten wurden die gewonnen Proben unter Eiskühlung für 12 min im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss erfolgte zunächst eine Zentrifugation bei 4000xg für 10 min, um grobe Bestandteile abzutrennen. Im Anschluss wurde

der Überstand bei 13.000xg für 2 min zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand (= Isolat) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen für das α-Glucosidase-Aktivitätsassay

	Zusammensetzung
Krebs-Henseleit Puffer (pH = 7,4)	118 mM Natriumchlorid 4,7 mM Kaliumchlorid 1,6 mM Calciumchlorid 1,2 mM Magnesiumsulfat 1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat 25 mM Natriumhydrogencarbonat 10 mM D-Glucose
HEPES-Puffer (pH = 7,12)	50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure 70 mM Natriumchlorid 1 mM Calciumchlorid
Enzymlösung (α-Glucosidase aus Schweinedarm)	Das gewonnene Isolat wurde im Verhältnis 1:2 mit HEPES-Puffer (pH = 7,12) verdünnt
4-MUGP Substratlösung	0,5 mM 4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid in 6 % (v/v) 2-Methoxyethanol in dest. Wasser
Reinstoffe	Einwaage in 10 % (v/v) DMSO in HEPES-Puffer (pH = 7,12) bzw. in 100 % (v/v) DMSO
Pflanzenextrakte	Einwaage in 100 % DMSO
Isotone Kochsalzlösung	0,9 % (w/v) Natriumchlorid in dest. Wasser

Das verwendete α-Glucosidase-Aktivitätsassay wurde von der Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität (Abschnitt. 2.2.1.1) abgeleitet und entsprechend angepasst. Es wurden jeweils 25 µL Probenlösung (Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt in 10 % (v/v) DMSO in HEPES-Puffer (pH = 7,12) bzw. in 100 % DMSO) mit 25 µL Enzymlösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Zur Bestimmung der 100 %-Aktivitätskontrolle der Schweinedarm-Enzymlösung wurden anstelle von Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt 25 µL 10 % (v/v) DMSO in HEPES-Puffer (pH = 7,12) bzw. 100 % DMSO mit 25 µL Enzymlösung gemischt. Im Anschluss wurden 50 µL 0,5 mM 4-MUGP zu den Ansätzen pipettiert. Die Proben wurden unter Verwendung eines Infinite F200 Microplate Readers (Tecan Group Ltd., Schweiz) bei 37 °C jede Minute über einen Zeitraum von 20 min vermessen (Ex/Em = 360nm/465nm). Die resultierende Fluoreszenzänderung pro Minute wurde mittels linearer Interpolation bestimmt. Eine potentielle Inhibition der Reinstoffe bzw. Pflanzenextrakte konnte durch einen Vergleich der erhaltenen Werte in Bezug auf die 100 %-Aktivitätskontrolle ermittelt werden.

2.2.1.4 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) aus Schweinedarm wurde ein *in vitro* Enzymassay etabliert. Dieses beruht auf der Dephosphorylierung des Ausgangsstoffes 4-Methylumbelliferyl-phosphat (4-MUP) in Anwesenheit aktiver Esterasen zum fluoreszierenden Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU, Abb. 2.4). Dieses kann bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm fluorimetrisch erfasst werden. Durch Zusatz von Pflanzenextrakten und Reinstoffen sollte deren inhibitorisches Potential in Bezug auf die Enzymaktivität bestimmt werden.

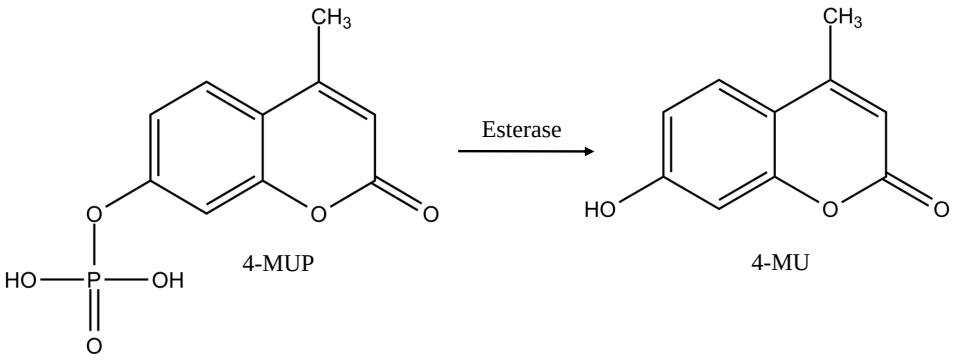


Abbildung 2.4: Reaktionsprinzip des ALP-Aktivitätsassays: Bei Vorhandensein von aktiven ALP wird das Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (4-MUP) zum stark fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (4-MU) umgesetzt

Die Isolierung einer aktiven Enzymsuspension aus Schweinedarm erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben. Mit Ausnahme der verwendeten Substratlösung (4-MUP) sind die unter Abschnitt 2.2.1.3 genannten Puffer und Lösungen analog verwendet worden.

Tabelle 2.4: Verwendete Puffer und Lösungen für das ALP-Aktivitätsassay

	Zusammensetzung
Enzymlösung (Esterasen aus Schweinedarm)	Das gewonnene Isolat wurde im Verhältnis 1:2 mit HEPES-Puffer (pH = 7,12) verdünnt
4-MUP Substratlösung	0,5 mM 4-Methylumbelliferylphosphat in 6 % (v/v) 2-Methoxyethanol in dest. Wasser

Das verwendete Aktivitätsassay wurde von der Methode des α-Glucosidase-Assay abgeleitet. Es wurden jeweils 25 µL Probenlösung (Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt in 10 % (v/v) DMSO in HEPES-Puffer (pH = 7,12) bzw. in 100 % DMSO) mit 25 µL Enzymlösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Für jeden Versuchsansatz wurde eine 100 %-Aktivitätskontrolle mitgeführt, in der anstelle von Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt 25 µL 10 % (v/v) DMSO in HEPES-Puffer bzw. 100 % DMSO zugesetzt wurden. Durch Zugabe von 50 µL 0,5 mM 4-MUP wurde die Reaktion gestartet. Die Aktivitätsmessung sowie deren Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt 2.2.1.3.

2.2.1.5 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Proteaseaktivität

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität aus Schweinepankreas wurde das *EnzChek® Protease Assay Kit* (E6638) der Firma Molecular Probes™ verwendet. Das *in vitro* Enzymassay basiert auf der proteolytischen Spaltung des modifizierten Caseinderivates BODIPY FL *casein*. Das zunächst mit dem Fluoreszenz-Farbstoff BODIPY FL gequenchte Caseinderivat wird bei Umsetzung des Subtrats durch aktive Proteasen in stark fluoreszierende Fragmente gespalten (Abb. 2.5), die bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm erfasst werden können. Der gemessene Fluoreszenzanstieg ist dabei proportional der Proteaseaktivität. Als Positivkontrolle wurde der Serinprotease-Inhibitor 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF) eingesetzt.

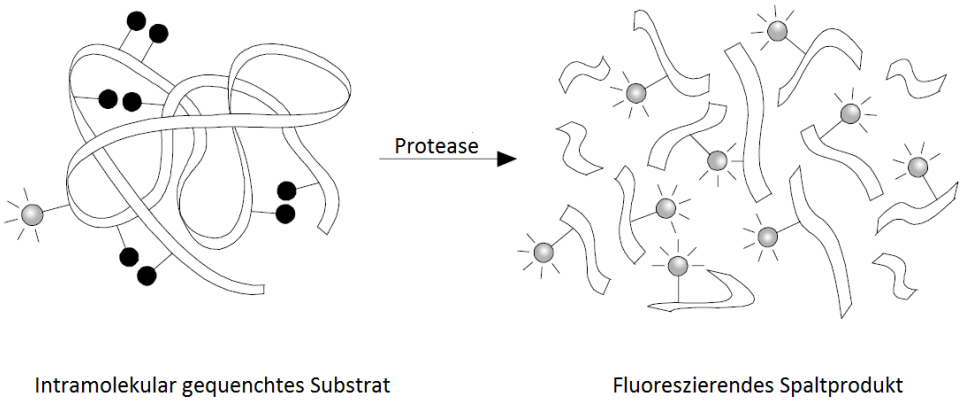


Abbildung 2.5: Prinzip des Protease-Aktivitätsassays: Bei Vorhandensein von aktiven Proteasen erfolgt die Umsetzung des Substrates (Caseinderivat) in stark fluoreszierende Fragmente. (Abb. nach [150])

Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen für das Protease-Aktivitätsassay

	Zusammensetzung
TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)	13 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) 150 mM Natriumchlorid 1,3 mM Calciumchlorid
Digestion Buffer 20x (pH = 7,8)	200 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (TRIS-HCl) 2 mM Natriumazid
Enzymlösung (Schweinepankreaslipase aus Pankreatinpulver)	0,5 mg/mL Pankreatin in 10 % (v/v) DMSO in 13 mM TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0)
BODIPY FL casein (= Substratlösung)	10 µg/mL BODIPY-FL Substratlösung in 1 % (v/v) PBS in Digestion Buffer 1x
Reinstoffe	Einwaage in 100 % DMSO
Pflanzenextrakte	Einwaage in 100 % DMSO

Es wurden 25 µL Probenlösung (Reinstoff bzw. Pflanzenextrakt in 100 % DMSO) mit 25 µL

Enzymlösung (0,5 mg/mL, Schweinepankreasproteasen aus Pankreatinpulver) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Zur Bestimmung der 100 %-Aktivitätskontrolle wurden anstelle der potentiell inhibitorischen Probenlösung 25 µL 100 % DMSO eingesetzt. Zum Start der Reaktion wurden 50 µL 10 µg/mL BODIPY-FL Substratlösung zu den Ansätzen pipettiert. Die Proben wurden bei 37 °C in 1-min-Intervallen über einen Zeitraum von 20 min vermessen (Ex/Em = 485/535nm). Die Bestimmung des inhibitorischen Potentials der eingesetzten Pflanzenextrakte bzw. Reinstoffe erfolgte über eine lineare Interpolation und einem Vergleich der Änderung der RFU pro Minute.

2.2.2 Herstellung verschiedener Extrakte aus getrocknetem Pflanzenmaterial

2.2.2.1 Methanolische Extrakte

Das zu analysierende Pflanzenmaterial wurde zunächst unter Verwendung einer Labormühle zerkleinert. Es wurden 5 g pulverisierte Droge in einem 250 mL Rundkolben mit 100 mL Methanol versetzt und im Wasserbad 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit abgenutscht. Das gewonnene Filtrat wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 10-15 mL eingeengt. Der Rückstand wurde quantitativ in eine Petrischale überführt und über Nacht zum Abdampfen des restlichen Lösungsmittels unter den Abzug gestellt. Der so gewonnene Rückstand wurde tiefgefroren und im Anschluss gefriergetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Wässrige Extrakte

Die Herstellung der wässrigen Extrakte erfolgte mit dest. Wasser analog zu den methanolischen Extrakten (Abschnitt 2.2.2.1) mit folgender Ausnahme: die Extrakte wurden 15 min unter Rückfluss erhitzt (Heizpilz) und direkt nach der Aufkonzentrierung am Rotationsverdampfer tiefgefroren.

2.2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von *Crataegus pinnatifida* Bge. auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration

Der methanolische Extrakt der Früchte von *Crataegus pinnatifida* zeigte in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Pankreaslipase als auch für die α-Amylase eine starke Inhibition der enzymatischen Aktivität. Auf Grundlage dieser Beobachtungen folgten im Anschluss tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss dieses Extraktes auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration im Diabetes-Typ-2 Tiermodell.

Die Tierversuche wurden an der Northwest A&F University (Yangling, China) durchgeführt und durch das Ethikkomitee der Universität überprüft und genehmigt. Es wurden männliche Sprague-Dawley (SD) Ratten vom Experimental Animal Center of the Fourth Military Medical University (Xi'an, China) bezogen. Alle Ratten wurden in einer herkömmlichen sanitären Einrichtung mit

der erforderlichen konstanten Temperatur und relativen Feuchtigkeit gehalten. Für die Versuche wurden 54 SD-Ratten (Gewicht: 280 ± 20 g) zufällig in 6 Gruppen von jeweils 9 Tieren aufgeteilt ($n = 9$). Die Gruppen wurden wie in Tabelle 2.6 dargestellt eingeteilt und entsprechend behandelt. Orlistat wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Tabelle 2.6: Übersicht zur Einteilung der SD-Ratten und Behandlungsformen der unterschiedlichen Modellgruppen

	Gruppe	**Hochfettdiät + Streptozotocin**	***Crataegus pinnatifida* Extrakt (CPE)**	**Orlistat**
1	Kontrollgruppe	-	-	-
2	T2DM	+	-	-
3	T2DM + 50 mg CPE	+	+	-
4	T2DM + 100 mg CPE	+	+	-
5	T2DM + 200 mg CPE	+	+	-
6	T2DM + Orlistat	+	-	+

T2DM: Typ-2-Diabetes-Modellgruppe; CPE: intragastrische Verabreichung von 50-200 mg/kg Körpergewicht *Crataegus pinnatifida* Extrakt (CPE) zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen; Orlistat: 40 mg/kg Körpergewicht Orlistat zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen

Zur Induktion eines Typ-2-Diabetes (Gruppe 2-6) wurden die SD-Ratten zunächst 2 Wochen unter Hochfettbedingungen gehalten. Die Tiere wurden im Anschluss für 12 h gefastet (Wasser *ad libitum*) und mit einer intraperitoneal injizierten Einzeldosis von Streptozotocin (STZ, 50 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt während der Anfangsphase und während des gesamten Experiments eine normale Rattendiät. Nach zwei Wochen wurde ihnen anstelle des STZ nur eine 0,9 % physiologische Kochsalzlösung injiziert. Eine Woche nach der STZ-Injektion wurden die Tiere zunächst erneut für 12 h gefastet und im Anschluss eine Dosis Glucose (2 g/kg Körpergewicht) oral verabreicht. Blutproben wurden aus der Schwanzspitze nach 0 und 120 min entnommen und auf ihren Glucosegehalt unter Verwendung eines Glucometers (Roche Diagnostics GmbH, Germany) analysiert. Ratten mit einer Nüchternblutzucker-Konzentration > 300 mg/dl wurden als diabetisch betrachtet. Im Anschluss erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen die Durchführung des Experiments nach den in Tabelle 2.6 dargestellten Kriterien. Nach Ablauf des 14 tägigen Versuchs wurden die Tiere zur erneuten Messung der Nüchternblutglucose-Konzentrationen für 12 h gefastet (Wasser *ad libitum*). Im Anschluss erfolgte eine Blutentnahme an der Schwanzspitze und die Bestimmung der Nüchternblutglucose-Konzentration mittels eines Glucometers. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere getötet, um Blut- und Pankreasgewebeproben zu sammeln. Das Serum wurde durch Zentrifugation bei 2500 rpm (10 min; 4°C) gewonnen und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Serum-Triglycerid- und Serum-Gesamtcholesterinkonzentration spektrophotometrisch unter Verwendung kommerzieller diagnostischer Kits (Jiancheng Institute of Biotechnology, Nanjing, China).

2.2.4 Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gehört zu den meistgenutzten Methoden der instrumentellen Analytik. Sie ermöglicht die Trennung von Subtanzen nach ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften [151].

2.2.4.1 Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke

Zur Charakterisierung der in Abschnitt 2.2.1.2 gewonnenen Spaltprodukte aus dem Stärkederivat „DQ starch from corn, BODIPY FL conjugate" erfolgte eine Analyse mittels HPLC. Zur Überprüfung des verwendeten Enzymassays wurden vergleichend die Spaltprodukte aus der Hydrolyse von natürlicher und modifizierter Stärke untersucht. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte durch eine HPLC Anlage der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan). Zur Detektion wurde ein Lichtstreudetektor (Evaporative Light-Scattering Detection, ELSD) vom Typ ELSD-LT II (Shimadzu; Kyoto, Japan) eingesetzt. Durch Zerstäubung der eluierten Substanzen mittels eines Inertgases (Stickstoff) werden diese getrocknet. Die entstehenden Feststoffpartikel driften durch einen Laserstrahl, der durch die Partikel unelastisch gestreut wird. Eine Fotodiode detektiert dabei die Menge an gestreutem Licht [152]. Die Geräteparameter und Bedingungen des verwendeten Systems sind in den Tabellen 2.7 und 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.7: Geräteparameter des HPLC-Systems und ELSD-Detektors zur Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke

Geräte-Parameter	
Säule	Waters; XBridge™Amide 3,5 µm; 3,0 x 250 mm
Vorsäule	Waters; XBridge™Amide 3,5 µm; 4,6 x 20 mm
Fluss	0,8 mL/min
Säulenofentemperatur	35 °C
Injektionsvolumen	20 µL
Eluent A	100 % (v/v) Acetonitril
Eluent B	0,1 % (v/v) Ammoniak in dest. Wasser
Detektor	Shimadzu ELSD-LT II
Detektortemperatur	40 °C
Inertgas	Stickstoff
Druck	320 kPa

Es wurde zu Beginn eine 1 µM α-Amylaselösung hergestellt. Die Konzentrationsbestimmung der eingesetzten α-Amylase erfolgte aufgrund der schlechten Löslichkeit des Pankreatinpulvers photometrisch. Es wurden 0,5 mg/mL Pankreatinpulver in TRIS-HCL-Puffer (pH = 8,0; Zusammensetzung siehe α-Amylase-Aktivitätsassay) eingewogen, kräftig gevortext und für 5 min bei 10.000xg zentrifugiert. 500 µL des gewonnenen Überstandes wurden im Anschluss mit 350 µL

dest. Wasser versetzt und bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch vermessen. Der gemessene Absorptionswert muss dabei zwischen 0,6 und 0,9 liegen, andernfalls muss eine weitere Verdünnung der Probe mit dest. Wasser vorgenommen werden.

Tabelle 2.8: Bedingungen des HPLC-Systems zur Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke

Zeit [min]	**Fluss [mL/min]**	**Eluent A [%]**	**Eluent B[%]**
5	0,8	70	30
23	0,8	70	30
25	0,8		
29	0,8	50	50
35	0,8	55	45
44	0,8		
46	0,8	70	30
50	0,8	70	30

Mithilfe eines spezifischen Berechnungsfaktors für Amylasen (f = 0,38; Vorschlag der Firma Worthington [153]) und der molaren Masse der eingesetzen α-Amylase konnte die Konzentration der hergestellten α-Amylaselösung berechnet werden (Gleichung 2.1). Die α-Amylaselösung bekannter Konzentration wurde anschließend, bezogen auf die mittels Gleichung 2.2 berechnete Stoffmengenkonzentration, mit TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0) auf 1 µM verdünnt (Endvolumen: 1000 µL).

$$c = E \cdot 0,38 \tag{2.1}$$

$$n = \frac{c \cdot 1000}{M} \tag{2.2}$$

E: Extinktion
c: Konzentration $[\frac{g}{L}]$
n: Stoffmengenkonzentration $[\mu M]$
M: Molare Masse Schweinepankreas-Amylase $[57,1\ kDa]$

Im Nachfolgenden wurde eine 1 % Stärkelösung sowohl aus natürlicher Stärke (Lösliche Stärke nach Zulkowsky) und der modifizierten Stärke aus dem EnzChek® Ultra Amylase Assay Kit in TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0) hergestellt. Für die Reaktionsansätze wurden 50 µL der jeweiligen Stärkelösung 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 40 µL TRIS-HCl-Puffer (pH = 8,0) und 10 µL der hergestellten 1 µM α-Amylaselösung zu den Ansätzen pipettiert. Die Proben wurden analog der α-Amylaseaktivitätsbestimmung für 35 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe von 100 µL eiskaltem Aceton. Dadurch erfolgt zum einen die Inaktivierung des Enzyms, zum anderen die Ausfällung von nicht abgebauter Stärke. Die Proben wurden 30 min auf Eis gelagert und nachfolgend für 10 min bei 9.000xg und 4 °C zentrifugiert.

Der gewonnene Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung der Spaltprodukte mittels HPLC. Als Referenz wurde ein Standardgemisch aus 5 verschiedenen Sacchariden (Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose und Maltotriose) aufgetrennt. Die Saccharide wurden in 50 % (v/v) Acetonitril gelöst. Die Konzentrationen der einzelnen Saccharide betrugen 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 und 2,0 mg/mL.

2.2.4.2 Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

Der wässrige und methanolische Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. zeigte für alle untersuchten Verdauungsenzyme (Pankreaslipase, -amylase, -proteasen) ein sehr hohes inhibitorisches Potential. Zur Identifizierung der inhibitorisch wirksamen Komponenten erfolgte daher im Anschluss an die enzymatischen Untersuchungen eine Analyse des methanolischen Extrakts mittels HPLC. Dazu wurde unter Verwendung einer präparativen HPLC Anlage der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) zunächst eine Fraktionierung des Extrakts vorgenommen und die gewonnen Fraktionen im Anschluss erneut in Hinsicht auf eine Inhibition der PL analysiert (Methode siehe Abschnitt 2.2.1.1).

Tabelle 2.9: Geräteparameter der HPLC-Systeme zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

Geräte-Parameter		
	Präparatives HPLC-Shimadzu System	*HPLC-Knauer System*
Säule	Phenomenex; Kinetex 5 µm XB-C18 100 Å; 4,6 x 250 mm	
Fluss	2,5 mL/min	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	500 µL	10 µL
Eluent A	100 % (v/v) Acetonitril	
Eluent B	Wasser (bidest.)	
Detektor	Detektor SPD-20AV	Diode Array Detector PLATINblue PDA-1

Tabelle 2.10: Bedingungen der HPLC-Systeme zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

Präparatives HPLC-Shimadzu System			*HPLC-Knauer System*		
Zeit [min]	**Eluent A [%]**	**Eluent B[%]**	**Zeit [min]**	**Eluent A [%]**	**Eluent B[%]**
0	3	97	0	4	96
6	4	96	6	6	94
30	30	70	9	9	91
35	60	40	30	35	65
45	3	97	40	60	40
55			45	4	96
			50		

Der Peak, welcher die stärkste Enzyminhibition zeigte, wurde im Anschluss mit der HPLC plus Anlage der Firma Knauer (Berlin, Germany) erneut aufgetrennt und in möglichst reiner Form isoliert. Die Geräteparameter und Bedingungen der verwendeten HPLC-Systeme sind nachfolgend (Tab 2.9 und 2.10) aufgeführt. Das so gewonnene Isolat wurde nachfolgend mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) hinsichtlich seiner Reinheit und der molaren Masse des Moleküls analysiert.

2.2.5 Untersuchungen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

Zur Charakterisierung von Reinheit und Molmasse der isolierten Fraktion des Extraktes von *Hibiscus sabdariffa* L. (Gewinnung s. Abschnitt 2.2.4.2) erfolgte im Anschluss eine Analyse mittels Elektrospray-Ionisations-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie (*electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, ESI-Q-TOF-MS). Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode zur Auftrennung von einzelnen geladenen Molekülen und Atomen im Vakuum zur Bestimmung ihrer Molekülmasse. Durch Ionisation der Moleküle kann der Quotient aus Masse (m) und Ladung (z) der gebildeten Ionen sowie derer Zerfallsprodukte bestimmt werden. Bei Kenntnis der Ladung des Molekülions kann somit die Masse der Molekülverbindung ermittelt werden [154, 155].
Das gewonnene Isolat wurde direkt (*off-line* Kopplung) in das Massenspektrometer injiziert. Die Ionisierung der Probe erfolgte durch ein ESI-Interface. Dabei wird die injizierte Probe durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Ende ein elektrisches Feld angelegt ist. Durch die Potentialdifferenz werden sehr kleine, je nach Polung der Spraykapillare positiv oder negativ geladene Lösungsmitteltropfen gebildet, aus denen nach Verdampfen des Lösungsmittels Ionen zurückbleiben. Häufig kommen dafür Trägergase zum Einsatz (hier: Stickstoff), die die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützen [154, 156]. Die Ionen gelangen nachfolgend zum Quadrupol, welcher eine Selektion von Ionen ermöglicht. Im anschließenden TOF-Analysator kann durch Messung der Flugzeit im Hochvakuum auf das m/z-Verhältnis der erzeugten Ionen geschlossen werden. Die Geräteparameter des verwendeten Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS Systems (Agilent Technologies, USA) sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Geräteparameter des Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS Systems

Geräteparameter	
Ionisationsquelle	Elektrosprayionisation (ESI), negativ
Injektionsvolumen	1 µL
Temperatur Trägergas	200 °C
Gas flow	14 L/min
Nebulizer	35 psig
Sheath Gas Temperatur	350 °C
Sheath GasFlow	11

2.2.6 Proteinchemische Methoden: BCA-Protein-Assay

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde das Pierce™*BCA Protein Assay Kit* (23225) der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Es basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Peptidbindungen sowie bestimmter Aminosäuren (Cystein, Cystin, Typtophan und Tyrosin) mit einer anschließenden Chelatisierung des gebildeten Cu^{+} durch Bicinchoninsäure (BCA) im Verhältnis 1:2 [157, 158]. Der gebildete BCA-Cu^{+}-Komplex ist wasserlöslich und weist eine starke lineare Absorption bei 562 nm mit steigender Proteinkonzentration auf. Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) wurde als Standard mitgeführt.

Tabelle 2.12: Verwendete Lösungen für das BCA-Protein-Assay

	Zusammensetzung
Nachweisreagenz	BCA Reagenz A/ BCA Regenz B 50:1 (v/v)
BCA Reagenz A	Natriumcarbonat
	Natriumbicarbonat
	Bicinchoninsäure
	Natriumtartrat
	in 0,1 M Natriumhydroxid
BCA Reagenz B	4 % Kupfersulfat
Bovine Serum Albumin (BSA)	2 mg/mL Stammlösung im jeweiligen LM

Es wurden jeweils 25 µL Standard bzw. Probe mit 200 µL des Nachweis-Reagenzes versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unter Verwendung eines Infinite F200 Microplate Readers (Tecan Group Ltd., Schweiz) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm erfasst. Als Standard diente die polynomische Regression einer BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 20 - 2000 µg/mL.

2.2.7 Dockingstudien und 3D-Pharmakophormodellierung der Pankreaslipase

Ein innovativer Ansatz zur Identifikation von potentiellen Enzyminhibitoren liegt in der Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen bekannter Inhibitoren. Durch *in silico* Experimente und Modelluntersuchungen der Bindungsstellen und des Pharmakophors sind Aussagen über Strukturmerkmale möglich, die sehr wahrscheinlich für eine inhibitorische Wirkung verantwortlich sind. Unter Verwendung virtueller Screeningmethoden können potentiell inhibitorische Verbindungen analysiert und ihre Wirksamkeit anschließend unter experimentellen Bedingungen getestet werden.

Die *in silico* Untersuchungen in Hinblick auf eine Identifikation von neuen potentiellen Inhibitoren der Pankreaslipase (*pig*) wurden am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin (Berlin, Germany) in der Abteilung für Pharmazeutische und Medizinische Chemie durch die Arbeitsgruppe für computergestütztes Wirkstoffdesign von Prof. Dr. Gerhard Wolber durchgeführt.

2.2.7.1 Modellierungssoftware

Die 3D-Koordinaten der Verbindungen wurden unter Verwendung von CORINA erzeugt [159]. SiteFinder implementiert in MOE [160] und FTMap [161–163] wurde zur Identifikation der Bindungstaschen verwendet. Das Softwarepaket GOLD Suite von CCDC [164] wurde zum Docking der Naturstoffe angewandt. Im Anschluss wurden Posen mit der aktuellen Version von Merck molecular force field [165–167], implementiert in LigandScout 4.0 [168–170], minimiert. Schließlich wurden die 3D-Pharmakophore in LigandScout 4.0 generiert.
Die Erzeugung des *Decoy*-Sets wurde mit der Software DecoyFinder [171] unter Verwendung der ZINC Naturstoffdatenbank und NPDB Datenbank als *Decoy*-Quelle durchgeführt. Es wurden dafür die folgenden Einstellungen verwendet: aktive Liganden vs. *Decoy tanimoto threshold* 0,75; *Decoy* vs. *Decoy tanimoto threshold* 0,90; Wasserstoffbrücken-Akzeptoren ± 2; Wasserstoffbrücken-Donoren ± 1; Molekulargewicht ± 40 Da; Rotationsbindungen ± 1; Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) ± 1,00; Maximale Standardabweichung vom Aktiven 1,00; Maximum an *Decoys* pro aktivem Liganden 50; Minimum an *Decoys* pro aktivem Liganden 20.

2.2.7.2 Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase

Da in den Untersuchungen hinsichtlich des inhibitorischen Potentials von Reinstoffen bzw. Pflanzenextrakten die Pankreaslipase aus Pankreatinpulver (*pig*) vermessen wurde, wurde auch in den Modellierungsversuchen die Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase (SPL, [PDB-Code: 1ETH [172]], Abb. 2.6) verwendet.

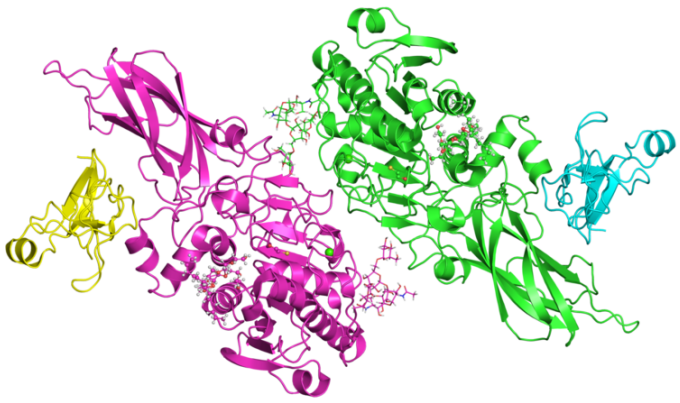


Abbildung 2.6: Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase (PDB-Code: 1ETH [172])

Die SPL besitzt eine Sequenzübereinstimmung von 83 % gegenüber der HPL. Weiterhin ist die Ligandenbindungsstelle der beiden Enzyme sehr ähnlich [172], sodass potentielle Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit auf das humane Enzym übertragbar sind. Es sind zwei Konformationen des Enzyms funktionell relevant [173]: (I) Die inaktive, geschlossene Form, in der das aktive Zentrum des Enzyms durch eine Schleife, auch *lid* oder *β5 active site surface loop* genannt, verdeckt wird und (II) die aktive, offene Form, welche die Ligandenbindung unterstützt [174] und in Anwesenheit von Gallensalzen und der aktiven Colipase gebildet wird [172, 175–179]. Aufgrund

der Beschaffenheit der natürlichen Substrate des Enzyms besteht die Bindungstasche der PL hauptsächlich aus hydrophoben Regionen, besitzt jedoch in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums einen hydrophilen Bereich in Form einer kleinen Teiltasche.
Anhand der Screeningdaten der untersuchten Reinstoffe sowie weiterer Literaturdaten sollen 3D-Pharmakophormodelle entwickelt werden, die eine Aussage über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zulassen. Durch ein anschließendes Pharmakophor-basiertes virtuelles Screening sollen potentielle Inhibitoren der PL identifiziert und nachfolgend *in vitro* analysiert werden.

2.2.8 Zellbiologische Methoden

2.2.8.1 Kultivierung der Zellen

CaCo-2 Zellen wurden in 75 cm^2-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen alle 3-4 Tage zunächst zweimal mit je 5 mL PBS gewaschen, durch Zugabe von 2 mL TrypLE™ Express trypsinisiert und im Anschluss in einer Konzentration von $10 \cdot 10^4$Zellen/mL Medium ausgesät. Das Zellkulturmedium bestand dabei aus DMEM (*Dulbecco´s modified Eagle medium*)-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (mit Phenolrot), 1 % L-Alanyl-L-Glutamin-Lösung (200 mM) sowie 20 % FBS (Fötales Bovines Serum) Superior. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgt alle 2 - 3 Tage.

2.2.8.2 Differenzierung der CaCo-2 Zellen

Bei der Differenzierung von CaCo-2 Zellen handelt es sich um einen wachstumsbezogenen Prozess. Während der exponentiellen Wachstumsphase sind die Zellen undifferenziert und beginnen erst mit Erreichen der Konfluenz mit der Differenzierung, die nach ca. 20 Tagen funktionell abgeschlossen ist [117]. Zur Beschleunigung des Differenzierungsvorganges erfolgt häufig eine Stimulation intestinaler Zellen (CaCo-2, HT-29) mit Natriumbutyrat, welches die Proliferation der Zellen hemmt und gleichzeitig ihre Differenzierung fördert [180]. Für nachfolgende Analysen hinsichtlich des Einflusses verschiedener Reinstoffe und Pflanzenextrakte auf die Glucoseresorption war eine Differenzierung der Zellen notwendig. Als Maß für den Differenzierungsgrad wird dabei häufig die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) herangezogen [118]. Durch die Differenzierung der intestinalen Zellen kommt es zur Ausbildung einer Bürstensaummembran und einer damit verbundenen Steigerung der ALP-Aktivität [181].

Zur Optimierung der Inkubationszeit der CaCo-2 Zellen mit Natriumbutyrat, wurden die Zellen während der Kultivierung mit dem Differenzierungsreagenz versetzt (Konzentration im Reaktionsansatz: 5 mM) und definierte Zeitabstände (96 h, 72 h, 48 h, 24 h, 0 h) damit inkubiert. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 200.000 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und kultiviert. Die Ernte erfolgte einmalig nach 96 Stunden. Es wurde das Kultivierungsmedium vollständig entfernt und die Zellen im Anschluss zweimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 mL TrypLE™ Express je Well erfolgte die Trypsinisierung der Zellen für ca. 10 min im Brutschrank bei 37 °C. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden

der Zellkulturplatte abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden die Zellen mit zweimal je 2,5 mL PBS versetzt und möglichst vollständig in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation von 5 min mit einer Geschwindigkeit von 1000 x g bei 4°C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 150 µL Homogenisierungspuffer (Tab. 2.13) aufgenommen.

Tabelle 2.13: Verwendete Puffer und Lösungen für die Differenzierung der CaCo-2 Zellen

	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer (pH = 7,6)	100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 300 mM KCl 0,1 % Triton X-100
Natriumbutyrat	5 mM Natriumbutyrat in Zellkulturmedium

Anschließend wurde gevortext und die Proben für 3 min im eisgekühlten Ultraschallbad behandelt und für weitere 15 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis stehen gelassen. Das erhaltene Zelllysat wurde im Anschluss für 15 Minuten bei 4700 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im direkten Anschluss erfolgte die Bestimmung der ALP-Aktivität nach der in Abschnitt 2.2.1.4 beschriebenen Methode. Es wurden hierfür 25 µL des gewonnenen Zelllysats eingesetzt und vermessen. Des Weiteren wurde der Gesamtproteingehalt des erhaltenen Lysats unter Verwendung des BCA-Protein-Assays (siehe Abschnitt 2.2.4.1) bestimmt und die gemessene ALP-Aktivität dazu in Relation gesetzt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 25 µL einer 1:2 Verdünnung des gewonnenen Zelllysats in Homogenisierungspuffer (pH = 7,6) eingesetzt.

2.2.8.3 Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung des Einflusses der untersuchten Testsubstanzen auf die metabolische Aktivität der CaCo-2 Zellen wurde ein MTT-Assay (Abb. 2.7) durchgeführt.

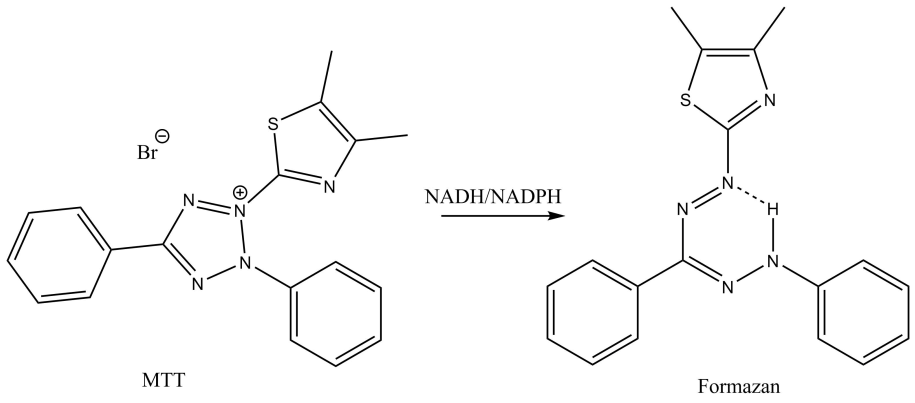


Abbildung 2.7: Reaktionsprinzip des MTT-Assays

Der Nachweis beruht hierbei auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetratoliumbromid (MTT) durch lebende, metabo-

lisch aktive Zellen zum wasserunlöslichen, blau-violetten Formazan [182,183]. Für den Umsatz von MTT sind vorallem Nicotinamidadenindinukleotid- (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH) abhängige Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums verantwortlich. Eine frühere Theorie, dass MTT hauptsächlich durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird, konnte durch Untersuchungen der letzten Jahre widerlegt werden [184]. Nach dem Zelltod werden diese Enzyme rasch inaktiv, sodass die Menge an gebildeten Formazan in etwa proportional zur Anzahl der viablen Zellen ist.
Zur Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay wurden die Zellen zunächst in einer Konzentration von 7.500 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät, mit dem Differenzierungsreagenz (5 mM Natriumbutyrat) versetzt und über 72 h kultiviert (nach 24 h wurde ein Mediumswechsel mit nur 5 % FBS Anteil + 5 mM Natriumbutyrat durchgeführt). Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Testsubstanz in das jeweilige Well. Die zu analysierenden Reinstoffe wurden bei einer Konzentration von 300 µM getestet, die untersuchten Pflanzenextrakte wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL eingesetzt (Reaktionsvolumen je Well: 100 µL). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde das Medium inklusive gelöster Testsubstanzen von den 96-Well-Platten entfernt, zweimal mit je 100 µL PBS gewaschen und anschließend das im Kultivierungsmedium gelöste MTT Reagenz (Tab. 2.14) zu 100 µL hinzugegeben.

Tabelle 2.14: Verwendete Lösungen für das MTT-Assay (Zytotoxizitätstest)

	Zusammensetzung
MTT Reagenz	0,5 mg/mL MTT in DMEM
Reinstoffe	300 µM in 0,3 % (v/v) DMSO in DMEM
Pflanzenextrakte	1 mg/mL in DMEM

Im Anschluss erfolgte eine Inkubation über 60 min bei 37 °C im Brutschrank. Das Medium sowie nicht umgesetztes MTT wurden vollständig entfernt und 100 µL DMSO in die Wells pipettiert. Das DMSO diente als Lösungsmittel für das gebildete, wasserunlösliche Formazan, welches sich am Boden der Wells niedergeschlagen hatte. Um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zu gewährleisten, wurden die Platten 5 min geschüttelt. Die Proben wurden unter Verwendung des Infinite F200 Microplate Readers bei einer Absorptionswellenlänge von 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen. Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte der behandelten Zellen mit denen unbehandelter Zellen verglichen und die Zellviabilität ermittelt.

2.2.8.4 Fluoreszenzbasierte Studien zur Glucoseaufnahme

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Reinstoffe und Pflanzenextrakte auf die Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen wurde basierend auf dem *Glucose Uptake Cell-based Assay Kit* (600470) der Firma Cayman Chemical Company eine geeignete Methode entwickelt und optimiert. Das Kit beruht auf der zellulären Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Glucoseanalogons 2-Deoxy-2-[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-Glucose (2-NBDG, Abb. 2.8). CaCo-2 Zellen wurden zunächst in einer Konzentration von 80.000 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte

ausgesät, mit dem Differenzierungsreagenz (5 mM Natriumbutyrat) versetzt und über insgesamt 96 h kultiviert. Nach den ersten 24 h erfolgte dabei ein Mediumswechsel (nur 5 % FBS Anteil + 5 mM Natriumbutyrat). Nach weiteren 72 h wurde das Kultivierungsmedium vollständig entfernt und die Zellen mit zweimal je 500 µL PBS gewaschen. Die Testsubstanzen wurden in Glucose- und Serumfreiem DMEM-Flüssigmedium gelöst, welches mit 2-NBDG (Konzentration im Reaktionsansatz: 60 µg/mL, Tab. 2.15) versetzt war, auf die Zellen gegeben und für 10 min damit inkubiert.

