

In vitro Studien zum Einfluss von Extrakten aus Kaffee, Artischocke, Ingwer, Erdbeerbaum und Tee auf die Phosphodiesterase-Aktivität

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

D386

Vorgelegt von Teresa Röhrig

Betreuung: Prof. Dr. Elke Richling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 20.01.2017

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von April 2012 bis August 2016 im Arbeitskreis von Prof.
Dr. Elke Richling an der TU Kaiserslautern

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 20.01.2017

Prüfungskommission

Vorsitz: Prof. Dr. Markus Gerhards

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Melanie Esselen

Ich danke Frau Prof. Dr. Richling und Frau Prof. Dr. Esselen für die Anregungen und
wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.



Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Kurzzusammenfassung.....	VIII
Abstract.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Stand der Wissenschaft.....	3
2.1 Zyklische Nukleotide, Phosphodiesterase und relevante physiologische Prozesse .	3
2.1.1 Nukleotid-vermittelte Signalkaskaden.....	4
2.1.2 Phosphodiesterasen	7
2.1.3 Phosphodiesterase Familie 4	11
2.1.4 Zyklische Nukleotide und Thrombozytenaktivierung.....	12
2.1.5 Zyklische Nukleotide und Gefäßerweiterung	17
2.1.6 Zyklische Nukleotide und Inflammation	18
2.2 Kaffee – Coffea arabica.....	20
2.2.1 Allgemein	20
2.2.2 Gewinnung des Rohkaffees und Röstung	20
2.2.3 Übersicht der Inhaltsstoffe von Kaffee.....	21
2.2.4 Studien zum Kaffeekonsum und Erkrankungen.....	23
2.2.5 Interventionsstudien zur PDE-Hemmung durch Kaffee.....	24
2.2.6 Koffein.....	27
2.2.7 Chlorogensäuren.....	32
2.2.8 Alkylpyrazine	35
2.2.9 Melanoidine.....	39
2.3 Artischocke – Cynara scolymus.....	46
2.3.1 Allgemein	46
2.3.2 Chlorogensäuren.....	47
2.3.3 Flavonoide	47
2.3.4 Weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	51
2.4 Ingwer – Zingiber officinale.....	53

2.4.1	Allgemein	53
2.4.2	Monoterpene und Sesquiterpene	54
2.4.3	Gingerole	56
2.4.4	Weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	60
2.5	Erdbeerbaum – <i>Arbutus unedo</i>	61
2.5.1	Allgemein	61
2.5.2	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	61
2.5.3	Physiologische Wirkungen	64
2.6	Tee – <i>Camellia sinensis</i>	65
2.6.1	Allgemein	65
2.6.2	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	65
2.6.3	Physiologische Wirkungen	66
2.7	Kinetik der Enzymhemmung.....	68
2.7.1	Grundlegende Enzymkinetik.....	68
2.7.2	Kompetitive Hemmung	69
2.7.3	Unkompetitive Hemmung.....	70
2.7.4	Nicht-kompetitive Hemmung	71
3	Problemstellung	73
4	Material und Methoden.....	75
4.1	Material	75
4.1.1	Verbrauchsmaterial	75
4.1.2	Geräte	75
4.1.3	Chemikalien	76
4.2	Allgemeine Zellkultur	78
4.2.1	LXFL529L Zelllinie	78
4.2.2	Phosphodiesterase-Ausstattung von LXFL 529L und LXFL 529.....	78
4.2.3	Mediumwechsel	78
4.2.4	Subkultivieren - Passagieren.....	79
4.2.5	Kryokonservierung	79
4.2.6	Zellzahlbestimmung und Viabilitätstest.....	79

4.2.7	Test auf Mycoplasmenkontamination	80
4.2.8	Verwendete Lösungen	81
4.3	cAMP-Phosphodiesterase Aktivitäts-Assay	82
4.3.1	Isolation der Phosphodiesterasen	82
4.3.2	cAMP-Phosphodiesterase-Aktivitäts-Assay.....	82
4.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	83
4.3.4	Verwendete Lösungen	83
4.4	Aufarbeitung und Charakterisierung der Kaffees	86
4.4.1	Extraktherstellung K2, K4.....	86
4.4.2	Extraktherstellung K1, K3.....	86
4.4.3	Extraktherstellung Roh- und Röstkaffee	86
4.4.4	Extraktherstellung entkoffeinierter, rekoffeinierter Kaffee	87
4.4.5	Grobfraktionierung K2	87
4.4.6	Fraktionierung der löslichen Kaffeeextrakte.....	87
4.4.7	Subfraktionierung der Fraktion F8	88
4.4.8	Hydrolyse der Fraktion F8	88
4.4.9	Ultrafiltration der Fraktion F8	88
4.4.10	Darstellung N-Caffeoyltryptophan und N-p-Cumaroyltryptophan	88
4.4.11	Charakterisierung der Kaffeeextrakte und Fraktionen mittels HPLC-DAD	91
4.4.12	Strukturaufklärung der Fraktionen F7 und F8 mit HPLC-ESI-MS/MS	92
4.5	Aufarbeitung und Charakterisierung der Artischocke.....	94
4.5.1	Extraktherstellung aus Artischockenblättern (ALE).....	94
4.5.2	Strukturaufklärung des Artischockenextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	94
4.5.3	Charakterisierung des Artischockenextraktes mittels HPLC-DAD.....	94
4.6	Aufarbeitung und Charakterisierung des Ingwers	96
4.6.1	Kommerzieller Extrakt (GRE)	96
4.6.2	Extraktherstellung aus Ingwerpulver (GPE).....	96
4.6.3	Fraktionierung des Ingwerpulverextraktes (GPE)	96
4.6.4	Strukturaufklärung der Ingwerextrakte mittels HPLC-ESI-MS.....	96
4.6.5	Charakterisierung der Ingwerextrakte mittels HPLC-DAD	97