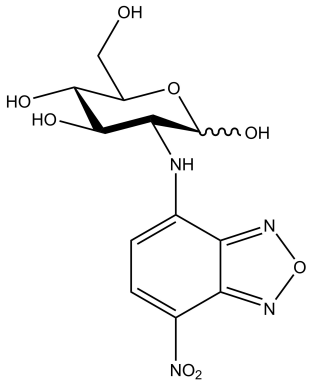


Abbildung 2.8: Chemische Struktur des fluoreszenzmarkierten Glucoseanalogons 2-NBDG

Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Durch Zugabe von 250 µL TrypLE™ Express je Well erfolgte die Trypsinisierung der Zellen für ca. 10 min im Brutschrank bei 37 °C. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden die Zellen zweimal mit je 500 µL PBS versetzt und möglichst vollständig in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei einer Geschwindigkeit von 1000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 150 µL Homogenisierungspuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben gevortext, für 3 min im Ultraschallbad behandelt und für weitere 15 min unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das erhaltene Zelllysat wurde im Anschluss für 15 Minuten bei 4700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im direkten Anschluss erfolgte die fluorimetrische Bestimmung der Glucoseaufnahme. Es wurden hierfür 25 µL des gewonnenen Zelllysats eingesetzt, mit 75 µL Homogenisierungspuffer versetzt und vermessen (Ex/Em = 485/535nm).

Tabelle 2.15: Verwendete Puffer und Lösungen für das zellbasierte Glucoseaufnahme-Assay

	Zusammensetzung
Cell-based Assay NBD Glucose	100 µg/mL 2-NBDG in 1 % (v/v) Ethanol in Serum- und Glucosefreiem DMEM
Homogenisierungspuffer (pH = 7,6)	100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 300 mM KCl 0,1 % Triton X-100
Reinstoffe	300 µM in 0,3 % (v/v) DMSO in Serum- und Glucosefreiem DMEM
Pflanzenextrakte	1 mg/mL in Serum- und Glucosefreiem DMEM

Des Weiteren wurde der Gesamtproteingehalt des erhaltenen Lysats unter Verwendung des BCA-Protein-Assays (siehe Abschnitt 2.2.6) bestimmt und die gemessene Glucoseaufnahme dazu in Relation gesetzt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der behandelten Zellen mit denen unbehandelter Zellen verglichen und die Glucoseaufnahme ermittelt.

2.2.9 Statistische Methoden

Unter Verwendung von SPSS 20 erfolgte die statistische Auswertung der generierten Daten. Zunächst wurde mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung geprüft. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurde anschließend ein zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Zuvor wurde der Levene-Test auf Varianzgleichheit durchgeführt. Bei Vorlage von Varianzgleichheit kam anschließend der t-Test zur Anwendung. Konnte hingegen keine Varianzgleichheit angenommen werden, wurden die Werte des Welch-Tests berücksichtigt. Als Ausreißertests wurden Dean-Dixon und Nalimov verwendet. Zur Auswertung der tierexperimentellen Studien wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei allen statistischen Tests bei $\alpha \leq 0{,}05$. Alle dargestellten Werte bilden den arithmetischen Mittelwert und dessen Standardabweichung, bei normalisierten Daten den Variationskoeffizienten ab.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Enzymaktivitäts-Assays

3.1.1 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Lipase-inhibitorischen Aktivität

Die nachfolgenden Enzymaktivitätsmessungen erfolgten nach der unter Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen Methode.

3.1.1.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen

Da polyphenole Verbindungen, insbesondere Flavonoide und Phenolsäuren, in der Literatur bereits als bekannte Inhibitoren von Enzymen beschrieben wurden [71, 74], erfolgte nach Optimierung des verwendeten *in vitro* Enzymassays die Untersuchung von 23 überwiegend polyphenolischen Reinstoffen auf ihre Pankreaslipase (PL)-inhibitorische Aktivität. Um die Beeinflussung des Enzyms durch das gewählte Lösungsmittel zu kontrollieren, wurden bei allen Untersuchungen 100 %-Aktivitätskontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde Orlistat verwendet (IC_{50}: $0{,}38 \pm 0{,}05$ nM). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 vergleichend zusammengefasst.

Tabelle 3.1: IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von PL (*pig*) und Kategorisierung anhand wichtiger Strukturmerkmale. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon. Angegeben sind MW $\pm$ SD, n ≥ 3.

Substanz	**IC_{50} [µM] Pankreaslipase**	**Substanzklasse**	**OH-Gruppen**	**COOH-Gruppen**	**Zucker-rest**
Chinasäure	12,5 ± 2,2	Carbonsäure	(4)	1	-
Fisetin	20,0 ± 6,3	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Gallussäure	37,3 ± 8,3	Phenolsäure	3	1	-
Chlorogensäure	42,8 ± 8,5	Phenolsäure	2 + (3)	1	-
Apigenin-7-glukosid	55,0 ± 20,5	Flavonoid (Flavon)	2	-	Glc
Rosmarinsäure	63,3 ± 9,5	Phenolsäure	2 + (2)	1	-
Apigenin	63,8 ± 8,8	Flavonoid (Flavon)	3	-	-
Myricetin	68,0 ± 21,0	Flavonoid (Flavonol)	6	-	-
Naringenin	71,3 ± 32,3	Flavonoid (Flavanon)	3	-	-
Rutin	82,0 ± 10,5	Flavonoid (Flavonol)	4	-	Glc, Rha
Rhaponticin	86,3 ± 9,8	Stilben	2	1	Glc
Kaempferol	86,3 ± 12,8	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-

Quercitrin	95,0 ± 9,5	Flavonoid (Flavonol)	4 + (3)	-	Rha
Quercetin	115,8 ± 5,5	Flavonoid (Flavonol)	5	-	-
Isorhamnetin	121,0 ± 43,0	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Kaffeesäure	125,5 ± 2,5	Phenolsäure	2	1	-
Verbascosid	134,0 ± 16,0	Phenylpropanoid	4	-	Glc, Rha
Chrysin	135,5 ± 3,3	Flavonoid (Flavon)	2	-	-
Ferulasäure	143,3 ± 26,3	Phenolsäure	1	1	-
Isoferulasäure	> 150,0	Phenolsäure	1	1	-
2-Hydroxyzimtsäure	> 150,0	Phenolsäure	1	1	-
4-Hydroxyzimtsäure	> 150,0	Phenolsäure	1	1	-
Sinapinsäure	> 150,0	Phenolsäure	1	1	-

OH-Gruppen: Anzahl phenol. + (alkohol.) Hydroxylgruppen, COOH-Gruppen: Anzahl Carboxylgruppen

Die höchste inhibitorische Aktivität zeigte Chinasäure mit einer IC_{50} von 12,5 ± 2,2 µM. Von den untersuchten Flavonoiden wies Fisetin (IC_{50}: 20,0 ± 6,3 µM) die stärkste Inhibition auf. Ein erster Vergleich der Ergebnisse der Flavonoidstrukturen zeigt einen verstärkten Hemmeffekt durch das Vorhandensein von Hydroxylgruppen in Position 3 und 4'. Eine ausführliche, *in silico*-modellbasierte Auswertung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der untersuchten Flavonoide wird in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, sodass an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen wird. Von den untersuchten Phenolsäuren zeigten insbesondere Gallussäure (IC_{50}: 37,3 ± 8,3 µM) und Chlorogensäure (IC_{50}: 42,8 ± 8,5 µM) ein sehr gutes Inhibitionspotential. Ein geringes Hemmvermögen mit einer IC_{50} von > 150,0 µM wiesen hingegen Isoferulasäure, Sinapinsäure sowie 2-Hydroxy- und 4-Hydroxyzimtsäure auf. Damit scheint die Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen einen positiven Einfluss auf die Enzyminhibition der verschiedenen Phenolsäuren zu haben. Je höher die Anzahl phenolischer Hydroxylgruppen im Molekül ist, umso stärker wird das Enzym in seiner Aktivität gehemmt. Weiterhin konnte für die untersuchten Phenolsäuren und das Phenylpropanoid Verbascosid eine Korrelation zwischen der Molekülgröße und der inhibitorischen Aktivität nachgewiesen werden. Kleine Moleküle wie Gallussäure zeigten einen stärkeren Hemmeffekt als größere Verbindungen. Diese Hypothese wird durch das starke Inhibitionspotential von Chinasäure (sehr kleines Molekül) bestätigt. Auch Rhaponticin, das einzige analysierte Stilben, konnte die PL signifikant hemmen (IC_{50}: 86,3 ± 9,8 µM). Weitere Untersuchungen von Stilbenen sind daher zu empfehlen, um das PL-Hemmpotenzial dieser Substanzklasse besser bewerten zu können.

3.1.1.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin

Im Folgenden wurden 32 verschiedene Pflanzen bzw. Pilze der TCM hinsichtlich einer PL inhibitorischen Aktivität analysiert, die bei Erkrankungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels Anwendung finden. Es wurden sowohl wässrige Extrakte getestet, die der traditionellen Herstel-

lungsweise entsprechen, als auch methanolische Extrakte. Die Ergebnisse der PL Inhibition sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Screeningergebnisse der getesteten TCM Pflanzen und Pilze auf PL (*pig*) Inhibition. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon. Die Extraktkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2,5 mg/mL. Angegeben sind MW ± SD, $n \geq 4$.

Pflanze	**Extraktgehalt [g/g Droge] MeOH-Extrakt**	**Extraktgehalt [g/g Droge] Wasserextrakt**	**PL Inhibition [%] MeOH-Extrakt**	**PL Inhibition [%] Wasserextrakt**
Poria cocos (Schw.) Wolf	0,012	0,019	100 ± 0	94,0 ± 1,4
Gardenia jasminoides Ellis	0,116	0,184	100 ± 0	93,8 ± 0,8
Crataegus pinnatifida Bge. var. *major* N.E.Br.	0,129	0,244	100 ± 0	88,4 ± 2,3
Carthamus tinctorius L.	0,086	0,340	100 ± 0	81,6 ± 5,6
Rehmannia glutinosa Libosch	0,239	0,363	100 ± 0	77,7 ± 0,4
Scutellaria baicalensis Georgi	0,178	0,318	100 ± 0	72,3 ± 2,3
Leomurus japonicas Houtt.	0,044	0,066	100 ± 0	65,7 ± 18,6
Dioscorea opposite Thunb.*	-	0,040	100 ± 0	59,4 ± 21,4
Phellodendron chinense Schneid.	0,033	0,060	100 ± 0	59,4 ± 2,4
Lycopus lucidus Turcz. var. *hirtus* Regel	0,035	0,112	100 ± 0	50,2 ± 6,2
Aucklandia lappa Decne.	0,098	0,244	100 ± 0	46,4 ± 7,6
Artactylodes macrocephala Koidz.	0,068	0,560	100 ± 0	25,5 ± 2,4
Agastache rugosus (Fisch. et Mey.) O. Ktze	0,042	0,058	100 ± 0	k.I.
Cyathula officinalis Kuan	0,100	0,276	100 ± 0	k.I.
Pueraria lobata (Willd.) Ohwi	0,111	0,293	100 ± 0	k.I.
Glycyrrhiza uralensis Fisch.	0,035	0,110	100 ± 0	n.b.
Coptis chinensis Franch.	0,099	0,159	98,2 ± 3,1	100 ± 0
Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf.	0,238	0,409	96,9 ± 3,6	k.I.
Anamarrhena asphodeloides Bge.	0,185	0,371	91,8 ± 9,5	43,0 ± 14,3
Trichosanthes kirilowii Maxim.	0,021	0,148	91,4 ± 11,0	44,8 ± 7,7
Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.	0,074	0,139	87,3 ± 4,3	-
Asparagus cochinchinensis (Lour.) Merr.	0,121	0,112	86,7 ± 5,2	30,4 ± 8,0
Aconitum carmichaelii Eebx.	0,047	0,093	86,7 ± 7,7	k.I.
Paeonia lactiflora Pall.	0,175	0,111	84,3 ± 11,7	k.I.

Alisma orientale (Sam.) Juzep.	0,065	0,139	82,2 ± 7,8	42,1 ± 8,7
Scrophularia ningpoensis Hemsl.	0,255	0,379	80,16 ± 3,3	55,4 ± 21,7
Lycium barbarum L.	0,389	0,475	701,0 ± 26,2	k.I.
Ophiopogon japonicas (L.f) Ker-Gawl.	-	-	67,1 ± 6,5	k.I.
Polygonatum kingianum Coll. et Hemsl.*	-	-	34,6 ± 0,6	22,3 ± 0,8
Angelica sinensis (Oliv.) Diels*	0,050	0,102	33,5 ± 10,8	k.I.
Ligusticum chuanxiong Hort.*	0,105	0,083	-	44,6 ± 13,6
Curcuma wenyujin Y. H. Chen et C. Ling	-	0,072	-	61,4 ± 61,4

* Konzentration im Reaktionsansatz: 0,25 mg/mL, da Eigenfluoreszenz zu hoch

- : keine Daten vorhanden, k.I.: keine Inhibition, Extraktgehalt = gewonnener Extrakt [g] aus 1 Gramm Droge

Eine Vielzahl der getesteten Extrakte zeigte eine starke Inhibition der PL. In der Regel besaßen die methanolischen Extrakte ein höheres Hemmpotential auf das Enzym als der jeweilige wässrige Extrakt. Dies lässt vermuten, dass vor allem mäßig polare oder unpolare Verbindungen für die Inhibition des Enzyms verantwortlich sind. Die stärkste Inhibition zeigte der Extrakt aus dem getrockneten Fruchtkörper (Sklerotium) des Pilzes *Poria cocos* (Schw.) Wolf. Der methanolische Extrakt war in der Lage, das Enzym vollständig zu inhibieren, eine Hemmung von 94 % wurde durch den wässrigen Extrakt erzielt. Eine anti-Lipase Aktivität von *Poria cocos* konnte bereits von Roh und Jung (2012) nachgewiesen werden ($12{,}7 \pm 0.5$ % Inhibition bei 100 µg/ml) [6]. Diese verwendeten jedoch einen Extrakt aus der Rinde des Pilzes.

Weiterhin waren die Extrakte von *Gardenia jasminoides* Ellis, *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. und *Carthamus tinctorius* L. sehr aktiv. Der methanolische Extrakt der jeweiligen Pflanze konnte die PL zu 100 % inhibieren. Die jeweiligen wässrigen Extrakte zeigten eine Enzyminhibition > 80 %. Eine PL inhibitorische Aktivität von *Crataegus pinnatifida* wurde bereits durch Lee *et al.* (2012) beschrieben [185]. Ein Extrakt aus den Stämmen und Zweigen der Pflanze zeigte eine Inhibition der PL um 42,5 %. Der Extrakt von *Dioscorea opposite* Thunb musste aufgrund seiner hohen Eigenfluoreszenz im Messwellenlängenbereich gegenüber den anderen Pflanzenextrakten im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Doch auch in diesem Konzentrationsbereich konnte der methanolische Extrakt das Enzym zu 100 % inhibieren. In der Literatur sind bisher keine anti-Lipase Effekte der Pflanze beschrieben. Im Jahr 2005 untersuchten Kim und Kang eine Vielzahl von koreanischen Pflanzen der traditionellen Medizin auf eine PL inhibitorische Wirkung [186]. Eine gezeigte Aktivität der Extrakte von *Rehmannia glutinosa* Libosch und *Trichosanthes kirilowii* Maxim. konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Inhibition > 90 %). Der methanolische Extrakt der Pflanze *Agastache rugosus* (Fisch. et Mey.) O. Ktze zeigte eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität. Der wässrige Extrakt zeigte hingegen keine Inhibition, sodass vermutlich lipophile Bestandteile für die Inhibition des Enzyms

verantwortlich sind.
Da von den untersuchten Pflanzenextrakten eine Vielzahl eine hohe Enzyminhibition bei der untersuchten Konzentration von 2,5 mg/mL zeigten, wurden nachfolgend sechs methanolische Extrakte ausgewählt und hinsichtlich ihres IC_{50}Wertes analysiert. Es wurden vor allem Pflanzen ausgewählt, die in der TCM weit verbreitet sind. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse dieser Messungen sowie die Hauptinhaltsstoffe der Pflanzen dargestellt.

Tabelle 3.3: IC_{50} Werte der ausgewählten methanolischen Extrakte von Pflanzen der TCM zur Inhibition der PL (*pig*). Die Bestimmung der Enzyminhibition erfolgte unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten *in vitro* Assays (Substrat: 4-Methylumbelliferyloleat). Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 3.

Pflanze	**Verwendeter Pflanzenteil**	**Hauptinhaltsstoff(e) [Ref.]**	**IC_{50} [µg/mL]**
Lycopus lucidus TURCZ. var. *hirtus* REGEL	Stamm, Blätter	Triterpene [187]	88,3 ± 4,1
Carthamus tinctorius L.	Corolla	Pigmentes (Carthamin, Precarthamin, Safflower Yellow A und B), Färberdistelöl [187]	90,7 ± 0,9
Trichosanthes kirilowii MAXIM.	Wurzel	Saponine, Organische Säuren, Salze, Zucker und Pigmente [188]	100,4 ± 17,2
Phellodendron chinense SCHNEID.	Rinde	Phenolsäuren (Ferula- und Kaffeesäure), Iso-Vanillin, Berberin [189]	135,7 ± 1,4
Cyathula officinalis KUAN	Wurzel	Phenolsäuren, Isoflavone (Daidzin, Puerarin) [190]	520,1 ± 1,4
Aucklandia lappa DECNE.	Wurzel	Aminosäuren, Inulin, Aplotaxene, Cotuslactone, Sterole [187]	897,2 ± 109,4

Alle getesteten Extrakte waren in der Lage, das Enzym dosisabhängig zu inhibieren. Der methanolische Extrakt von *Lycopus lucidus* zeigte mit einem IC_{50} Wert von 88,3 ± 4,1 µg/mL die stärkste Inhibition. Weiterhin waren die Extrakte von *Carthamus tinctorius*, *Trichosanthes kirilowii* und *Phellodendron chinense* sehr aktiv.

3.1.1.3 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin

Vergleichend zu den getesteten Pflanzen der TCM wurden ebenso Pflanzen der TEM untersucht, denen in der Literatur eine positive Wirkung bei der Behandlung von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechselstörungen zugeschrieben wurde. Da in vielen Fällen jedoch kein Wirkmechanismus bekannt ist, wurden die Pflanzen auf die Inhibition von wichtigen Verdauungsenzymen getestet. Die Ergebnisse zur Inhibition der PL sind in der nachfolgenden Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur Inhibition der PL (*pig*). Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon. Die Extraktkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2,5 mg/mL. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 4.

Pflanze	**Extraktgehalt [g/g Droge] MeOH-Extrakt**	**Extraktgehalt [g/g Droge] Wasserextrakt**	**PL Inhibition [%] MeOH-Extrakt**	**PL Inhibition [%] Wasserextrakt**
Hibiscus sabdariffa L.	0,348	0,491	100 ± 0	100 ± 0
Cinnamomum cassia (L.) Presl	0,128	0,106	100 ± 0	80,8 ± 3,2
Nigella sativa L.	0,386	0,262	100 ± 0	69,0 ± 3,6
Punica granatum L. (Samen)	0,122	0,112	100 ± 0	68,8 ± 21,2
Peumus boldus Molina	0,307	0,284	100 ± 0	59,0 ± 3,1
Vitis vinifera L.	0,141	0,073	100 ± 0	58,6 ± 5,7
Rosmarinus officinalis L.	0,251	0,228	100 ± 0	31,8 ± 8,0
Mentha aquatica L.	0,208	0,24	100 ± 0	29,8 ± 3,6
Olea europaea L.	0,337	0,318	100 ± 0	20,9 ± 5,0
Cynara cardunculus L.	0,345	0,289	100 ± 0	k.I.
Phaseolus vulgaris L.	0,043	0,321	100 ± 0	k.I.
Tamarindus indica L.	0,536	0,462	98,6 ± 0,6	98,2 ± 0,1
Punica granatum L. (Hülsen)	0,334	0,388	97,9 ± 1,6	100 ± 0
Vaccinium myrtillus L.	0,082	0,131	96,8 ± 0,8	68,5 ± 1,2
Artemisia dracunculus L.	0,230	0,362	94,9 ± 2,0	78,4 ± 1,1
Potentilla aurea L.	0,149	0,177	93,3 ± 7,9	58,3 ± 58,3
Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Scheinfrucht)	0,237	0,274	93,2 ± 1,1	k.I.
Opuntia ficus-indica (L.) Mill.	0,157	–	92,8 ± 1,6	38,0 ± 4,7
Sarcopoterium spinosum (L.) Spach	0,176	0,094	92,5 ± 1,5	81,8 ± 3,1
Echium vulgare L.*	0,073	0,169	92,4 ± 3,4	-
Trigonella foenum-graecum L.	0,178	0,086	92,3 ± 3,3	10,4 ± 5,6
Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	0,077	0,313	92,0 ± 5,2	97,4 ± 0,3
Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.	0,049	–	90,9 ± 2,3	58,4 ± 2,8
Melissa officinalis L.	0,155	0,237	90,4 ± 3,2	k.I.
Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Blätter und Blüten)	0,233	0,184	89,1 ± 5,0	45,4 ± 3,1
Allium sativum L.	0,089	0,794	86,3 ± 1,8	9,9 ± 3,2
Ceratonia siliqua L.	0,061	–	86,1 ± 1,9	50,8 ± 2,1
Panax ginseng Mey	0,244	0,103	85,1 ± 9,3	48,8 ± 3,9

Zingiber officinale Roscoe*	0,044	0,073	81,4 ± 14,4	80,1 ± 6,1
Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott	0,546	0,520	72,9 ± 5,1	k.I.

* Konzentration im Reaktionsansatz: 0,25 mg/mL, da Eigenfluoreszenz zu hoch

- : keine Daten vorhanden, k.I.: keine Inhibition, – : keine quantitative Überführung des Extrakts möglich

Extraktgehalt = gewonnener Extrakt [g] aus 1 Gramm Droge

Ein Großteil der analysierten Pflanzenextrakte zeigte eine hohe PL inhibitorische Wirkung bei der getesteten Konzentration von 2,5 mg/mL. Auch hier zeigten die methanolischen Extrakte insgesamt eine stärkere Inhibition als der jeweilige wässrige Extrakt. Ein bereits in der Literatur beschriebener PL inhibitorischer Effekt von *Echium vulgare* L., *Mentha aquatica* L. und *Rosmarinus officinalis* L. konnte bestätigt werden [97, 101]. Für die weiteren Extrakte liegen keine Literaturdaten in Bezug auf eine PL Inhibition vor. Beschriebene hypolipidämische Effekte können daher auf eine Inhibition der Nährstoffhydrolyse zurückzuführen sein. So konnte für *Allium sativum* L., *Crataegus laevigata* (Poir.) DC., *Nigella sativa* L., *Punica granatum* L. und *Vitis vinifera* L. ein TAG-Spiegel senkender Effekt nachgewiesen werden [133, 135, 141, 147]. Eine mögliche Erklärung ist die hier gezeigte PL Inhibition und die damit einhergehende reduzierte bzw. retardierte Nährstoffresorption.

Da viele der Pflanzenextrakte eine starke Enzyminhibition bei der Testkonzentration von 2,5 mg/mL zeigten, wurden nachfolgend acht sehr aktive Extrakte ausgewählt und hinsichtlich ihres IC_{50}Wertes untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Alle getesteten Pflanzenextrakte waren in der Lage, das Enzym dosisabhängig zu inhibieren. Die stärkste PL Inhibition zeigte dabei der methanolische Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. (IC_{50}: 35,8 ± 0,8 µg/mL).

Tabelle 3.5: IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte der TEM zur Inhibition der PL (*pig*)

Pflanze	**Verwendeter Pflanzenteil**	**IC_{50} [µg/mL] Lipase MeOH Extrakt**	**IC_{50} [µg/mL] Lipase Wasserextrakt**
Hibiscus sabdariffa L.	Blüten	35,8 ± 0,8	40,8 ± 6,2
Mentha aquatica L.	Blätter	76,4 ± 1,8	9940,2 ± 80,7
Punica granatum L.	Samen	108,7 ± 12,3	2261,4 ± 372,1
Tamarindus indica L.	Hülsen (Paste)	152,4 ± 6,9	211,6 ± 2,3
Olea europaea L.	Blätter	186,1 ± 12,3	6771,9 ± 478,8
Punica granatum L.	Hülsen	188,3 ± 9,4	187,8 ± 14,2
Rosmarinus officinalis L.	Blätter	196,3 ± 17,4	4597,9 ± 645,3
Peumus boldus Molina	Blätter	217,4 ± 15,1	2268,1 ± 170,6

Hibiscus sabdariffa ist eine in Europa, Asien und Afrika weit verbreitete traditionelle Heilpflanze und wird unter anderem gegen Hypercholesterinämie eingesetzt [191]. Seine positive Wirkung konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden [139, 192, 193]. Weiterhin zeigte der Extrakt

von *Mentha aquatica* L. ein sehr gutes Ergebnis und bestätigt die Beobachtungen von Marelli *et al.* (2014) [97].

3.1.2 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Amylase-inhibitorischen Aktivität

Die nachfolgenden Messungen zur Bestimmung der α-Amylase Aktivität erfolgten nach der in Abschnitt 2.2.1.2 beschriebenen Methode.

3.1.2.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen

Analog zur Bestimmung der Lipase-inhibitorischen Aktivität erfolgte eine Analyse der Inhibition der α-Amylase durch ausgewählte Reinsubstanzen. Als Positivkontrolle wurde Acarbose eingesetzt (IC_{50}: 2,03 ± 0,19 µM). Geordnet nach steigendem IC_{50}-Wert und kategorisiert nach wichtigen Strukturmerkmalen sind die Ergebnisse in Tabelle 3.6 vergleichend dargestellt.

Tabelle 3.6: IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition der α-Amylase (*pig*) und Kategorisierung anhand wichtiger Strukturmerkmale. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung eines Stärke-Analogons. Angegeben sind MW ± SD, $n \geq 3$.

Substanz	**IC_{50} [mM] α-Amylase**	**Substanzklasse**	**OH-Gruppen**	**COOH-Gruppen**	**Zucker-rest**
Rosmarinsäure	0,10 ± 0,01	Phenolsäure	2 + (2)	1	-
Chinasäure	0,10 ± 0,00	Carbonsäure	(4)	1	-
Myricetin	0,14 ± 0,09	Flavonoid (Flavonol)	6	-	-
Chlorogensäure	0,15 ± 0,02	Phenolsäure	2 + (3)	1	-
Gallussäure	0,16 ± 0,02	Phenolsäure	3	1	-
Sinapinsäure	0,17 ± 0,01	Phenolsäure	1	1	-
Isoferulasäure	0,20 ± 0,10	Phenolsäure	1	1	-
4-Hydroxyzimtsäure	0,26 ± 0,01	Phenolsäure	1	1	-
Fisetin	0,26 ± 0,00	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Chrysin	0,27 ± 0,03	Flavonoid (Flavon)	2	-	-
Ferulasäure	0,35 ± 0,10	Phenolsäure	1	1	-
2-Hydroxyzimtsäure	0,36 ± 0,02	Phenolsäure	1	1	-
Kaffeesäure	0,39 ± 0,10	Phenolsäure	2	1	-
Verbascosid	0,55 ± 0,21	Phenylpropanoid	4	-	Glc, Rha
Apigenin	0,62 ± 0,13	Flavonoid (Flavon)	3	-	-
Isorhamnetin	0,69 ± 0,10	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Rhaponticin	0,73 ± 0,16	Stilben	2	1	Glc
Quercetin	0,75 ± 0,03	Flavonoid (Flavonol)	5	-	-
Quercitrin	0,88 ± 0,45	Flavonoid (Flavonol)	4 + (3)	-	Rha
Kaempferol	1,01 ± 0,42	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-

Naringenin	1,05 ± 0,26	Flavonoid (Flavanon)	3	-	-
Rutin	1,08 ± 0,15	Flavonoid (Flavonol)	4	-	Glc, Rha
Apigenin-7-glucosid	4,05 ± 0,22	Flavonoid (Flavon)	2	-	Glc

OH-Gruppen: Anzahl phenol. + (alkohol.) Hydroxylgruppen, COOH-Gruppen: Anzahl Carboxylgruppen

Insgesamt zeigten Verbindungen aus der Substanzklasse der Phenolsäuren die stärkste Inhibition der pankreatischen α-Amylase. Rosmarinsäure war darunter der potenteste Inhibitor mit einer IC_{50} von $0{,}10 \pm 0{,}01$ mM. Aber auch Chlorogensäure, Gallussäure und Sinapinsäure zeigten ein hohes Hemmpotential. Analog zu den Ergebnissen der PL Inhibition korreliert auch hier die Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen mit der inhibitorischen Aktivität. Diese ist umso höher, je mehr phenolische Hydroxylgruppen im Molekül vorhanden sind. Von den untersuchten Flavonoiden war Myricetin (IC_{50}: $0{,}14 \pm 0{,}09$ mM) am aktivsten. Es besitzt die höchste Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen und bestätigt somit die hinsichtlich der Phenolsäuren aufgestellte Hypothese. Jedoch ist im Gegensatz zur Inhibition der PL keine Aussage über bevorzugte Positionen der Hydroxylgruppen möglich. Negativ scheinen sich hingegen zusätzliche Zuckerreste auf die Inhibitionswirkung auszuwirken. Ein direkter Strukturvergleich von Quercetin, Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) und Rutin (Quercetin-3-rutinosid) zeigt eine Abnahme der Inhibition mit Erhöhung der Anzahl an Zuckerresten im Molekül und bestätigt diese Hypothese. Weiterhin zeigt ein Vergleich des Flavons Apigenin mit dem strukturnahen Flavanon Naringenin, dass das Vorhandensein einer Doppelbindung zwischen dem C2- und C3-Atom die Inhibition begünstigt. Chinasäure, welche bereits der stärkste Inhibitor der PL war, zeigte sich auch in Hinsicht auf eine Inhibition der α-Amylase sehr aktiv (IC_{50}: $0{,}10 \pm 0{,}00$ mM). Die schwächste Inhibition der untersuchten Reinstoffe zeigte das Flavonoid Apigenin-7-glucosid mit einer $IC_{50} > 4$ mM. Gründe hierfür sind wahrscheinlich die niedrige Anzahl an phenolischen Hydroxlgruppen und der in Position 7 gebundene Zucker. In Abbildung 3.1 sind aus den Ergebnissen abgeleitete Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoide dargestellt.

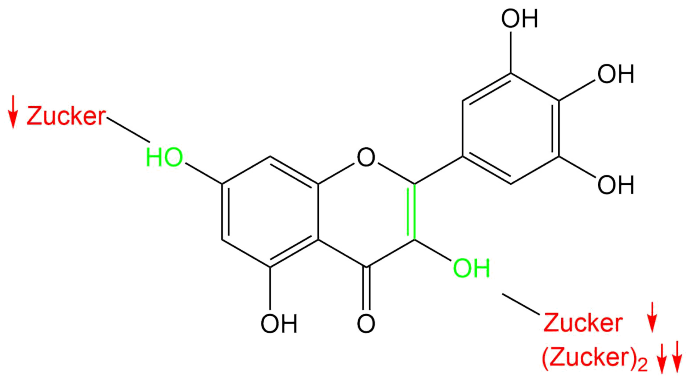


Abbildung 3.1: Schema der Struktur-Wirkungsbeziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der α-Amylase (*pig*), (grün = erhöhte Enzyminhibition, rot: verringerte Enzyminhibition).

3.1.2.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin

Parallel zu den Untersuchungen des Hemmpotentials von Pflanzen der TCM auf die Aktivität der pankreatischen Lipase, wurden die 32 verschiedene Pflanzen bzw. Pilze hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die pankreatische α-Amylase getestet. Die Pflanzen werden gegen Erkrankungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels eingesetzt, ihre Funktionsweise ist jedoch zum Großteil ungeklärt. Die Screeningergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Screeningergebnisse der getesteten TCM Pflanzen und Pilze zur Inhibition der α-Amylase (*pig*). Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung eines Stärkederivats. Die Extraktkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2,5 mg/mL. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 4.

Pflanze	**Extraktgehalt [g/g Droge] MeOH-Extrakt**	**Extraktgehalt [g/g Droge] Wasserextrakt**	**α-Amylase Inhibition [%] MeOH-Extrakt**	**α-Amylase Inhibition [%] Wasserextrakt**
Crataegus pinnatifida Bge. var. *major* N.E.Br.	0,129	0,244	100 ± 0	100 ± 0
Rehmannia glutinosa Libosch	0,239	0,363	100 ± 0	88,6 ± 2,0
Dioscorea opposite Thunb.	-	0,040	99,5 ± 0,7	96,9 ± 4,2
Trichosanthes kirilowii Maxim.	0,021	0,148	99,1 ± 0,7	92,4 ± 1,4
Gardenia jasminoides Ellis	0,116	0,184	95,1 ± 0,4	80,0 ± 4,2
Coptis chinensis Franch.	0,099	0,159	91,6 ± 0,7	82,9 ± 2,3
Artractylodes macrocephala Koidz.	0,068	0,560	89,9 ± 2,1	54,9 ± 6,7
Anemarrhena asphodeloides Bge.	0,185	0,371	88,8 ± 2,0	45,1 ± 3,5
Poria cocos (Schw.) Wolf	0,012	0,019	86,9 ± 4,3	98,0 ± 1,2
Scutellaria baicalensis Georgi	0,178	0,318	85,0 ± 0,4	71,9 ± 4,8
Lycopus lucidus Turcz. var. *hirtus* Regel	0,035	0,112	83,8 ± 1,5	26,7 ± 2,1
Carthamus tinctorius L.	0,086	0,340	80,5 ± 2,7	78,8 ± 3,1
Curcuma wenyujin Y. H. Chen et C. Ling	-	0,072	79,2 ± 4,5	94,3 ± 1,1
Agastache rugosus (Fisch. et Mey.) O. Ktze	0,042	0,058	77,1 ± 3,4	56,1 ± 1,0
Asparagus cochinchinensis (Lour.) Merr.	0,121	0,112	76,9 ± 6,8	52,8 ± 4,1
Ligusticum chuanxiong Hort.	0,105	0,083	74,3 ± 0,40	70,9 ± 4,0
Aconitum carmichaelii Eebx.	0,047	0,093	74,0 ± 3,9	78,2 ± 5,9
Paeonia lactiflora Pall.	0,175	0,111	73,9 ± 4,3	74,8 ± 10,6
Leomurus japonicas Houtt.	0,044	0,066	73,7 ± 2,3	60,5 ± 5,2
Glycyrrhiza uralensis Fisch.	0,035	0,110	72,8 ± 1,9	53,3 ± 2,2
Alisma orientale (Sam.) Juzep.	0,065	0,139	72,4 ± 0,9	92,7 ± 6,5

Cyathula officinalis Kuan	0,100	0,276	72,3 ± 1,8	60,3 ± 1,1
Aucklandia lappa Decne.	0,098	0,244	70,4 ± 1,0	41,2 ± 5,3
Scrophularia ningpoensis Hemsl.	0,255	0,379	67,7 ± 0,7	37,6 ± 1,9
Lycium barbarum L.	0,389	0,475	66,6 ± 1,8	70,5 ± 3,4
Pueraria lobata (Willd.) Ohwi	0,111	0,293	64,9 ± 2,7	66,8 ± 3,7
Polygonatum kingianum Coll. et Hemsl.	-	-	64,2 ± 0,8	46,1 ± 5,2
Angelica sinensis (Oliv.) Diels	0,050	0,102	61,4 ± 4,1	37,5 ± 2,1
Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.	0,074	0,139	58,7 ± 0,7	50,3 ± 4,6
Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf.	0,238	0,409	44,2 ± 3,6	44,3 ± 4,1
Ophiopogon japonicas (L.f) Ker-Gawl.	-	-	44,1 ± 1,3	26,2 ± 5,6
Phellodendron chinense Schneid.	0,033	0,060	-	68,7 ± 2,2

- : keine Daten vorhanden, Extraktgehalt = gewonnener Extrakt [g] aus 1 Gramm Droge

Die Extrakte zeigten insgesamt auf die α-Amylase eine schwächere Inhibition als auf die PL. Es konnte jedoch wieder ein insgesamt höheres Hemmpotential der methanolischen Extrakte beobachtet werden. Die stärkste Inhibition zeigte der Extrakt aus der Frucht von *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br.. Sowohl der wässrige, als auch der methanolische Extrakt waren in der Lage, das Enzym vollständig (100 %) zu inhibieren. Ebenfalls sehr aktiv zeigten sich die Extrakte von *Rehmannia glutinosa* Libosch, *Dioscorea opposite* Thunb. und *Trichosanthes kirilowii* Maxim.. Zu den Pflanzen sind keine Literaturdaten in Bezug auf eine Inhibition der pankreatischen α-Amylase vorhanden. Durch Gao *et al.* (2008) konnte für *Rehmannia glutinosa* lediglich eine Inhibition der α-Glucosidase nachgewiesen werden [194]. Analog zu den Versuchen zur PL Inhibition, wurden im Anschluss an das Screening (Extraktkonzentration von 2,5 mg/mL) sechs methanolische Extrakte ausgewählt und hinsichtlich ihres IC_{50} Wertes analysiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend (Tab. 3.8) dargestellt. Vergleichend zu den Ergebnissen der PL Inhibition, wurde die α-Amylase deutlich schwächer durch die ausgewählten Pflanzenextrakte gehemmt. Der methanolische Etxrakt von *Trichosanthes kirilowii* MAXIM. zeigte mit einem IC_{50}Wert von 248,8 ± 67,3 µg/mL die stärkste Enzyminhibition, liegt damit jedoch deutlich höher als der beste PL-Inhibitor Extrakt (IC_{50}: 88,3 ± 4,1 µg/mL).

Tabelle 3.8: IC_{50} Werte der ausgewählten methanolischen Extrakte von Pflanzen der TCM zur Inhibition der α-Amylase (*pig*). Die Bestimmung der Enzyminhibition erfolgte unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten *in vitro* Assays (Substrat: 4-Methylumbelliferyloleat). Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 3.

Pflanze	**Verwendeter Pflanzenteil**	**Hauptinhaltsstoff(e) [Ref.]**	**IC_{50} [mg/mL]**
Trichosanthes kirilowii MAXIM.	Wurzel	Saponine, Organische Säuren, Salze, Zucker und Pigmente [188]	0,25 ± 0,07
Carthamus tinctorius L.	Corolla	Pigmentes (Carthamin, Precarthamin, Safflower Yellow A und B), Färberdistelöl [187]	0,85 ± 0,16
Lycopus lucidus TURCZ. var. *hirtus* REGEL	Stamm, Blätter	Triterpene [187]	1,01 ± 0,01
Phellodendron chinense SCHNEID.	Rinde	Phenolsäuren (Ferula- und Kaffeesäure), Iso-Vanillin, Berberin [189]	1,85 ± 0,07
Aucklandia lappa DECNE.	Wurzel	Aminosäuren, Inulin, Aplotaxene, Cotuslactone, Sterole [187]	2,00 ± 0,13
Cyathula officinalis KUAN	Wurzel	Phenolsäuren, Isoflavone (Daidzin, Puerarin) [190]	3,18 ± 0,32

3.1.2.3 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin

Es wurden 24 Pflanzen der TEM untersucht, die in der Literatur gegen Erkrankungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels positive Ergebnisse zeigten. Da jedoch in den meisten Fällen keine Wirkmechanismen beschrieben sind, wurde im nachfolgenden (Tab. 3.9) die α-Amylase-inhibitorische Wirkung der wässrigen und methanolischen Extrakte der Pflanzen untersucht.

Tabelle 3.9: Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur α-Amylase (*pig*) Inhibition. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung eines Stärkederivats. Die Extraktkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2,5 mg/mL. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 4.