4.7	Aufarbeitung und Charakterisierung der Erdbeerbaumfrüchte.....	99
4.7.1	Extrakterstellung aus Erdbeerbaumfrüchten (SFE)	99
4.7.2	Strukturaufklärung des Erdbeerbaumextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS	99
4.7.3	Charakterisierung des Erdbeerbaumextraktes mittels HPLC-DAD	100
4.8	Aufarbeitung und Charakterisierung des Grüntees.....	102
4.8.1	Extrakterstellung aus Grünteeblättern (TXE)	102
4.8.2	Strukturaufklärung des Grünteeextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	102
4.8.3	Charakterisierung des Grünteeextraktes mittels HPLC-UV/Vis.....	103
4.9	Deskriptive Statistik und Berechnungen	104
4.9.1	Untersuchung der Varianzen.....	104
4.9.2	Untersuchung der Unterschiede auf Signifikanz.....	104
4.9.3	Korrelation.....	104
4.9.4	Ausreißertest.....	104
5	Ergebnisse und Diskussion	105
5.1	Einfluss von Koffein, Brühmethode und Röstprozess des Kaffees auf die Phosphodiesterase-Aktivität.....	105
5.1.1	Einfluss des Koffeins auf die Phosphodiesterase-Aktivität in vitro	105
5.1.2	Einfluss der Brühmethode und des Röstgrades auf die Phosphodiesterase-Aktivität in vitro	107
5.1.3	Einfluss der Röstung der Kaffees auf die Phosphodiesterase-Aktivität in vitro	107
5.2	Aktivitäts-geleitete Fraktionierung.....	110
5.2.1	Grobfractionierung	110
5.2.2	Feinfraktionierung der löslichen Fraktion FS	111
5.2.3	Identifizierung der Leitsubstanzen in Fraktion F8	115
5.2.4	Subfraktionierung von Fraktion F8.....	118
5.2.5	Hydrolyse der Fraktion F8	119
5.2.6	Ultrafiltration der Fraktion F8	120
5.2.7	Identifizierung der PDE-hemmenden Stoffklasse in Fraktionen F6, F7, F8....	121
5.2.8	Diskussion.....	124

5.3	Einfluss des Artischockenextraktes (ALE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität	128
5.4	Einfluss des Ingwerextraktes (GPE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität.....	134
5.5	Einfluss des Erdbeerbaumextraktes (SFE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität...	140
5.6	Einfluss des Grünteeextraktes (TXE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität	145
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	149
7	Literaturverzeichnis	153
8	Tabellenverzeichnis.....	180
9	Abbildungsverzeichnis.....	182
10	Anhang	190
	Dankeschön!	209
	Lebenslauf.....	211
	Veröffentlichungen	213
	Eidesstattliche Erklärung	215

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AC	Adenylatzyklase
ACE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AFMU	5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
AKAP	PKA-Ankerprotein
ALE	Artischockenblätterextrakt
ARE	<i>antioxidative response element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C	Catechin
cAMP	zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
CaW	<i>N</i> -Caffeoyltryptophan
CG	Catechingallat
CGA	Chlorogensäure
cGMP	zyklisches 3', 5'-Guanosinmonophosphat
CML	Carboxymethyllysin
CO	Kohlenmonoxid
CoA	Coenzym A
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
cpm	<i>counts per minute</i>
CQA	Caffeoylchinasäure
CRE	cAMP responsive Element, <i>cAMP response element</i>
CREB	cAMP-responsives-Element-Bindeprotein, <i>cAMP response element binding protein</i>
CuW	<i>N</i> -Cumaroyltryptophan
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DAD	Diodenarray-Detektor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DiCQA	Dicaffeoylchinasäure
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
ESI	Elektrosprayionisierung
FL	ϵ -Fructosyl-L-lysin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAF	Proteindomäne in cGMP-PDEs, Adenylatzyklasen und FhLA
GC	Guanylatzyklase
GC	Gallocatechin

GCG	Gallocatechingallat
GDP	Guanosindiphosphat
GLE	lipoide Ingwerfraktion
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPE	Ingwerpulverextrakt
GRE	Ingwer-Extrakt (superkrit. CO ₂)
GTP	Guanosintriphosphat
GWE	wässrige Ingwerfraktion
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
K _i	Dissoziationskonstante der Enzym-Inhibitor-Verbindung
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LAL	Lysinoalanin
LC	Flüssigkeitschromatographie
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
MeOH	Methanol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MS	Massenspektrometrie
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NMR	Kernspinresonanz-Analyse
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Lösung
PDE	Phosphodiesterase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
SFE	Erdbeerbaumfruchtextrakt
Sp1	Transkriptionsfaktor
THF	Tetrahydrofuran
TMP	Tetramethylpyrazin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXE	Teeextrakt
UCR	<i>upstream conserved region</i>
XAD	Styrol-Divinylbenzol-Polymerharz