Pflanze	**Extraktgehalt [g/g Droge] MeOH-Extrakt**	**Extraktgehalt [g/g Droge] Wasserextrakt**	**α-Amylase Inhibition [%] MeOH-Extrakt**	**α-Amylase Inhibition [%] Wasserextrakt**
Hibiscus sabdariffa L.	0,348	0,491	100 ± 0	100 ± 0
Tamarindus indica L.	0,462	0,536	100 ± 0	100 ± 0
Punica granatum L. (Hülsen)	0,334	0,388	99,2 ± 0,9	98,4 ± 1,9
Punica granatum L. (Samen)	0,122	0,112	94,5 ± 5,2	52,5 ± 12,0
Potentilla aurea L.	0,149	0,177	85,9 ± 8,5	65,3 ± 2,4
Rosmarinus officinalis L.	0,251	0,228	74,01 ± 1,1	37,4 ± 3,6
Echium vulgare L.	0,073	0,169	71,7 ± 8,9	17,7 ± 3,4
Peumus boldus MOLINA	0,307	0,284	69,2 ± 4,9	58,7 ± 1,6
Melissa officinalis L.	0,155	0,237	69,0 ± 7,4	4,0 ± 6,8
Olea europaea L.	0,337	0,318	64,3 ± 1,1	32,3 ± 0,8
Crataegus laevigata (POIR.) DC. (Blätter und Blüten)	0,233	0,184	63,2 ± 3,9	39,8 ± 5,6

Zingiber officinale Roscoe	0,044	0,073	62,5 ± 5,4	69,4 ± 12,4
Mentha aquatica L.	0,208	0,240	61,7 ± 5,5	14,0 ± 3,0
Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott	0,546	0,520	58,6 ± 2,0	49,7 ± 3,8
Vaccinium myrtillus L.	0,082	0,131	56,9 ± 3,1	42,7 ± 3,7
Vitis vinifera L.	0,141	0,073	53,7 ± 1,9	63,9 ± 4,3
Nigella sativa L.	0,386	0,262	45,8 ± 5,3	17,0 ± 0,5
Phaseolus vulgaris L.	0,043	0,321	40,9 ± 10,0	k.I.
Cynara cardunculus L.	0,345	0,289	38,0 ± 2,7	5,0 ± 2,2
Allium sativum L.	0,089	0,794	36,6 ± 4,0	44,7 ± 6,4
Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Scheinfrucht)	0,237	0,274	35,4 ± 4,7	41,1 ± 15,3
Cinnamomum cassia (L.) Presl	0,128	0,106	26,4 ± 7,8	k.I.
Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	0,077	0,313	21,3 ± 4,0	31,8 ± 0,7
Trigonella foenum-graecum L.	0,178	0,086	6,0 ± 2,4	13,5 ± 4,1
Sarcopoterium spinosum (L.) Spach	0,176	0,094	k.I.	29,2 ± 2,3
Ceratonia siliqua L.	0,061	–	k.I.	20,6 ± 1,3
Artemisia dracunculus L.	0,230	0,362	k.I.	14,4 ± 3,7
Opuntia ficus-indica (L.) Mill.	0,157	–	k.I.	10,8 ± 1,5
Panax ginseng Mey	0,244	0,103	k.I.	k.I.
Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.	0,049	–	k.I.	k.I.

k.I.: keine Inhibition, – : keine quantitative Überführung des Extrakts möglich

Extraktgehalt = gewonnener Extrakt [g] aus 1 Gramm Droge

Die Pflanzen der TEM zeigten eine sehr gute Inhibition der pankreatischen α-Amylase. Insgesamt konnte erneut eine stärkere Hemmung der methanolischen Pflanzenextrakte beobachtet werden. In der Literatur sind bereits anti-Amylase Wirkungen für die Extrakte von *Cynara cardunculus* L., *Melissa officinalis* L., *Phaseolus vulgaris* L. und *Tamarindus indica* L. beschrieben [17, 140, 146], die in dieser Arbeit bestätigt werden konnten. Für einige der analysierten Pflanzen sind zwar hypoglykämische und antidiabetische Effekte beschrieben, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch ungeklärt. So ist eine Blutglucosekonzentration senkende Wirkung durch Extrakte von *Olea europaea* L., *Peumus boldus* Molina, *Punica granatum* L., *Trigonella foenum-graecum* L. und *Vaccinium myrtillus* L. bekannt [137, 138, 140, 142, 147]. Eine Inhibition der α-Amylase und die damit einhergehende reduzierte Kohlenhydratresorption ist eine mögliche Erklärung für die Blutzucker senkende Wirkung der Pflanzen.

Analog zum PL-Screening, wurden acht Extrakte ausgewählt, die bei der Testkonzentration von 2,5 mg/mL eine sehr gute Hemmung der α-Amylase zeigten und hinsichtlich ihres IC_{50} Wertes analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte der TEM zur Inhibition der α-Amylase (*pig*)

Pflanze	**Verwendeter Pflanzenteil**	**IC_{50} [mg/mL] α-Amylase MeOH Extrakt**	**IC_{50} [mg/mL] α-Amylase Wasserextrakt**
Hibiscus sabdariffa L.	Blüten	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Tamarindus indica L.	Hülsen (Paste)	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Punica granatum L.	Hülsen	0,24 ± 0,01	0,61 ± 0,08
Rosmarinus officinalis L.	Blätter	0,82 ± 0,05	5,09 ± 0,15
Olea europaea L.	Blätter	0,85 ± 0,41	4,55 ± 0,05
Punica granatum L.	Samen	1,10 ± 0,03	4,28 ± 0,07
Peumus boldus Molina	Blätter	1,53 ± 0,06	2,14 ± 0,50
Mentha aquatica L.	Blätter	2,37 ± 0,18	> 10,0

Alle getesteten Pflanzenextrakte waren in der Lage, das Enzym dosisabhängig zu inhibieren. Die stärkste α-Amylase Inhibition zeigte der methanolische Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. (IC_{50}: 29,3 ± 0,5 µg/mL). Bereits die PL konnte durch den Hibiskus-Extrakt am stärksten in ihrer Aktivität gehemmt werden. Weiterhin waren der wässrige und methanolische Extrakt von *Tamarindus indica* L. sehr aktiv. Der wässrige Extrakt dieser Pflanze wurde bereits von Azman *et al.* (2012) im Tiermodell näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Extrakt von *Tamarindus indica* die Plasmakonzentrationen von Cholesterol, LDL und TAGs signifikant senken und damit einhergehend eine Gewichtsreduktion erreichen konnte.

3.1.3 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der α-Glucosidase-inhibitorischen Aktivität von Reinstoffen

Die Enzymaktivitätsmessungen zur Bestimmung des inhibitorischen Potentials ausgewählter Reinstoffe auf die Aktivität der α-Glucosidase erfolgten nach der unter Abschnitt 2.2.1.3 beschriebenen Methode. Es wurden 23 überwiegend polyphenolische Verbindungen analysiert (Tab. 3.11). Als Positivkontrolle diente Miglitol (IC_{50}: 12,08 ± 2,45 µM).

Tabelle 3.11: IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von α-Glucosidase (*pig*) und Zuordnung wichtiger Strukturmerkmale. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 3.

Substanz	**IC_{50} [mM] α-Glucosidase**	**Substanzklasse**	**OH-Gruppen**	**COOH-Gruppen**	**Zucker-rest**
Myricetin	0,16 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	6	-	-
Apigenin	0,16 ± 0,01	Flavonoid (Flavon)	3	-	-
Isorhamnetin	0,19 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Quercetin	0,20 ± 0,02	Flavonoid (Flavonol)	5	-	-
Apigenin-7-glucosid	0,21 ± 0,01	Flavonoid (Flavon)	2	-	Glc
Kaempferol	0,21 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-

Quercitrin	0,22 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4 + (3)	-	Rha
Rutin	0,24 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	Glc, Rha
Verbascosid	0,31 ± 0,04	Phenylpropanoid	4	-	Glc, Rha
Fisetin	0,34 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Rosmarinsäure	0,40 ± 0,03	Phenolsäure	2 + (2)	1	-
Chrysin	0,41 ± 0,03	Flavonoid (Flavon)	2	-	-
Chlorogensäure	0,64 ± 0,03	Phenolsäure	2 + (3)	1	-
Rhaponticin	0,70 ± 0,06	Stilben	2	1	Glc
Naringenin	1,54 ± 0,03	Flavonoid (Flavanon)	3	-	-
Kaffeesäure	2,89 ± 0,31	Phenolsäure	2	1	-
Sinapinsäure	3,29 ± 0,18	Phenolsäure	1	1	-
Gallussäure	3,99 ± 0,29	Phenolsäure	3	1	-
Ferulasäure	4,44 ± 0,37	Phenolsäure	1	1	-
Isoferulasäure	5,82 ± 0,60	Phenolsäure	1	1	-
2-Hydroxyzimtsäure	6,20 ± 0,16	Phenolsäure	1	1	-
4-Hydroxyzimtsäure	7,76 ± 0,14	Phenolsäure	1	1	-
Chinasäure	13,91 ± 1,13	Carbonsäure	(4)	1	-

OH-Gruppen: Anzahl phenol. + (alkohol.) Hydroxylgruppen, COOH-Gruppen: Anzahl Carboxylgruppen

Insgesamt zeigte das Flavonoid Myricetin, welches die meisten phenolischen Hydroxylgruppen aufweist, die stärkste Inhibition der α-Glucosidase mit einer IC_{50} von $0{,}16 \pm 0{,}01$ mM. Anders als jedoch zu den Ergebnissen der pankreatischen α-Amylase, waren vor allem Flavonoid-Verbindungen inhibitorisch sehr aktiv. Hier sind Apigenin und Isorhamnetin als sehr aktive Verbindungen zu nennen. Dabei zeigt ein Strukturvergleich zwischen dem Flavon Apigenin und dem strukturell ähnlichen Flavanon Naringenin, dass eine Doppelbindung zwischen dem C2- und C3-Atom die inhibitorische Aktivität stark begünstigt. Apigenin weist eine um den Faktor 10 stärkere Enzyminhibition auf. Zuckerreste wirken sich hingegen negativ auf die Hemmung des Enzyms aus. Sowohl Apigenin-7-glucosid als auch Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) sowie Rutin (Quercetin-3-rutinosid) zeigten eine deutlich schlechtere Inhibition als ihr jeweiliges Aglykon. Weiterhin wirkt sich eine Hydroxylgruppe in Position 3 begünstigend auf eine Enzymhemmung auf, da überwiegend Flavonoide mit einer Flavonol-Struktur hohe Inhibitionen zeigten. In Abbildung 3.2 sind die abgeleiteten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoide auf die α-Glucosidase dargestellt.

Phenolsäuren zeigten hingegen eine deutlich geringere Aktivität. Vor allem die Hydroxyzimtsäurederivate Ferula-, Isoferula- und 2- bzw. 4-Hydroxyzimtsäure waren nur sehr schwach inhibierend (IC_{50}> 4 mM). Das mit Abstand geringste Hemmpotential zeigte die Carbonsäure Chinasäure (IC_{50}> 13 mM). Chlorogensäure (zwei Hydroxylgruppen im Molekül) weist mit einer IC_{50} von $0{,}64 \pm 0{,}03$ mM die höchste Enzyminhibition innerhalb der Phenolsäuren auf. Die am wenigsten aktive Verbindung Chinasäure besitzt keine phenolische Hydroxylgruppe im Molekül, was eine

positive Beeinflussung des Inhibitionsvermögens durch das Vorhandensein einer bzw. mehrerer aromatischer Hydroxylgruppen im Molekül vermuten lässt.

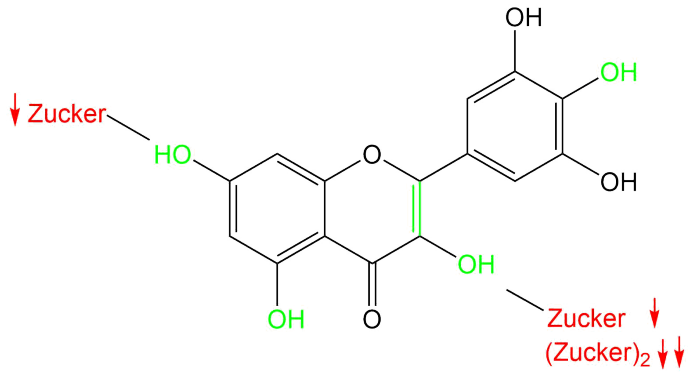


Abbildung 3.2: Schema der Struktur-Wirkungsbeziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der α-Glucosidase (*pig*), (grün = erhöhte Enzyminhibition, rot: verringerte Enzyminhibition).

3.1.4 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der ALP-inhibitorischen Aktivität von Reinstoffen

Die Bestimmungen der Enzymaktivität erfolgten nach der unter Abschnitt 2.2.1.4 beschriebenen Methode. Es wurden insgesamt 23 Reinstoffe in Hinsicht auf eine Inhibition der intestinalen Alkalische Phosphatase (ALP) analysiert. Die ermittelten IC_{50} Konzentrationen sind in der nachfolgenden Tabelle 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12: IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition der Alkalischen Phosphatase (*pig*) und Zuordnung wichtiger Strukturmerkmale. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferylphosphat. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 3.

Substanz	**IC_{50} [mM] ALP**	**Substanzklasse**	**OH-Gruppen**	**COOH-Gruppen**	**Zucker-rest**
Myricetin	0,20 ± 0,02	Flavonoid (Flavonol)	6	-	-
Kaempferol	0,22 ± 0,00	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Apigenin-7-glucosid	0,23 ± 0,03	Flavonoid (Flavon)	2	-	Glc
Rutin	0,24 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	Glc, Rha
Apigenin	0,24 ± 0,01	Flavonoid (Flavon)	3	-	-
Quercitrin	0,24 ± 0,02	Flavonoid (Flavonol)	4 + (3)	-	Rha
Quercetin	0,25 ± 0,02	Flavonoid (Flavonol)	5	-	-
Isorhamnetin	0,25 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Fisetin	0,27 ± 0,01	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Verbascosid	0,42 ± 0,03	Phenylpropanoid	4	-	Glc, Rha
Chrysin	0,43 ± 0,03	Flavonoid (Flavon)	2	-	-
Chlorogensäure	0,50 ± 0,04	Phenolsäure	2 + (3)	1	-
Rosmarinsäure	0,54 ± 0,01	Phenolsäure	2 + (2)	1	-

Naringenin	1,25 ± 0,04	Flavonoid (Flavanon)	3	-	-
Rhaponticin	1,70 ± 0,16	Stilben	2	1	Glc
Kaffeesäure	2,43 ± 0,18	Phenolsäure	2	1	-
Sinapinsäure	2,68 ± 0,24	Phenolsäure	1	1	-
Ferulasäure	3,93 ± 0,13	Phenolsäure	1	1	-
Isoferulasäure	5,04 ± 0,14	Phenolsäure	1	1	-
2-Hydroxyzimtsäure	5,16 ± 0,11	Phenolsäure	1	1	-
4-Hydroxyzimtsäure	5,45 ± 0,09	Phenolsäure	1	1	-
Chinasäure	13,63 ± 0,21	Carbonsäure	(4)	1	-
Gallussäure	nicht auswertbar	Phenolsäure	3	1	-

OH-Gruppen: Anzahl phenol. + (alkohol.) Hydroxylgruppen, COOH-Gruppen: Anzahl Carboxylgruppen

Analog zu den Ergebnissen der α-Amylase- und α-Glucosidase-Aktivitätsbestimmung zeigte das Flavonoid Myricetin mit 6 phenolischen Hydroxylgruppen auch hinsichtlich der ALP das stärkste Hemmpotential (IC_{50}: $0{,}20 \pm 0{,}02$ mM). Weitere Flavonoide mit einer hohen ALP-inhibitorischen Aktivität waren Kaempferol und Apigenin-7-glucosid. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass mit abnehmender Anzahl an Hydroxylgruppen auch das inhibitorische Potential der Flavonoid-Strukturen abnimmt. Zusätzlich gebundene Zucker begünstigen hingegen die Inhibition des Enzyms, wobei die im Zuckerrest gebundenen Hydroxylgruppen vermutlich keinen Einfluss haben. Diese Hypothesen können durch einen direkten Struktur-Vergleich von Quercetin und Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) belegt werden. Obwohl Quercetin eine phenolische Hydroxylgruppe weniger besitzt, kann durch die zusätzlich gebundene Rhamnose ein ähnlicher IC_{50}Wert erreicht werden. Rutin (Quercetin-3-rutinosid) mit der zusätzlich gebundenen Glucose ist im Vergleich dazu noch einmal aktiver. Weiterhin macht der Vergleich des Flavons Apigenin mit dem strukturnahen Flavanon Naringenin deutlich, dass das Vorhandensein einer Doppelbindung zwischen dem C2- und C3-Atom die Enzyminhibition begünstigt. Beide Verbindungen besitzen die gleiche Anzahl an Hydroxylgruppen und unterscheiden sich lediglich anhand ihrer Doppelbindung in C3-Position. Auch die Hydroxylgruppe in C3-Position scheint eine ALP-Inhibition zu begünstigen, da fast ausschließlich Flavonol-Strukturen die stärkste Hemmung des Enzyms aufwiesen. Die ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abbildung 3.3 graphisch dargestellt.
Vergleichend dazu zeigten die Vertreter aus der Stoffklasse der Phenolsäuren insgesamt eine schwache Enzyminhibition, wobei Chlorogen- und Rosmarinsäure noch die stärkste Hemmung aufzeigten. Sehr inaktiv waren hingegen Isoferula-, 2- und 4-Hydroxyzimtsäure ($IC_{50} > 5$ mM). Das deutlich geringste Hemmpotential zeigte die Carbonsäure Chinasäure ($IC_{50} > 13$ mM). Eine mögliche Erklärung liegt in der deutlich erniedrigten Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen. Es lässt sich auch hier erkennen, dass Verbindungen mit zwei phenolischen Hydroxylgruppen im Molekül (z.B. Chlorogen- und Rosmarinsäure) eine stärkere Inhibition aufzeigten als solche mit lediglich einer (z.B. Ferulasäure, 4-Hydroxyzimtsäure) bzw. keiner (Chinasäure).

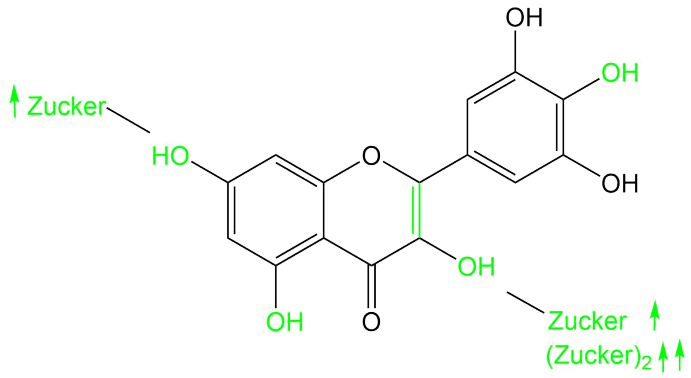


Abbildung 3.3: Schema der Struktur-Wirkungsbeziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (*pig*), (grün = erhöhte Enzyminhibition).

3.1.5 Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Protease-inhibitorischen Aktivität

Die nachfolgenden Enzymaktivitätsmessungen erfolgten nach der unter Abschnitt 2.2.1.5 beschriebenen Methode. Die Inhibition pankreatischer Proteasen spielt für die Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle. Dennoch wurde auch das Protease-inhibitorische Potential von Reinstoffen und Pflanzen der TEM analysiert. Da es sich bei allen getesteten Enzymen um Hydrolasen handelt, ist eine Inhibition durch strukturverwandte Verbindungen möglich und soll hiermit untersucht werden.

3.1.5.1 IC_{50} Bestimmung von Reinstoffen

Es wurden insgesamt 23 Reinstoffe hinsichtlich eines Protease-inhibitorischen Potentials analysiert. Als Positivkontrolle wurde 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF, IC_{50}: $1{,}652 \pm 0{,}098$ mM) eingesetzt. Geordnet nach steigendem IC_{50}-Wert und kategorisiert nach wichtigen Strukturmerkmalen sind die Ergebnisse in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.13: IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von Proteasen (*pig*) und Zuordnung wichtiger Strukturmerkmale. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung eines Casein-Analogons. Angegeben sind MW ± SD, $n \geq 3$.

Substanz	**IC_{50} [mM] Proteasen**	**Substanzklasse**	**OH-Gruppen**	**COOH-Gruppen**	**Zuckerrest**
Rosmarinsäure	1,21 ± 0,06	Phenolsäure	2 + (2)	1	-
Chinasäure	1,30 ± 0,05	Carbonsäure	(4)	1	-
Chlorogensäure	1,33 ± 0,07	Phenolsäure	2 + (3)	1	-
Ferulasäure	1,60 ± 0,17	Phenolsäure	1	1	-
4-Hydroxyzimtsäure	1,71 ± 0,02	Phenolsäure	1	1	-
Isoferulasäure	1,76 ± 0,13	Phenolsäure	1	1	-
2-Hydroxyzimtsäure	1,77 ± 0,02	Phenolsäure	1	1	-

Gallussäure	1,79 ± 0,03	Phenolsäure	3	1	-
Sinapinsäure	1,83 ± 0,03	Phenolsäure	1	1	-
Kaffeesäure	1,91 ± 0,07	Phenolsäure	2	1	-
Apigenin	1,96 ± 0,03	Flavonoid (Flavon)	3	-	-
Fisetin	2,64 ± 0,11	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Isorhamnetin	3,35 ± 0,18	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Quercetin	7,24 ± 0,58	Flavonoid (Flavonol)	5	-	-
Naringenin	7,62 ± 0,07	Flavonoid (Flavanon)	3	-	-
Quercitrin	9,29 ± 0,33	Flavonoid (Flavonol)	4 + (3)	-	Rha
Myricetin	10,78 ± 0,18	Flavonoid (Flavonol)	6	-	-
Rutin	14,43 ± 1,51	Flavonoid (Flavonol)	4	-	Glc, Rha
Rhaponticin	> 15,0	Stilben	2	1	Glc
Apigenin-7-glucosid	> 15,0	Flavonoid (Flavon)	2	-	Glc
Kaempferol	IC_{28}: 2,50 ± 0,51	Flavonoid (Flavonol)	4	-	-
Chrysin	nicht auswertbar	Flavonoid (Flavon)	2	-	-
Verbascosid	nicht auswertbar	Phenylpropanoid	4	-	Glc, Rha

OH-Gruppen: Anzahl phenol. + (alkohol.) Hydroxylgruppen, COOH-Gruppen: Anzahl Carboxylgruppen

Von den untersuchten Reinstoffen zeigten überwiegend Phenolsäuren eine gute Inhibition des Enzyms. Rosmarinsäure war mit einer IC_{50} von $1{,}21 \pm 0{,}06$ mM der stärkste Inhibitor. Chinasäure und Chlorogensäure zeigten ebenfalls ein gutes Hemmpotential. Da auch die Verbindung Chinasäure sehr aktiv ist, lassen sich hinsichtlich der Proteasen keine Rückschlüsse bezüglich des Einflusses phenolischer Hydroxylgruppen ziehen. Auch scheint die Molekülgröße im Vergleich zu der PL keinen Einfluss zu haben. Innerhalb der Substanzklasse der Flavonoide ist das Flavon Apigenin mit einer IC_{50} von $1{,}96 \pm 0{,}03$ mM der stärkste Enzyminhibitor. Da Apigenin wiederum deutlich aktiver als das strukturverwandte Naringenin ist, begünstigt eine Doppelbindung in C3-Position scheinbar die Inhibition der Proteasen. Zuckerreste im Molekül verschlechtern hingegen die Hemmung der Enzyme, da das Aglykon Quercetin (IC_{50}: $7{,}24 \pm 0{,}58$ mM) deutlich aktiver ist als Quercitrin (IC_{50}: $9{,}29 \pm 0{,}33$ mM; zusätzlich Rhamnose gebunden) und Rutin (IC_{50}: $14{,}43 \pm 1{,}51$ mM; zusätzlich Glucose und Rhamnose gebunden). Auch Apigenin-7-glucosid (IC_{50}> 15 mM) ist deutlich inaktiver als sein Aglykon Apigenin. Die Ergebnisse der ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind nachfolgend (Abb. 3.4) dargestellt.
Insgesamt sind die ermittelten IC_{50} Konzentrationen jedoch deutlich höher als bei den anderen Enzymassays. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass es sich bei den Proteasen aus Pankreatinpulver um ein Enzymgemisch (Trypsin, Chymotrypsin, Elastasen) handelt. Eine Inhibition aller Enzyme durch eine Substanz ist deutlich schwieriger, als wenn es sich um ein einzelnes Enzym handelt. Belegt wird diese Theorie durch die relativ hohe IC_{50} der Positivkontrolle AEBSF. Eine vergleichende Übersicht der ermittelten IC_{50} Werte aller getesteten Enzyme ist in Abschnitt 3.1.6 dargestellt.

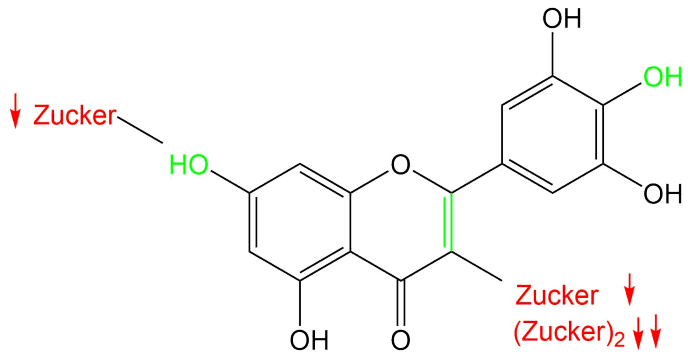


Abbildung 3.4: Schema der Struktur-Wirkungsbeziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der Pankreasproteasen (*pig*), (grün = erhöhte Enzyminhibition, rot: verringerte Enzyminhibition).

3.1.5.2 Screening von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin

Analog zur Bestimmung des Inhibitionspotentials von Pflanzen der TEM auf die Aktivität der pankreatischen Lipase und α-Amylase, erfolgte eine Untersuchung ihres Einflusses auf die Aktivität der pankraetischen Proteasen. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt (Tab. 3.14).

Tabelle 3.14: Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur Inhibition von pankraetischen Proteasen (*pig*). Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung eines Caseinderivats. Die Extraktkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2,5 mg/mL. Angegeben sind MW ± SD, n ≥ 4.

Pflanze	**Extraktgehalt [g/g Droge] MeOH-Extrakt**	**Extraktgehalt [g/g Droge] Wasserextrakt**	**Protease Inhibition [%] MeOH-Extrakt**	**Protease Inhibition [%] Wasserextrakt**
Hibiscus sabdariffa L.	0,348	0,491	100,0 ± 0	99,2 ± 1,0
Tamarindus indica L.	0,462	0,536	98,0 ± 0,7	97,2 ± 0,8
Punica granatum L. (Hülsen)	0,334	0,388	52,9 ± 8,6	36,0 ± 4,4
Nigella sativa L.	0,386	0,262	48,7 ± 4,0	73,9 ± 1,1
Rosmarinus officinalis L.	0,251	0,228	33,8 ± 8,4	47,1 ± 3,1
Vaccinium myrtillus L.	0,082	0,131	30,0 ± 2,4	48,1 ± 2,5
Cinnamomum cassia (L.) Presl	0,128	0,106	21,5 ± 3,7	k.I.
Sarcopoterium spinosum (L.) Spach	0,176	0,094	18,8 ± 8,3	63,8 ± 15,4
Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Blätter und Blüten)	0,233	0,184	11,0 ± 0,5	k.I.
Melissa officinalis L.	0,155	0,237	4,6 ± 3,7	31,2 ± 1,22
Phaseolus vulgaris L.	0,043	0,321	k.I.	86,7 ± 1,8
Potentilla aurea L.	0,149	0,177	k.I.	71,8 ± 2,4
Peumus boldus Molina	0,307	0,284	k.I.	36,8 ± 1,5
Mentha aquatica L.	0,208	0,240	k.I.	35,5 ± 13,8
Olea europaea L.	0,337	0,318	k.I.	26,9 ± 4,4
Trigonella foenum-graecum L.	0,178	0,086	k.I.	20,3 ± 1,3

Cynara cardunculus L.	0,345	0,289	k.I.	13,4 ± 10,0
Allium sativum L.	0,089	0,794	k.I.	k.I.
Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott	0,546	0,520	k.I.	k.I.
Artemisia dracunculus L.	0,230	0,362	k.I.	k.I.
Ceratonia siliqua L.	0,061	–	k.I.	k.I.
Crataegus laevigata (Poir.) DC. Scheinfrucht (Beere)	0,237	0,274	k.I.	k.I.
Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.	0,049	–	k.I.	k.I.
Echium vulgare L.	0,073	0,169	k.I.	k.I.
Opuntia ficus-indica (L.) Mill.	0,157	–	k.I.	k.I.
Panax ginseng Mey	0,244	0,103	k.I.	k.I.
Punica granatum L. (Samen)	0,122	0,112	k.I.	k.I.
Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry	0,077	0,313	k.I.	k.I.
Vitis vinifera L.	0,141	0,073	k.I.	k.I.
Zingiber officinale Roscoe	0,044	0,073	k.I.	k.I.

k.I.: keine Inhibition, – : keine quantitative Überführung des Extrakts möglich

Extraktgehalt = gewonnener Extrakt [g] aus 1 Gramm Droge

Die Ergebnisse zeigen, dass die pankreatischen Proteasen deutlich schwächer durch die Pflanzenextrakte der TEM inhibiert wurden als die pankraetische Lipase und α-Amylase. Ausnahme war jedoch auch hier der methanolische Extrakt aus den Blüten von *Hibiscus sabdariffa* L., der eine Enzyminhibition von 100 % auswies. Bereits 1995 konnten Abu-Tarboush und Ahmed eine inhibitorische Wirkung von *Hibiscus sabdariffa* auf die Aktivität von Trypsin und Chymotrypsin nachweisen [195] und bestätigen damit die erzielten Ergebnisse. Weiterhin sehr aktiv waren sowohl der wässrige Extrakt mit einer Inhibition von 97 % als auch methanolische Extrakt mit 98 % Inhibition von *Tamarindus indica* L.. Aus der Pflanze konnten bereits verschiedene Serinprotease-Inhibitoren identifiziert werden [196, 197]. Für weitere Studien wäre es interessant, ob die isolierten Proteaseinhibitoren ebenso in der Lage sind, die pankreatische Lipase und α-Amylase zu inhibieren, da auch hier sehr gute Ergebnisse durch die Pflanze *Tamarindus indica* erzielt wurden. Zahlreiche andere Pflanzen zeigten hingegen keine Inhibition bei der Testkonzentration von 2,5 mg/mL und stellen somit keinen Ansatz für weitere Forschungen dar.

Da der methanolische Extrakt aus den Blüten von *Hibiscus sabdariffa* L. für alle pankreatischen Enzyme (Lipase, Amylase, Proteasen) ein sehr starkes Inhibitionsvermögen zeigte, wurde dieser anschließend mittels HPLC und ESI-Q-TOF-MS zur Identifikation inhibitorisch wirksamer Inhaltsstoffe näher analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.3.2 und 3.4 aufgeführt.

3.1.6 Vergleichende Darstellung des Inhibitionspotentials von Reinstoffen und Pflanzenextrakten auf die Aktivität von Verdauungsenzymen

3.1.6.1 Inhibitionspotential von Reinstoffen

Zur Beurteilung des inhibitorischen Potentials der untersuchten Reinstoffe auf die Aktivität aller getesteten Enzyme (PL, α-Amylase,α-Glucosidase, ALP, Proteasen) wurden den ermittelten IC_{50} Werten Ränge zugeordnet und anschließend eine Rangsumme gebildet. Substanzen mit niedrigen IC_{50} Werten wurden kleine Ränge zugeordnet. Diese Darstellungsmöglichkeit wurde gewählt, da die ermittelten IC_{50} Werte der verschiedenen Testsysteme nicht direkt miteinander vergleichbar sind (Abhängigkeit von Substrat, Puffer, u.a.). Eine detaillierte Beschreibung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Polyphenole ist in den Abschnitten 3.1.1 - 3.1.5 erläutert.

Einfluss auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels Eine vergleichende Darstellung für die Enzyme mit amylytischer Aktivität ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Es ist erkennbar, dass vor allem das Flavonoid Myricetin eine gute Hemmwirkung auf die für den Kohlenhydratstoffwechsel essentiellen Enzyme α-Amylase und α-Glucosidase hat. Die starke Inhibition der Enzyme ist sehr wahrscheinlich bedingt durch die hohe Anzahl phenolischer Hydroxylgruppen im Molekül sowie nicht vorhandener Zucker. Weiterhin zeigte die Phenolsäure Rosmarinsäure ein gutes Inhibitionspotential, wobei die α-Amylase deutlich stärker gehemmt wurde. Eine insgesamt gering ausgeprägte Inhibition zeigte hingegen das Flavonoid Naringenin.

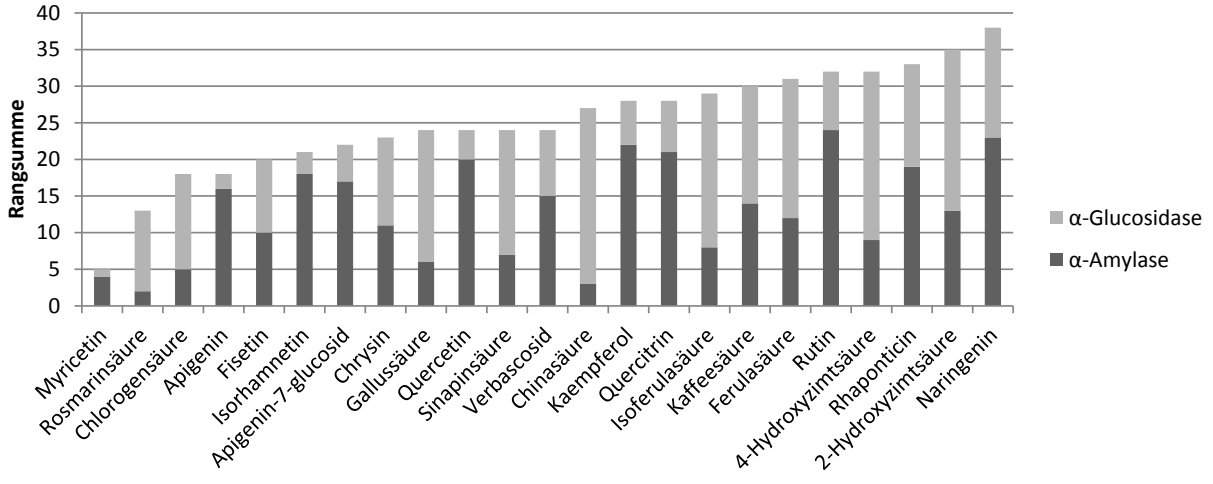


Abbildung 3.5: Vergleichende Darstellung der ermittelten Rangsummen der Enzyme mit amylytischer Aktivität. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den experimentell ermittelten IC_{50}Werten. Kleine Ränge entsprechen niedrigen IC_{50} Konzentrationen.

Aus der Abbildung wird jedoch deutlich, dass Unterschiede in der strukturellen Inhibition der beiden Enzyme vorliegen. Mit Ausnahme von Myricetin werden die amylytischen Enzyme durch die Stoffe unterschiedlich stark inhibiert, sodass eine optimale Inhibition nur durch Kombination der Verbindungen (z.B. Myricetin und Apigenin) möglich ist.

Einfluss auf Schlüsselenzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels Die pankreatischen α-Amylasen und Lipasen sind Schlüsselenzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels und stellen für eine Behandlung metabolischer Stoffwechselstörungen (Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2) ein wichtiges Target dar. Ein großes Interesse kommt daher solchen Substanzen zu, die in der Lage sind beide Enzyme zu inhibieren. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, zeigen besonders Chinasäure und die Phenolsäuren Rosmarin-, Chlorogen- und Gallussäure ein hohes inhibitorisches Potential. Auch die Flavonoide Fisetin und Myricetin zeigen ein gutes Ergebnis.

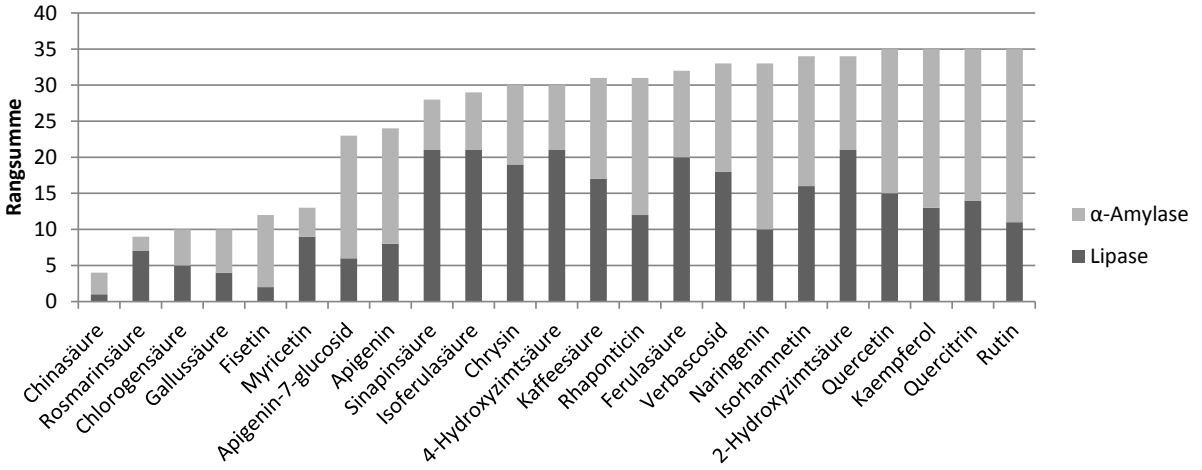


Abbildung 3.6: Vergleich des Inhibitionspotentials auf PL und α-Amylase Aktivität. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den experimentell ermittelten IC_{50}Werten. Niedrigen IC_{50} Konzentrationen wurden kleine Ränge zugeordnet.

Es zeigen sich insbesondere Verbindungen mit einem hohen Anteil an phenolischen Hydroxylgruppen sowie kleine Moleküle besonders aktiv. Eine gleichzeitige Inhibition der Enzyme ist daher möglich und stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus dar.

Einfluss auf alle analysierten Verdauungsenzyme Nachfolgend ist eine vergleichende Übersicht (Abb. 3.7) für alle getesteten Enzyme dargestellt. Auch hier zeigte das Flavonoid Myricetin eine gute Hemmwirkung, lediglich bei den Proteasen war sie etwas schwächer ausgeprägt, welche sich vorrangig durch Phenolsäuren inhibieren ließen. Neben Myricetin zeigten ebenso die Phenolsäuren Rosmarin- und Chlorogensäure ein gutes Ergebnis. Aus der Abbildung wird jedoch ersichtlich, dass die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass Naturstoffe mit ähnlicher Struktur auch vergleichbare Effekte auf die Enzyme des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels haben, nicht bestätigt werden konnte. Einige Strukturmerkmale (Anzahl phenolischer Hydroxylgruppen, Doppelbindung in Position 3 bei den Flavonoiden) wirken sich zwar auf die meisten Enzyme positiv hinsichtlich einer Inhibition aus, jedoch sind vor allem Einflüsse der Substanzklassen und der im Molekül gebundenen Zucker unterschiedlich. Daher ist eine Kombination unterschiedlicher Verbindungen notwendig, um eine breite Enzyminhibition zu erreichen.

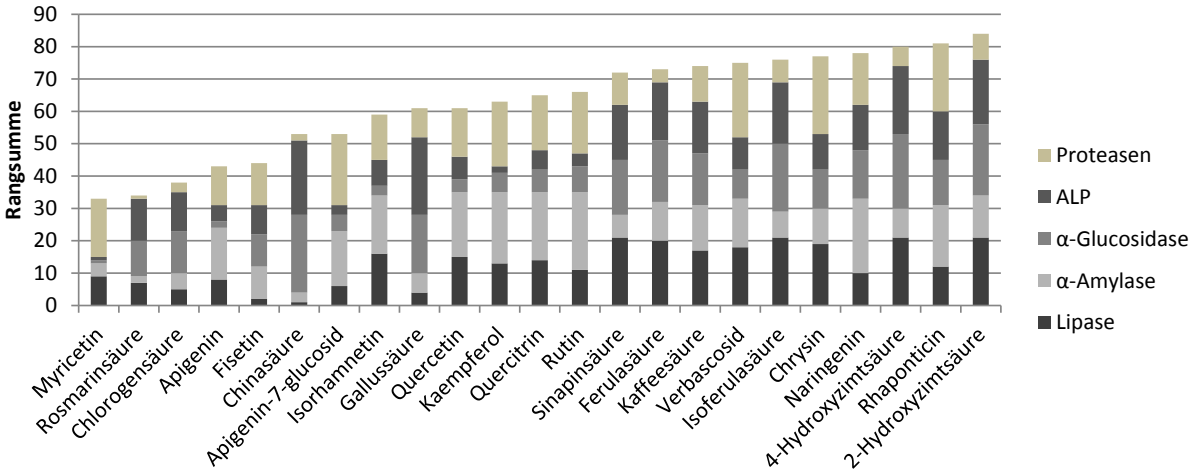


Abbildung 3.7: Vergleichende Darstellung der ermittelten Rangsummen aller getesteten Enzyme. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den experimentell ermittelten IC_{50}Werten. Kleine Ränge entsprechen niedrigen IC_{50} Konzentrationen.

3.1.6.2 Inhibitionspotential von Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin

Zur Beurteilung des inhibitorischen Potentials der analysierten TCM Drogen auf die Aktivität der pankreatischen Lipase und α-Amylase, wurden den ermittelten Screeningergebnissen Ränge zugeordnet und entsprechende Rangsummen gebildet. Nachfolgend sind jeweils die zehn aktivsten TCM Drogen der wässrigen (Abb. 3.8) und methanolischen (Abb. 3.9) Extrakte vergleichend dargestellt.