Kurzzusammenfassung

Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren die Hydrolyse der *second messenger* cAMP und cGMP und spielen damit eine wichtige Rolle in cAMP- und cGMP-vermittelten Signalkaskaden. PDE-Hemmstoffe besitzen pharmakologische Wirkungen und werden daher u.a. als Antikoagulantien, Antiphlogistika und Vasodilatoren eingesetzt. Neben synthetischen PDE-Hemmstoffen sind zahlreiche natürliche Hemmstoffe bekannt, die sowohl in Arzneipflanzen als auch in Lebensmitteln vorkommen. So sind beispielsweise Methylxanthine, Chlorogensäuren, Alkylpyrazine und Flavonoide als PDE-Hemmstoffe beschrieben. Der Verzehr von Lebensmitteln mit PDE-hemmendem Potential könnte sich aufgrund der pharmakologischen Wirkungen von PDE-Hemmstoffen positiv auf das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen auswirken. Daher besteht gesteigertes Interesse, das PDE-hemmende Potential von verschiedenen Lebensmitteln und die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe zu identifizieren. Zwei Humanstudien haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die PDE-Aktivität in Thrombozyten bei langzeitigem Konsum von Kaffee (*Coffea arabica*) gehemmt wurde. Dabei wurden die verantwortlichen Inhaltsstoffe in Kaffee nicht identifiziert, weshalb in der vorliegenden Arbeit eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung mit *in vitro* PDE-Aktivitäts-Assay durchgeführt wurde. Im Rahmen der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung wurde eine Fraktion von wasserlöslichen Melanoidinen mit niedrigem Molekulargewicht (< 3 kDa), niedriger Polarität und UV-Aktivität (260 nm, 280 nm, 420 nm) als verantwortlich für die PDE-Hemmung durch Kaffee identifiziert. Als Mechanismus der Hemmung wurde eine nicht-kompetitive Hemmung bestimmt, die vermutlich durch die Chelatisierung von zweiwertigen Kationen durch die Melanoidinfraktion hervorgerufen wird. Da Daten zur Bioverfügbarkeit von intakten Melanoidinen in der Literatur fehlen, bleibt eine physiologische Bedeutung unklar. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit Arzneipflanzen mit kulinarischer Bedeutung auf ihr PDE-hemmendes Potential untersucht. Während Extrakte aus Erdbeerbaumfrüchten (*Arbutus unedo*) und Grüntee (*Camellia sinensis*) wider Erwarten keine Effekte auf die PDE-Aktivität besaßen, konnte für einen Artischockenblätterextrakt (ALE, *Cynara scolymus*) und einen Ingwerpulverextrakt (GPE, *Zingiber officinale*) ein mit Kaffee vergleichbares PDE-hemmendes Potential gezeigt werden. Einzelsubstanztestungen haben gezeigt, dass für das PDE-hemmende Potential des ALE vermutlich ein Synergismus von mehreren Inhaltsstoffen verantwortlich ist, wobei es sich sehr wahrscheinlich um Flavone und Chlorogensäuren handelt. Eine grobe Fraktionierung des GPE zeigte, dass das PDE-hemmende Potential der lipoiden Fraktion zuzuordnen war. Einzelsubstanztestung von [6]-Gingerol lässt vermuten, dass das PDE-hemmende Potential von den Gingerolen und deren Derivaten ausgeht. So konnten in der vorliegenden Arbeit zwei neue Lebens- bzw. Arzneimittel mit PDE-hemmendem Potential identifiziert sowie die verantwortlichen Inhaltsstoffe eingegrenzt werden. Zukünftig gilt es zu untersuchen, ob Effekte durch den Verzehr dieser Extrakte oder Lebensmittel zu einem physiologischen Effekt führt, der positive Auswirkungen auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen besitzt.

Abstract

Phosphodiesterases (PDE) catalyze the hydrolysis of the *second messengers* cAMP and cGMP and thus play a major role in cAMP and cGMP dependent signaling pathways. PDE inhibitors exhibit pharmacological properties and are therefore used as anticoagulant, antiphlogistic, and vasodilatory agents. While there are synthetic inhibitors, numerous naturally occurring inhibitors are known as well which can be contained in medicinal plants and foods. For example, methylxanthines, chlorogenic acids, alkylpyrazines, and flavonoids have been described as PDE inhibitors. Now, the consumption of foods with PDE inhibiting potential might have beneficial effects on the risk of a cardiovascular disease based on the pharmacological effects of PDE inhibitors. This leads to an increased interest to identify food with PDE inhibiting ability and to target active ingredients thereof. In this context, two human intervention studies demonstrated that longtime consumption of coffee (*Coffea arabica*) led to a decrease of PDE activity in thrombocytes. Because the responsible coffee ingredients were not identified, an activity guided fractionation with subsequent testing in an *in vitro* PDE activity assay was chosen in the present work. Through this fractionation a fraction of water soluble melanoidins with low molecular weight (< 3 kDa), low polarity, and UV activity (260 nm, 280 nm, 420 nm) was identified to be responsible for PDE inhibition by coffee. The mechanism of inhibition was determined as non-competitive which is probably due to chelation of bivalent cations by this melanoidin fraction. A physiological relevance still has to be proven since data about melanoidin bioavailability is not available. Furthermore, several medicinal plants with culinary relevance were tested for their PDE inhibiting potential in this work. While against expectation, extracts from green tea (*Camellia sinensis*) and strawberry tree fruits (*Arbutus unedo*) showed no effect on PDE activity, it was shown for extracts from artichoke leaves (ALE, *Cynara scolymus*) and ginger powder (GPE, *Zingiber officinale*) that they inhibit PDE activity in a comparable manner to coffee. Single substance testing revealed that the PDE inhibition of ALE is probably due to synergistic effects of several ingredients, most likely flavones and chlorogenic acids. Crude fractionation of GPE revealed, that the PDE inhibiting potential is located in the lipoid fraction, and from single substance testing it was proposed, that in all likelihood the effect is mediated by gingerols and their derivatives. In the present work two medicinal plants or rather foods with PDE inhibiting potential were identified and the responsible classes of ingredients were determined. In future research the physiological relevance of the consumption of these foods has to be evaluated in prospective of possible beneficial effects regarding cardiovascular diseases.

1 Einleitung

Die Nukleotide zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sind sekundäre Botenstoffe zellulärer Aktivierungskaskaden. Diese sog. *second messenger* vermitteln im Körper neben zahlreichen anderen Prozessen die Thrombozytenaktivierung, Reaktionen des Metabolismus sowie Immunsystems und die Gefäßkontraktion (Gresele *et al.*, 2011). Sie unterliegen einer strengen Regulation durch bildende und abbauende Enzyme. Während Adenylat- und Guanylatzyklen die Synthese von cAMP und cGMP katalysieren, wird die Hydrolyse der beiden Verbindungen durch Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert. Eine Hemmung der PDEs führt zu einer intrazellulären Akkumulation dieser *second messenger*, was zu einer Hemmung der Thrombozytenaktivierung oder zu Gefäßdilatation führen kann. Daher werden PDE-Hemmstoffe in der Pharmakologie als Vasodilatoren, Antiphlogistika oder Antikoagulantien eingesetzt (Wood und Hiatt, 2001; Klöner, 2004; Gresele *et al.*, 2011). Aus der Literatur ist bekannt, dass neben zahlreichen synthetischen Hemmstoffen auch natürliche Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen und Lebensmitteln eine hemmende Wirkung auf PDEs besitzen können. So wurde eine PDE-hemmende Wirkung beispielsweise für einige Flavonoide und Methylxanthine beschrieben (Rall und Sutherland, 1958; Beretz *et al.*, 1978; Ferrell *et al.*, 1979; Ruckstuhl *et al.*, 1979; Kuppusamy und Das, 1992; Ko *et al.*, 2004; Marko *et al.*, 2004). Aufgrund der physiologischen Wirkungen von PDE-Hemmstoffen könnte der regelmäßige Verzehr von Lebensmitteln mit PDE-hemmenden Inhaltsstoffen positive Effekte auf das Herz-Kreislauf-System besitzen und zur Prävention der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragen. Es ist daher von Interesse, Lebensmittel mit PDE-hemmendem Potential und die verantwortlichen Inhaltsstoffe zu identifizieren. Epidemiologische Studien haben den Konsum von Kaffee in Verbindung mit einem verringerten Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen gebracht (Ding *et al.*, 2013). Kaffee ist mit einem Pro-Kopf-Verzehr von 162 l in 2014 (Dt. Kaffeeverband) eines der am meisten konsumierten Getränke in Deutschland. In zwei Humanstudien konnte bei zwei- bzw. vierwöchigem Konsum von Kaffee eine Abnahme der PDE-Aktivität und eine Zunahme an intrazellulärem cAMP in den Thrombozyten von gesunden Probanden beobachtet werden (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Inhaltsstoffe des Kaffees, welche *in vitro* als schwache PDE-Hemmstoffe identifiziert wurden, sind Koffein (Rall und Sutherland, 1958), Alkylpyrazine sowie Chlorogensäuren (Montoya *et al.*, 2014). Allerdings reichen das hemmende Potential und die Konzentrationen dieser Verbindungen nicht aus, um für die beobachteten Effekte allein verantwortlich zu sein. Demnach wurden die Inhaltsstoffe des Kaffees mit dem stärksten PDE-hemmenden Potential bisher nicht identifiziert. Ein Lebensmittel, das verglichen mit