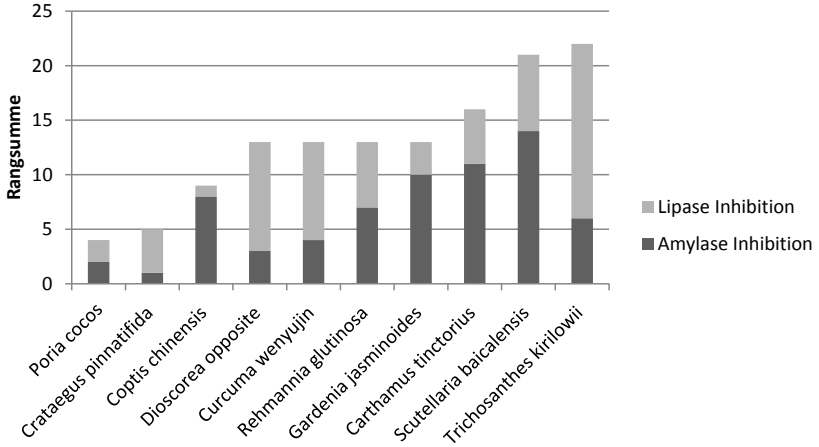


Abbildung 3.8: Vergleich des Inhibitionspotentials der wässrigen TCM Extrakte auf die Aktivitäten der PL und α-Amylase. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den ermittelten Screeninergebnissen der Inhibitionsversuche. Hohen Inhibitionenswerten wurden entsprechend kleine Ränge zugeordnet.

Der getrocknete Fruchtkörper (Sklerotium) des Pilzes *Poria cocos* (Schw.) Wolf zeigte innerhalb der wässrigen Extrakte das stärkste Inhibitionsvermögen. Weiterhin zeigten die wässrigen Extrakte der TCM Pflanzen *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. und *Coptis chinensis* Franch. ein gutes Hemmpotential.

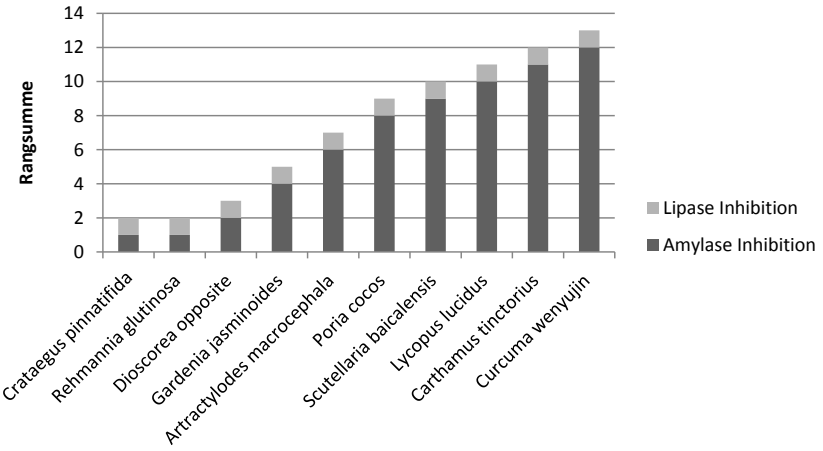


Abbildung 3.9: Vergleich des Inhibitionspotentials der methanolischen TCM Extrakte auf die Aktivitäten der PL und α-Amylase. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den ermittelten Screeninergebnissen der Inhibitionsversuche. Hohe Inhibitionenswerte entsprechen kleinen Rängen.

Die methanolischen Extrakte der untersuchten TCM Drogen zeigten insgesamt ein sehr gutes Inhibitionsvermögen. Die in Abbildung 3.9 dargestellten Drogen wiesen jeweils eine PL-Inhibition von 100 % auf. Zusätzlich wurde die α-Amylase durch die methanolischen Extrakte von *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. und *Rehmannia glutinosa* Libosch stark gehemmt, sodass diese insgesamt das beste Ergebnis zeigten.

Aufgrund der starken Inhibtion der Schlüsselenzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels durch den methanolischen Extrakt von *Crataegus pinnatifida*, wurden nachfolgend tierexperimentelle Studien (siehe Abschnitt 3.2) zum Einfluss des Extraktes auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration durchgeführt.

3.1.6.3 Inhibitionspotential von Pflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin

Analog zur Beurteilung des Inhibitionspotentials der TCM erfolgte eine vergleichende Darstellung der ermittelten Screeningergebnisse der Pflanzen der TEM. Diese wurden hinsichtlich ihres inhibitorischen Einflusses auf die pankreatische Lipase, α-Amylase und Proteasen analysiert. Die Ergebnisse der jeweils zehn aktivsten Extrakte sind nachfolgend dargestellt. Wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich, zeigte der wässrige Extrakt der Blüten von *Hibiscus sabdariffa* L. die beste inhibitorische Wirkung auf alle getesteten Enzyme. Ein ebensfalls sehr gutes Inhibitionsvermögen besaß der Extrakt aus den Hülsen von *Tamarindus indica* L.. Der Extrakt von *Punica granatum* L. (Hülsen) zeigte eine sehr gute Inhibition der pankreatischen Amylase und Lipase, die Wirkung auf die im Pankreatin enthaltenen Pankreasproteasen war hingegen deutlich schwächer ausgeprägt.

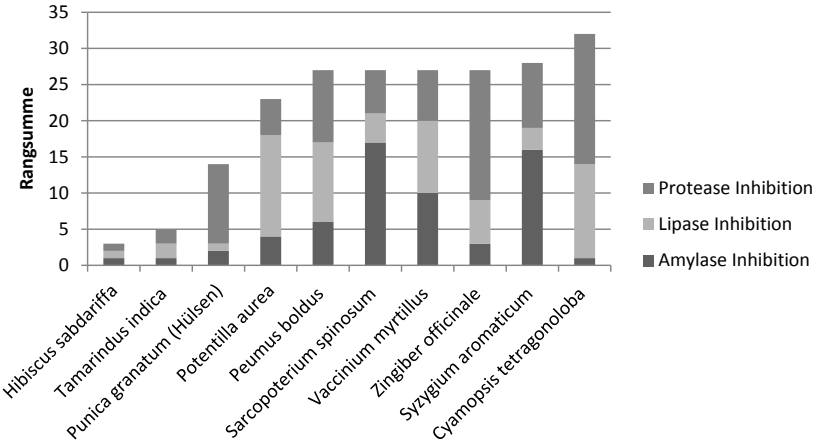


Abbildung 3.10: Vergleich des Inhibitionspotentials der wässrigen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM auf die Aktivitäten der pankreatischen α-Amylase, Lipase und Proteasen. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den ermittelten Screeninergebnissen der Inhibitionsversuche. Hohen Inhibitionenswerten wurden kleine Ränge zugeordnet.

Analog zu den Ergebnissen der wässrigen Extrakte, zeigte der methanolische Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. das stärkste Inhibitionspotential (Abb. 3.11) für alle getesteten Enzyme. Auch die methanolischen Extrakte von *Tamarindus indica* L. und *Punica granatum* L. besaßen, übereinstimmend mit den Ergebnissen der wässrigen Extrakte, ein sehr gutes Hemmpotential.

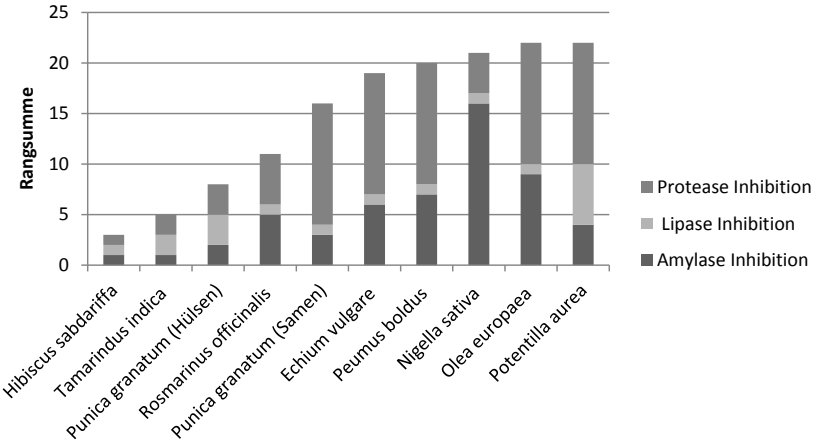


Abbildung 3.11: Vergleich des Inhibitionspotentials der methanolischen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM auf die Aktivitäten der pankreatischen α-Amylase, Lipase und Proteasen. Die dargestellten Rangsummen basieren auf den ermittelten Screeninergebnissen der Inhibitionsversuche. Hohen Inhibitionenswerten wurden kleine Ränge zugeordnet.

Der Extrakt aus den Blüten von *Hibiscus sabdariffa* L. zeigte für alle pankreatischen Enzyme (Lipase, Amylase, Proteasen) ein sehr starkes Inhibitionsvermögen und wurde anschließend mittels HPLC und ESI-Q-TOF-MS zur Identifikation inhibitorisch wirksamer Verbindungen näher analysiert (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.4).

3.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von *Crataegus pinnatifida* Bge. auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentration

Der methanolische Extrakt von *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. zeigte sowohl für die Pankreaslipase als auch für die α-Amylase eine starke Inhibition der enzymatischen Aktivität. *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. gehört zur Familie der Rosaceae und wird im Deutschen als Fiederblatt- oder Chinesischer Weißdorn bezeichnet. Dieser Weißdorn ist vorwiegend in China, dort unter anderem in den Provinzen Anhui, Guangdong, Guizhou und Sichuan, in Korea, der Mongolei und Teilen Russlands anzutreffen [198]. *Crataegus pinnatifida* ist eine traditionelle Heilpflanze und wird seit langem in der Volksmedizin verwendet. Die Pflanze findet vor allem Anwendung zur Behandlung von Verdauungsstörungen, hohem Blutdruck sowie Herz-Kreislauferkrankungen. Weiterhin konnte ein positiver Effekt bei der Behandlung von Hyperlipid- und Hypercholesterinämien beschrieben werden [128, 199].
Auf Grundlage der gezeigten Enzyminhibitionen folgten im Anschluss tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss dieses Extraktes auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipidkonzentrationen (Triglyceride, Gesamtcholesterin) im Diabetes-Typ-2 Rattenmodell. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen 3.12 - 3.14 dargestellt.

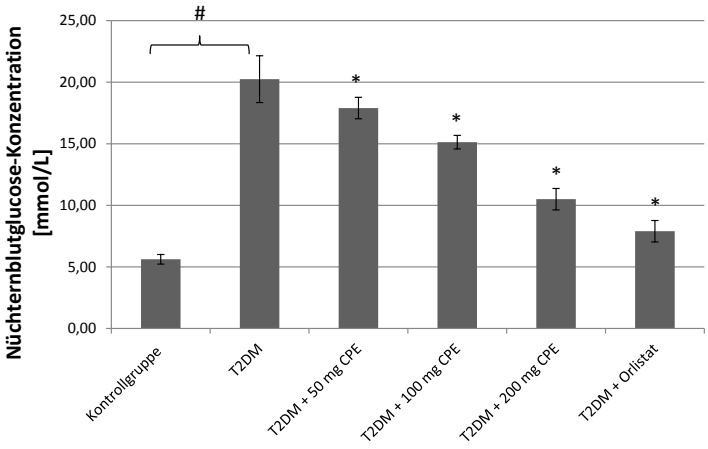


Abbildung 3.12: Nüchternblutglucose-Konzentration der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch. Kontrollgruppe: keine Induktion eines Typ-2-Diabetes, normale Diät; T2DM: Typ-2-Diabetes-Modellgruppe; CPE: T2DM + intragastrische Verabreichung von 50-200 mg/Kg KG *Crataegus pinnatifida* Extrakt (CPE) zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen; Orlistat: T2DM + 40 mg/Kg KG; Orlistat zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen. Bestimmung der Nüchternblutglucose-Konzentration nach 12 h Fasten (Wasser *ad libitum*). # = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten T2DM Kontrolle, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9.

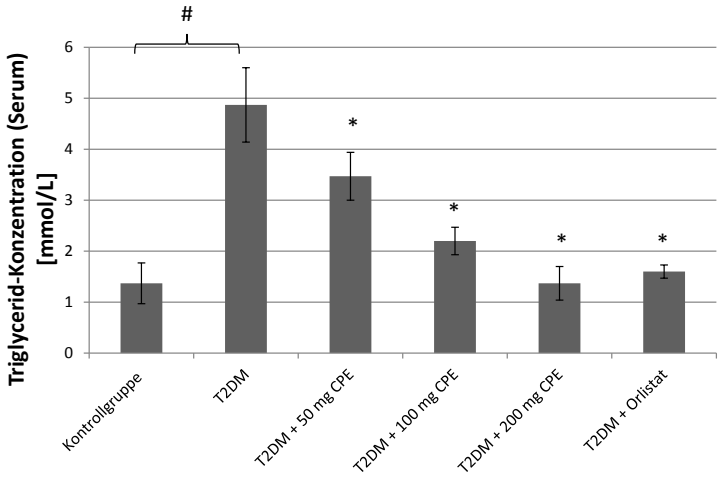


Abbildung 3.13: Triglycerid-Konzentration (Serum) der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch. Kontrollgruppe: keine Induktion eines Typ-2-Diabetes, normale Diät; T2DM: Typ-2-Diabetes-Modellgruppe; CPE: T2DM + intragastrische Verabreichung von 50-200 mg/Kg KG Crataegus pinnatifida Extrakt (CPE) zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen; Orlistat: T2DM + 40 mg/Kg KG; Orlistat zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen. # = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten T2DM Kontrolle, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9.

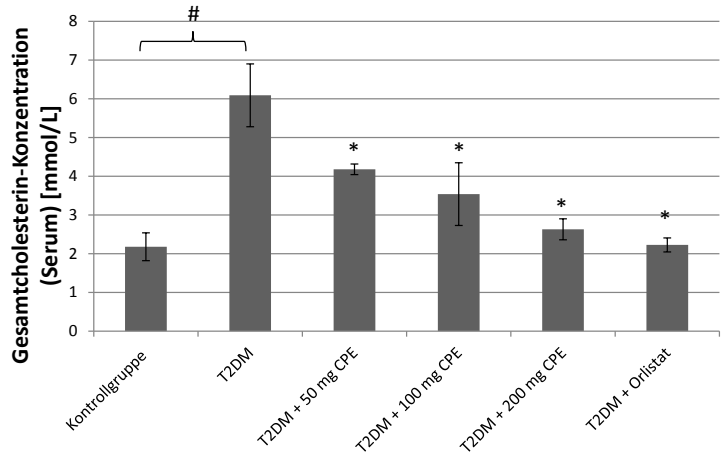


Abbildung 3.14: Gesamtcholesterin-Konzentration (Serum) der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch. Kontrollgruppe: keine Induktion eines Typ-2-Diabetes, normale Diät; T2DM: Typ-2-Diabetes-Modellgruppe; CPE: T2DM + intragastrische Verabreichung von 50-200 mg/Kg KG Crataegus pinnatifida Extrakt (CPE) zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen; Orlistat: T2DM + 40 mg/Kg KG; Orlistat zweimal täglich an 14 aufeinander folgenden Tagen. # = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten T2DM Kontrolle, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), $\alpha \leq 0{,}05$, n = 9.

Ein erster Vergleich zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der Typ-2-Diabetes-Modellgruppe zeigt eine erhöhte Nüchternblutglucose-Konzentration sowie erhöhte Serumlipidspiegel (Triglyceride, Gesamtcholesterin) der T2DM-Gruppe. Diese erhöhten Serumkonzentrationen sind repräsentative Biomarker eines Diabetes mellitus und bestätigen die erfolgreiche Etablierung des STZ-induzierten Typ-2-Diabetes-Rattenmodells. Die Nüchternblutglucose-Konzentration der mit *Crataegus pinnatifida* Extrakt behandelten Tiere waren signifikant erniedrigt. Vor al-

lem die mit 200 mg/kg KG Extrakt behandelten Tiere ($c = 10.5 \pm 0{,}9$ mmol/L) zeigten eine Reduzierung der Blutglucose-Konzentration um 48,1 % im Vergleich zur unbehandelten Typ-2-Diabetes-Modellgruppe ($c = 20.3 \pm 1.9$ mmol/L). Auch die Triglycerid- und Gesamtcholesterin-Konzentrationen konnten signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Wang *et al.* (2011) überein [200]. Ein Extrakt aus den Blättern von *Crataegus pinnatifida* zeigte im *in vivo* Mausmodell eine signifikante Hemmung der Triglycerid- und Glucosekonzentration im Blut nach oraler Verabreichung einer Sucrose- bzw. Olivenöl-Lösung in Kombination mit dem Trockenextrakt. Weiterhin konnten positive Effekte bei der Behandlung von Hyperlipidämien gezeigt werden [201]. Diese gesundheitsfördernden Effekte sind laut Jurikova *et al.* (2012) hauptsächlich auf die in der Pflanze enthaltenen polyphenolischen Verbindungen und Triterpensäuren zurückzuführen [202]. Ein potentieller Wirkmechanismus ist die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition essentieler Enzyme des Verdauungssystem (PL, α-Amylase). Eine Isolation und Identifikation der inhibitorisch aktiven Verbindungen aus *Crataegus pinnatifida* ist daher der nächste Schritt zur Entwicklung neuer, phytotherapeutischer Präparate zur Behandlung von Diabetes mellitus und Adipositas.

3.3 Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

3.3.1 Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke

Zur näheren Analyse der durch amylytischen Stärkeabbau gewonnenen Spaltprodukte, erfolgte deren Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC. Als Referenz wurde ein Standardgemisch aus 5 verschiedenen Sacchariden aufgetrennt. Das in Abbildung 3.15 beispielhaft dargestellte Chromatogramm wurde für die Standardsubstanzen bei einer Saccharidkonzentration von 1,2 mg/mL generiert.

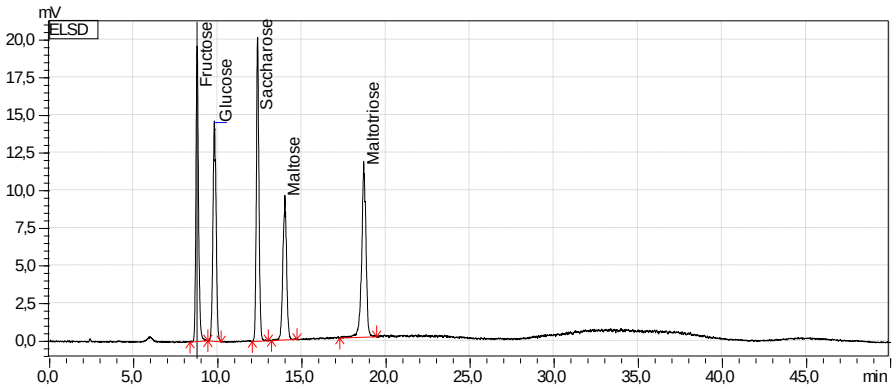


Abbildung 3.15: HPLC-Chromatogramm des Kalibration-Standardgemisches aus 5 Sacchariden; 1,2 mg/mL Saccharidkonzentration, 10 µL Injektionsvolumen, n = 9

Im Nachfolgenden wurden die Spaltprodukte des Abbaus von natürlicher und modifizierter Stärke chromatographisch aufgetrennt. In den Abbildungen 3.16 und 3.17 sind beispielhaft die erhaltenen

Chromatogramme dargestellt. Es ist erkennbar, dass gleiche Reaktionsprodukte gebildet werden. Jedoch ist der Abbau der modifizierten Stärke im Vergleich zur natürlichen Stärke verlangsamt, nach 35 minütiger Inkubationszeit sind noch größere Spaltprodukte (Maltopentaose, Maltohexaose und Maltoheptaose) detektierbar.

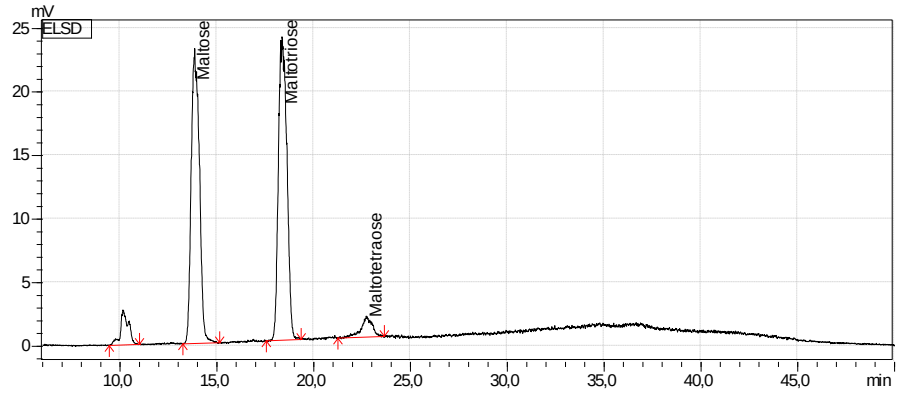


Abbildung 3.16: HPLC-Chromatogramm der gewonnenen Spaltprodukte nach dem amylytischen Abbau von natürlicher Stärke, 1 % (w/v) natürliche Stärke, 1 µM Amylase, 20 µL Injektionsvolumen, n = 3.

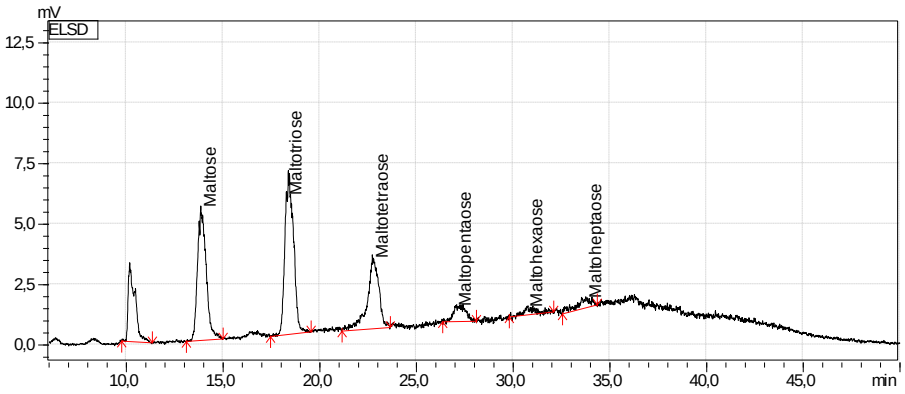


Abbildung 3.17: HPLC-Chromatogramm der gewonnenen Spaltprodukte nach dem amylytischen Abbau von modifizierter Stärke, 1 % (w/v) natürliche Stärke, 1 µM Amylase, 20 µL Injektionsvolumen, n = 3.

Damit spiegelt das angewandte α-Amylase-Aktivitätsassay die Bedingungen eines natürlichen Stärke Abbaus wider. Es werden gleiche Spaltprodukte gebildet, lediglich der Abbau ist aufgrund einer vermutlich sterischen Behinderung verlangsamt. Die in Abschnitt 3.1.2 untersuchten Reinstoffe und Pflanzenextrakte sind daher in der Lage, das Enzym in seiner natürlichen Aktivität zu inhibieren. Die erhaltenen Peakflächen wurden unter Verwendung der Kalibrations-Standards ausgewertet. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15: Ermittelte Konzentrationen der Spaltprodukte nach amylytischen Stärkeabbau. Dargestellt sind MW ± SD, n = 3.

	Saccharid	**Retentionszeit [min]**	**Konzentration [mg/mL]**
natürliche Stärke	Maltose	13,8	0,75 ± 0,04
	Maltotriose	18,4	0,70 ± 0,03
	Maltotetraose	22,7	0,17 ± 0,01
modifizierte Stärke	Maltose	13,8	0,26 ± 0,01
	Maltotriose	18,4	0,27 ± 0,01
	Maltotetraose	22,7	0,22 ± 0,01
	Maltopentaose	27,1	0,14 ± 0,00

Die Hydrolyse von modifizierter Stärke zeigte ebenfalls Spuren von Maltohexaose und Maltoheptaose als Abbauprodukte. Aufgrund des sehr geringen Signal/Rausch-Verhältnisses wurden diese Reaktionsprodukte jedoch bei der Quantifizierung vernachlässigt.

3.3.2 Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

In den Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität verschiedener Pflanzenextrakte zeigte *Hibiscus sabdariffa* L. das höchste Inhibitionspotential für alle analysierten Verdauungsenzyme (Pankreaslipase, -amylase und -proteasen). *Hibiscus sabdariffa*, im Deutschen auch als Roselle bezeichnet, gehört zur Familie der Malvaceae und ist eine einjährige, krautige Pflanze deren purpufarbene Stängel eine Wuchshöhe von bis zu 3,5 m erreichen können. Die Blätter sind lang gestielt und können farblich von dunkelgrün bis rötlich variieren [203]. Die zwittrigen Blüten bilden ein Perianth und bestehen aus fünf purpurfarbenen Kelchblättern sowie fünf gelben, am Grund dunkelrot gefärbten Kronblättern. Wie für die Unterfamilie der Malvoideae typisch, sind die Staubblätter zu einer den Griffel umgebenden Röhre vereinigt [204].

Abbildung 3.18: Blätter und Blütenstand (links) und Einzelblüte (rechts) von *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) [203]

Die fleischigen und roten, becherförmigen Kelche werden traditionell als kaltes und heißes Getränk (Tee) zubereitet. Diese Auszüge werden ebenfalls in der Volksmedizin gegen Beschwerden wie Bluthochdruck, Lebererkrankungen und Fieber eingesetzt [205]. Weiterhin ist eine hypocholesterinämische Wirkung der Pflanze beschrieben [191], die bereits in Humanstudien bestätigt werden

konnte: Gurrola-Díaz *et al.* (2010) beschrieben die Effekte eines *Hibiscus sabdariffa* Extraktpulvers auf die Lipidprofile von Probanden mit und ohne metabolischem Syndrom. Patienten, die mit dem Extrakt behandelt wurden, hatten signifikant verringerte Glucose- und Gesamtcholesterinspiegel sowie erhöhte HDL-c-Spiegel. Zusätzlich wurde eine triglyceridsenkende Wirkung beobachtet [193]. Ein ähnliches Ergebnis konnte durch Lin *et al.* (2007) beschrieben werden. Nach Einnahme einer definierten Menge an Hibiskusextrakt (1000 mg/d) innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 4 Wochen, konnten die Serum-Cholesterinspiegel von 71 % der Probanden signifikant reduziert werden [206]. Ein möglicher Wirkmechanismus ist die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition essentieller Verdauungsenzyme des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels.
Zur Identifizierung der inhibitorisch wirksamen Komponenten erfolgte im Anschluss an die enzymatischen Messungen eine Analyse des methanolischen Extrakts mittels HPLC. Dazu wurde zunächst eine Fraktionierung des Extrakts durch ein präparatives HPLC-System (Shimadzu, Japan) durchgeführt. In Abbildung 3.19 ist beispielhaft ein erhaltenes Chromatogramm und der daraus analysierte Bereich dargestellt. Es wurden die Peaks A-E aufgefangen und in Hinsicht auf eine Inhibition der PL analysiert. Dazu wurden die gewonnenen Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt und in dest. Wasser resuspendiert. Das Enzymassay wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.16 dargestellt.

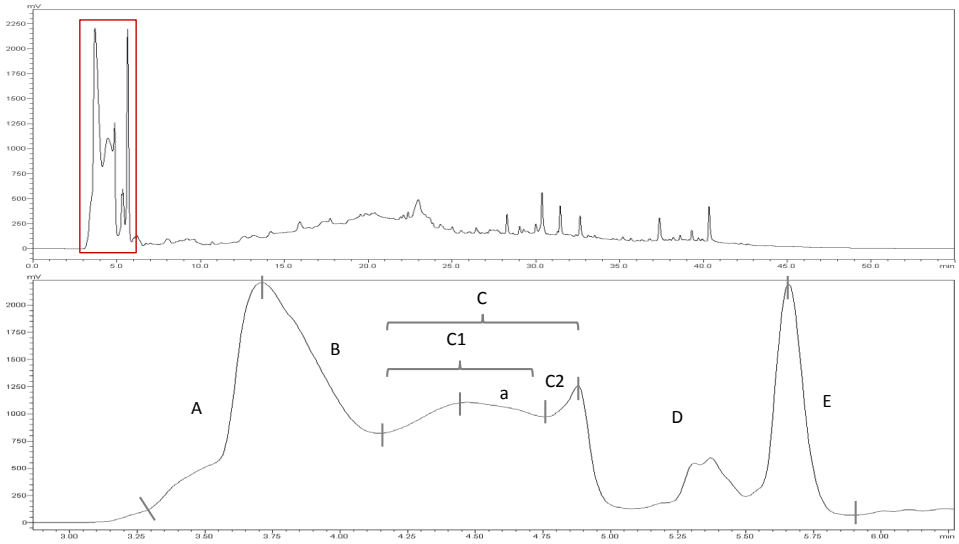


Abbildung 3.19: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L., 10 mg/mL in dest. Wasser, 500 µL Injektionsvolumen, A-E = fraktionierte und anschließend analysierte Bereiche des Chromatogramms, präparatives HPLC-System.

Peak C zeigte von den zunächst aufgefangenen Peaks A, B, C, D und E das höchste inhibitorische Potential, sodass nachfolgend die Bereiche C1 und C2 separat fraktioniert und erneut vermessen wurden. Es zeigte sich, dass Peak C1 das Enzym zu 100 % inhibieren konnte, Peak C2 jeodch nur zu 67 %. Peak C1 war somit von hohem Interesse für weitere Messungen. Um eine möglichst hohe Reinheit der gwünschten Fraktion zu erhalten, wurde in nachfolgenden Untersuchungen nur der absteigende Ast (Peak C1a) gesammelt und näher charakterisiert.

Tabelle 3.16: Ermittelte Enzyminhibition [%] der Einzelpeaks des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon.

	Peak A	**Peak B**	**Peak C**	**Peak C1**	**Peak C1a**	**Peak C2**	**Peak D**	**Peak E**
Enzyminhibition [%]	0	81,90	100,0	100,0	100,0	67,40	0	0

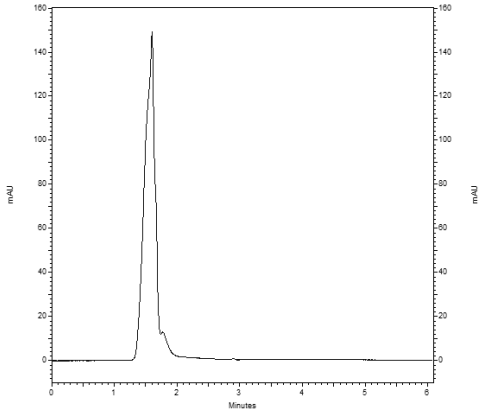


Abbildung 3.20: HPLC-Chromatogramm des isolierten und aufkonzentrierten Peakbereichs C1a aus dem methanolischen Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. 10 µL Injektionsvolumen, Knauer-HPLC-System.

Dazu wurde der Peakbereich C1a mehrerer HPLC Läufe gesammelt, bis zur Trockne eingeengt, in dest. Wasser resuspendiert und zur Verbesserung der Reinheit unter Verwendung einer Knauer HPLC-Anlage erneut chromatografisch aufgetrennt. In Abbildung 3.20 ist beispielhaft das erhaltene Chromatogramm eines Laufes dargestellt. Es konnte ein Hauptpeak eindeutig identifiziert werden. Um optimale Reinheitsbedingungen zu erreichen, wurde auch hier der abfallende Ast des Hauptpeaks separat fraktioniert und aufkonzentriert (= aufgereinigtes Isolat) und im Anschluss zur weiteren Identifizierung mittels ESI-Q-TOF-MS vermessen.

3.4 Untersuchungen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L.

Das gewonnene und aufgereinigte Isolat des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. (s. Abschnitt 3.3.2) wurde mittels ESI-Q-TOF-MS im negativen Ionisierungsmodus auf das Vorhandensein von Molekülmassensignalen im Bereich 100 – 1700 m/z untersucht. Das erhaltene Massenspektrum ist nachfolgend (Abb. 3.21) dargestellt.

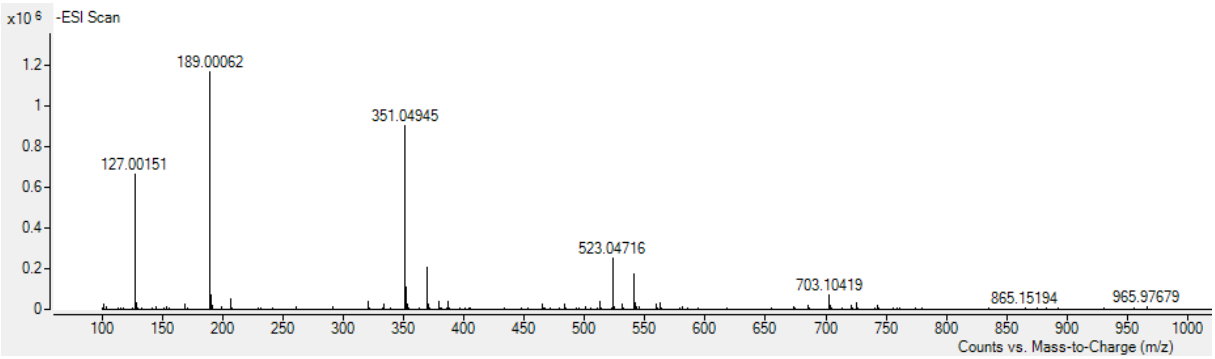


Abbildung 3.21: (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum des aufgereinigten Isolats aus dem methanolischen Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L., 1 µL Injektionsvolumen, Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS-System.

Es konnten drei starke Signale mit einem m/z-Verhältnis von 127,00 $[M\text{-}H]^-$, 189,00 $[M\text{-}H]^-$ und 351,05 $[M\text{-}H]^-$detektiert werden. Diese wurden nachfolgend mit vorhanden Literaturdaten verglichen [207, 208]. Es konnte eine eindeutige Zuordnung der Signale vorgenommen werden (Tab. 3.17).

Tabelle 3.17: Identifikation der inhibitorisch aktiven Verbindungen aus *Hibiscus sabdariffa* L. durch Vergleich mit LC-MS und MS^2 Literatur-Daten [207, 208].

	MS	MS^2	
Verbindung	**$[M\text{-}H]^-$**	**Basis-Peak**	**Produkt-Ion**
Hibiskussäure	189	127	-
Hibiskussäure-Glucosid	351	189	127 (48)

Somit konnten die Verbindungen Hibiskussäure (M = 190,1 g/mol, Abb. 3.22) und Hibiskussäure-Glucosid (352,1 g/mol) als inhibitorisch aktive Verbindungen aus dem methanolischen Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. eindeutig identifiziert werden.

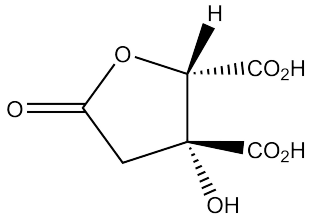


Abbildung 3.22: Chemische Struktur von Hibiskussäure ((+)-*allo-hydroxycitric acid lactone*) [208]

Hibiskussäure ist eine bekannte Verbindung der Pflanze *Hibiscus sabdariffa* [192, 207]. Im Jahr 2000 wurde sie durch Hansawasdi *et al.* erstmals im Zusammenhang mit einer α-Amylase inhibitorischen Aktivität beschrieben [208]. Studien zur Inhibition des Stärkeabbaus im CaCo-2 Zellmodell folgten [209], in der die inhibitorische Wirkung der Hibiskussäure bestätigt werden konnte. Tier- oder Humanstudien liegen hingegen nicht für die Substanz vor. Auch ist bisher keine inhibitorische Aktivität gegenüber der Pankreaslipase beschrieben, wie sie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Im Anschluss an die massenspektrometrische Untersuchung des aufgereinigten Isolats und die Identifikation von Hibiskussäure als aktive Verbindung, wurden zur näheren Charakterisierung *in silico* Docking Experimente zwischen der Hibiskussäure und der Pankreaslipase durchgeführt. Die *in silico* Untersuchungen erfolgten analog der unter Abschnitt 2.2.7 und 3.5 beschriebenen Bedingungen. Es wurde ebenfalls die Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase (PDB-Code: 1ETH [172]) verwendet. Die in Abbildung 3.23 dargestellte Dockingpose zeigt potentielle Interaktionen zwischen der Hibiskussäure und dem Enzym.

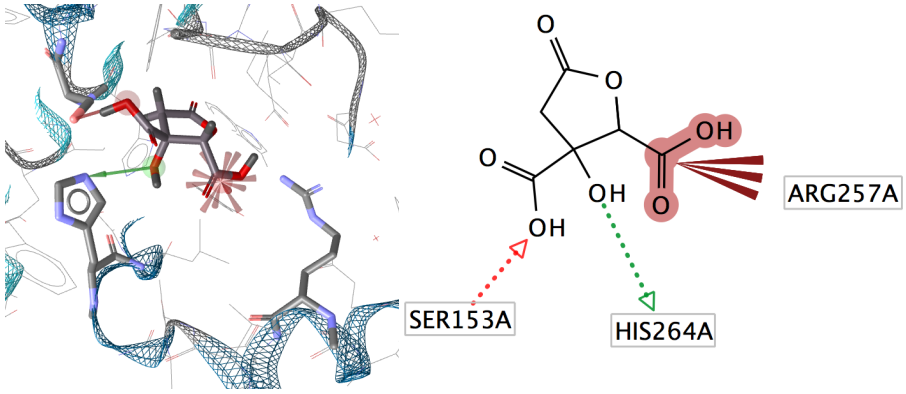


Abbildung 3.23: MIF der Hibiskussäure im aktiven Zentrum der Pankreaslipase mit Lipase-Interaktionshotspots (PDB-Code: 1ETH; grün = Wasserstoffbrückendonator, rot = Wasserstoffbrückenakzeptor).

Es werden zum einen Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser (153) und His (264) ausgebildet, zum anderen sind ionische Wechselwirkungen mit Asp (177) möglich. Die Aminosäuren Ser (153) und His (264) sind Bestandteil der katalytischen Triade des Enzyms und für seine Funktion unabdingbar. Die hier gezeigten Interaktionen der Hibiskussäure mit dem aktiven Zentrum des Enzyms sind daher sehr wahrscheinlich ursächlich für die starke Inhibition des Enzyms und stellen einen wichtigen Ansatzpunkt für zukünftige Forschungen auf diesem Gebiet dar.

3.5 Dockingstudien und 3D-Pharmakophormodellierung der Pankreaslipase

Das virtuelle Screening potentieller Inhibitoren der Schweinepankreaslipase und die Modellierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin (Berlin, Germany) in der Abteilung für Pharmazeutische und Medizinische Chemie durch die Arbeitsgruppe für computergestütztes Wirkstoffdesign von Prof. Dr. Gerhard Wolber durchgeführt.

Auf Grundlage der experimentell ermittelten IC_{50} Werte zur Inhibition der PL sowie weiterer Literaturdaten erfolgte zunächst die Entwicklung von 3D-Pharmakophormodellen für ein virtuelles Screening. Mit Hilfe von Naturstoffdatenbanken konnten potentiell inhibitorische Verbindungen analysiert und ihre Wirksamkeit unter experimentellen Bedingungen getestet werden. Weiterhin konnten Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoide auf die PL getroffen werden.

3.5.1 Entwicklung von 3D-Pharmakophormodellen

Für das virtuelle Screening wurde zunächst die Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase [172] analysiert, um potentielle Bindungsstellen zu identifizieren und strukturelle Eigenschaften der PL zu untersuchen. Die Kristallstruktur umfasst einen ternären Lipase-Colipase-Komplex mit nicht-ionischen Detergenzien, die an das aktive Zentrum des Enzyms binden. Diese Vorstellung weicht von den modernen Konzepten der PL-Aktivierung ab, die eine Dimerisierung der PL als notwendig erachten.
In der aktiven, offenen Konformation ist die katalytische Triade, bestehend aus Ser (153), Asp (177) und His (264), für Wasser und andere Verbindungen zugänglich [172]. Im Allgemeinen stellt die Lipidbindungsstelle eine große und überwiegend hydrophobe Tasche dar. Das aktive Zentrum besteht dabei hauptsächlich aus hydrophoben Resten wie Phe (216), Tyr (115), Phe (78) und Iso (79). Diese Reste werden im Folgenden als hydrophobe Haupttasche bezeichnet (Abb. 3.24A). Tiefer in der großen Tasche befindet sich außerdem eine kleine hydrophile Teiltasche, die sich durch die hydrophilen Reste Trp (86), Asp (80) und His (152) auszeichnet (Abb. 3.24B).

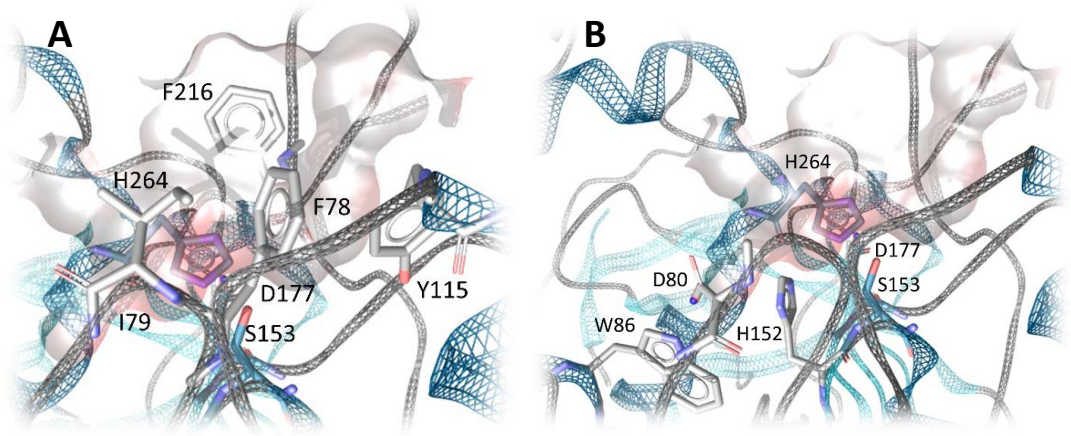


Abbildung 3.24: MIF (*molecular interaction field*) der Lipid-Bindungstasche mit katalytischer Triade bestehend aus Ser (153), His (264) und Asp (177). (A): Hydrophobe Hauptbindungstasche (grau) des aktiven Zentrums. (B): Hydrophile Reste (grau) der hydrophilen Teiltasche (PDB-Code: 1ETH, Oberfläche: weiß = hydrophobe Bereiche, rot = hydrophile Bereiche)

Diese Bindungsstellenstruktur stimmt mit der physiologischen Funktion der PL zur Lipidbindung überein, wobei die endogenen Liganden auf zwei Arten mit dem Enzym wechselwirken können: (1) Der hydrophile Glyceridanteil der Lipide bindet an die katalytischen Reste und die hydrophile Teiltasche, während (2) hydrophobe Fettsäureketten in der Lage sind, mit der hydrophoben Haupttasche in Kontakt zu treten.

Der synthetische PL Inhibitor Orlistat stellt einen hoch affinen Liganden der PL dar und wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle des *in vitro* Aktivitäts-Assays (Abschnitt 2.2.1.1) und als Vorbild für die *Docking*-Studien verwendet, um potenzielle Schlüssel-Interaktionen und Interaktions-Hotspots potenter PL Inhibitoren zu identifizieren. Aufgrund der hohen Flexibilität im Hexyl-

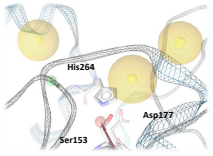
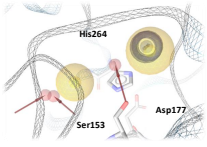
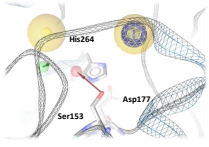
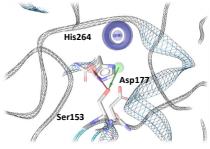
und Tridecanyl-Anteil resultierten die Bindungsstudien in einer Vielzahl von möglichen Konformationen. Dennoch konnte ein gemeinsames Bindungsmotiv unter allen *Docking*-Ergebnissen identifiziert werden: Allgemeine Wechselwirkungen schließen hydrophobe Kontakte mit den lipophilen Seitenketten von Tyr (115), Phe (78) und Phe (216) sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Stickstoff von Leu (154) in der hydrophilen Teiltasche ein.

Tabelle 3.18: Zur Pharmakophormodell-Entwicklung verwendete Naturstoffe und ihre Derivate

Substanzklasse	**Anzahl an Verbindungen**	**Quelle**	**Ref.**
Chalkone	12	*Glycyrrhiza glabra* L.	[210]
Flavone	9	*Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack.	[88]
Flavonoide	5	Cassia auriculata L.	[211]
Polyphenole	54	*Camellia sinensis* (L.) Kuntze	[84]
Oxadiazole	3	synthetisch	[212]
Berberin und Dihydroberberin	2	synthetisch	[213]
Carnosolsäure	1	*Salvia officinalis* L.	[214]
Cetilistat	1	synthetisch	[215]

Aufgrund des starren und aromatischen Gerüsts der Mehrzahl der Naturstoffverbindungen sowie häufig stark polarer Reste (Zucker, Gallate), ist eine exakt gleiche Bindungsart der Naturstoffe wie bei Orlistat eher unwahrscheinlich. Dennoch wurden die im Rahmen dieser Arbeit analysierten polyphenolischen Reinstoffe sowie aus Literaturquellen ausgewählte Verbindungen (Tab. 3.18) in die Bindungstasche des Enzyms gedockt, um plausible Bindungsmodi in Abhängigkeit von gemeinsamen Wechselwirkungsmustern strukturell verwandter Verbindungen wie Flavonoiden und deren Glykoside zu identifizieren. Es konnten insgesamt fünf 3D-Pharmakophormodelle für die unterschiedlichen Sekundärmetabolite generiert werden, die in der nachfolgenden Tabelle 3.19 vergleichend dargestellt sind.

Tabelle 3.19: Entwickelte 3D-Pharmakophormodelle der Naturstoffe

	Modell 1	**Modell 2+3**	**Modell 4**	**Modell 5**
				
Modellgrundlage	Verbindungen mit langen Kohlenstoffketten	Flavonoide und Flavonoidglykoside	Chalkone und phenolische Verbindungen	Polyzyklische Verbindungen
Verbindungen zur Modellgenerierung (Auswahl)	- Orlistat [e.D.] - Cetilistat [215]	- Myricetin, Fisetin, Chrysin [e.D.] - Luteolin [211] - Epicatechingallat [84]	- Licurosid, Isoliquiritin [210] - Methylchlorogenat [88]	- Carnosolsäure [214] - Theaflavin [84]

e.D.: Die Daten liegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zugrunde

Modell 1 wurde aus *Docking*-Posen von Verbindungen mit fettsäureähnlichen Kohlenstoffketten wie Orlistat oder Fucoxanthinol erzeugt. Modell 2 und 3 wurden aus Flavonoid-Bindungsmodushypothesen abgeleitet, während Modell 3 ein Wechselwirkungsmuster mit Schwerpunkt auf Wasserstoffbrücken-Bindungen im Bereich der hydrophilen Teiltasche darstellt. Modell 4 wurde basierend auf Phenylpropanoid-Strukturen erstellt, während Modell 5 auf *Docking*-Studien zu polycyclischen Verbindungen aufgebaut ist. Unter Verwendung dieser entwickelten 3D-Pharmakophormodelle wurden zunächst Untersuchungen hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure-activity relationship*, SAR) der analysierten Flavonoide durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein virtuelles Naturstoffscreening unter Verwendung verschiedener Naturstoffdatenbanken.

3.5.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Flavonoide

Flavonoide repräsentieren die umfangreichste Klasse von polyphenolischen Verbindungen in der menschlichen Ernährung und zeigen ein hohes Potential für die Inhibition der PL [34]. Zur Untersuchung und Aufklärung ihres Bindungsmechanismus an das Enzym, wurden *Docking*-Studien auf Grundlage der Flavonoid-Strukturen der analysierten Reinstoffe (siehe Abschnitt 3.1.1) und Literaturdaten (Tab. 3.18) durchgeführt. Die Ergebnisse der SAR-Studie sind in Abbildung 3.25 vergleichend dargestellt.

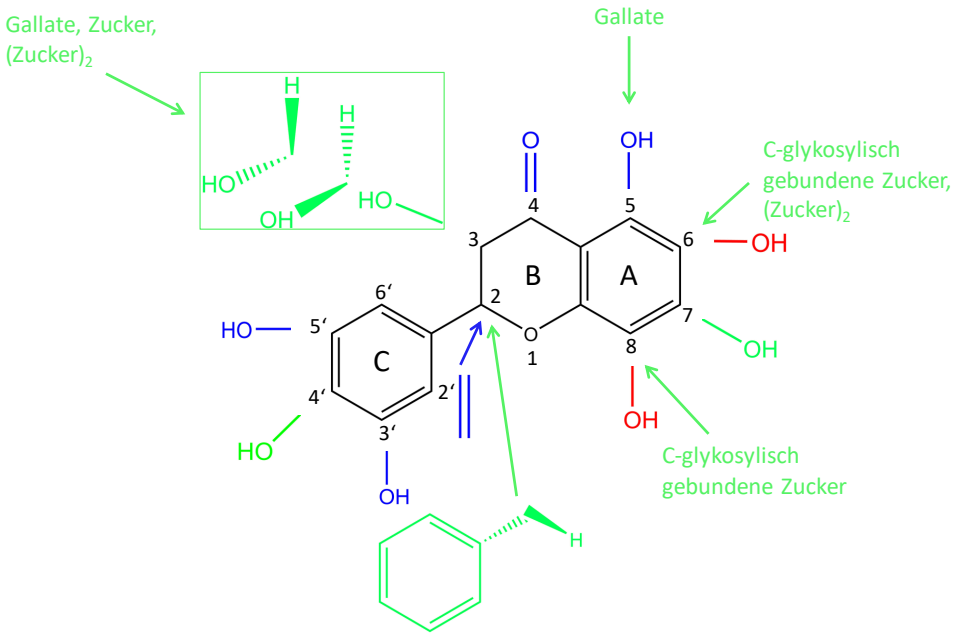


Abbildung 3.25: Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der Schweinepankreaslipase (grün = erhöhte Enzyminhibition, blau = keine einheitliche Aussage möglich, rot: verringerte Enzyminhibition).

Hydroxylgruppen am 2-Phenyl-Substituenten (C-Ring) zeigten je nach Position einen unterschiedlichen Effekt. In Position 4 führte eine Hydroxylierung zu einer verstärkten Inhibition der PL.

Hydroxylgruppen in Position 3 und 5 zeigten hingegen kein eindeutiges Ergebnis. Am B-Ring des 1,4-Benzopyron-Grundgerüsts führte eine Hydroxylgruppe an Position 3 zu einer Verstärkung der Lipase-Inhibition. Dabei zeigte eine (S)-Konfiguration an Position 2 ein besseres Ergebnis als eine (R)-Konfiguration (Position 3 dabei immer (R)-konfiguriert). Auch das Vorhandensein von Gallat-Resten und O-glykosidisch gebundenen Zuckern (2 Zucker > 1 Zucker) an Position 3 zeigte eine verstärkte Inhibition des Enzyms. Nicht eindeutig war hingegen das Vorhandensein einer Doppelbindung in Position 2. Für eine Carbonylgruppe in Position 4 war ebenfalls kein direkter Vergleich möglich. Substituenten am A-Ring des 1,4-Benzopyrons zeigten die folgenden Ergebnisse: eine Hydroxylgruppe in Position 5 zeigte keine eindeutigen Ergebnisse. Eine verstärkte Inhibition zeigte jedoch ein Gallat-Rest in gleicher Position. Im Nachfolgenden werden die ermittelten Bindungsmodi von glykolysierten und nicht-glykolysierten Flavonoiden näher erläutert.

3.5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von nicht-glykolysierten Flavonoiden

Nicht-glykolisierte Flavonoide legen den folgenden Bindungsmodus nahe: der 2-Phenyl-Substituent (C-Ring) des Flavonoids ist in der Nähe der kleinen, hydrophilen Teiltasche lokalisiert. Bei Vorhandensein von Hydroxylgruppen am C-Ring können Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Asp (80) und Trp (86) des Enzyms ausgebildet werden und eine Aktivitätsmodulierung kann stattfinden. Die Flavonoide Chrysin (keine Hydroxylgruppen am C-Ring) und Isorhamnetin (Methoxygruppe in *meta*-Position) besitzen daher keine modulierende Aktivität. Die stärkste Enzyminhibition zeigten Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe in *para*- oder zwei Hydroxylgruppen in *meta*- und *para*-Position. Drei Hydroxylgruppen hingegen beeinflussen die Hydrophobizität des C-Rings, sodass wichtige hydrophobe Wechselwirkungen mit den lipophilen Seitenketten von Ile (79), Val (260), Ala (261) und Leu (265) ungünstig beeinflusst werden. Das 1,4-Benzopyron-Grundgerüst der Flavonoide ist zwischen Tyr (115) und Phe (216) lokalisiert, während die 4-Oxo-Einheit zum aktiven Zentrum ausgerichtet ist. Auf diese Weise kann das Ringsystem π-π-Wechselwirkungen mit dem Phenylring von Phe (216) eingehen. Der Benzolring (Ring A) ist in der Lage, hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten von Phe (78), Tyr (115), Ile (210) und Phe (216) auszubilden. Eine Hydroxylgruppe in Position 3 des B-Rings erhöht die Hemmwirkung, dies kann durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den katalytischen Resten Ser (153) und His (264) erklärt werden. Im Gegensatz dazu verringert eine Hydroxylgruppe in Position 5 die Lipase inhibierende Wirkung, bedingt durch die reduzierte Hydrophobizität des A-Rings. Das Flavonoid Fisetin kombiniert diese Eigenschaften: zwei Hydroxylgruppen in *meta*- und *para*-Position am C-Ring, eine Hydroxylgruppe in Position 3 des B-Rings, keine Hydroxylgruppe in Position 5 des A-Rings und zeigt damit von den analysierten Verbindungen die stärkste Inhibition der PL. Abbildung 3.26 zeigt die Docking Position von Fisetin in der Bindungstasche des Enzyms.

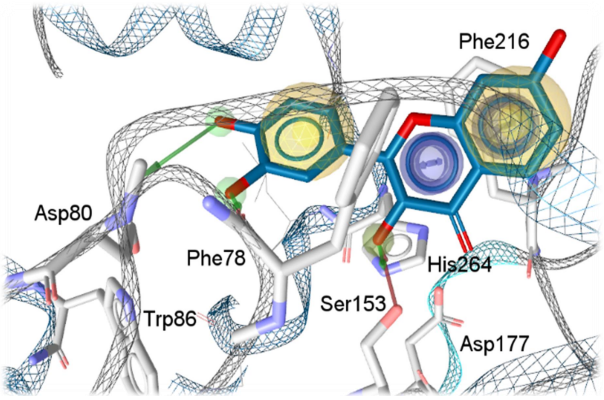


Abbildung 3.26: MIF des nicht-glykolysierten Flavonoids Fisetin im aktiven Zentrum der PL mit Lipase-Interaktionshotspots und 3D-Pharmakophormodell (PDB-Code: 1ETH; grün = Wasserstoffbrückendonator, rot = Wasserstoffbrückenakzeptor, gelb = hydrophobe Kontakte).

Insbesondere hydrophobe Kontakte zu Tyr (115), Phe (216) und Val (260) sowie Wasserstoffbrückenbindungen zu Ser (153) und His (264) scheinen für eine Lipase inhibitorische Wirkung von hoher Bedeutung zu sein. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Bindungsstudien von Wang *et al.* (2015) [216] und Birari *et al.* (2011) [210].

3.5.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von glykolysierten Flavonoiden

Die mit dem Fisetin strukturverwandten, glykolysierten Flavonoide Quercitrin und Rutin zeigen ein ähnliches Interaktionsprofil. Jedoch unterscheidet sich ihre Orientierung am 1,4-Benzopyron-Grundgerüst.

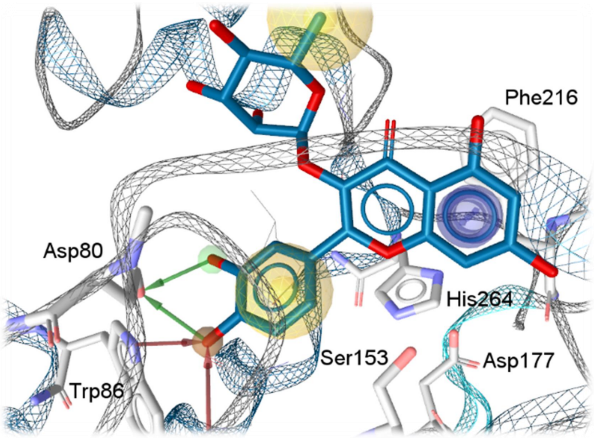


Abbildung 3.27: MIF des glykolysierten Flavonoids Quercitrin in der Lipid-Bindungstasche der PL mit Lipase-Interaktionshotspots und 3D-Pharmakophormodell (PDB-Code: 1ETH; grün = Wasserstoffbrückendonator, rot = Wasserstoffbrückenakzeptor, gelb = hydrophobe Kontakte).

Die 4-Oxo-Einheit ist zur geöffneten Bindungstasche ausgerichtet. Dennoch ist der 2-Phenyl-Substituent (C-Ring) in der kleinen, hydrophilen Teiltasche lokalisiert und das 1,4-Benzopyron-Grundgerüst befindet sich im lipophilen Bereich zwischen den Aminosäuren Tyr (115) und Phe

(216). Auf diese Weise erfolgt eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Gly (77), Asp (80) und Trp (86) durch Hydroxylgruppen des 2-Phenyl-Substituenten. Ebenso sind hydrophobe Kontakte mit Leu (265) möglich. Weitere Interaktionsmöglichkeit stellen π-π-Wechselwirkungen zwischen dem Benzol-Ring des Benzopyrons und Phe (216) und hydrophobe Kontakte zwischen der Methylgruppe des α-L-Rhamnopyranosyl-(1→6))-β-D-glucopyranosyl-Restes (Rutin) bzw. α-L-Rhamnopyranosyl-Restes (Quercitrin) mit Val (260) im geöffneten Zustand der Bindungstasche dar. In Abbildung 3.27 ist das MIF von Quercitrin in der Lipid-Bindungstasche dargestellt.

3.5.3 Pharmakophorbasiertes virtuelles Screening von Naturstoffen - *in silico* Identifizierung und *in vitro* Aktivität von Inhibitoren der Pankreaslipase

Für das virtuelle Naturstoffscreening wurde der in Abbildung 3.28 gezeigte Arbeitsablauf angewandt. Ausgehend von den validierten strukturbasierten 3D-Pharmakophorenmodellen (Modell 1-5, Tab. 3.19) wurden Naturstoffdatenbanken verschiedener Anbieter mit insgesamt 342.628 Naturstoffen und Naturstoff-ähnlichen Verbindungen (Tab. 3.20) hinsichtlich einer Interaktionsmuster-Übereinstimmung analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse werden im Folgenden als Screening-Treffer (*Virtual Screening Hits*) bezeichnet.

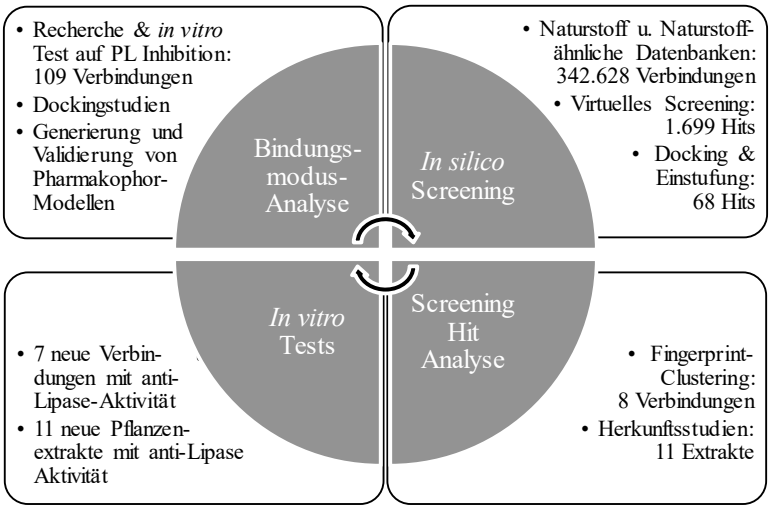


Abbildung 3.28: Schema des verwendeten Arbeitsablaufs für das virtuelle Naturstoffscreening

Die Verwendung des *Pharmakophor-Fit-Scores* in LigandScout [168, 169] führte zu einer Identifizierung von 68 Verbindungen (Naturstoffe bzw. Naturstoff-ähnliche Verbindungen) mit einer potentiell PL inhibitorischen Aktivität. Eine vollständige Liste der identifizierten Verbindungen ist dem Anhang (Tab. A.2) zu entnehmen. Um eine repräsentative Auswahl an zu testenden Verbindungen auszuwählen, wurden diese 68 Verbindungen strukturabhängig in verschiedene Untergruppen (*Fingerprint-Cluster*) eingeteilt: Flavonoide, polycyclische Verbindungen, Chalkone, andere Polyphenole und eine Reihe verschiedener Strukturen.

Tabelle 3.20: Für das virtuelle Screening verwendete Datenbanken von Naturstoffen und naturstoffähnlichen Verbindungen

Datenbank	Anzahl an Verbindungen	Anmerkungen
Analyticon		Verbindungen...
- MEGxm	1.116	mikrobiellen Ursprungs
- MEGxp	3.483	pflanzlichen Ursprungs
- NATx	21.296	halbsynthetische Naturstoff-Derivate
NPD09	116.144	intern gesampelt
Foodb	1.424	aus Nahrungsquellen
SPECS	866	Naturstoffe und ihre Derivate
ZINC	198.299	Naturstoffe und ihre Derivate

3.5.3.1 Bestimmung der *in vitro* Aktivität der identifizierten Reinstoffe

Es wurden insgesamt acht kommerziell erhältliche Verbindungen aus den 68 virtuellen *Screening Hits* ausgewählt (Abb. 3.29) und anschließend unter experimentellen Bedingungen *in vitro* getestet. Die Substanzen wurden von den Firmen Mcule, Inc. (Palo Alto, USA) und MolMall Sarl (Lonay, Switzerland) bezogen.

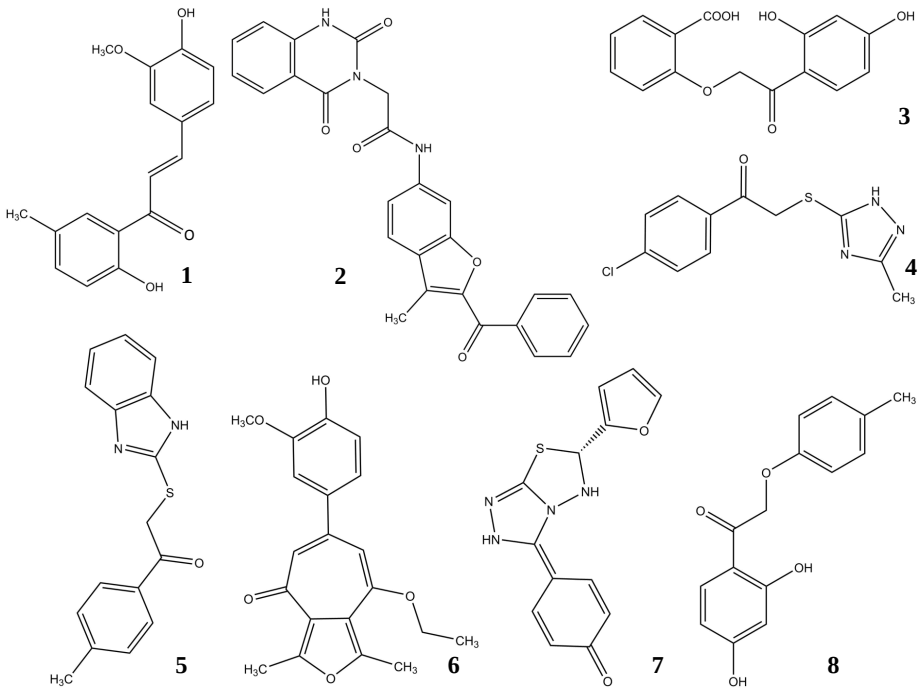


Abbildung 3.29: Chemische Struktur der *in silico* identifizierten und *in vitro* analysierten potentiellen PL Inhibitoren. Die Verbindungen wurden mittels *in silico* Docking, 3D-Pharmakophormodellierung und eines anschließenden virtuellen Screening identifiziert. Substanz PL0**1**: 4,2´-Dihydroxy-3-methoxy-5´-methylchalkon, Substanz PL0**2**: N-(2-Benzoyl-3-methyl-benzofuran-6-yl)-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)-acetamid, Substanz PL0**3**: 2-[2-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-oxoethoxy]benzoesäure, Substanz PL0**4**: 1-(4-Chlorophenyl)-2-[(5-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)sulfanyl]ethanon, Substanz PL0**5**: 2-(1H-Benzoimidazol-2-ylsulfanyl)-1-(*p*-tolyl)ethanon, Substanz PL0**6**: 8-Ethoxy-6-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,3-dimethyl-cyclohepta[c]furan-4-on, Substanz PL0**7**: 4-[7-(2-Furyl)-6-thia-1,3,4,8-tetrazabicyclo[3.3.0]octa-2,4-dien-2-yl]phenol, Substanz PL0**8**: 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-(4-methoxyphenoxy)ethanon.

Die Substanzen wurden nach der in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen Methode hinsichtlich ihres PL inhibitorischen Potentials analysiert. Die ermittelten IC_{50}Werte sind in Tabelle 3.21 aufgeführt. Sieben der acht getesteten Substanzen waren in der Lage, das Enzym dosisabhängig zu inhibieren. Die Trefferquote liegt somit bei 87,5 %. Substanz PL06 zeigte mit einem IC_{50}Wert von $87{,}4 \pm 3{,}1$ µM die stärkste Inhibition der PL. Auch PL01 wies mit einem IC_{50} von $133{,}8 \pm 19{,}3$ µM ein gutes Ergebnis auf. Keine Inhibition zeigte hingegen Verbindung PL05.

Tabelle 3.21: Ermittelte IC_{50}Werte zur Inhibition der PL der *in silico* identifizierten Verbindungen. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon. Angegeben sind MW ± SD, n = 4.

Substanz	**ZINC ID**	**IC_{50} [mM]**
PL06	ZINC04252577	0,09 ± 0,00
PL01	ZINC09050354	0,13 ± 0,02
PL03	ZINC04046682	0,70 ± 0,02
PL07	ZINC05730067	0,71 ± 0,07
PL02	ZINC03669836	0,87 ± 0,04
PL08	ZINC00108368	1,18 ± 0,10
PL04	ZINC03843271	> 2,50
PL05	ZINC00141040	keine Inhibition

Um die im Rahmen des virtuellen Screenings verwendeten 3D-Pharmakophormodelle zu bewerten und die Bindungsmuster der virtuellen *Screening Hits* zu untersuchen, wurde ein *Redocking*, ein erneutes Docking des virtuellen *Screening Hits* in die Bindungstasche des Enzyms, durchgeführt. Dafür wurden die Docking-Posen und Interaktionsmuster mit den ermittelten IC_{50} Werten verglichen.

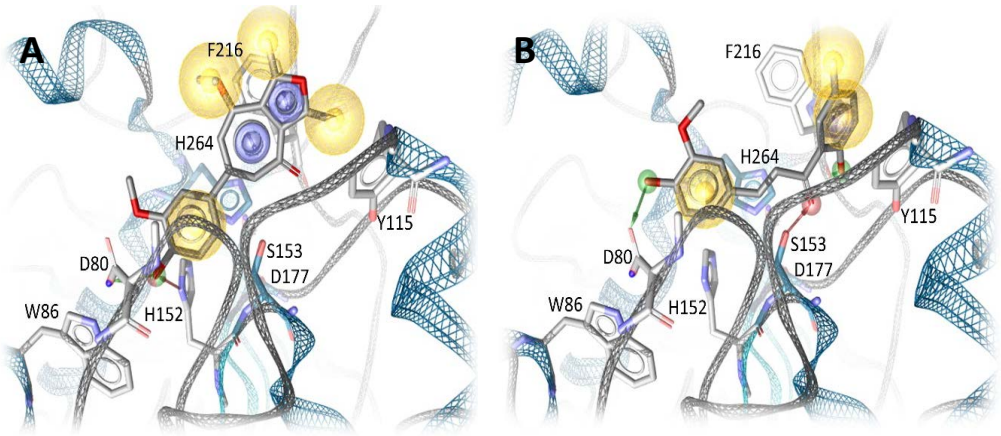


Abbildung 3.30: Docking-Posen und abgeleitete 3D-Pharmakophore-Modelle der potentesten virtuellen *Screening Hits* (A) PL06 und (B) PL01 (PDB-Code: 1ETH, grün = H-Bindungsdonor, rot = H-Bindungsakzeptor, gelb = hydrophobe Kontakte, blau = π-π-Wechselwirkungen).

Die Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese, dass Verbindungen, die Docking-Posen mit Resten in der hydrophilen Teiltasche zeigen, eine höhere anti-Lipase-Aktivität aufweisen. In Abbildung 3.30 sind die Docking-Posen von PL06 und PL01 dargestellt. PL06 zeigt eine partielle

Interaktion mit der hydrophilen Teiltasche und eine Wasserstoffbrücken-Donor-Wechselwirkung mit der Carbonsäure von Asp (80). Weiterhin bestehen hydrophobe Interaktionen mit der hydrophilen Teiltasche sowie (bei geöffneter Konformation) mit der Hauptbindungstasche. Für PL01 können Bindungsarten geschlussfolgert werden, die hydrophobe Wechselwirkungen in der Tasche, Wasserstoffbrücken in der hydrophilen Teiltasche und den katalytischen Rest Ser (153) umfassen. Diese Interaktionsmuster entsprechen den aufgestellten Bindungsmodus-Hypothesen (Abschnitt 3.5.2) für die anfänglichen Screening-Verbindungen und Literaturdaten.

3.5.3.2 Bestimmung der *in vitro* Aktivität der identifizierten biologischen Quellen

Zusätzlich zu den Analysen der Reinstoffe wurden biologische Quellen der identifizierten *Screening Hits* untersucht, um potentiell aktive Pflanzenextrakte vorhersagen zu können. Typische Pflanzen, die die genannten Verbindungen enthalten, sind: *Parazoanthus gracilis*, *Artocarpus* Arten (*A. champeden*, *A. communis*, *A. dadah*, *A. rigidus*), *Acacia* Arten (*A. crombei*, *A. nilotica*) und *Glycyrrhiza* Arten (*G. pallidiflora* , *G. glabra*). Aus handelsüblichen Pflanzen wurden 11 Pflanzen ausgewählt, wässrige und methanolische Extrakte hergestellt (Extraktion siehe Abschnitt 2.2.2) und nachfolgend *in vitro* analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst.

Tabelle 3.22: IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte (methanolisch/wässrig) des *in silico* Versuchs. Die biologische Quellen wurden mittels *in silico* Docking, einer 3D-Pharmakophormodellierung und einem anschließenden virtuellen Screening identifiziert. Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgte unter Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferon. Angegeben sind MW ± SD, n = 4.

Lateinischer Name	**Verwendeter Pflanzenteil**	**IC_{50} [µg/mL] MeOH Extrakt**	**IC_{50} [µg/mL] Wasserextrakt**
Acacia melanoxylon R.BR.	Oberirdischer Teil	90,3 ± 2,7	294,0 ± 10,1
Acacia rostellifera BENTH.	Oberirdischer Teil	100,3 ± 6,5	1058,0 ± 61,0
Acacia verticillata (L'HER.) WILLD.	Oberirdischer Teil	120,6 ± 11,6	100,4 ± 50,0
Acacia longifolia (ANDREWS) WILLD.	Oberirdischer Teil	158,6 ± 13,1	1916,5 ± 291,3
Marrubium vulgare L.	Kraut	193,2 ± 5,5	733,9 ± 94,3
Morus alba L.	Sprossachse	209,1 ± 23,4	773,8 ± 20,9
Hypericum hookerianum WIGHT & ARN.	Sprossachse	267,0 ± 8.5	851,8 ± 30,5
Cryptomeria japonica (THUNB. ex L.F.) D.DON	Blätter	272,5 ± 9,5	3264,3 ± 98,9
Maytenus boaria MOLINA	Blätter	283,3 ± 26,9	3193,4 ± 61,1
Glycyrrhiza glabra L.	Wurzel	288,5 ± 3,9	1411,4 ± 142,7
Acacia decora RCHB.F.	Oberirdischer Teil	324,9 ± 6,8	874,5 ± 43,3

Alle getesteten Pflanzenextrakte waren in der Lage, das Enzym dosisabhängig zu inhibieren. In den meisten Fällen war die hemmende Wirkung der methanolischen Extrakte auf die enzymatische Aktivität höher als die der wässrigen Extrakte. Dies war zu erwarten, da bei der methanolischen Extraktion ein breiteres Spektrum an unpolaren Verbindungen gewonnen wird. Diese haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an das eher hydrophob geprägte aktive Zentrum des Enzyms zu binden.

Die durch *in silico* Studien vorhergesagte Aktivität von Pflanzen der Gattung *Acacia* konnte experimentell bestätigt werden: der methanolische Extrakt von *Acacia melanoxylon* R.BR. zeigte

die stärkste Inhibition der PL (IC_{50}: 90,3 ± 2,7 µg/mL). Auch der wässrige Extrakt wies eine gute Enzyminhibition auf. Ikarashi *et al.* (2011) konnten in vorangegangenen Studien zeigen, dass die gepulverten Samen von *Acacia melanoxylon* einen hypoglykämischen Effekt durch Erhöhung der Insulinsekretion in nicht-diabetischen Tiermodellen hervorrufen können [217]. Zusammen mit den hier gezeigten PL inhibitorischen Eigenschaften stellt *Acacia melanoxylon* somit eine vielversprechende Pflanze zur Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus dar. Auch für weitere *Acacia* Arten konnte eine PL Inhibition beobachtet werden: *Acacia verticillata* (L'HER.) WILLD, *Acacia rostellifera* BENTH., *Acacia longifolia* (ANDREWS) WILLD. und *Acacia decora* RCHB.F. zeigten anti-Lipase Effekte, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurden. Die Pflanze *Marrubium vulgare* L. wird häufig in der traditionellen Medizin verwendet. Die oberirdischen Teile der Pflanze sowie ihre wässrigen und hydroalkoholischen Extrakte werden zur Behandlung von Husten sowie als Choleretikum bei Verdauungs- und Gallenbeschwerden eingesetzt [218]. Villa-Ruano *et al.* (2013) und Benguechoua *et al.* (2014) berichteten bereits über eine geringe Anti-Lipase-Aktivität für *Marrubium vulgare*, die in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte [219, 220]. Das in *Marrubium vulgare* vorkommende 7-O-Lactoyl-luteolin wurde als potentiell aktive Verbindung im Rahmen des virtuellen Screenings vorhergesagt. Auch die in Studien beschriebene hypoglykämische und lipasehemmende Wirkung von *Morus alba* L. [221,222] konnte in den Versuchen bestätigt werden. *Morus alba* wird traditionell zur Behandlung von Fieber, zur Blutdrucksenkung und als antihyperglykämisches Nahrungmittel für Patienten mit Diabetes mellitus eingesetzt [223, 224]. Albafuran B wurde als virtueller *Screening Hit* identifiziert, *Morus alba* stellt eine biologische Quelle dieser Verbindung dar. Der methanolische Extrakt von *Hypericum hookerianum* WIGHT & ARN. zeigte eine eher schwache PL-Hemmung. Die natürliche Verbindung 4-Hydroxy-3-methoxyphenylferulat wurde im virtuellen Screening als potentiell aktive Verbindung dieser Pflanze identifiziert. Die Pflanze *Glycyrrhiza glabra* L. ist bedeutend in der traditionellen Medizin und besitzt eine lange ethnobotanische Geschichte. Wurzeln der Pflanze werden in der Volksmedizin auf der ganzen Welt verwendet [225, 226]. Neben zahlreichen anderen positiven Effekten konnte eine hypocholesterinämische Wirkung beschrieben werden [227]. So wurden verschiedene Flavonoide aus der Wurzel von *Glycyrrhiza glabra* von Birari *et al.* (2011) hinsichtlich einer Inhibition der PL untersucht [210]. Einige Verbindungen zeigten eine starke Hemmung des Enzyms. Molekulare Docking Studien der aktivsten Verbindung (Isoliquiritigenin) zeigten eine Interaktion der Verbindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Für *Maytenus boaria* MOLINA und *Cryptomeria japonica* (THUNB ex L.F.) D.DON konnten keine Literaturdaten für einen anti-Lipase Effekt gefunden werden. Durch das virtuelle Screening konnten die Flavonoide 5'-O-Methylgallocatechol (*Maytenus boaria*) und Leutolin (*Cryptomeria japonica*) als potentiell aktive Verbindungen in den Pflanzen identifiziert werden.

Die Ergebnisse der experimentellen Analysen bestätigen die entwickelten Pharmakophormodelle und demonstrieren die Eignung und Stärke der Kopplung von *in silico* Methoden mit biologischen *in vitro* Tests. Zum einen können potentielle PL Inhibitoren durch Recherche von Naturstoffdatenbanken identifiziert werden. Zum anderen können Hinweise gegeben werden, welche pflanzlichen

Quellen für eine Ernährung verwendet werden sollten, um eine Reduzierung der Lipidabsorption und eine damit einhergehender Steigerung des Sättigungsspiegels (*ileal brake*) zu erreichen.

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Differenzierung der CaCo-2 Zellen

Zur Studie des Einflusses verschiedener Sekundärmetaboliten und Pflanzenextrakte auf die Glucoseresorption war eine Differenzierung der verwendeten CaCo-2 Zellen notwendig. Zur Beschleunigung des Differenzierungsvorganges erfolgte eine Stimulation der intestinalen Zellen mit Natriumbutyrat, da es die Zellen in ihrer Proliferation hemmt und ihre Differenzierung fördert [180]. Als Maß für den Differenzierungsgrad der Zellen wurde die ALP-Aktivität bestimmt. Die hierfür angewandte Methode ist in Abschnitt 2.2.8.2 beschrieben.

Während der Versuchsdauer konnten mikroskopische Unterschiede zwischen den Zellen, in Abhängigkeit von der Stimulationszeit mit Natriumbutyrat, beobachtet werden (Abb. 3.31). Mit Abnahme der Stimulationsdauer war eine gesteigerte Proliferation erkennbar. Ein deutlich reduziertes Wachstum zeigten dabei die von Beginn an mit Natriumbutyrat behandelten Zellen (96 h) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Weiterhin waren Unterschiede im Differenzierungsgrad erkennbar. Die über 96 h und 72 h behandelten CaCo-2 Zellen bildeten ein Mosaikmuster mit deutlich größeren Einzelflächen aus. So war eine mikroskopische Einschätzung des Differenzierungsstadiums gut möglich.

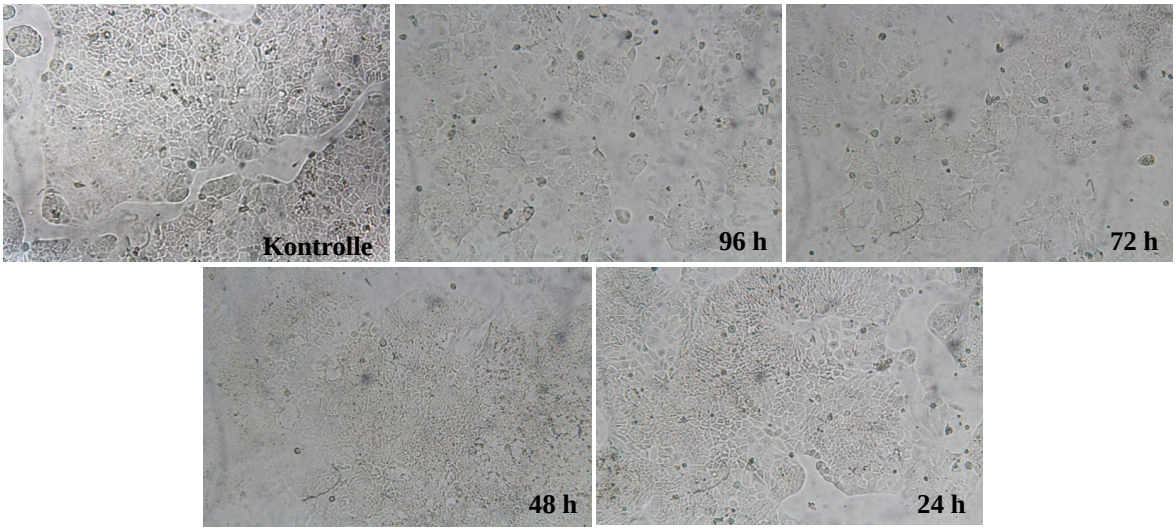


Abbildung 3.31: Differenzierung von CaCo-2 Zellen nach Stimulation mit 5 mM Natriumbutyrat (NaBu)**.** CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 200.000 Zellen/well in einer 6-well Platte angesiedelt. Im Anschluss erfolgte der Zusatz von NaBu (5 mM) nach definierten Zeitabständen. Die Versuchsdauer betrug 96 Stunden. Kontrolle: keine Stimulation, 96 h: Stimulation mit NaBu über 96 Stunden, 72 h: Stimulation mit NaBu über 72 Stunden, 48 h: Stimulation mit NaBu über 48 Stunden, 24 h: Stimulation mit NaBu über 24 Stunden. Die Lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten 96 h nach Stimulationsbeginn bei 100-facher Vergrößerung.