Kaffee ebenfalls reich an Chlorogensäuren ist, ist die Artischocke (*Cynara scolymus* L.). Weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in Artischocke sind Flavone und Flavanone (Schütz *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2010; Pandino *et al.*, 2011). Eine *in vitro* Studie konnte gefäßerweiternde Effekte für einen Artischockenextrakt zeigen (Li *et al.*, 2004), sodass dies neben dem Inhaltsstoffprofil auf eine mögliche PDE-Hemmung als Wirkmechanismus hindeutet. Gefäßerweiternde Effekte sind ebenfalls für Extrakte aus Blättern und Wurzel des Erdbeerbaums (*Arbutus unedo* L.) beschrieben (Ziyyat *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte *in vitro* eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung gezeigt werden (Mekhfi *et al.*, 2006; El Haouari *et al.*, 2007). Neben Gallus- und Ellagsäurederivaten enthalten Blätter und Früchte des Erdbeerbaums das Hydrochinon-Glykosid Arbutin. Die Früchte enthalten außerdem Anthocyane (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008; Pavlović *et al.*, 2009). Eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus wurde allerdings bisher nicht untersucht. Ein weiteres Lebensmittel, welches in Zusammenhang mit einer Hemmung von PDEs steht, ist Ingwer (*Zingiber officinale* Roscoe). Eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus wurde für Ingwer zwar in zahlreichen Studien untersucht, die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich (Kobayashi *et al.*, 1987; Thein *et al.*, 1995; Ghayur *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2011). Erste Hinweise auf einen PDE-abhängigen Wirkmechanismus liefert die breite Verwendung des Ingwerrhizoms in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) als Antikoagulans und für die Behandlung von Inflammation. Eine spezielle Klasse von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in Ingwer, Gingerole und ihre Derivate, erfüllt außerdem die strukturellen Voraussetzungen nach Card *et al.* (2004) für eine Bindung ins aktive Zentrum der PDEs. Neben einem Serotonin-Antagonismus, Hemmung der Cyclooxygenase und Lipoxigenase würde eine PDE-Hemmung einen ergänzenden Wirkmechanismus darstellen. Dem Ingwer ähnlich zeigten Extrakte aus Grüntee (*Camellia sinensis* L.) in zahlreichen Studien antiinflammatorische und anti-thrombotische Wirkungen (Ruch *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2007). Epidemiologische Studien korrelierten außerdem den Konsum von Grüntee mit einer verminderten Sterblichkeit insbesondere durch koronare Herzkrankheit (Kuriyama *et al.*, 2006). Da Grüntee ähnlich wie Kaffee reich an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und zudem koffeinhaltig ist, ist eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus wahrscheinlich. Um die Wirkmechanismen dieser Arzneipflanzen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Extrakte hergestellt und auf ihre PDE-Hemmung getestet. Zusätzlich erfolgte die Testung von Leitsubstanzen der jeweiligen Pflanze. Da PDE-Hemmung als ein Wirkmechanismus bei Kaffee bereits bekannt war, wurde das Augenmerk auf die Identifizierung der verantwortlichen Substanzen gelegt. Die Vielzahl an Inhaltsstoffen des Kaffees machte es erforderlich, einen alternativen Ansatz zur Einzelsubstanz-Testung zu wählen, weshalb eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung durchgeführt wurde.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Zyklische Nukleotide, Phosphodiesterase und relevante physiologische Prozesse