Zur Auswertung der ALP-Aktivität wurde zunächst die gemessene Enzymaktivität auf den ermittelten Gesamtproteingehalt bezogen. Es konnte dabei festgestellt werden, dass mit Zunahme der Inkubationsdauer mit Natriumbutyrat der Proteingehalt sank. Dies bestätigt die Hypothese, dass durch das Differenzierungsreagenz die Proliferation der Zellen zugunsten ihrer Differenzierung gehemmt wird. Die ermittelten Messwerte der unbehandelten Kontrolle wurden 1 gesetzt und die mit Natriumbutyrat behandelten Zellen relativ dazu dargestellt (Abb. 3.32). Die Ergebnisse zeigen, dass die über 96 h mit Natriumbutyrat behandelten CaCo-2 Zellen die höchste ALP-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (8,8-fache Steigerung der Enzymaktivität) aufwiesen. Zur Optimierung der Stimulationsdauer musste ein Kompromiss zwischen Proliferation und Differenzierungsgrad gefunden werden. Bei einer Stimulationsdauer von 96 h mit Natriumbutyrat konnte dieser gefunden werden, sodass in allen nachfolgenden Versuchen die Ansiedlung der Zellen nach diesem Maßstab erfolgte.

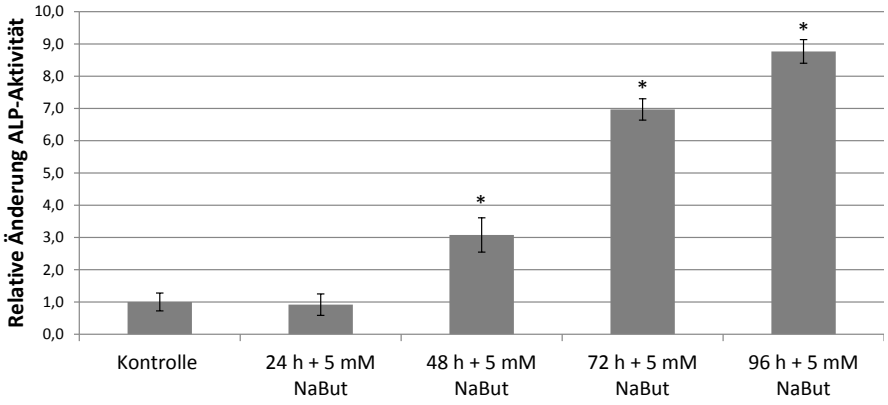


Abbildung 3.32: ALP-EnzymAktivität der CaCo-2 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung mit Natriumbutyrat (NaBu). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die für 96 h in DMEM kultiviert wurden. Die Kontrolle wurde 1 gesetzt und die mit Natriumbutyrat (5 mM) behandelten CaCo-2 Zellen relativ dazu dargestellt. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, $n = 4$.

Mit diesen Ergebnissen konnte die Beschleunigung des Differenzierungsvorganges der intestinalen Zelllinie CaCo-2 durch Zugabe von Natriumbutyrat, wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt [180, 228], bestätigt werden. Im Zuge der Differenzierung kommt es zur Ausbildung einer Bürstensaummembran und einer damit verbundenen Synthese verschiedener Hydrolasen sowie Nährstofftransporter [181, 229]. Die Ausbildung verschiedener Transportsysteme (SGLT1, GLUT2) im CaCo-2 Zellsystem war Voraussetzung für die nachfolgenden Untersuchungen zur fluoreszenzbasierten Quantifizierung der Glucoseaufnahme.

3.6.2 Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Naturstoffe und Pflanzenextrakte auf die metabolische Aktivität der CaCo-2 Zellen wurde ein Zytotoxizitätstest (MTT-Assay, Methode siehe Abschnitt 2.2.8.3) durchgeführt. Für die nachfolgenden fluoreszenzbasierten Messungen zur Glucoseaufnahme musste zunächst eine geeignete Substanz-Konzentration gefunden werden,

die keinen Einfluss auf das Zellwachstum und ihre Viabilität aufweist. Durch den Vergleich mit Literaturdaten [230–232] wurde für die Reinstoffe eine Testkonzentration von 300 µM, für die unterschiedlichen Pflanzenextrakte von 1 mg/mL vermessen. Die analysierten Reinstoffe wurden zunächst in reinem DMSO vorgelöst und anschließend mit Zellkulturmedium auf die Testkonzentration eingestellt. Die maximale DMSO-Konzentration im Versuchsansatz betrug 0,3 % (v/v). Vorversuche zeigten keinen Einfluss der DMSO-Konzentration auf die Zellviabilität. Als Positivkontrolle wurde Triton X-100 verwendet (Zellviabilität: 2,8 ± 0,8 %). Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests der Reinstoffe und Pflanzenextrakte sind in den nachfolgenden Abbildungen 3.33 und 3.34 dargestellt.

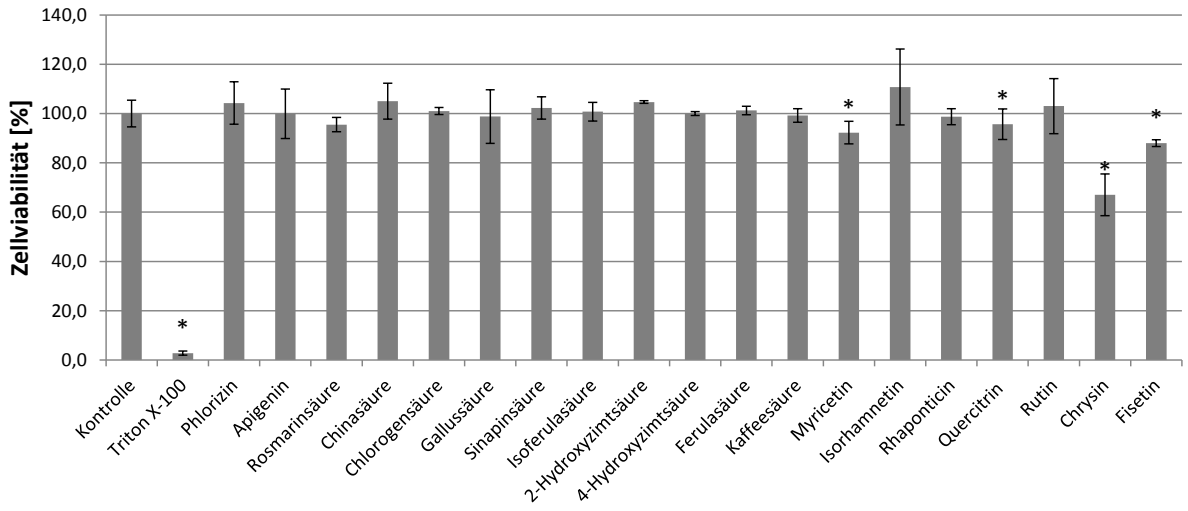


Abbildung 3.33: Zytotoxizitätsuntersuchung (MTT-Assay) unterschiedlicher Reinstoffe. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 5.000 Zellen/well in einer 96-well Platte angesiedelt. Nach 72 h erfolgte die Zugabe der Testsubstanz (Konzentration: 300 µM) über einen Zeitraum von 24 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die für 96 h in DMEM kultiviert wurden. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, $n \geq 4$.

Die Untersuchungen zeigen, dass der Großteil der analysierten Reinstoffe keinen Einfluss auf die Zellviabilität aufweist. Lediglich die Flavonoide Myricetin (Zellviabilität: 92,3 ± 4,6 %), Quercitrin (Zellviabilität: 95,6 ± 6,2 %), Fisetin (Zellviabilität: 88,0 ± 1,4 %) und Chrysin (Zellviabilität: 67,0 ± 8,4 %) zeigten einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum und wurden in den nachfolgenden Glucoseaufnahme-Studien nicht weiter analysiert.

Für die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses verschiedener Pflanzenextrakte auf die Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen wurden sieben Extrakte der TEM ausgwählt (Abb. 3.34), die bereits eine starke Inhibition verschiedener Verdauungsenzyme zeigten. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die methanolischen Extrakte nicht bzw. nur ungenügend in dem verwendeten Zellkulturmedium löslich waren, sodass lediglich die wässrigen Extrakte analysiert wurden. Die Extrakte von *Potentilla aurea* L. und *Punica granatum* L. zeigten eine geringe Hemmung der Zellviabilität (87,5 ± 7,0 % bzw. 91,0 ± 0,8 %) und wurden daher nachfolgend nicht näher analysiert.

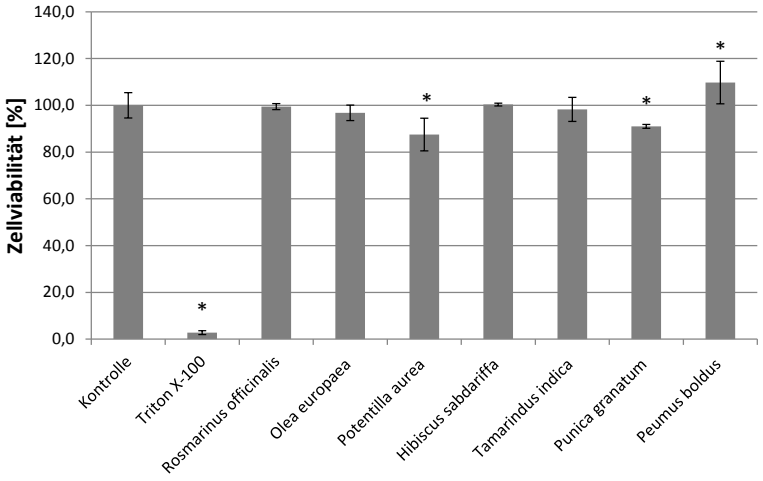


Abbildung 3.34: Zytotoxizitätsuntersuchung (MTT-Assay) der wässrigen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 5.000 Zellen/well in einer 96-well Platte angesiedelt. Nach 72 h erfolgte die Zugabe des Testextrakts (Konzentration: 1 mg/mL) über einen Zeitraum von 24 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die für 96 h in DMEM kultiviert wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die für 96 h in DMEM kultiviert wurden. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, $n \geq 4$.

Der wässrige Extrakt von *Peumus boldus* Molina zeigte hingegen einen positiven Effekt (Zellviabilität: $109{,}8 \pm 9{,}1\,\%$) auf das Zellwachstum und wurde unter Berücksichtigung der kurzen Versuchsdauer der Glucoseaufnahme Studien (25 min, inklusive Vorinkubation) und der hohen Verdopplungszeit der CaCo-2 Zellen (80 h [119]) weiter analysiert.

3.6.3 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Glucoseaufnahme

Der Einfluss verschiedener Reinstoffe und Pflanzenextrakte auf die zelluläre Glucoseaufnahme wurde unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Glucoseanalogons (2-NBDG, Methode siehe Abschnitt 2.2.8.4) untersucht. Da die Glucoseresorption physiologisch vorwiegend in den vorderen Abschnitten des Dünndarms (Duodenum, Jejunum) erfolgt, mussten die verwendeten CaCo-2 Zellen zunächst zu Dünndarm-ähnlichen Zellen differenziert werden (siehe Abschnitt 2.2.8.2). In diesem Zusammenhang erfolgte die Ausbildung wichtiger Glucosetransporter (SGLT1, GLUT2), die für eine Resorption des Monosaccharids essentiell sind.

3.6.3.1 Voruntersuchungen

Zur Optimierung der Inkubationszeit der CaCo-2 Zellen mit dem Glucoseanalogon erfolgten zunächst Voruntersuchungen der intrazellulären Glucoseaufnahme über einen Zeitraum von 5, 10 und 30 min. Die erhaltenen Messwerte wurden in Relation zum ermittelten Proteingehalt ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 3.35 dargestellt.

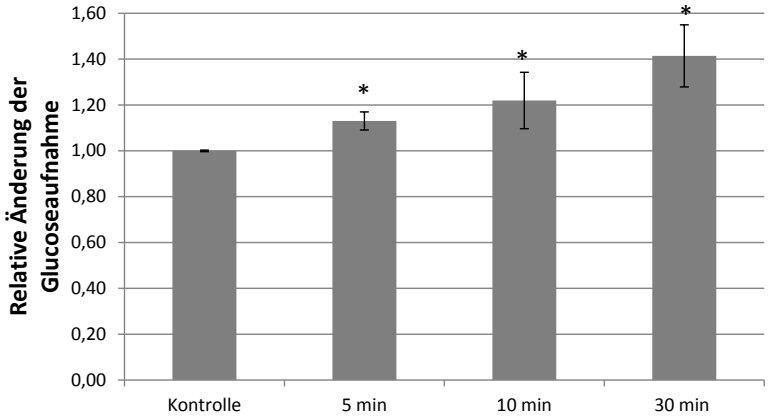


Abbildung 3.35: Vorversuch zur Optimierung der Inkubationszeit der CaCo-2 Zellen mit 2-NBDG. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 80.000 Zellen/well in einer 12-well Platte angesiedelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die für 30 min in reinem DMEM inkubiert wurden. Die Kontrolle wurde 1 gesetzt und die mit 2-NBDG behandelten CaCo-2 Zellen relativ dazu dargestellt. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, n = 4.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigender Inkubationszeit eine erhöhte Glucoseaufnahme in die Zielzelle erfolgt. Bei einer Inkubation über 30 min (relative Änderung: $1{,}41 \pm 0{,}14$) werden ca. doppelt soviele Glucosemoleküle von den CaCo-2 Zellen resorbiert als bei einer Inkubation über 10 min (relative Änderung: $1{,}22 \pm 0{,}12$). Da bei einer Inkubationszeit von 10 min noch keine Sättigung der Glucoseaufnahme vorliegt, wurden alle nachfolgenden Stimulationsversuche über einen Zeitraum von 10 min durchgeführt. Die erfolgreiche Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Glucoseanalogons in die Zelle wurde ebenfalls durch eine mikroskopische Betrachtung (Abb. 3.36) bestätigt.

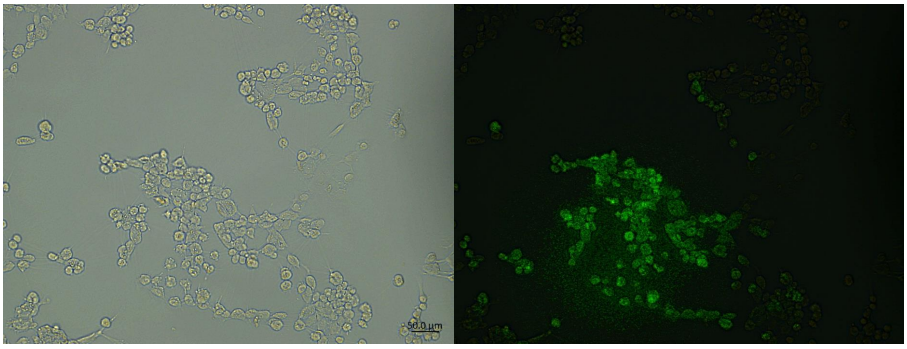


Abbildung 3.36: Mikroskopische Betrachtung der CaCo-2 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit 2-NBDG. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 80.000 Zellen/well in einer 12-well Platte angesiedelt, über 96 h kultiviert und mit dem Glucoseanalogon versetzt. Die Licht- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten 30 min nach Stimulationsbeginn bei 200-facher Vergrößerung.

3.6.3.2 Einfluss von Reinstoffen

Nach dem Abschluss der Vorversuche erfolgte zunächst die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Reinstoffe auf die zelluläre Glucoseaufnahme (Abb. 3.37). Als Positivkontrolle für die Hemmung der Glucoseaufnahme wurde das Flavonoid Phlorizin (Glucoseaufnahme: $81{,}7 \pm 3{,}4\,\%$)

verwendet, welches in der Literatur [233, 234] bereits als bekannter SGLT1-Inhibitor beschrieben wurde. Eine schwache, signifikante Hemmung der Glucoseaufnahme zeigten Gallussäure (Glucoseaufnahme: 94,4± 7,5 %) und Rhaponticin (Glucoseaufnahme: 91,7 ± 3,7 %). Alle anderen Reinstoffe besaßen keinen Einfluss auf die zelluläre Glucoseresorption.

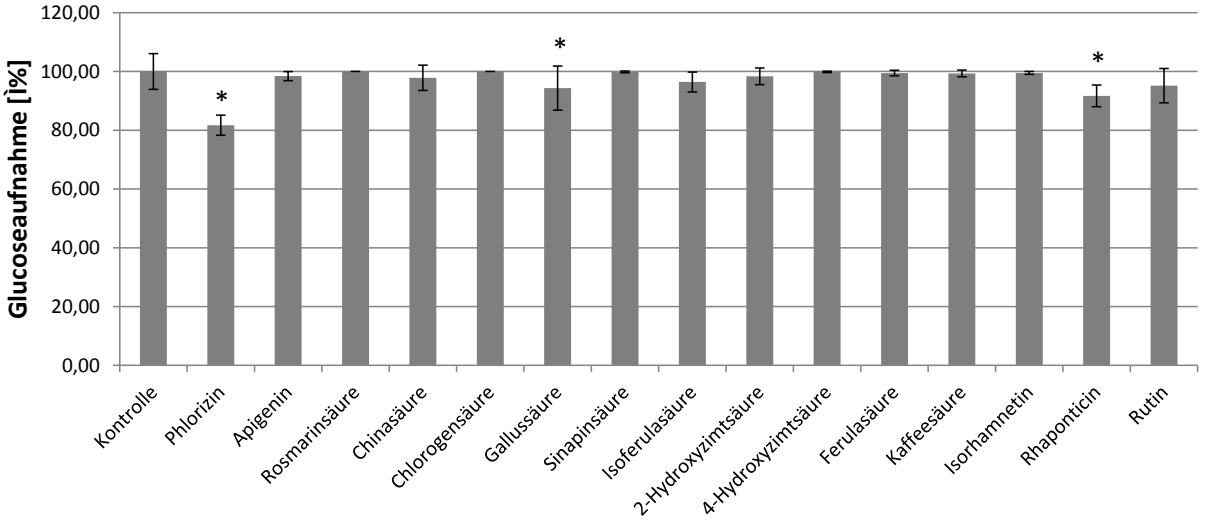


Abbildung 3.37: Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Inhibition der Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen durch polyphenolische Reinstoffe. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 80.000 Zellen/well in einer 12-well Platte angesiedelt und über 96 h kultiviert. Zunächst wurde eine Vorinkubation der Zellen mit der Testsubstanz (15 min, 300 µM) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine 10 minütige Inkubation mit 2-NDBG. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, $n \geq 4$.

Da bereits die Positivkontrolle Phlorizin (Inhibition von SGLT1) eine relativ schwache Inhibition zeigte (ca. 20 %), ist eine Glucoseaufnahme durch ein weiteres Transportprotein anzunehmen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass keine Verbesserung der Hemmwirkung durch das Arbeiten unter natriumfreien Bedingungen (SGLT1 inaktiv) erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die eingesetzte Glucosekonzentration ist mit 100 µg/mL als relativ hoch einzuschätzen, was in einer gesteigerten Glucoseaufnahme durch erleichterte Diffusionsprozesse (GLUT2) resultiert haben könnte.

In der Literatur sind bereits Hemmwirkungen verschiedener Polyphenole (v.a. Quercetin und Luteolin sowie deren Derivate) auf die Aktivität von SGLT1 beschrieben [111, 112]. Kobayashi *et al.* (2000) konnten, entgegen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse, eine Inhibition durch das Flavonoid Apigenin (IC_{50}: 65,7 µM) nachweisen. Rutin zeigte jedoch auch hier keinen Einfluss auf die Glucoseaufnahme [111]. Kottra and Daniel (2007) konnten ebenfalls keine Inhibition durch Apigenin nachweisen [112]. In Abhängigkeit von dem zur Untersuchung verwendeten Substrat (radioaktiv oder fluoreszenzmarkierte Glucose) sind unterschiedliche Sensitivitäten möglich, die in unterschiedlichen Ergebnissen resultieren können. Fluoreszenzbasierte Methoden setzen eine höhere Substratkonzentration voraus, die eine Aktivierung von Diffusionsprozessen (GLUT2) begünstigen. Eine Inhibition von GLUT2 durch Polyphenole wurde erstmals von Song *et al.* (2002) beschrieben. Mit ihrer Arbeit konnten sie eine reversible, nicht-kompetetive

Hemmung von GLUT2 durch das Flavonoid Quercetin nachweisen [113].
Zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Reinstoffen liegen jedoch keine vergleichenden Literaturdaten vor.

3.6.3.3 Einfluss von Pflanzenextrakten

Im Anschluss erfolgte die Analyse des Einflusses ausgewählter Pflanzenextrakte auf die Glucoseresorption (Abb. 3.38). Dabei zeigten die wässrigen Extrakte von *Rosmarinus officinalis* L. (Glucoseaufnahme: $85{,}3 \pm 5{,}0\,\%$), *Olea europaea* L. (Glucoseaufnahme: $91{,}1 \pm 6{,}8\,\%$) und *Peumus boldus* Molina (Glucoseaufnahme: $90{,}7 \pm 8{,}0\,\%$) eine signifikante Inhibition der intestinalen Glucoseresorption. Die Extrakte von *Hibiscus sabdariffa* L. und *Tamarindus indica* L. hatten hingegen keinen Einfluss.

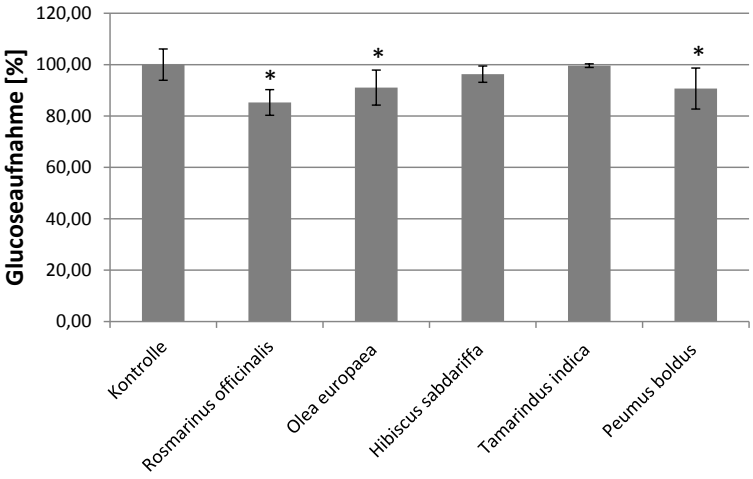


Abbildung 3.38: Fluoreszenzbasierte Studien zur Inhibition der Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen durch Pflanzen der TEM. CaCo-2 Zellen wurden in einer Konzentration von 80.000 Zellen/well in einer 12-well Platte angesiedelt und über 96 h kultiviert. Zunächst wurde eine Vorinkubation der Zellen mit dem Testextrakt (15 min, 1 mg/mL) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine 10 minütige Inkubation mit 2-NDBG. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. $*$ = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, $\alpha \leq 0{,}05$, $n \geq 4$.

Der Extrakt von *Rosmarinus officinalis* zeigte die höchste Inhibition (ca. 15 %) der Glucoseaufnahme. Vorangegange Studien von Azevedo *et al.* (2011) konnten eine signifikante Hemmung der kohlenhydratinduzierten SGLT1-Induktion im Tiermodell durch Gabe eines Tees aus *Salvia fruticosa* Mill. (Lamiaceae) nachweisen [235]. Rosmarinsäure, der wichtigste phenolische Bestandteil des Tees, konnte dabei als aktive Verbindung identifiziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die gezeigte Wirkung von *Rosmarinus officinalis* ebenfalls auf die enthaltene Rosmarinsäure zurückzuführen ist. Da Rosmarinsäure als Reinstoff (siehe Abschnitt 3.5.3.2) jedoch keine Inhibition der intestinalen Glucoseresorption zeigte, ist eine additive Wirkung verschiedener Inhaltsstoffe wahrscheinlich. Rosmarinsäure gehört zu den sogenannten "Labiatengerbstoffen", einer Gruppe von Verbindungen, die für den gerbenden Charakter einer Reihe von Drogen der Familie der Lamiaceae verantwortlich sind [236]. Künftige Studien sollten sich daher vermehrt

auf Pflanzen bzw. Pflanzenextrakte dieser Familie beziehen. Der Extrakt von *Olea europaea* zeigte ebenfalls eine Inhibition der Glucoseaufnahme. Im Tiermodell konnte eine signifikant reduzierte Stärkeverdauung und -absorption bei Gabe eines Extrakts aus den Blättern der Pflanze durch Wainstein *et al.* (2012) gezeigt werden [237]. Die reduzierte Stärkeverdauung ist dabei sehr wahrscheinlich auf eine Inhibition der Pankreasamylase zurückzuführen, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 gezeigt wurde. Für eine Inhibition der Glucosetransportproteine durch *Olea europaea* liegen hingegen keine Hinweise vor, sodass der beschriebene Effekt der verminderten Stärkeresorption sehr wahrscheinlich durch eine Inhibition des Enzyms und eine damit fehlende Spaltung in resorbierebare Komponenten bedingt ist. Für den Extrakt von *Peumus boldus* liegen keine Literaturdaten in Hinblick auf eine Inhibition der intrazellulären Glucoseaufnahme vor.
Die beschriebenen Hemmeffekte der getesteten Pflanzenextrakte sind insgesamt als gering einzustufen. Weiterhin ist nicht zu schlussfolgern, ob ausschließlich SGLT1 oder auch GLUT2 (durch hohe Glucosekonzentration ebenfalls apikal lokalisiert, siehe Abschnitt 3.6.3.2) durch die Pflanzenextrakte gehemmt wurden. Für weitere Untersuchungen wäre daher die Verwendung eines radioaktiv-markierten Glucoeanalogons anzuraten.
In der Literatur weiterhin beschrieben sind SGLT1 inhibitorische Effekte von Grünkohl-, Zwiebel-, Weinreben- und Apfelextrakten im *in vitro* Modell, die partiell im *in vivo* Mausmodell belegt werden konnten [238]. Neben SGLT1 wurde auch das inhibitorische Potential auf den GLUT2 vermittelten Transport untersucht. Hier zeigten vor allen der Apfel- und Zwiebel- und Weinrebenextrakt eine signifikante Hemmung der Glucoseaufnahme. In den Extrakten enthaltene prominente Einzelverbindungen wurden als Phloretin (Apfelextrakt), Quercetin-3-galactosid (Zwiebelextrakt) und ε-Viniferin bzw. Hopeaphenol (Weinrebenextrakt) identifiziert. Eine Inhibition der intestinalen Glucoseresorption durch Pflanzen, die traditionell als Antidiabetika Anwendung finden, wurde von Baldea *et al.* (2010) untersucht. Im *in vitro* Modell zeigten sich die Extrakte von *Rhododendron tomentosum* Harmaja (Ericaceae) and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae) besonders aktiv. In einer anschließenden Humanstudie konnte die Wirkung von *Rhododendron tomentosum* bestätigt werden [239]. Weiterhin konnte eine Hemmung der intestinalen Glucoseresorption durch den wässrigen Schalenextrakt von *Plantago ovata* Forssk. (Plantaginaceae) [240] und Nigella sativa L. (Ranunculaceae) [241] nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse liefern einen ersten Hinweis und Grundlagen für weitere Untersuchungen für die Entwicklung pflanzenbasierter Antidiabetika. Im Zusammenhang mit einer entsprechenden Diät und Lebensführung stellen sie einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Behandlung von Hyperglykämie sowie Dyslipidämie bei Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas dar.

4 Schlussfolgerungen

Die Inhibition essentieller Enzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels ist ein vielversprechender Ansatz bei der Therapie der Adipositas und des Diabetes mellitus Typ 2. Insbesondere Enzyminhibitoren pflanzlichen Ursprungs sind von großem Interesse, da sie eine reversible Enzyminhibition und damit einhergehend verminderte gastrointestinale Nebenwirkungen zeigen als rein synthetisch hergestellte Verbindungen. Weiterhin sind systemische Nebenwirkungen durch geringe Resorptionsraten von Sekundärmetaboliten reduziert. Durch den Weitertransport energiereicher Nährstoffe in distale Regionen des Dünndarms wird der Rückkopplungs-Mechanismus *ileal-brake* ausgelöst, welcher die gastrische Entleerung und die duodenale-jejunale Motilität verlangsamt. In Folge ist die Nahrungsaufnahme reduziert und Sättigungsspiegel sind erhöht [28–30].
In der vorliegenden Arbeit konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Polyphenolen auf die Aktivität essentieller Verdauungsenzyme abgeleitet werden. Dabei zeigten vor allem die Anzahl und die Position phenolischer Hydroxylgruppen einen Einfluss auf die Hemmung des Enzyms. Auch die Anwesenheit gebundener Zucker hatte je nach Enzym einen positiven oder negativen Einfluss auf den Inhibitionseffekt. Nachfolgend untersuchte Extrakte von Pflanzen, welche in der Volksmedizin traditionell gegen Erkrankungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels Anwendung finden, zeigten teilweise starke Enzyminhibitionen. Vor allem der Extrakt aus der Pflanze *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) war sehr aktiv und wurde anschließend mittels HPLC und ESI-Q-TOF-MS zur Identikation inhibitorisch wirksamer Verbindungen näher analysiert. Es konnten die Verbindungen Hibiskussäure und Hibiskussäure-Glucosid als Enzyminhibitoren identifiziert werden. In Hinsicht auf weiterführende Studien wäre die Isolation, Aufreinigung und anschließende Bestimmung des IC_{50}Wertes interessant, um das volle Potential dieser Verbindungen besser bewerten zu können. *Docking* Experimente der Hibiskussäure in das aktive Zentrum der Schweinepankreaslipase zeigten starke Interaktionen und bestätigen die *in vitro* ermittelten Ergebnisse. Auch der Extrakt der Pflanze *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. (Rosaceae) war in Hinsicht auf eine Inhibition essentieller Verdauungsenzyme sehr aktiv. Es wurden daher nachfolgend tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Extraktes auf die Nüchternblutglucose- und Serumlipid-Konzentrationen im Diabetes Typ 2-Rattenmodell durchgeführt. Hypoglykämische und hypolipidämische Effekte konnten nachgewiesen werden, welche die *in vitro* gezeigte Enzymhemmung bestätigen. Auch für den Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* liegen bereits positive Tierstudien vor, nicht jedoch für die Reinsubstanz Hibiskussäure oder Hibiskussäure-Glucosid. Ein nächster Schritt wäre daher die Untersuchung des Einflusses dieser Verbindungen im Tiermodell und in Humanstudien. Die Entwicklung eines Nahrungsergänzungsmittels zur unterstützenden Therapie der zuvor genannten Stoffwechselstörungen wäre

damit denkbar und sinnvoll.
Basierend auf den Inhibitions-Ergebnissen des *in vitro* Screenings und weiterer Literaturdaten wurden für die Pankreaslipase 3D-Pharmakophormodelle entwickelt und ein anschließendes Naturstoffscreening durchgeführt. Es konnten 68 potentielle Inhibitoren, sogenannte *Hits*, identifiziert werden. Ausgewählte Verbindungen wurden nachfolgend experimentell untersucht. Sieben von acht der untersuchten Naturstoffe sowie elf Pflanzenextrakte wurden als Inhibitoren der Pankreaslipase identifiziert. Diese Ergebnisse zeigen die Stärke der Kopplung von *in silico* Methoden mit *in vitro* Verfahren für eine Identifizierung neuer Enzyminhibitoren. Nahrungsmittel, die eine natürliche Quelle dieser Enzyminhibitoren darstellen, können den Lipidverdau auf natürlichen Weg inhibieren und somit einen *ileal brake* initiieren.
Ergänzend zu den Studien zur Enzyminhibition wurden Untersuchungen zum Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die intestinale Glucoseaufnahme durchgeführt. Die Glucoseaufnahme erfolgt ausschließlich im Dünndarm, sodass die verwendete CaCo-2-Zelllinie zunächst zu Enterocyten-ähnlichen Zellen differenziert werden musste. Durch den Zusatz von Natriumbutyrat als Differenzierungsreagenz konnte eine Bürstensaummembran mit den für die Glucoseaufnahme wichtigen Transportproteinen (SGLT1, GLUT2) exprimiert werden. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte durch Bestimmung der Aktivität der intestinalen Alkalischen Phosphatase. Nach erfolgreicher Etablierung des Zellmodells wurden Glucoseaufnahme-Studien durchgeführt. Die untersuchten Reinstoffe und Pflanzenextrakte zeigten jedoch nur geringe Hemmeffekte. Auch die Positivkontrolle (SGLT1-Inhibitor) hemmte die Glucoseaufnahme nur gering. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die verwendete Konzentration des fluoreszierenden Glucose-Analogons 2-NBDG. Fluoreszenzbasierte Untersuchungen sind gegenüber radioaktiven Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität deutlich im Nachteil. Auch müssen deutlich höhere Substratkonzentrationen eingesetzt werden, die eine Aktivierung von erleichterten Diffusionsprozessen durch Translokation von GLUT2 an die apikale Zellmembran begünstigen. Weiterführende Studien zum Einfluss von Naturstoffen auf die Glucoseaufnahme sollten daher mit radioaktiven Methoden durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Naturstoffe eine Quelle für Enzyminhibitoren darstellen. Sie sind in der Lage, essentielle Enzyme des Verdauungssystems zu inhibieren und dadurch Resorptionsraten energiereicher Makronährstoffe zu reduzieren. Ein Vorteil von Naturstoffen als Inhibitoren von Verdauungsenzymen ist ihre relativ geringe Bioverfügbarkeit und eine damit verbundene hohe Präsenz an ihrem Wirkort (Dünndarm) nach oraler Verabreichung [79]. Weiterhin sind keine weiteren Stoffwechselprozesse für eine Aktivierung der Verbindungen notwendig, sodass in Lebensmitteln erreichte Polyphenol-Konzentrationen für eine Beeinflussung der Nährstoffhydrolyse vermutlich ausreichend sind. Das Flavonoid Myricetin, welches eine starke Hemmung der amylytischen Enzyme zeigte, ist beispielsweise in hohen Konzentrationen in roten Weintrauben und schwarzem Tee enthalten [242]. Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Chinasäure, einem starken Inhibitor der pankreatischen Lipase und α-Amylase, sind Citrusfrüchte, Äpfel, Pflaumen, Brombeeren, Heidelbeeren und Kaffeebohnen [243].

Dennoch fehlt es bislang an umfassenden Studien über den Metabolismus und vor allem die Toxizität von Naturstoffen. Metabolite, die sich aus dem mikrobiellem Abbau der Verbindungen im menschlichen Körper ergeben, sind weitgehend unbekannt [67]. In wenigen Arbeiten wurden toxische Effekte auf Mikroorganismen [244] sowie Leber-und Nierenschäden durch hohe Mengen an Polyphenolen beschrieben [245]. Diese unerwünschten Nebenwirkungen wurden jedoch bei sehr hohen, unphysiologischen Konzentrationen beobachtet und für ein klares Verständnis der potentiell nachteiligen Effekte von diätetischen Polyphenolen und anderen Naturstoffen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Literaturverzeichnis

[1] World Health Organization: Obesity and overweight. Factsheet. *Geneva: WHO* 311 (2015)

[2] Hauner, H. ; Buchholz, G. ; Hamann, A. ; Husemann, B. ; Koletzko, B. ; Liebermeister, H. ; Wabitsch, M. ; Westenhöfer, J. ; Wirth, A. ; Wolfram, G.: Adipositas und Diabetes mellitus. *Diabetologie* 6 (2011), S. 137–142

[3] Kopelman, P. G.: Obesity is a medical problem. *Nature* 404 (2000), S. 635–643

[4] Trigueros, L. ; Peña, S. ; Ugidos, A.V. ; Sayas-Barberá, E. ; Pérez-Álvarez, J.A. ; Sendra, E.J.: Food Ingredients as Anti-Obesity Agents: A Review. *Food Sci. Nutr.* 53 (2013), S. 929–942

[5] Deutsche Adipositas Gesellschaft: Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas. *S3-Leitlinie* (2014)

[6] Roh, C. ; Jung, U.: Screening of Crude Plant Extracts with Anti-Obesity Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012), S. 1710–1719.

[7] Singh, S. ; Jarial, R. ; Kanwar, S.S.: Therapeutic effect of herbal medicines on obesity: herbal pancreatic lipase inhibitors. *Wudpecker J. Med. Plants* 2 (2013), S. 53–65.

[8] Gholamhoseinian, A. ; Shahouzehi, B. ; Sharifi-far, F.: Inhibitory Effect of some Plant Extracts on Pancreatic Lipase. *Int. J. Pharmacol.* 6 (2010), S. 18–24.

[9] Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel: Nationale Verzehrsstudie II. *Max Rubner-Institut* (2008)

[10] *American Medical Association House of Delegates, Resolution 420 (A-13).* 2013

[11] AMB: Medikamentöse Therapie der Adipositas? *Der Arzneimittelbrief* 34, 09 (2000)

[12] Schatz, H.: Zwei Medikamente zur Behandlung der Adipositas in der Europäischen Union (EU) neu zugelassen. *Medizinische Kurznachrichten der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie* (2015)

[13] Weibel, E.K. ; Hadvary, P. ; Hochuli, E. ; Kupfer, E. ; Lengsfeld, H.: Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by Streptomyces toxytricini. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* 40 (1987), S. 1081–1085

[14] Garza, A.L. de l. ; Milagro, F.I. ; Boque, N. ; Campión, J. ; Martínez, J.A.: Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment. *Planta Med.* 77 (2011), S. 773–785.

[15] Chaput, J.P. ; St-Pierre, S. ; Tremblay, A.: Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. *Med. Chem.* 7 (2007), S. 3–10

[16] World Health Organization: Diabetes. Factsheet. *Geneva: WHO* 312 (2015)

[17] Funke, I.: *Untersuchungen zur Beeinflussung der Amylase-Aktivität durch Pflanzenextrakte und polyphenolische Reinstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Cynara cardunculus L. ssp. flavescens Wikl. und seiner Inhaltsstoffe*, Freie Universität Berlin, Diss., 2007

[18] Bundesärztekammer (BÄK), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (. Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) (. Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV): Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes - Langfassung. *1. Auflage. Version 4.* (2013)

[19] (ADA), American Diabetes A.: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 33 (2010), S. 62–69

[20] Baumgärtner, W. ; Gruber, A.D.: *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin.* Enke Verlag - Georg Thieme Verlag, 2015

[21] Kerner, W. ; Brückel, J.: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 6 (2011), S. 107–110

[22] Deutsches Zentrum für Diabetesforschung e.V.: Therapie des Typ-1-Diabetes. *http://www.dzd-ev.de/diabetes-die-krankheit/therapie-des-typ-1-diabetes/therapie-mit-insulinpumpe/index.html* ([letzter Aufruf: 27.07.2016])

[23] Zhang, C.-S. ; Podeschwa, M. ; Block, O. ; Altenbach, H.-J. ; Piepersberg, W. ; Wehmeier, U.F.: Identification of a 1-epi-valienol 7-kinase activity in the producer of acarbose, Actinoplanes sp. SE50/110. *FEBS Lett.* 540 (2003), S. 53–57

[24] Chiasson, J.-L. ; Josse, R. G. ; Gomis, R. ; Hanefeld, M. ; Karasik, A. ; The STOP-NIDDM Trial Research Group, M. L.: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOPNIDDM randomised trial. *Lancet* 359 (2002), S. 2072–2077

[25] Hillebrand, I. ; Boehme, K. ; Frank, G. ; Fink, H. ; Berchtold, P.: The Effects of the a-Glucosidase Inhibitor BAY g 5421 (Acarbose) on Meal-Stimulated Elevations of Circulating Glucose, Insulin, and Triglyceride Levels in Man. *Research in Experimental Medicine* 175 (1979), S. 81–86

[26] Berg, J.M. ; Tymoczko, J.L. ; Stryer, L.: *Stryer Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2007

[27] Campbell, N.A. ; Reece, J.B. ; Urry, L.A. ; Cain, M.L. ; Wasserman, S.A. ; Minorsky, P.V. ; Jackson, R.B.: *Campbell Biologie.* Bd. 10. Auflage. Pearson Studium, 2015

[28] Maljaars, P.W. ; Keszthelyi, D. ; Masclee, A.A.: An ileal brake-through? *Am. J. Clin. Nutr.* 92 (2010), S. 467–468

[29] Shin, H.S. ; Ingram, J.R. ; McGill, A.T. ; Poppitt, S.D.: Lipids, CHOs, proteins: can all macronutrients put a 'brake' on eating? *Physiol. Behav.* 120 (2013), S. 114–123

[30] Maljaars, P.W. ; Peters, H.P. ; Mela, D.J. ; Masclee, A.A.: Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review. *Physiol. Behav.* 95 (2008), S. 271–281

[31] Winkler, F.K. ; Darcy, A. ; Hunziker, W.: Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343 (1990), S. 771–774

[32] Kimura, H. ; Futami, Y. ; Tarui, S. ; Shinomiya, T.: Activation of Human Pancreatic Lipase Activity by Calcium and Bile Salts. *J. Biochem.* 92 (1982), S. 243–251

[33] http://www.uniprot.org/uniprot/P16233 [12.10.2016]

[34] Birari, R.B. ; Bhutani, K.K.: Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today* 12 (2007), S. 879–89

[35] Schmid, Ulrike: *Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution*, Universität Stuttgart, Diss., 1999

[36] Zeitz, V.M. ; Caspary, W.F. ; Bockemühl, J. ; Lux, G.: *Ökosystem Darm V.* Springer Verlag, Heidelberg, 1993

[37] Ebermann, R. ; Elmadfa, I.: *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung.* Springer Verlag, Heidelberg, 2011

[38] Franco, O.L. ; Rigden, D.J. ; Melo, F.R. ; Grossi-De-Sá, M.F.: Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase. *Eur. J. Biochem.* 292 (2002), S. 397–412

[39] Buchholz, T.: *In-Gel-Verdau von ausgewählten Proteinen - Peptidanalyse mittels MALDI-TOF-MS und Proteinidentifikation*, Universität Potsdam, Diplomarbeit, 2011

[40] Lebovitz, H.E.: Alpha-Glucosidase Inhibitors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 26 (1997), S. 539–551

[41] http://www.uniprot.org/uniprot/P04746 [20.10.2016]

[42] Brayer, G.D. ; LUO, Y. ; Withers, S.G.: The structure of human pancreatic a-amylase at 1.8 A resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* 4 (1995), S. 1730–1742

[43] Henrissat, B.: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (1991), S. 309–316

[44] Henrissat, B. ; Bairoch, A.: Updating the sequence-based classification of glykosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 (1996), S. 695–696

[45] Janecek, S. ; Svensson, B. ; MacGregor, E.A.: Alpha-Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014), S. 1149–1170

[46] Coutinho, P.M. ; Henrissat, B.: Carbohydrat-active enzymes: an integrated database approach. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. *Cambridge: The Royal Society of Chemistry* (1999), S. 3–12

[47] Berman, H.M. ; Westbrook, J. ; Feng, Z. ; Gilliland, G. ; Bhat, T.N. ; Weissig, H. ; Shindyalov, I.N. ; Bourne, P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28 (2002), S. 235–242

[48] Nichols, B.L. ; Eldering, J. ; Avery, S. ; Hahn, D. ; Quaronii, A. ; Sterchi, E.: Human Small Intestinal Maltase-glucoamylase cDNA Cloning. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), S. 3076–3081

[49] Nichols, B. L. ; S.Avery ; Sen, P. ; Swallow, D. M. ; Hahn, D. ; Sterchi, E.: The maltase-glucoamylase gene: Common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003), S. 1432–1437

[50] http://www.uniprot.org/uniprot/O43451 [27.08.2016]

[51] Sim, L. ; Quezada-Calvillo, R. ; Sterchi, E. E. ; Nichols, B. L. ; Rose, D. R.: Human Intestinal Maltase-Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *J. Mol. Biol.* 375 (2008), S. 782–792

[52] Horton, H.R. ; Moran, L.A. ; Scrimgeour, K. G. ; Perry, M.D. ; Rawn, J.D.: *Biochemie*. Pearson Deutschland GmbH, 2008 (4. Auflage)

[53] http://www.uniprot.org/uniprot/P07477 [04.09.2016]

[54] http://www.uniprot.org/uniprot/Q6GPI1 [04.09.2016]

[55] http://www.uniprot.org/uniprot/P08217 [04.09.2016]

[56] Narisawa, S. ; Huang, L. ; Iwasaki, A. ; Hasegawa, H. ; Alpers, D.H. ; Millan, J.L.: Accelerated Fat Absorption in Intestinal Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *Mol Cell Biol.* 23 (2003), S. 7525–7530

[57] http://www.uniprot.org/uniprot/P09923 [29.08.2016]

[58] Akiba, Y. ; Mizumori, M. ; Guth, P.H. ; Engel, E. ; Kaunitz, J.D.: Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293 (2007), S. 1223–1233

[59] Benic, V. ; Fiser-Herman, M.: Über alkalische Phosphatasen in menschlichen Faeces. *Z. klin. Chem. u, klin. Biochem.* 8 (1970), S. 458–464

[60] Bajorat, T. ; Brandenburger, T.: *Fallbuch Biochemie - Fall 12 Verdauung und Resorption von Kohlenhydraten und Proteinen*. 1. Auflage. Thieme Verlagsgruppe, 2006

[61] Kellett, G.L. ; Brot-Laroche, E.: Apical GLUT2 - A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. *Diabetes* 54 (2005), S. 3056–3062

[62] Rosenwasser, R.F. ; Sultan, S. ; Sutton, D. ; Choksi, R. ; Epstein, B.J.: SGLT-2 inhibitors and their potential in the treatment of diabetes. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.: Targets Ther.* 6 (2013), S. 453–467

[63] Grempler, R. ; Thomas, L. ; Eckhardt, M. ; Himmelsbach, F. ; Sauer, A. ; Sharp, D.E. ; Bakker, R. A. ; Mark, M. ; Klein, T. ; Eickelmann, P.: Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obes. Metab.* 14 (2012), S. 83–90

[64] Bojunga, J. ; Schölmerich, J.: SGLT2-Inhibitoren - Eine neue Substanzklasse zur Therapie des Typ-2-Diabetes. *Arzneimitteltherapie* 33 (2015), S. 137–145

[65] Löffler, G. ; Petrides, P.E. ; Heinrich, P.C.: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, 2007 (8. Auflage)

[66] Kuksis, A. ; Shaikh, N.A. ; Hoffman, A.G.: Lipid absorption and metabolism. *Environ. Health Perspect.* 33 (1979), S. 45–55

[67] Nikfardjam, Martin Shahin P.: *Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung*, Justus von Liebig-Universität Giessen, Diss., 2001

[68] Kuhnert, N.: Polyphenole: Vielseitige Pflanzen inhaltsstoffe. *Chem. Unserer Zeit* 47 (2013), S. 80–91

[69] Manach, C. ; Scalbert, A. ; Morand, C. ; Remesy, C. ; Jimenez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004), S. 727–747

[70] Kaufeld, Aurica-Maria: *Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Procyanidin-induzierten Vasorelaxation an isolierten Arterien vom Schwein*, Freie Universität Berlin, Diss., 2015

[71] Park, H.J. ; Jung, U.J. ; Lee, MK ; Cho, S.J. ; Jung, H.K. ; Hong, J.H. ; Park, Y.B. ; Kim, S.R. ; Shim., S. ; Jung, J. ; Choi, M.S.: Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013), S. 360–364

[72] Assini, J.M. ; Mulvihill, E.E. ; Huff, M.W.: Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 24 (2013), S. 34–40

[73] Hanhineva, K. ; Törrönen, R. ; Bondia-Pons, I. ; Pekkinen, J. ; Kolehmainen, M. ; Mykkänen, H. ; Poutanen, K.: Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010), S. 1365–1402

[74] Yoshikawa, M. ; Shimoda, H. ; Nishida, N. ; Takada, M. ; Matsuda, H.: Salacia reticulata and Its Polyphenolic Constituents with Lipase Inhibitory and Lipolytic Activities Have Mild Antiobesity Effects in Rats. *J. Nutr.* 132 (2002), S. 1819–1824

[75] Hara, Y. ; Honda, M.: The Inhibition of alpha-Amylase by Tea Polyphenols. *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990), S. 1939–1945

[76] Mole, S. ; Waterman, P.G.: Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry* 26 (1986), S. 99–102

[77] Griffiths, D.W.: The inhibition of digestive enzymes by extracts of field bean (vicia faba). *J. Sci. Food Agric.* 30 (1979), S. 458–462

[78] Haslam, E.: Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited. Chemistry and pharmacology of natural products University of Cambridge Oriental Publications. *Cambridge: CUP Archive* (1989)

[79] Buchholz, T. ; Melzig, M.F.: Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors. *Planta Med.* 81 (2015), S. 771–783

[80] Spencer, J.P.E.: Flavonoids: modulators of brain function? *Br. J. Nutr.* 99 (2008), S. ES60–ES77

[81] Wollgast, J. ; Anklam, E.: Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* 33 (2000), S. 423–447

[82] *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods.* 2001, 3

[83] Kumar, S. ; Alagawadi, K.R.: Anti-obesity effects of galangin, a pancreatic lipase inhibitor in cafeteria diet fed female rats. *Pharm. Biol.* 51 (2013), S. 607–613

[84] Nakai, M. ; Fukui, Y. ; Asami, S. ; Toyoda-Ono, Y. ; Iwashita, T. ; Shibata, H. ; Mitsunaga, T. ; Hashimoto, F. ; Kiso, Y.: Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005), S. 4593–4598

[85] Yuda, N. ; Tanaka, M. ; Suzuki, M. ; Asano, Y. ; Ochi, H. ; Iwatsuki, K.: Polyphenols extracted from black tea (Camellia sinensis) residue by hot-compressed water and their inhibitory effect on pancreatic lipase in vitro. *J. Food Sci.* 77 (2012), S. H254–261

[86] Shimura, S. ; Itoh, Y. ; Yamashita, A. ; Kitano, A. ; Hatano, T. ; Yoshida, T. ; Okuda, T.: Inhibitory effects of flavonoids on lipase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41 (1994), S. 847–850

[87] Kawaguchi, K. ; Mizuno, T. ; Aida, K. ; Uchino, K.: Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and Pseudomonas. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 61 (1997), S. 102–104

[88] Lee, E.M. ; Lee, S.S. ; Chung, B.Y. ; Cho, J.Y. ; Lee, I.C. ; Ahn, S.R. ; Jang, S.J. ; Kim, T.H.: Pancreatic Lipase Inhibition by C-Glycosidic Flavones Isolated from Eremochloa ophiuroides. *Molecules* 15 (2010), S. 8251–8259

[89] Batubara, I. ; Kuspradini, H. ; Muddathir, A.M. ; Mitsunaga, T.: Intsia palembanica wood extracts and its isolated compounds as Propionibacterium acnes lipase inhibitor. *J. Wood Sci.* 60 (2014), S. 169–174

[90] Tao, Y. ; Zhang, Y. ; Wang, Y. ; Cheng, Y.: Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography - mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf. *Anal. Chim. Acta* 785 (2013), S. 75–81

[91] You, Q. ; Chen, F. ; Wang, X. ; Luo, P.G. ; Jiang, Y.: Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on alpha-glucosidase and pancreatic lipase activities. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011), S. 9506–9511

[92] Kawsar, S.M.A. ; Huq, E. ; Nahar, N. ; Ozeki, Y.: Identification and quantification of phenolic acids in Macrotyloma uniflorum by reversed phase HPLC. *J. Plant Physiol.* 3 (2008), S. 165–172

[93] Bengoechea, L. ; Hernandez, T. ; Quesada, C. ; Bartolome, B. ; Estrella, I. ; Gomez-Cordoves, C.: Structure of Hydroxycinnamic Acid Derivatives Established by High-Perfomance Liquid Chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia* 41 (1995), S. 95–98

[94] Meyer, A.S. ; Donovan, J.L. ; Pearson, D.A. ; Waterhouse, A.L. ; Frankel, E.N.: Fruit Hydroxycinnamic Acids Inhibit Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S. 1783–1787

[95] Herrmann, K.: Ueber den Gehalt und die Lokalisation der Phenolischen Inhaltsstoffe im Gemuese. *Qual. Plant.* 25 (1976), S. 231–246

[96] Watzl, B. ; Rechkemmer, G.: Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* 48 (2001), S. 413–416

[97] Marrelli, M. ; Loizzo, M.R. ; Nicoletti, M. ; Menichini, F. ; Conforti, F.: In vitro investigation of the potential health benefits of wild Mediterranean dietary plants as anti-obesity agents with alpha-amylase and pancreatic lipase inhibitory activities. *J. Sci. Food. Agric.* 94 (2014), S. 2217–2224

[98] Kato, E. ; Yama, M. ; Nakagomi, R. ; Shibata, T. ; Hosokawa, K. ; Kawabata, J.: Substrate-like water soluble lipase inhibitors from Filipendula kamtschatica. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012), S. 6410–6412

[99] Cha, K.H. ; Song, D.G. ; Kim, S.M. ; Pan, C.H.: Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (Ligularia fischeri) tea polyphenols during simulated digestion. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012), S. 7152–7157

[100] Wu, Y.H.S. ; Chiu, C.H. ; Yang, D.J. ; Lin, Y.L. ; Tseng, J.K. ; Chen, Y.C.: Inhibitory effects of litchi (Litchi chinensis Sonn.) flower-water extracts on lipase activity and diet-induced obesity. *J. of Func. Foods* 5 (2013), S. 923–929

[101] Bustanji, Y. ; Issa, A. ; Mohammad, M. ; Hudaib, M. ; Tawah, K. ; Alkhatib, H. ; Almasri, I. ; Al-Khalidi, B.: Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by Rosmarinus officinalis extract and selected phenolic constituents. *J. Med. Plant Res.* 4 (2010), S. 2235–2242

[102] Karamac, M. ; Amarowicz, R.: Inhibition of Pancreatic Lipase by Phenolic Acids - Examination in vitro. *Z. Naturforsch.* 51 (1996), S. 903–905

[103] Grove, K.A. ; Lambert, J.D.: Laboratory, Epidemiological, and Human Intervention Studies Show That Tea (Camellia sinensis) May Be Useful in the Prevention of Obesity. *J. Nutr.* 140 (2010), S. 446–453

[104] Khadem, S. ; Marles, R.J.: Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15 (2010), S. 7985–8005

[105] Shahidi, F. ; Ho, C.T.: Phenolics in Food and Natural Health Products: An Overview. Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products. ACS Symposium Series. *American Chemical Society* Chap.1 (2005), S. 2–8.

[106] Jo, Y.H. ; Kim, S.B. ; Ahn, J.H. ; Liu, Q. ; Hwang, B.Y. ; Lee, M.K.: Inhibitory activity of benzophenones from Anemarrhena asphodeloides on pancreatic lipase. *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013), S. 481–483

[107] Dalar, A. ; Türker, M. ; Zabaras, D. ; Konczak, I.: Phenolic Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of Eryngium bornmuelleri leaf. *Plant Foods Hum. Nutr.* 69 (2014), S. 30–36

[108] Adlercreutz, H.: Lignans and human health. *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 44 (2007), S. 483–525

[109] Meagher, L.P. ; Beecher, G.R.: Assessment of data on the lignan content of foods. *J. Food Compos. Anal.* 13 (2000), S. 935–947

[110] Ahn, J.H. ; Shin, E.J. ; Liu, Q. ; Kim, S.B. ; Choi, K.M. ; Yoo, H.S. ; Lee, B.Y. Hwang M.: Lignan Derivatives from Fraxinus rhynchophylla and Inhibitory Activity on Pancreatic Lipase. *Nat. Prod. Sci.* 18 (2012), S. 116–120

[111] Kobayashi, Y. ; Suzuki, M. ; Satsu, H. ; Arai, S. ; Hara, Y. ; Suzuki, K. ; Miyamoto, Y. ; Shimizu, M.: Green Tea Polyphenols Inhibit the Sodium-Dependent Glucose Transporter of Intestinal Epithelial Cells by a Competitive Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 5618–5623

[112] 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322 (2007), S. 829–835

[113] Song, J. ; Kwon, O. ; Chen, S. ; Daruwala, R. ; Eck, P. ; Park, J.B. ; Levine, M.: Flavonoid Inhibition of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) and Glucose Transporter Isoform 2 (GLUT2), Intestinal Transporters for Vitamin C and Glucose. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 15252–15260

[114] 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. *FASEB J.* 21 (2007), S. 366–377

[115] 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. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007), S. 4604–4609

[116] Klaus, S. ; Pültz, S. ; Thöne-Reineke, C. ; Wolfram, S.: Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obes.* 29 (2005), S. 615–623

[117] Kirchner, T. ; Lembcke, B. ; (Hrsg.), M. K.: *Ökosystem Darm VIII.* Springer Verlag, Heidelberg, 1999

[118] Heerdt, B.G. ; Houston, M.A. ; Augenlicht, L.H.: Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 54 (1994), S. 3288–3293

[119] https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-169.html [02.12.2015]

[120] Soumyanath, A.: *Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants.* Taylor & Francis group, Abingdon, England, 2006

[121] Jun, H.-J. ; Chung, M.-J. ; Dawson, K. ; Rodriguez, R.L. ; Houng, S.-J. ; Cho, S.-Y. ; Jeun, J. ; Kim, J.-Y. ; Kim, K.-H. ; Park, K.W. ; Kim, C.-T. ; Lee, S.J.: Nutrigenomic Analysis of Hypolipidemic Effects of Agastache rugosa Essential Oils in HepG2 Cells and C57BL/6 Mice. *Food Sci. Biotechnol.* 19 (2010), S. 219–227

[122] Jia, W. ; Gao, W. ; Tang, L.: Antidiabetic Herbal Drugs Officially Approved in China. *Phytother. Res.* 17 (2003), S. 1127–1134

[123] Wang, K. ; Cao, P. ; Shui, W. ; Yang, Q. ; Tang, Z. ; Zhang, Y.: Angelica sinensis polysaccharide regulates glucose and lipid metabolism disorder in prediabetic and

streptozotocin-induced diabetic mice through the elevation of glycogen levels and reduction of inflammatory factors. *Food Funct.* 6 (2005), S. 902–909

[124] Yin, J. ; Zhang, H. ; Ye, J.: Traditional Chinese Medicine in Treatment of Metabolic Syndrome. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 8 (2008), S. 99–111

[125] Yoon, T.S. ; Sung, Y.Y. ; Jang, J.Y. ; Yang, W.K. ; Ji, Y.U. ; Kim, H.K.: Anti-obesity Activity of Extract from Saussurea lappa. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 4 (2010), S. 151–156

[126] Asgary, S. ; Rahimi, P. ; Mahzouni, P. ; Madani, H.: Antidiabetic effect of hydroalcoholic extract of Carthamus tinctorius L. in alloxan-induced diabetic rats. *J. Res. Med. Sci.* 17 (2012), S. 386–392

[127] He, K. ; Li, X. ; Chen, X. ; Ye, X. ; Huang, J. ; Jin, Y. ; Li, P. ; Deng, Y. ; Jin, Q. ; Shi, Q. ; Shu, H.: Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011), S. 1135–1142

[128] Chowdhury, S.S. ; Islam, M.N. ; Jung, H.A. ; Choi, J.S.: In vitro antidiabetic potential of the fruits of Crataegus pinnatifida. *Res. Pharm. Sci.* 9 (2014), S. 1–22

[129] Yanfu, Z.: *Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine.* China Press of Traditional Chinese Medicine, Beijing, China, 2002

[130] Lee, I.-A. ; Lee, J.H. ; Baek, N.-I. ; Kim, D.-H.: Antihyperlipidemic Effect of Crocin Isolated from the Fructus of Gardenia jasminoides and Its Metabolite Crocetin. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005), S. 2106–2110

[131] Xiong, W. ; Chen, G. ; Tan, D. ; Zou, S.: Hypoglycemic and hypolipidemic effect of polysaccharide from wild plant Lycopus lucidus Turcz.on alloxan-induced diabetic mice. *Chin. J. Bioprocess Eng.* 6 (2011), S. 45–48

[132] Xie, W. ; Du, L.: Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines. *Diabetes, Obes. Metab.* 13 (2011), S. 289–301

[133] Eidi, A. ; Eidi, M. ; Esmaeili, E.: Antidiabetic effect of garlic (Allium sativum L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 13 (2006), S. 624–629

[134] El-Abhar, H.S. ; Schaalan, M.F.: Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J. Diabetes* 5 (2014), S. 176–197

[135] Graf, B.L. ; Raskin, I. ; Cefalu, W.T. ; Ribnicky, D.M.: Plant-derived therapeutics for the treatment of metabolic syndrome. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11 (2010), S. 1107–1115

[136] Bäumler, S.: *Heilpflanzen - Praxis heute, Band 2 Rezepturen und Anwendung.* Urban & Fischer Verlag, 2013 (2. Auflage)

[137] Schilcher, H. ; Kammerer, S. ; Wegener., T.: *Leitfaden Phytotherapie.* Urban & Fischer Verlag (Elsevier GmbH), 2010 (4. Auflage)

[138] Guillou, I. ; Schäffler, A. ; Escher, M.: *Medizin für Heilpraktiker.* Haug Verlag, 2012 (1. Auflage)

[139] Adisakwattana, S. ; Ruengsamran, T. ; Kampa, P. ; Sompong, W.: In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal alpha-glucosidase and pancreatic alpha-amylase. *BMC Complementary Altern. Med.* 12:110 (2012)

[140] Melzig, M.F. ; Funke, I.: Inhibitors of alpha-amylase from plants-a possibility to treat diabetes mellitus type II by phytotherapy? *Wien Med. Wochenschr.* 157 (2007), S. 320–324

[141] Qidwai, W. ; Ashfaq, T.: Effect of dietary supplementation of black seed (N. Sativa L.) on lipid profile of patients suffering from diabetes. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 13 (2014), S. 3–8

[142] Panickar, K.S.: Beneficial effects of herbs, spices and medicinal plants on the metabolic syndrome, brain and cognitive function. *Cent. Nerv Syst. Agents Med. Chem.* 13 (2013), S. 13–29

[143] Osuna-Martínez, U. ; Reyes-Esparza, J. ; Rodríguez-Fragoso, L.: Cactus (Opuntia ficus-indica): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Nat. Prod. Chem. Res.* 2:6 (2014)

[144] Uzayisenga, R. ; Ayeka, P.A. ; Wang, Y.: Anti-Diabetic Potential of Panax Notoginseng Saponins (PNS): A Review. *Phytother. Res.* 28 (2014), S. 510–516

[145] Fintelmann, V. ; Weiss, R.F.: *Lehrbuch Phytotherapie.* Georg Thieme Verlag, 2009 (12. Auflage)

[146] Barrett, M.L. ; Udani, J.K.: A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr. J.* 10: 24 (2011)

[147] Banihani, S. ; Swedan, S. ; Alguraan, Z.: Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutr. Res.* 33 (2013), S. 341–348

[148] Khosla, P. ; Gupta, D.D. ; Nagpal, K.: Effect of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) on blood glucose in normal and diabetic rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39 (1995), S. 173–174

[149] Sergent, T. ; Vanderstraeten, J. ; Winand, J. ; Beguin, P. ; Schneider, Y.-J.: Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food Chemistry* 135 (2012), S. 68–73

[150] Probes, Molecular: *EnzChek® Protease Assay Kit, green fluorescence (E6638)*, 2016

[151] Aces, G. ; Möckel, HJ.: *Liquid-Chromatographie, Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC.* VHC-Verlag, Weinheim, 1991 (1. Auflage)

[152] Young, C.S. ; Dolan, J.W.: Success with evaporative lightscattering detection. *LC GC Europe* 17 (2004), S. 192–199

[153] Worthington Biochemical Corporation. (Hrsg.): *Worthington Enzyme Manual: Alpha Amylase Assay.* Worthington Biochemical Corporation.

[154] Lottspeich, F. ; Engels, JW.: *Bioanalytik.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2006 (2. Auflage)

[155] Pingoud, A. ; Urbanke, C.: *Arbeitsmethoden der Biochemie.* Walter de Gruyter Verlag, 1997 (1. Auflage)

[156] Trafkowski, J.: *Dissertation: Anwendungen der HPLC-Triple Quadrupol MassenspektromeMass in der forensischen und klinischen Toxikologie bei der Analytik von Opioiden.* Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2008

[157] Smith, P.K. ; Krohn, R.I. ; Hermanson, G.T. ; Mallia, A.K. ; Gartner, F.H. ; Provenzano, M.D. ; Fujimoto, E.K. ; Goeke, N.M. ; Olson, B.J. ; Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1985), S. 76–85

[158] Wiechelman, K.J. ; Braun, R.D. ; Fitzpatrick, J.D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175 (1988), S. 231–237

[159] *CORINA 3.4.* Molecular Networks GmbH: Erlangen, Germany., 2006

[160] Galal, S.A. ; Abdelsamie, A.S. ; Soliman, S.M. ; Mortier, J. ; Wolber, G. ; Ali, M.M. ; Tokuda, H. ; Suzuki, N. ; Lida, A. ; Ramadan, R.A. ; Diwani, H.I. E.: Design, synthesis and structure-activity relationship of novel quinoxaline derivatives as cancer chemopreventive agent by inhibition of tyrosine kinase receptor. *Eur. J. Med. Chem.* 69 (2013), S. 115–124

[161] Kozakov, D. ; Hall, L.E. G. ; Bohnuud, T. ; Mottarella, S.E. ; Luo, L. ; Xia, B. ; Beglov, D. ; Vajda, S.: The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nat. Protoc.* 10 (2015), S. 733–755

[162] Brenke, R. ; Kozakov, D. ; Chuang, G.-Y. ; Beglov, D. ; Hall, D. ; Landon, M.R. ; Mattos, C. ; Vajda, S.: Fragment-based identification of druggable 'hot spots' of proteins using Fourier domain correlation techniques. *Bioinformatics* 25 (2009), S. 621–627

[163] Kozakov, D. ; Hall, D.R. ; Chuang, G.-Y. ; Cencic, R. ; Brenke, R. ; Grove, L.E. ; Beglov, D. ; Pelletier, J. ; Whitty, A. ; Vajda, S.: Structural conservation of druggable hot spots in protein-protein interfaces. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011), S. 13528–13533

[164] Levay, M. ; Krobert, K.A. ; Wittig, K. ; Voigt, N. ; Bermudez, M. ; Wolber, G. ; Dobrev, D. ; Levy, F. O. ; Wieland, T.: NSC23766, a Widely Used Inhibitor of Rac1 Activation, Additionally Acts as a Competitive Antagonist at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 347 (2013), S. 69–79

[165] Halgren, T.A.: Merck molecular force field.1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17 (1996), S. 490–519

[166] Halgren, T.A.: Merck molecular force field.2. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem.* 17 (1996), S. 520–552

[167] Halgren, T.A.: Merck molecular force field.3. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17 (1996), S. 553–586

[168] Wolber, G. ; Langer, T.: LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model* 45 (2005), S. 160–169

[169] Wolber, G. ; Dornhofer, A.A. ; Langer, T.: Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 20 (2006), S. 773–788

[170] Seidel, T. ; Ibis, G. ; Bendix, F. ; Wolber, G.: Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discov. Today* 17 (2010), S. e221–e228

[171] Cereto-Massague, A. ; Guasch, L. ; Valls, C. ; Mulero, M. ; Pujadas, G. ; Garcia-Vallve, S.: DecoyFinder: an easy-to-use python GUI application for building target-specific decoy sets. *Bioinformatics* 28 (2012), S. 1661–1662

[172] Hermoso, J. ; Pignol, D. ; Kerfelec, B. ; Crenon, I. ; Chapus, C. ; Fontecilla-Camps, J.C.: Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monooctyl ether complex. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), S. 18007–18016.

[173] Bourbon-Freie, A. ; Dub, R.E. ; Xiao, X. ; Lowe, M.E.: Trp-107 and Trp-253 Account for the Increased Steady-State Fluorescence that Accompanies the Conformational Change in Human Pancreatic Triglyceride Lipase Induced by Tetrahydrolipstatin and Bile Salt. *J. Biol. Chem.* 284 (2009), S. 14157–14164

[174] Luthipeng, Q.Q. ; Marki, H.P. ; Hadvary., P.: Identification of the active-site serine in human pancreatic lipase by chemical modification with tetrahydrolipstatin. *Febs Letters* 299 (1992), S. 111–115

[175] Vandermeers, A. ; Vandermeers-Piret, M.C. ; Rathé, J. ; Christophe, J.: On human pancreatic triacylglycerol lipase: isolation and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 370 (1974), S. 257–268

[176] Borgstrom, B. ; Erlanson, C.: Pancreatic juice co-lipase: physiological importance. *Biochim. Biophys. Acta* 242 (1971), S. 509–513

[177] Borgstrom, B. ; Erlanson, C.: Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. *Eur. J. Biochem.* 37 (1973), S. 60–68

[178] Borgstrom, B.: On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *J. Lipid. Res.* 16 (1975), S. 411–417

[179] Maylie, M.F. ; Charles, M. ; Cache, C. ; Desnuelle, P.: Isolation and partial identification of a pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 229 (1971), S. 286–289

[180] Barnard, J.A. ; Warwick, G.: Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ.* 4 (1993), S. 495–501

[181] Sussman, N.L. ; Eliakim, R. ; Rubin, D. ; Perlmutter, D.H. ; DeSchryver-Kecskemeti, K. ; Alpers, D.H.: Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes. *Am. J. Physiol.* 257 (1989), S. G14–23

[182] Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1983), S. 55–63

[183] Berridge, M.V. ; Tan, A.S. ; McCoy, K.D. ; Wang, R.: The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4 (1996), S. 14–19

[184] Berridge, M.V. ; Herst, P.M. ; Tan, S.A.: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11 (2005), S. 127–152

[185] Lee, Y.M. ; Kim, Y.S. ; Lee, Y. ; Kim, J. ; Sun, H. ; Kim, J.H. ; Kim, J.S.: Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extract. *Phytother. Res.* 26 (2012), S. 778–782

[186] Kim, H.Y. ; Kang, M.H.: Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytother. Res.* 19 (2005), S. 359–361

[187] Fang, Y.C. ; Huang, H.C. ; Chen, C.C. ; Juan, H.F.: TCMGeneDIT: a database for associated traditional Chinese medicine, gene and disease information using text mining. *BMC Complementary Altern. Med.* 8 (2008), S. 58

[188] http://www.chineseherbshealing.com/trichosanthes-kirilowii/ [16.11.2015]

[189] Wang, M. ; Ji, T.F. ; Yang, J.B. ; Su, Y.L.: Studies on the chemical constituents of Phellodendron chinense. *Zhong Yao Cai - Journal of Chinese medicinal materials* 32 (2009), S. 208–210

[190] Zhou, R. ; Li, B.-G. ; Zhang, G.-L.: Chemical study on Cyathula officinalis Kuan. *J Asian Nat Prod Res* 7 (2005), S. 245–252

[191] Pérez-Torres, I. ; Ruiz-Ramírez, A. ; Baños, G. ; El-Hafidi, M.: Hibiscus sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), curcumin and resveratrol as alternative medicinal agents against metabolic syndrome. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 11 (2013), S. 25–37

[192] Da-Costa-Rocha, I. ; Bonnlaender, B. ; Sievers, H. ; Pischel, I. ; Heinrich, M.: Hibiscus sabdariffa L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 165 (2014), S. 424–443

[193] Gurrola-Díaz, C.M. ; García-López, P.M. ; Sánchez-Enríquez, S. ; Troyo-Sanromán, R. ; Andrade-González, I. ; Gómez-Leyva, J.F.: Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment(diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine* 17 (2010), S. 500–505

[194] Gao, H. ; Huang, Y.-N. ; Gao, B. ; Xu, P.-Y. ; Inagaki, C. ; Kawabata, J.: α-Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of Tussilago farfara L. *Food Chem.* 106 (2008), S. 1195–1201

[195] Abu-Tarboush, H.M. ; Ahmed, S.A.B.: Studies on karkade (Hibiscus sabdariffa): protease inhibitors, phytate, in vitro protein digestibility and gossypol content. *Food chem.* 56 (1996), S. 15–19

[196] Fook, J.M.S.L.L ; Macedo, L.L.P. ; Moura, G.E.D.D ; Teixeira, F.M ; Oliveira, A.S. ; Queiroz, A.F.S. ; Sales, M.P.: A serine proteinase inhibitor isolated from Tamarindus indica seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. *Life sciences* 76 (2005), S. 2881–2891

[197] Araújo, C.L. ; Bezerra, I.W.L ; Oliveira, A.S. ; Moura, F.T. ; Macedo, L.L.P. ; Gomes, C.E.M. ; Barbosa, A.E.A.D. ; Macedo, F.P. ; Souza, T.M.S. ; Franco, O.L. u. a.: In vivo bioinsecticidal activity toward Ceratitis capitata (fruit fly) and Callosobruchus maculatus (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of

insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (Tamarindus indica) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005), S. 4381–4387

[198]

[199] Kwok, C.-Y. ; Wong, C.N.-Y. ; Yau, M. Y.-C. ; Yu, P. H.-F. ; Au, A.L.S. ; Poon, C. C.-W. ; Seto, S.-W. ; Lam, T.-Y. ; Kwan, Y.-W. ; Chan, S.-W.: Consumption of dried fruit of Crataegus pinnatifida (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *J. Funct. Foods* 2 (2010), S. 179–186

[200] Wang, T. ; An, Y. ; Zhao, C. ; Han, L. ; Boakye-Yiadom, M. ; Wang, W. ; Zhang, Y.: Regulation Effects of Crataegus pinnatifida Leaf on Glucose and Lipids Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011), S. 4987–4994

[201] Zhang, J. ; Liang, R. ; Wang, L. ; Yan, R. ; Hou, R. ; Gao, S. ; Yang, B.: Effects of an aqueous extract of Crataegus pinnatifida Bge. var. major N.E.Br. fruit on experimental atherosclerosis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013), S. 563–569

[202] Jurikova, T. ; Sochor, J. ; Rop, O. ; Mlcek, J. ; Balla, S. ; Szekeres, L. ; Adam, V. ; Kizek, R.: Polyphenolic Profile and Biological Activity of Chinese Hawthorn (Crataegus pinnatifida BUNGE) Fruits. *Molecules* 17 (2012), S. 14490–14509

[203] Qi, Y. ; Chin, K.L. ; Malekian, F. ; Berhane, M. ; Gager, J.: Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, Hibiscus Sabdariffa. *Circular UFNR* 604 (2005)

[204] Schmeil, O. ; Fitschen, J. ; Seybold, S. (Hrsg.): *Flora von Deutschland und angrenzender Länder*. Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim, 2006

[205] Ali, B.H. ; Wabel, N. A. ; Blunden, G.: Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A Review. *Phytother. Res.* 19 (2005), S. 369–375

[206] Lina, T. ; Linb, H.-H. ; Chenb, C.-C. ; Linc, M.-C. ; Choud, M.-C. ; Wang, C.-J.: Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* 27 (2007), S. 140–145

[207] Ramirez-Rodrigues, M.M. ; Plaza, M.L. ; Azeredo, A. ; Balaban, M.O. ; Marshall, M.R.: Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from Hibiscus sabdariffa. *J. Food Sci.* 76 (2011), S. C428–435

[208] Hansawasdi, C. ; Kawabata, J. ; Kasai, T.: Alpha-amylase inhibitors from roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000), S. 1041–1043

[209] Hansawasdi, C. ; Kawabata, J. ; Kasai, T.: Hibiscus Acid as an Inhibitor of Starch Digestion in the Caco-2 Cell Model System. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 65 (2001), S. 2087–2089

[210] Birari, R.B. ; Gupta, S. ; Mohan, C.G. ; Bhutani, K.K.: Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine* 18 (2011), S. 795–801

[211] Habtemariam, S.: Antihyperlipidemic components of Cassia auriculata aerial parts: identification through in vitro studies. *Phytother. Res.* 27 (2013), S. 152–155

[212] Point, V. ; Kumar, K.V.P.P. ; Marc, S. ; Delorme, V. ; Parsiegla, G. ; Amara, S. ; Carrière, F. ; Buono, G. ; Fotiadu, F. ; Canaan, S. ; Leclaire, J. ; Cavalier, J-F: Analysis of the discriminative inhibition of mammalian digestive lipases by 3-phenyl substituted 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones. *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012), S. 452–463

[213] Mohammad, M. ; Al-masri, I.M. ; Issa, A. ; A.Khdair ; Bustanji, Y.: Inhibition of pancreatic lipase by berberine and dihydroberberine: an investigation by docking simulation and experimental validation. *Med. Chem. Res.* 22 (2013), S. 2273–2278

[214] Ninomiya, K. ; Matsuda, H. ; Shimoda, H. ; Nishida, N. ; Kasajima, N. ; Yoshino, T. ; Morikawa, T. ; Yoshikawa, M.: Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004), S. 1943–1946

[215] Yamada, Y. ; Kato, T. ; Ogino, H. ; Ashina, S. ; Kato, K.: Cetilistat (ATL-962), a novel pancreatic lipase inhibitor, ameliorates body weight gain and improves lipid profiles in rats. *Horm. Metab. Res.* 40 (2008), S. 539–543

[216] Wang, H. ; Zhao, X. ; Wang, S. ; Tao, S. ; Ai, N. ; Wang, Y.: Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. *J. Chromatogr. A.* 1392 (2015), Nr. 20-27

[217] Ikarashi, N. ; Takeda, R. ; Ito, K. ; Ochiai, W. ; Sugiyama, K.: The inhibition of lipase and glucosidase activities by acacia polyphenol. *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.* (2011), S. Article ID 272075

[218] Sahpaz, S. ; Garbacki, N. ; Tits, M. ; Bailleul, F.: Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from Marrubium vulgare. *J. Ethnopharmacol.* 79 (2002), S. 389–392

[219] Benguechoua, M. ; Nia, S. ; Benarous, K. ; Khachba, I. ; Yousfi, M.: Inhibition of Candida rugosa Lipase by Different Extracts of Five Algerian Plants and their Antioxidant Activities. Current Enzyme Inhibition. *Curr. Enzyme Inhib.* 10 (2016), S. 121–128

[220] Villa-Ruano, N. ; Zurita-Vasquez, G.G. ; Pacheco-Hernandez, Y. ; Betancourt-Jimenez, M.G. ; Cruz-Duran, R. ; Duque-Bautista, H.: Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, Mexico. *Biol. Res.* 46 (2013), S. 153–160

[221] Jeong, J.Y. ; Jo, Y.H. ; Kim, S.B. ; Liu, Q. ; Lee, J.W. ; Mo, E.J. ; Lee, K.Y. ; Hwang, B.Y. ; Lee, M.K.: Pancreatic lipase inhibitory constituents from Morus alba leaves and optimization for extraction conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015), S. 2269–2274

[222] Kobayashi, Y. ; Miyazawa, M. ; Kamei, A. ; Abe, K. ; Kojima, T.: Ameliorative effects of mulberry (Morus alba L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010), S. 2385–2395

[223] Katsube, T. ; Imawaka, N. ; Kawano, Y. ; Yamazaki, Y. ; Shiwaku, K. ; Yamane, Y.: Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (Morus alba L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.* 97 (2006), S. 25–31

[224] Zhishen, J. ; Mengcheng, T. ; Jianming, W.: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 (1999), S. 555–559

[225] Fenwick, G.R. ; Lutomski, J. ; Nieman, C.: Liquorice, Glycyrrhiza glabra L. - Composition, uses and analysis. *Food Chem.* 38 (1990), S. 119–143

[226] Dhingra, D. ; Parle, M. ; Kulkarni, S.K.: Memory enhancing activity of Glycyrrhiza glabra in mice. *J. Ethnopharmacol.* 91 (2004), S. 361–365

[227] Visavadiya, N.P. ; Narasimhacharya, A.V.R.L.: Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Glycyrrhiza glabra (Linn) in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006), S. 1080–1086

[228] Basson, M.D. ; Turowski, G.A. ; Rashid, Z. ; Hong, F. ; Madri, J.A.: Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig. Dis. Sci.* 41 (1996), S. 1986–1993

[229] Meunier, V. ; Bourri, M. ; Berger, Y. ; Fabre, G.: The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* 11 (1995), S. 187–194

[230] Johnston, K. ; Sharp, P. ; Clifford, M. ; Morgan, L.: Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 579 (2005), S. 1653–1657

[231] Manzano, S. ; Williamson, G.: Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010), S. 1773–1780

[232] Gallagher, A.M. ; Flatt, P.R. ; Duffy, G. ; Abdel-Wahab, Y.H.A.: The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutrition Research* 23 (2003), S. 413–424

[233] Ehrenkranz, J.R.L. ; Lewis, N.G. ; Kahn, C.R. ; Roth, J.: Phlorizin: a review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21 (2004), S. 31–38

[234] Lostao, M.P. ; Hirayama, B.A. ; Loo, D.D.F. ; Wright, E.M.: Phenylglucosides and the Na+/glucose cotransporter (SGLT1): Analysis of interactions. *J. Membarin Biol.* 142 (1994), S. 161–170

[235] Azevedo, M.F. ; Lima, C.F. ; Fernandes-Ferreira, M. ; Almeida, M.J. ; Wilson, J.M. ; Pereira-Wilson, C.: Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effects on blood glucose. *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011), S. 15–25

[236] M.Petersen ; Simmonds, M.S.J.: Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62 (2003), S. 121–125

[237] Wainstein, J. ; Ganz, T. ; Boaz, M. ; Dayan, Y.B. ; Dolev, E. ; Kerem, Z. ; Madar., Z.: Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *J. Med. Food* 15 (2012), S. 605–610

[238] Schulze, Christine: *From molecule to men: Inhibition of intestinal glucose absorption by polyphenols and plant extracts for reducing the glycemic response*, Technische Universität München, Diss., 2014

[239] Baldea, L.A.N. ; Martineau, L.C. ; Benhaddou-Andaloussi, A. ; Arnason, J.T. ; Lévyc, É. ; Haddad, P.S.: Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010), S. 473–482

[240] Hannan, J.M.A. ; Ali, L. ; Khaleque, J. ; Akhter, M.: Aqueous extracts of husks of Plantago ovata reduce hyperglycaemia in type 1 and type 2 diabetes by inhibition of intestinal glucose absorption. *Br. J. Nutr.* 96 (2006), S. 131–137