Für die Signalübertragung von Zelloberfläche ins Zellinnere gibt es zahlreiche Mechanismen. Dabei spielen Mechanismen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) eine übergeordnete Rolle. Unter den GPCR-gekoppelten Mechanismen findet man wiederum „second messenger“-vermittelte Signalkaskaden. *Second messenger* sind intrazelluläre Botenstoffe, die nach Aktivierung einer Signalkaskade gebildet oder ausgeschüttet werden und spezifische Ziele im Zellinneren aktivieren oder deaktivieren. Zu ihnen zählen neben Ca^{2+} und Inositoltriphosphat (IP_3) die zyklischen Nukleotide cAMP (zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat) und cGMP (zyklisches 3', 5'-Guanosinmonophosphat). cAMP- und cGMP-vermittelte Signalkaskaden sind u.a. beteiligt an Reaktionen des Immunsystems, des Metabolismus sowie der Gefäßkontraktion und der Thrombozytenaktivierung. In diesen Signalkaskaden werden die intrazellulären Level an cAMP und cGMP durch auf- und abbauende Enzyme streng reguliert. Auf der Seite der Bildung stehen Adenylat- und Guanylatzyklen, die die Bildung aus Adenosin- und Guanosintriphosphat katalysieren. Auf der Seite des Abbaus stehen Phosphodiesterasen (PDE), die die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung katalysieren. Eine Hemmung der PDEs führt zu einer Akkumulation von cAMP und/oder cGMP im Zellinneren und zu einer Verstärkung der aktiven Signalkaskaden. PDE-Hemmstoffe werden daher in der Pharmakologie eingesetzt als Antikoagulantien, Vasodilatoren und Antiphlogistika für die Therapie von peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), erektiler Dysfunktion, Hypertonie, Herzinsuffizienz, Hyperkoagulation, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Psoriasis (Giembycz und Field, 2010; Gresele *et al.*, 2011; Kavanaugh *et al.*, 2014; Felquer und Soriano, 2015), siehe Tabelle 2-1. Aktuelle klinische Studien prüfen zudem die Wirksamkeit von PDE-Hemmstoffen für die Behandlung von Alzheimer-Krankheit (García-Osta *et al.*, 2012). Insbesondere in Bezug auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Phosphodiesterasen interessante Ziele. Diese Erkrankungen werden begünstigt bei Störungen der Blutgerinnung, der Blutdruckregulation und der Immunantwort. Auf diese Prozesse und die Rolle der zyklischen Nukleotide wird in den Kapiteln 2.1.4, 2.1.5 und 2.1.6 weiter eingegangen.

Tabelle 2-1: PDE-Hemmstoffe mit Arzneimittelzulassung

Hemmstoff	Erkrankung	Target-PDE
Cilostazol	pAVK	PDE3
Milrinon	Herzinsuffizienz	PDE3
Roflumilast	COPD	PDE4
Apremilast	Psoriasis	PDE4
Sildenafil	erektile Dysfunktion, Hypertonie	PDE5 (PDE6)
Tadalafil	erektile Dysfunktion, Hypertonie, benigne Prostatahyperplasie	PDE5
Vardenafil	erektile Dysfunktion	PDE5
Avanafil	erektile Dysfunktion	PDE5
Dipyridamol	Thromboseprophylaxe	PDE5 (PDE6, PDE7)

2.1.1 Nukleotid-vermittelte Signalkaskaden

Bei den zyklischen Nukleotiden cAMP (zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat) und cGMP (zyklisches 3', 5'-Guanosinmonophosphat) handelt es sich um sog. *second messenger*. cAMP und cGMP sind intrazelluläre Botenstoffe G-Protein-vermittelter Signalkaskaden. Dabei unterscheidet man inhibierende (G_i) und stimulierende (G_s) G-Protein-Signale.

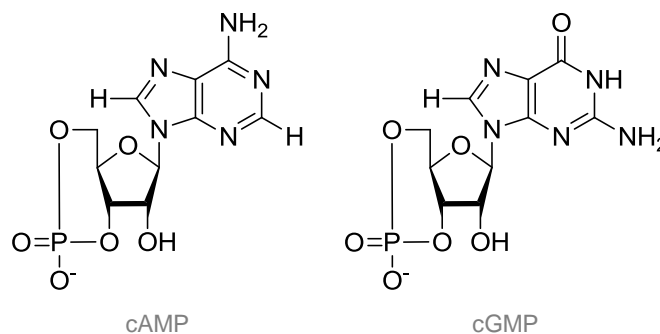


Abbildung 2-1: Zyklische Nukleotide

Stimulierende G-Protein-Signale (G_s)

Bei stimulierenden Signalen bindet ein primärer Botenstoff („*first messenger*“), z.B. ein Hormon oder Neurotransmitter, an einen extrazellulären G_s -Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR, „*G-protein coupled receptor*“). Dieser Rezeptor besitzt sieben Transmembran-Domänen und ist intrazellulär an das membrangebundene Guanosintriphosphat-abhängige Protein (GTP-abhängiges Protein, G-Protein) gekoppelt. Bei Aktivierung des Rezeptors wird das G-Protein entkoppelt. Die α -Untereinheit des G-Proteins nimmt GTP unter Guanosindiphosphat-Verlust auf und spaltet sich von der β - γ -Untereinheit ab. Die α -Untereinheit migriert zur membrangebundenen Adenylat-(AC) oder Guanylatzyklase (GC), welche wiederum durch die Bindung der α -Untereinheit aktiviert wird. Die Zyklasen bilden aus Adenosintriphosphat (ATP) und GTP entsprechend cAMP und

cGMP. Die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit hydrolysiert das gebundene GTP zu GDP. Die dadurch inaktivierte α -Untereinheit besitzt eine höhere Affinität für die β - γ -Untereinheit des G-Proteins und reassoziert mit dieser. Dieser Vorgang dauert wenige Sekunden¹. Die so gebildeten *second messenger* binden im Weiteren an ihre Effektorproteine. Dies sind beispielsweise direkt beeinflussbare Ionenkanäle, Epac-Proteine („*exchange protein directly activated by cAMP*“) oder Proteinkinasen. Die Aktivierung von Proteinkinasen ist die am besten untersuchte Wirkung. Jeweils zwei Äquivalente der gebildeten *second messenger* binden an zwei regulatorische Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) bzw. cGMP-abhängigen Proteinkinase C (PKC). Die beiden regulatorischen Untereinheiten dissoziieren von der heterotetrameren Proteinkinase und die monomeren katalytischen Untereinheiten phosphorylieren die Zielproteine an Serin- und Threonin-Resten von bspw. Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren, welche dadurch wiederum aktiviert oder deaktiviert werden (Tasken und Aandahl, 2004). Diese Transkriptionsfaktoren binden bspw. an cAMP-responsive Elemente (CRE, *cAMP response element*), weshalb sie den Namen „*cAMP response element-binding proteins*“ (CREB) tragen. Daneben werden Phosphodiesterasen (PDE) aktiviert, welche die Hydrolyse der zyklischen Nucleotide katalysieren und die Signalkaskade beenden (siehe Kapitel 2.1.2). Die Aktivierung der Epac-Proteine durch die direkte Bindung von cAMP führt zur Aktivierung der GTPasen Rap1 und Rap2 und der daran gekoppelten Mechanismen (De Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Abbildung 2-3 zeigt eine detaillierte Darstellung der G_S -cAMP-Signalkaskade. Ein beispielhafter Prozess, der durch die stimulierende G-Protein-Signalkaskade ausgelöst wird, ist die Vasodilatation (siehe Kapitel 2.1.5).