[241] Meddah, B. ; Ducroc, R. ; Faouzi, M. El A. ; Eto, B. ; Mahraoui, L. ; Benhaddou-Andaloussi, A. ; Martineau, L.C. ; Cherrah, Y. ; Haddad, P.S.: Nigella sativa inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J. Ethnopharmacol.* 121 (2009), S. 419–424

[242] Fischer, M. ; Glomb, M.A.: *Moderne Lebensmittelchemie.* Behr's Verlag, Hamburg, 2015

[243] http://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/chinasaeure/1604

[244] Field, J.A. ; Lettinga, G.: *Toxicity of Tannic Compounds to Microorganisms. Plant Polyphenols: Basic Life Science.*. Bd. 59: 673-692. Heidelberg: Springer Verlag, 1992

[245] Lambert, J.D. ; Sang, S. ; Yang, C.S.: Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007), S. 583–585

Tabellenverzeichnis

1.1 BMI-Tabelle (Einteilung nach WHO) . . . 2
1.2 Kriterien zur Diagnostik eines Diabetes mellitus . . . 4
1.3 Allgemeine Daten zur Pankreaslipase [33] . . . 8
1.4 Allgemeine Daten zur pankreatischen α-Amylase [41] . . . 10
1.5 Allgemeine Daten zur intestinalen α-Glucosidase (Maltase-Glucoamylase) [50] . . 11
1.6 Allgemeine Daten zu den Pankreasproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase [53–55] . . . 12
1.7 Allgemeine Daten zur intestinalen Alkalischen Phosphatase [57] . . . 13
1.8 Vergleich von Flavonoiden pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) . . . 17
1.9 Vergleich von Hydroxyzimtsäuren pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) . . . 19
1.10 Vergleich von Hydroxybenzoesäuren pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) . . . 20
1.11 Vergleich von Lignanen pflanzlichen Ursprungs mit PL inhibitorischer Aktivität nach Buchholz und Melzig (2015) . . . 21

2.1 Verwendete Puffer und Lösungen für das Lipase-Aktivitätsassay . . . 39
2.2 Verwendete Puffer und Lösungen für das α-Amylase-Aktivitätsassay . . . 39
2.3 Verwendete Puffer und Lösungen für das α-Glucosidase-Aktivitätsassay . . . 41
2.4 Verwendete Puffer und Lösungen für das ALP-Aktivitätsassay . . . 42
2.5 Verwendete Puffer und Lösungen für das Protease-Aktivitätsassay . . . 43
2.6 Übersicht zur Einteilung der SD-Ratten und Behandlungsformen der unterschiedlichen Modellgruppen . . . 45
2.7 Geräteparameter des HPLC-Systems und ELSD-Detektors zur Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke . . . 46
2.8 Bedingungen des HPLC-Systems zur Charakterisierung der Abbauprodukte aus Stärke . . . 47
2.9 Geräteparameter der HPLC-Systeme zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. . . . 48
2.10 Bedingungen der HPLC-Systeme zur Charakterisierung des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. . . . 48
2.11 Geräteparameter des Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS Systems . . . 49
2.12 Verwendete Lösungen für das BCA-Protein-Assay . . . 50
2.13 Verwendete Puffer und Lösungen für die Differenzierung der CaCo-2 Zellen . . . 53
2.14 Verwendete Lösungen für das MTT-Assay (Zytotoxizitätstest) . . . 54
2.15 Verwendete Puffer und Lösungen für das zellbasierte Glucoseaufnahme-Assay . . . 55

3.1 IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von PL (*pig*) . . . 57
3.2 Screeningergebnisse der getesteten TCM Pflanzen und Pilze auf PL (*pig*) Inhibition. 59
3.3 IC_{50} Werte der ausgewählten methanolischen Extrakte von Pflanzen der TCM zur Inhibition der PL (*pig*). . . . 61

3.4 Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur Inhibition der PL (*pig*). 62
3.5 IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte der TEM zur Inhibition der PL (*pig*) 63
3.6 IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition der α-Amylase (*pig*) 64
3.7 Screeningergebnisse der getesteten TCM Pflanzen und Pilze zur Inhibition der α-Amylase (*pig*). 66
3.8 IC_{50} Werte der ausgewählten methanolischen Extrakte von Pflanzen der TCM zur Inhibition der α-Amylase (*pig*). 68
3.9 Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur α-Amylase (pig) Inhibition. 68
3.10 IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte der TEM zur Inhibition der α-Amylase (*pig*) 70
3.11 IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von α-Glucosidase (*pig*) . . . 70
3.12 IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition der Alkalischen Phosphatase (*pig*) 72
3.13 IC_{50} Werte der getesteten Reinstoffe zur Inhibition von Proteasen (*pig*) 74
3.14 Screeningergebnisse der getesteten Pflanzen der TEM zur Inhibition von pankraetischen Proteasen (*pig*). 76
3.15 Ermittelte Konzentrationen der Spaltprodukte nach amylytischen Stärkeabbau . 87
3.16 Ermittelte Enzyminhibition [%] der Einzelpeaks des Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. 89
3.17 Identifikation der inhibitorisch aktiven Verbindungen aus *Hibiscus sabdariffa* L. durch Vergleich mit LC-MS und MS^2 Literatur-Daten [207, 208]. 90
3.18 Zur Pharmakophormodell-Entwicklung verwendete Naturstoffe und ihre Derivate 93
3.19 Entwickelte 3D-Pharmakophormodelle der Naturstoffe 93
3.20 Für das virtuelle Screening verwendete Datenbanken von Naturstoffen und naturstoffähnlichen Verbindungen 98
3.21 Ermittelte IC_{50}Werte zur Inhibition der PL der *in silico* identifizierten Verbindungen 99
3.22 IC_{50} Werte der getesteten Pflanzenextrakte (methanolisch/wässrig) des *in silico* Versuchs 100

A.1 Strukturformeln der untersuchten Reinstoffe (Enzymaktivitäts-Versuche und Glucoseaufnahme-Studien). 139
A.2 Strukturformeln der im Rahmen des virtuellen Screenings identifizierten 68 Verbindungen (Naturstoffe bzw. Naturstoff-ähnliche Verbindungen) mit einer potentiell PL inhibitorischen Aktivität. 141

Abbildungsverzeichnis

1.1 Chemische Struktur von Tetrahydrolipstatin (Gebrauchsname: Orlistat) 3
1.2 Chemische Struktur von Metformin 5
1.3 Chemische Struktur von Acarbose 6
1.4 Einsatzmöglichkeiten von Enzyminhibitoren als Therapieansatz zur Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2. 7
1.5 Mechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse von Esterbindungen 9
1.6 Reaktionsmechanismus der α-Amylase 10
1.7 Verdauung und Resorption von Kohlenhydraten im Intestinaltrakt 14
1.8 Verdauung und Resorption von Triacylglyceriden im Intestinaltrakt 15
1.9 Grundstruktur der Flavonoide: das Flavan (2-Phenylchroman) 17
1.10 Grundstruktur der *p*-Hydroxyzimtsäuren 18
1.11 Grundstruktur der *p*-Hydroxybenzoesäuren 19
1.12 Grundstruktur von Dibenzylbutan (Lignan) 20

2.1 Lichtmikroskopische Aufnahme undifferenzierter CaCo-2-Zellen bei 100-facher Vergrößerung 30
2.2 Prinzip des Lipase-Aktivitätsassays 38
2.3 Reaktionsprinzip des α-Glucosidase-Aktivitätsassays 40
2.4 Reaktionsprinzip des ALP-Aktivitätsassays 42
2.5 Prinzip des Protease-Aktivitätsassays 43
2.6 Kristallstruktur der Schweinepankreaslipase 51
2.7 Reaktionsprinzip des MTT-Assays 53
2.8 Chemische Struktur des fluoreszenzmarkierten Glucoseanalogons 2-NBDG . . . 55

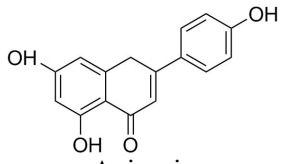
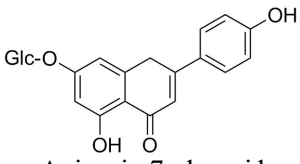
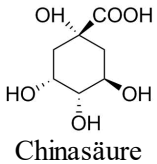
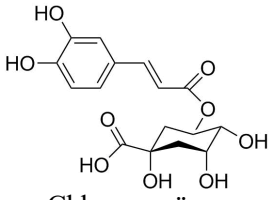
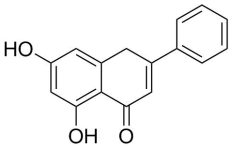
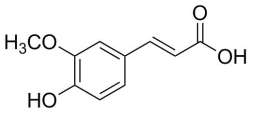
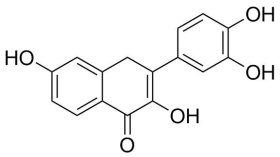
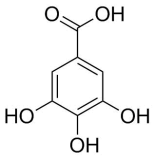
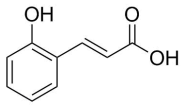
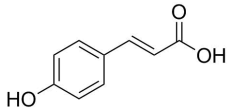
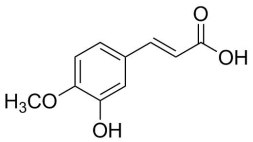
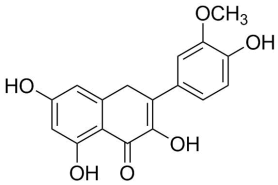
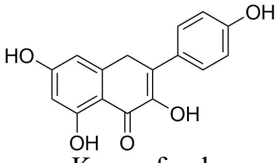
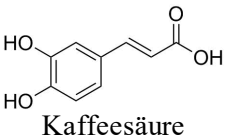
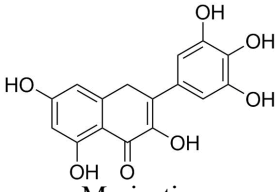
3.1 Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der α-Amylase (*pig*) 65
3.2 Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der α-Glucosidase (*pig*) 72
3.3 Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (*pig*) 74
3.4 Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Flavonoide auf die Aktivität der Pankreasproteasen (*pig*) 76
3.5 Vergleichende Darstellung der ermittelten Rangsummen der Enzyme mit amylytischer Aktivität. 78
3.6 Vergleich des Inhibitionspotentials auf PL und α-Amylase Aktivität 79
3.7 Vergleichende Darstellung der ermittelten Rangsummen aller getesteten Enzyme. 80
3.8 Vergleich des Inhibitionspotentials der wässrigen TCM Extrakte auf die Aktivitäten der PL und α-Amylase. 80
3.9 Vergleich des Inhibitionspotentials der methanolischen TCM Extrakte auf die Aktivitäten der PL und α-Amylase. 81

3.10 Vergleich des Inhibitionspotentials der wässrigen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM auf die Aktivitäten der pankreatischen α-Amylase, Lipase und Proteasen. 82
3.11 Vergleich des Inhibitionspotentials der methanolischen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM auf die Aktivitäten der pankreatischen α-Amylase, Lipase und Proteasen. 82
3.12 Nüchternblutglucose-Konzentration der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch 83
3.13 Triglycerid-Konzentration (Serum) der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch 84
3.14 Gesamtcholesterin-Konzentration (Serum) der unterschiedlichen Modellgruppen im Tierversuch 84
3.15 HPLC-Chromatogramm des Kalibration-Standardgemisches aus 5 Sacchariden . 85
3.16 HPLC-Chromatogramm der gewonnenen Spaltprodukte nach dem amylytischen Abbau von natürlicher Stärke 86
3.17 HPLC-Chromatogramm der gewonnenen Spaltprodukte nach dem amylytischen Abbau von modifizierter Stärke 86
3.18 Blätter und Blütenstand (links) und Einzelblüte (rechts) von *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) [203] 87
3.19 HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extrakts von *Hibiscus sabdariffa* L. 88
3.20 HPLC-Chromatogramm des isolierten und aufkonzentrierten Peakbereichs C1a aus dem methanolischen Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. 89
3.21 (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum des aufgereinigten Isolats aus dem methanolischen Extrakt von *Hibiscus sabdariffa* L. 90
3.22 Chemische Struktur von Hibiskussäure ((+)-*allo-hydroxycitric acid lactone*) [208] 90
3.23 MIF (*molecular interaction field*) der Hibiskussäure im aktiven Zentrum der Pankreaslipase mit Lipase-Interaktionshotspots 91
3.24 MIF (*molecular interaction field*) der Lipid-Bindungstasche mit katalytischer Triade 92
3.25 Schema der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Flavonoiden auf die Aktivität der Schweinepankreaslipase 94
3.26 MIF (*molecular interaction field*) des nicht-glykolysierten Flavonoids Fisetin im aktiven Zentrum der Pankreaslipase mit Lipase-Interaktionshotspots und 3D-Pharmakophormodell 96
3.27 MIF des glykolysierten Flavonoids Quercitrin in der Lipid-Bindungstasche der Pankreaslipase mit Lipase-Interaktionshotspots und 3D-Pharmakophormodell . . 96
3.28 Schema des verwendeten Arbeitsablaufs für das virtuelle Naturstoffscreening . . . 97
3.29 Chemische Struktur der *in silico* identifizierten und *in vitro* analysierten potentiellen PL Inhibitoren 98
3.30 Docking-Posen und abgeleitete 3D-Pharmakophore-Modelle der potentesten virtuellen *Screening Hits* PL06 und PL01 99
3.31 Differenzierung von CaCo-2 Zellen nach Stimulations mit Natriumbutyrat 102
3.32 ALP-Enzymaktivität der CaCo-2 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung mit Natriumbutyrat 103
3.33 Zytotoxizitätsuntersuchung (MTT-Assay) unterschiedlicher Reinstoffe 104
3.34 Zytotoxizitätsuntersuchung (MTT-Assay) der wässrigen Extrakte von ausgewählten Pflanzen der TEM 105
3.35 Vorversuch zur Optimierung der Inkubationszeit der CaCo-2 Zellen mit 2-NBDG 106

3.36 Mikroskopische Betrachtung der CaCo-2 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit 2-NBDG 106
3.37 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Inhibition der Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen durch polyphenolische Reinstoffe 107
3.38 Fluoreszenzbasierte Studien zur Inhibition der Glucoseaufnahme in CaCo-2 Zellen durch Pflanzen der TEM 108

Anhang

Tabelle A.1: Strukturformeln der untersuchten Reinstoffe (Enzymaktivitäts-Versuche und Glucoseaufnahme-Studien).

 Apigenin	 Apigenin-7-glucosid	 Chinasäure
 Chlorogensäure	 Chrysin	 Ferulasäure
 Fisetin	 Gallussäure	 2-Hydroxyzimtsäure
 4-Hydroxyzimtsäure	 Isoferulasäure	 Isorhamnetin
 Kaempferol	 Kaffeesäure	 Myricetin

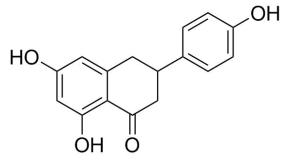
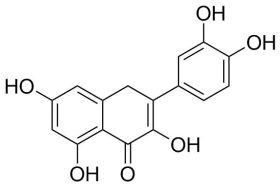
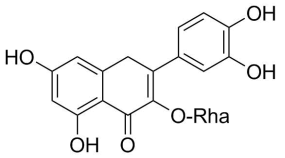
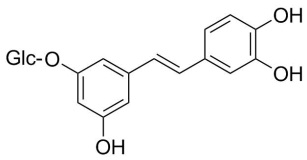
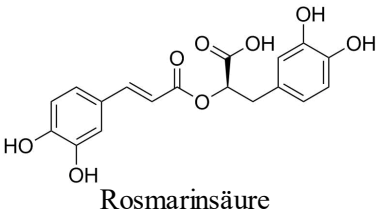
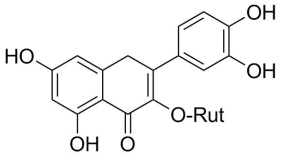
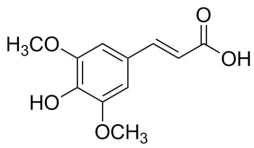
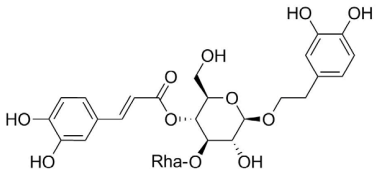
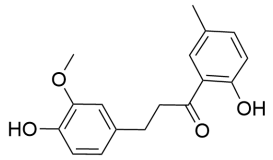
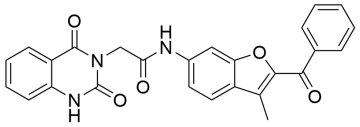
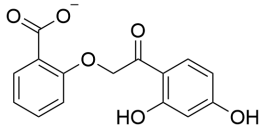
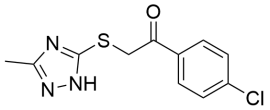
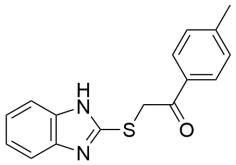
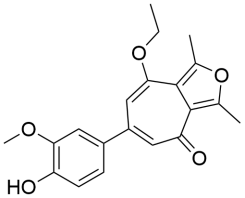
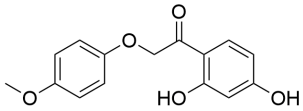
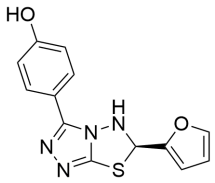
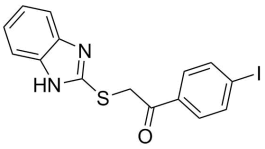
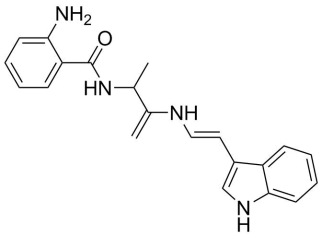
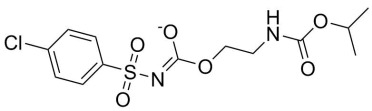
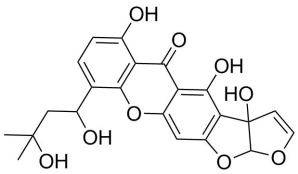
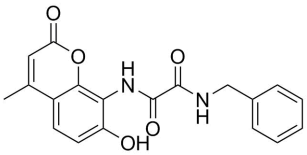
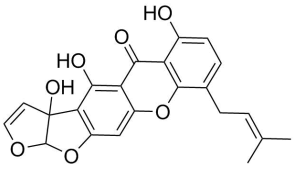
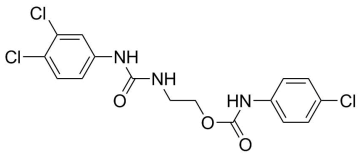
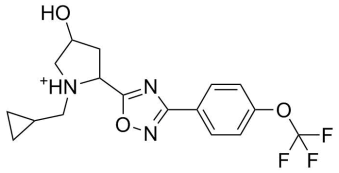
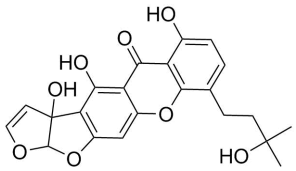
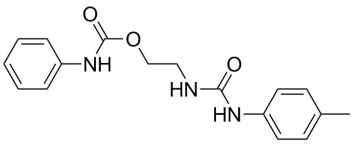
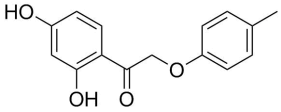
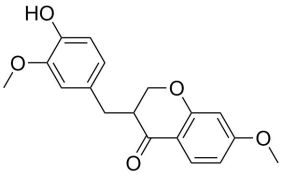
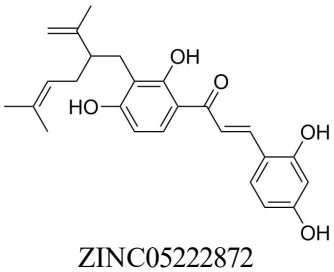
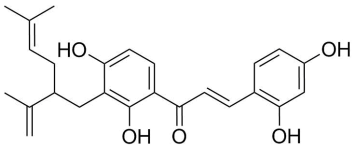
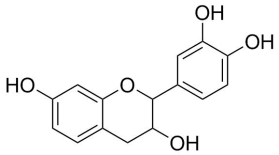
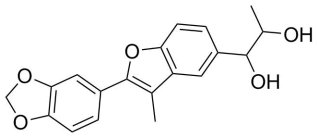
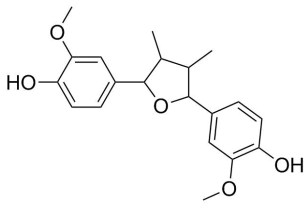
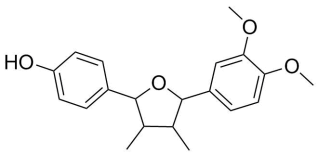
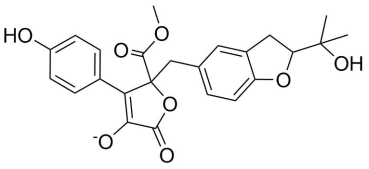
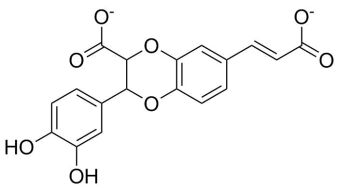
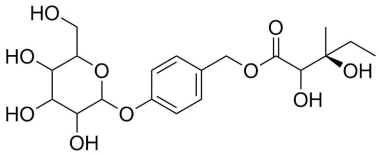
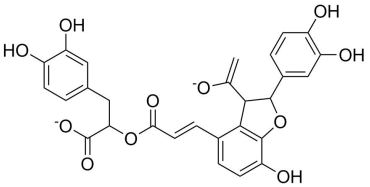
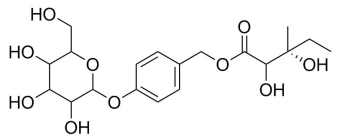
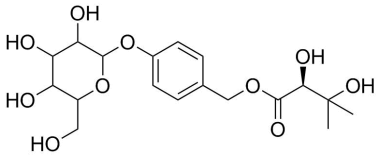
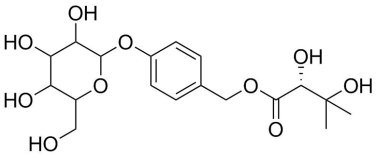
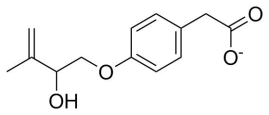
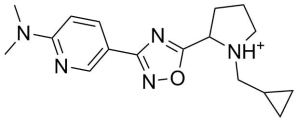
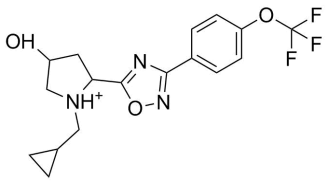
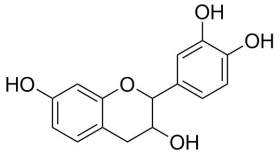
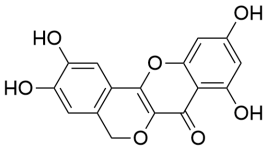
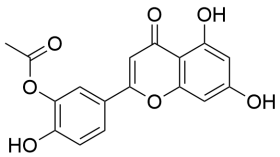
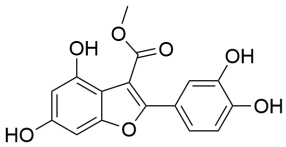
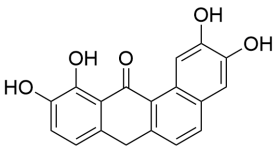
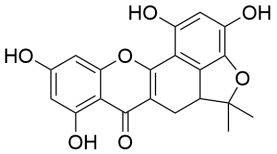
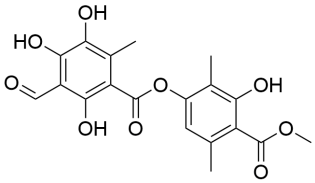
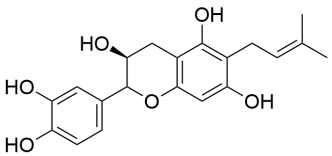
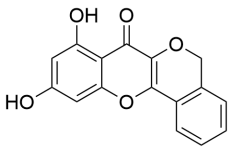
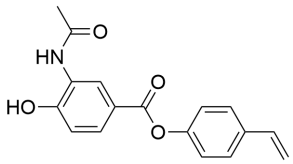
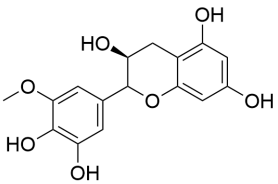
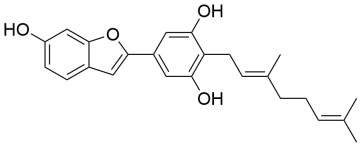
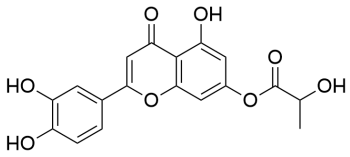
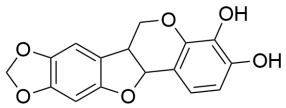
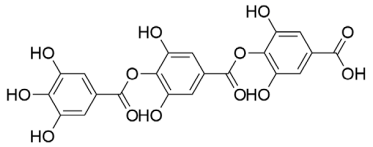
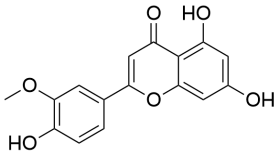
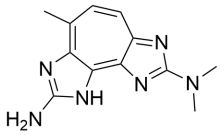
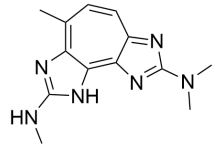
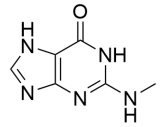
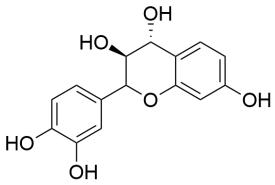
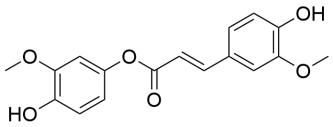
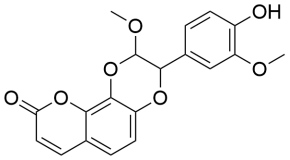
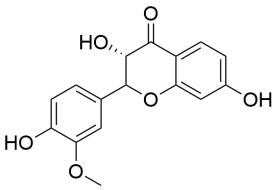
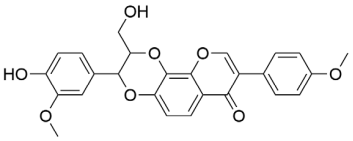
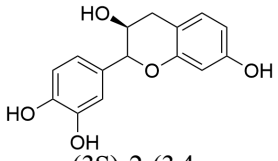
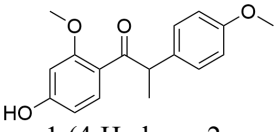
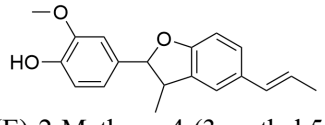
 Naringenin	 Quercetin	 Quercitrin
 Rhaponticin	 Rosmarinsäure	 Rutin
 Sinapinsäure	 Verbascosid	

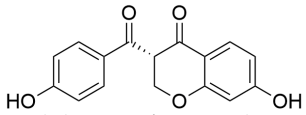
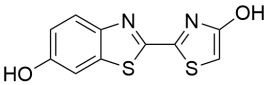
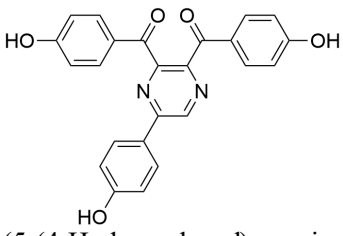
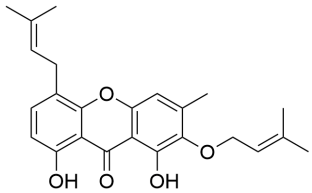
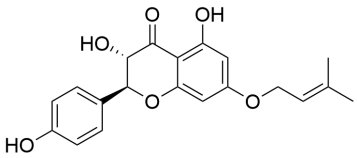
Tabelle A.2: Strukturformeln der im Rahmen des virtuellen Screenings identifizierten 68 Verbindungen (Naturstoffe bzw. Naturstoff-ähnliche Verbindungen) mit einer potentiell PL inhibitorischen Aktivität.

 ZINC04252577 PL01 (Zn, mod_2)	 ZINC09050354 PL02 (Zn, mod_1)	 ZINC04046682 PL03 (Zn, mod_2)
 ZINC05730067 PL04 (Zn, mod_1)	 ZINC03669836 PL05 (Zn, mod_1)	 ZINC00108368 PL06 (Zn, mod_2)
 ZINC00141040 PL07 (Zn, mod_2)	 ZINC03843271 PL08 (Zn, mod_2)	 ZINC37354049 PL09 (Zn, mod_)
 ZINC31165359 PL10 (Zn, mod_)	 ZINC68586656 PL11 (Zn, mod_)	 ZINC31164801 PL12 (Zn, mod_)
 ZINC49543503 PL13 (Zn, mod_)	 ZINC14858287 PL14 (Zn, mod_)	 ZINC68586595 PL15 (Zn, mod_)

 ZINC15674284 PL16 (Zn, mod_)	 ZINC06003042 PL17 (Zn, mod_)	 ZINC68586613 PL18 (Zn, mod_)
 ZINC00477211 PL19 (Zn, mod_)	 ZINC03198545 PL20 (Zn, mod_)	 ZINC05222872 PL21 (Zn, mod_)
 ZINC05222883 PL22 (Zn, mod_)	 ZINC08681597 PL23 (Zn, mod_)	 ZINC13340414 PL24 (Zn, mod_)
 ZINC13484751 PL25 (Zn, mod_)	 ZINC31167723 PL26 (Zn, mod_)	 ZINC35466092 PL27 (Zn, mod_)
 ZINC72319974 PL28 (Zn, mod_)	 ZINC72320194 PL29 (Zn, mod_)	 ZINC38138562 PL30 (Zn, mod_)
 ZINC72320193 PL31(Zn, mod_)	 ZINC77257434 PL32 (Zn, mod_)	 ZINC77257436 PL33 (Zn, mod_)

 ZINC35456239 PL34 (Zn, mod_)	 NAT18-473588 PL35 (Nx, mod_)	 NAT18-348786 PL36 (Nx, mod_)
 FDB002415 PL37 (Fb, mod_)	 2,3,8,10-Tetrahydroxyisochromeno[4,3-b]chromen-7(5H)-on PL38 (Np, mod_3)	 5-(5,7-Dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-2-hydroxyphenylacetat PL39 (Np, mod_3)
 Methyl 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,6-dihydroxybenzofuran-3-carboxylat PL40 (Np, mod_3)	 2,3,10,11-Tetrahydroxytetraphen-12(7H)-on PL41 (Np, mod_3)	 1,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dimethyl-5a,6-dihydro-5H,7H-benzofuro[3,4-bc]xanthen-7-on PL42 (Np, mod_3)
 3-Hydroxy-4-(methoxycarbonyl)-2,5-dimethylphenyl 3-formyl-2,4,5-trihydroxy-6-methylbenzoat PL43 (Np, mod_3)	 (3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-6-(3-methylbut-2-en-1-yl)chroman-3,5,7-triol PL44 (Np, mod_3)	 8,10-Dihydroxyisochromeno[4,3-b]chromen-7(5H)-on PL45 (Np, mod_3)
 4-Vinylphenyl 3-acetamido-4-hydroxybenzoat PL46 (Np, mod_3)	 (3S)-2-(3,4-Dihydroxy-5-methoxyphenyl)chroman-3,5,7-triol PL47 (Np, mod_3)	 (E)-2-(3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-5-(6-hydroxybenzofuran-2-yl)benzen-1,3-diol PL48 (Np, mod_3)

 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl 2-hydroxypropanoat PL49 (Np, mod_3)	 6a,12a-Dihydro-6H-[1,3]dioxolo[4',5':5,6]benzofuro[3,2-c]chromene-3,4-diol PL50 (Np, mod_3)	 4-((3,5-Dihydroxy-4-((3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy)benzoyl)oxy)-3,5-dihydroxybenzoesäure PL51 (Np, mod_3)
 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-on PL52 (Np, mod_3)	 N8,N8,4-Trimethyl-1H-cyclohepta[1,2-d:3,4-d']diimidazol-2,8-diamin PL53 (Np, mod_5)	 N2,N8,N8,4-Tetramethyl-1H-cyclohepta[1,2-d:3,4-d']diimidazol-2,8-diamin PL54 (Np, mod_5)
 2-(Methylamino)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on PL55 (Np, mod_5)	 (3S,4R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)chroman-3,4,7-triol PL56 (Np, mod_2)	 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylat PL57 (Np, mod_2)
 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-methoxy-2,3-dihydro-9H-[1,4]dioxino[2,3-h]chromen-9-on PL58 (Np, mod_2)	 (3S)-3,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chroman-4-on PL59 (Np, mod_2)	 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-8-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-7H-[1,4]dioxino[2,3-h]chromen-7-on PL60 (Np, mod_2)
 (3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)chroman-3,7-diol PL61 (Np, mod_2)	 1-(4-Hydroxy-2-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)propan-1-on PL62 (Np, mod_2)	 (E)-2-Methoxy-4-(3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)phenol PL63 (Np, mod_2)

 (R)-7-Hydroxy-3-(4-hydroxybenzoyl)chroman-4-on PL64 (Np, mod_2)	 2-(4-Hydroxythiazol-2-yl)benzo[d]thiazol-6-ol PL65 (Np, mod_2)	 (5-(4-Hydroxyphenyl)pyrazin-2,3-diyl)bis((4-hydroxyphenyl)methanon) PL66 (Np, mod_2)
 1,8-Dihydroxy-3-methyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-2-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-on PL67 (Np, mod_1)	 (2S,3S)-3,5-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)chroman-4-on PL68 (Np, mod_1)	

Publikationsverzeichnis

Artikel in Fachzeitschriften

L. Uhr, **T. Buchholz**, T. Homann, G. Huschek, H. M. Rawel. Targeted proteomics-based analysis of technical enzymes from fungal origin in baked products. Journal of Cereal Science, 60; 440-447 (2014)

T. Buchholz, M. F. Melzig. Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors. Planta Medica, 81; 771-783 (2015)

T. Buchholz, M. F. Melzig. Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus - Screening for Pancreatic Lipase and α-Amylase Inhibition. Phytotherapy Research, 30; 260-266 (2016)

T. Buchholz, C. Chen, X.Y. Zhang, M. F. Melzig. Investigation of Traditional Chinese Medicine (TCM) plants for pancreatic lipase and α-amylase inhibitory activities. Pharmazie, 71; 420-424 (2016)

T. Buchholz, M. F. Melzig. Polyphenolische Verbindungen als Inhibitoren der Pankreaslipase. Zeitschrift für Phytotherapie, 37; 144-150 (2016)

T. Buchholz, A. Frank, M. F. Melzig, G. Wolber. Fighting Obesity - *In silico* techniques and *in vitro* testing to identify natural products that trigger the ileal brake. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2017), under review

Poster

T. Buchholz, M. F. Melzig. Selected natural products as inhibitors of pancreatic lipase. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Guimarães, Portugal, 31. August - 4. September 2014

T. Buchholz, X. Y. Zhang, M. F. Melzig. *In vitro* screening of Traditional Chinese Medical (TCM) plants for pancreatic lipase and α-amylase inhibitory activities. 63nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Budapest, Ungarn, 23. - 27. August 2015

C. Görick, **T. Buchholz**, M. F. Melzig. Olive, boldo, roselle, and rosemary support diet. 63nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Budapest, Ungarn, 23. - 27. August 2015

T. Buchholz, X. Y. Zhang, M. F. Melzig. *In vitro* Untersuchungen von Arzneipflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) auf Inhibition der pankreatischen Lipase und α-Amylase-Aktivität. Phytokongress 2015. Rostock, Deutschland, 8. - 10. Oktober 2015

T. Buchholz, M. F. Melzig. Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus - Screening for Pancreatic Lipase and α-Amylase Inhibition. Dahlem Centre of Plant Sciences (DCPS) - Havel-Spree Colloquium 2015. Berlin, Deutschland, 24. November 2015

T. Buchholz, A. Frank, G. Wolber, M. F. Melzig. *In silico* identification and *in vitro* activity of new pancreatic lipase inhibitors. 9th Joint Natural Products Conference. Kopenhagen, Dänemark, 24. - 27. Juli 2016

Vorträge

T. Buchholz, M. F. Melzig. Secondary plant products as inhibitors of pancreatic digestive enzymes. 6st Dahlem Centre of Plant Sciences (DCPS) ‚OpenHouse' day - Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland, 29. Januar 2014

T. Buchholz, M. F. Melzig. Secondary metabolites as inhibitors of digestive enzymes. 1st Minisymposium Berlin and Warsaw 2015 "New developments in Pharmacognosy - Berlin and Warsaw 2015", Berlin, Deutschland, 7. März 2015

T. Buchholz, C. Chen, X. Chang, M. F. Melzig. Diabetes and metabolic syndrome - treatable by phytotherapy? 2nd Minisymposium Berlin and Warsaw 2016 "Searching for active compounds from natural sources", Warschau, Polen, 9. April 2016

T. Buchholz, M. F. Melzig. Traditional Medicine in China and Europe - Treatment of Obesity and Diabetes mellitus Type 2. Shaanxi Sci-Tech University, Hanzhong, China, 10. September 2016

Lebenslauf

- Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten. -

Danksagung

Abschließend möchte ich noch einige dankende Worte an die Menschen richten, die mich beim Erstellen dieser Arbeit so wunderbar unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und die stets wertvollen Hinweise und Diskussionen danken. Danke für das in mich gesetzte Vertrauen als „Fachfremden". Auch der Besuch zahlreicher nationaler und internationaler Kongresse war eine wertvolle Erfahrung für mich.
Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel für die immerwährende Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken. Vielen Dank auch für die Hilfe beim Erstellen meiner ersten Publikationen.
Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerhard Wolber, allen voran Frau Anne Frank, danke ich für die enge Zusammenarbeit im Rahmen der Dockingstudien. Danke Anne, nie hat mir das Schreiben eines Papers mehr Spaß gemacht als mit dir.
Frau Dr. Julia Lazar-Schurreit danke ich für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen des Exkursionspraktikums. Danke für die Einführung in die Welt der Karyopsen, Fruchtknoten und Blütendiagramme. Der Botanische Garten wird auch nach der Promotion ein gern besuchter Ort für mich bleiben. Vielen Dank auch für eine stete Versorgung mit Nervennahrung in Form von Schokolade und allerlei anderen Leckereien.
Bei Herrn Prof. Dr. H. Pertz, Frau Dr. Katharina Mulsow und Herrn Andreas Kannegießer möchte ich mich für die wunderbare Einführung und die anschließende Zusammenarbeit im Praktikum Biologie III bedanken. Rückflusskühler, Sprühkopf und Rotationsverdampfer sind nun keine Fremdwörter mehr für mich.
Jens Purschwitz, den ich während seiner Diplomarbeit betreuen durfte, danke ich für die Unterstützung bei den Zellkulturversuchen und für allerlei erheiternde Diskussionen auch außerhalb des Laboralltags.
Vielen vielen Dank auch an Rina, Martin und Patrick für die freundliche Aufnahme in euer Labor. Danke für viele schöne Stunden, den wissenschaftlichen und häufig auch nicht-wissenschaftlichen Austausch. Unser „Vierer-Labor" werde ich stets in liebevoller Erinnerung behalten.
Ein großer Dank geht auch an dich, liebe Conny. Vielen Dank für deine große Unterstützung bei der Jagd nach aktiven Inhaltsstoffen. Wir haben sie gefunden! Danke auch für die vielen Gespräche, dein Verständnis und zahlreiche Lacher, die meinen Laboralltag so oft erheitert haben.
Ein großes Dankeschön auch an meinen jetzigen Laborpartner Flo. Vielen Dank für all deine wunderbaren Abbildungen, die musikalische Unterhaltung, die Donuts und natürlich (nichts wäre

ohne ihn möglich gewesen) deinen Taschenrechner! Hakuna Matata!
Lieben Dank auch an Simko (Valar Morghulis!), Marian (*trans*-Fettsäuren!) und Eric für viele schöne Momente und Erinnerungen, die immer bleiben werden.
Vielen vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe. Es war eine tolle und unvergessliche Zeit.

Aus ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken. Für ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihren liebevollen Rückhalt. Danke für viele schöne Urlaube und Zeit zum Entspannen.
Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei Phillip bedanken. Du hast mir so viel Liebe, Verständnis und moralische Unterstützung entgegengebracht, die mich jeden noch so schwierigen Labortag vergessen ließen. Danke für all unsere wunderbaren Abende mit Rufus, Edna und Co. Wie habe ich sie geliebt! Vielen Dank auch für deine wirklich unendliche Geduld in all meinen Formatierungsfragen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung von anderen als den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Berlin, den 26. März 2017