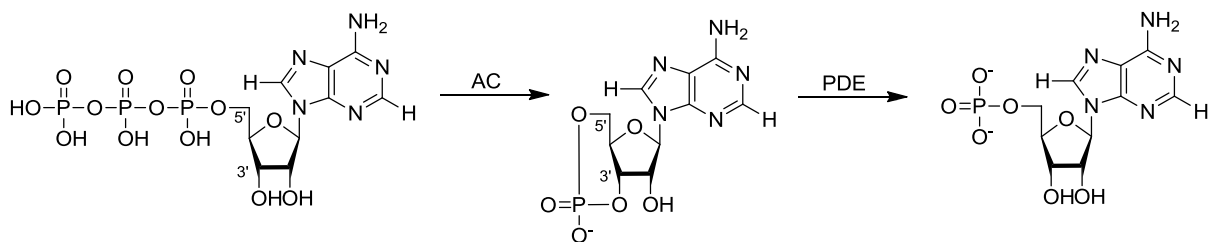


Abbildung 2-2: Bildung von cAMP aus ATP und Hydrolyse. AC - Adenylatzyklase; PDE - Phosphodiesterase

Inhibierende G-Protein-Signale (G_i)

Bei inhibierenden G-Protein-Signalen erfolgt die Bindung der α -Untereinheit eines G_i -Proteins an die Adenylat- oder Guanylatzyklase analog den stimulierenden Signalen, resultiert aber in der Inhibition der entsprechenden Zykase. Dies führt wiederum zu einer Abnahme der intrazellulären Level an cAMP bzw. cGMP und einem Abklingen von cAMP-

¹ Aktories *et al.*, 2005, S. 18f

bzw. cGMP-vermittelten Funktionen¹. Dies kann im Detail in Abbildung 2-3 betrachtet werden. Ein Prozess, der über eine Abnahme an intrazellulären zyklischen Nukleotiden gesteuert wird ist bspw. die Thrombozytenaktivierung (siehe Kapitel 2.1.4).

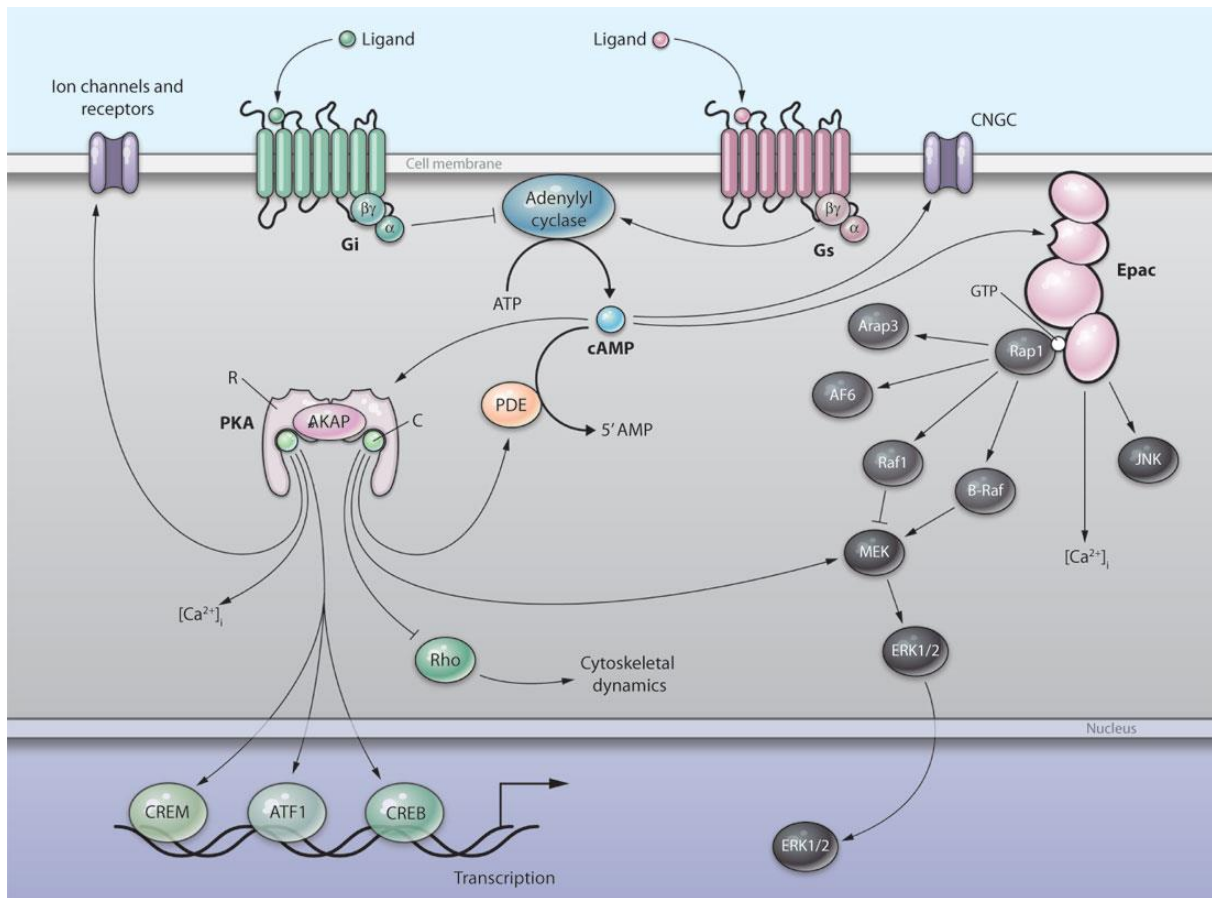


Abbildung 2-3: Detaillierte Darstellung der cAMP-Signalkaskade aus Murray (2008). AF6 - Afadin-Protein; AKAP - Proteinkinase A Ankerprotein, AMP - Adenosinmonophosphat; Arap3 - Arf und Rho GAP Adapter Protein 3 ; ATF1 - cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor, *activating transcription factor 1*; ATP - Adenosintri-phosphat; B-Raf - Proteinkinase B-Raf; C - katalytische Untereinheit Proteinkinase A; cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat; CNGC - *cyclic nucleotide-gated channels*; CREB - *cAMP response element-binding protein*; CREM - *cAMP response element-modulator*; Epac - *exchange protein directly activated by cAMP*; ERK1/2 - *extracellular signal-related kinase 1/2*; GAP - GTPase-aktivierende Proteine; Gi - inhibierendes G-Protein; Gs - stimulierendes G-Protein; GTP -Guanosintri-phosphat; JNK - c-Jun N-terminale Kinasen; MAPK - Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK - MAPK/ERK Kinase; PDE - Phosphodiesterase, PKA - cAMP-abhängige Proteinkinase A, R - regulatorische Untereinheit Proteinkinase A; Raf1 - Proteinkinase C-Raf; Rap1 - GTPase, *Ras-related protein 1*; Ras - GTPasen-Familie; Rho - GTPase, *Ras homologue*;

Regulation

Damit die primären Signale eine gezielte Wirkung in der Zelle auslösen, sind spezifische Regulationsmechanismen erforderlich. Dies wird zum einen durch die hohe Biodiversität der beteiligten Enzyme und Rezeptoren erreicht. Bis dato sind 367 verschiedene GPCRs bekannt² sowie 9 AC-Familien³ und 11 PDE-Familien mit mehr als 100 Isoformen (Bender und Beavo, 2006). Während PKA Typ I vorwiegend zytosolisch vorliegt, ist der PKA Typ II

² Siehler und Milligan, 2010. S. 1

³ Siehler und Milligan, 2010. S. 191

meistens über Ankerproteine (AKAP - „*A proteinkinase anchoring protein*“) an Organellen gebunden. Es sind über 50 AKAP-Isoformen bekannt (Tasken und Aandahl, 2004). Zum anderen spielt die partikuläre oder cytosolische Lokalisation der intrazellulären Enzyme eine entscheidende Rolle. GPCRs stimulieren/hemmen ACs in unmittelbarer Nähe. Der cAMP-Pool wird durch PDEs räumlich begrenzt und aktiviert dadurch direkt benachbarte PKAs, siehe Abbildung 2-4 (Tasken und Aandahl, 2004). Zusätzlich werden bei den beteiligten Proteinen gewebespezifische Verteilungsmuster beobachtet (Tasken und Aandahl, 2004; Gresele *et al.*, 2011) und ³.

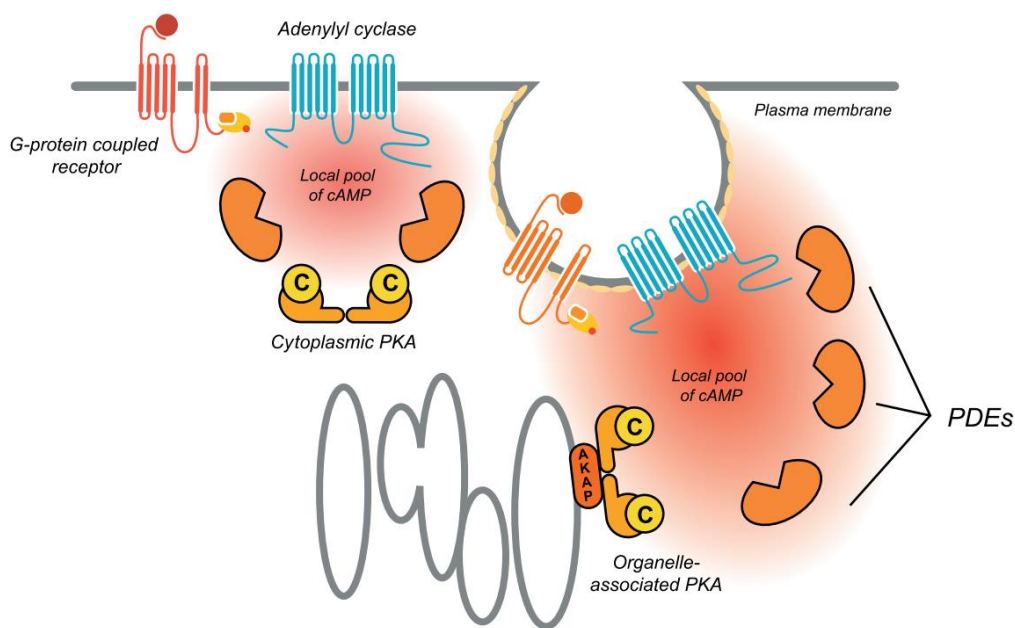


Abbildung 2-4: Spezifität der cAMP-vermittelten Signalkaskade durch Kompartimentalisierung der cAMP-Pools. AKAP - „*A kinase anchoring protein*“; C - katalytische Untereinheit der PKA; cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat; PDE - Phosphodiesterase; PKA - Proteinkinase A; aus Tasken und Aandahl (2004).

2.1.2 Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren die Hydrolyse der zyklischen Nucleotide und regulieren neben Adenylat- und Guanylatzyklasen die intrazellulären Level der zyklischen Nucleotide. Man unterscheidet 11 Familien, die sich in Substrat- und Inhibitor-Spezifität unterscheiden. Berücksichtigt man die 21 Genloki und zahlreichen Transkriptionsprodukte sowie Spleißvarianten gibt es schätzungsweise mehr als 100 Isoformen (Bender und Beavo, 2006). Tabelle 2-2 zeigt die Unterschiede der PDE-Familien in der Substratspezifität sowie die gewebespezifische Verteilung der Isoformen auf. Kombiniert mit den gewebespezifischen Verteilungsmustern schafft die hohe Biodiversität die Grundlage für gezielte pharmakologische Anwendung von PDE-Hemmstoffen. Durch die Hemmung der PDE akkumulieren die intrazellulären Spiegel der *second messenger* und führen zu cAMP- und

cGMP-spezifischen Reaktionen der betroffenen Zellen. Der PDE-Hemmstoff Roflumilast wirkt auf die PDE4 in der Lunge und wird in der Kombinationstherapie von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) angewendet (Giembycz und Field, 2010). Ein weiterer Hemmstoff der PDE4 ist Apremilast, der kürzlich für die der Langzeitbehandlung von Psoriasis vulgaris und Psoriasisarthritis zugelassen wurde (Kavanaugh *et al.*, 2014; Felquer und Soriano, 2015). Die PDE5-Inhibitoren Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil wirken vasodilatierend auf die glatte Gefäßmuskulatur, insbesondere im *Corpus cavernosum*, und werden daher für die Behandlung von erektiler Dysfunktion eingesetzt (Kloner, 2004). In der Kurzzeittherapie von peripherer arterieller Verschlusskrankheit hat sich der PDE3-Hemmer Cilostazol bewährt. Die primären Wirkmechanismen sind die Hemmung der Thrombozytenaktivierung und die Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur. Die Langzeitanwendung der PDE3-Hemmstoffe ist allerdings insbesondere bei gleichzeitiger koronarer Herzkrankheit kontraindiziert (Wood und Hiatt, 2001). Polymorphismen der Phosphodiesterasen sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. So wurde beispielsweise eine Assoziation mehrerer PDE4D-Polymorphismen mit der Inzidenz eines Hirninfarktes gefunden (Gretarsdottir *et al.*, 2003; Brophy *et al.*, 2006) (Saleheen *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2009). Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht für eine deutsche Kohorte nachgewiesen werden (Kuhlenbäumer *et al.*, 2006). Ein PDE4D-Polymorphismus wurde ebenfalls mit der Entwicklung chronisch obstruktiver Lungenerkrankung in Verbindung gebracht (Homma *et al.*, 2006). Ein Polymorphismus des PDE4B-Gens scheint mit der Inzidenz von Schizophrenie in Verbindung zu stehen (Fatemi *et al.*, 2008). Frauen mit einem Polymorphismus des PDE8B-Gens neigen zu einer subklinischen Hypothyreoiditis in der Schwangerschaft (Shields *et al.*, 2009).

Tabelle 2-2: Substratspezifität der PDE-Familien und gewebespezifische Verteilung (Gresele *et al.*, 2011).

Isoform	Organ/Gewebe	Substratspezifität
PDE1	Herz, glatte Gefäßmuskulatur, Gehirn	cAMP > cGMP
PDE2	Thrombozyten, Gefäßendothel, Herz	cAMP = cGMP
PDE3	Herz, glatte Gefäßmuskulatur, Thrombozyten, Corpus cavernosum	cAMP > cGMP
PDE4	Herz, glatte Gefäßmuskulatur, Gehirn, Lunge, Immunzellen	cAMP
PDE5	Thrombozyten, glatte Gefäßmuskulatur, Corpus cavernosum	cGMP
PDE6	Netzhaut (Stäbchen und Zapfen)	cGMP > cAMP
PDE7	T-Zellen, B-Zellen, Herz, Skelettmuskel	cAMP > cGMP
PDE8	Hoden, Auge, Leber, Skelettmuskel, Eierstock, Embryo, Gehirn, Niere	cAMP
PDE9	Gehirn, glatte Darmmuskulatur, Leber, Lunge, Niere, Skelettmuskel, Hoden, Herz	cGMP
PDE10	Hoden, Gehirn	cAMP > cGMP
PDE11	Skelettmuskel, Prostata, Leber, Niere, Hoden, Speicheldrüsen, Hypophyse	cAMP = cGMP

Aktives Zentrum

Trotz vieler Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen, ist das aktive Zentrum bei der Mehrheit der PDEs ähnlich aufgebaut. Das aktive Zentrum, bestehend aus 16 Helices, siehe Abbildung 2-5, lässt sich in drei Untereinheiten einteilen (Bender und Beavo, 2006). Die M-Subdomäne enthält die zweiwertigen Metallionen Zn^{2+} und Mg^{2+} . Zn^{2+} wird dabei von zwei Histidin- und zwei Aspartat-Resten koordiniert (Card *et al.*, 2004; Bender und Beavo, 2006). Einer dieser Aspartat-Reste koordiniert auch das Mg^{2+} , welches von fünf Wassermolekülen umgeben wird. Eines dieser Wassermoleküle bildet eine Brücke zurück zum Zn^{2+} . Beide Metallionen sind oktaedrisch koordiniert (Card *et al.*, 2004). Die S-Subdomäne enthält hydrophile Aminosäurereste und bindet Wassermoleküle. Die Q-Subdomäne ist maßgeblich für die Bindung des Substrates über hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich und wird nochmals in Q1- und Q2-Subdomäne unterteilt (Card *et al.*, 2004). Die Subdomänen sind in Abbildung 2-6a dargestellt. Die zyklischen Nukleotide binden über verschiedene Wechselwirkungen ins aktive Zentrum. In der PDE4D2 richtet sich die zyklische Phosphatgruppe des cAMPs in Richtung der beiden Metallionen aus (M-Subdomäne) und wird fixiert über H-Brücken mit drei benachbarten gebundenen Wassermolekülen (S-Subdomäne) und einem Glutaminrest. Der Adeninrest des cAMPs wird über die Q-Subdomäne gebunden. Hierbei kommt es neben der Ausbildung einer H-Brückenbindung zu einem Glutaminrest auch zu einem Einschluss des Adenins zwischen Phenylalanin oder Tryptophan und Isoleucin oder Phenylalanin (Wang *et al.*, 2007). Die Ausrichtung der Amidgruppe des Glutaminrestes ist entscheidend für die Erkennung des Adenins oder Guanins (Zhang *et al.*, 2004). Die Ribosyl-Einheit des cAMPs wird über eine einzige H-Brücke fixiert (S-Subdomäne) und steht in *anti*-Stellung (Wang *et al.*, 2007). Die Bindung von cAMP im aktiven Zentrum ist in Abbildung 2-6b verdeutlicht. Aufgrund des Aufbaus des aktiven Zentrums wurden einige Voraussetzungen für kompetitive Hemmstoffe der PDEs formuliert. Als erste Voraussetzung gilt ein planarer hydrophober Ring, der in der Q-Subdomäne zwischen Phenylalanin, Tryptophan und/oder Isoleucin fixiert werden kann. Weiterhin muss der Inhibitor in der Lage sein eine H-Brücke mit dem Glutamin-Rest einzugehen, die normalerweise durch Adenin gebildet wird (Card *et al.*, 2004).

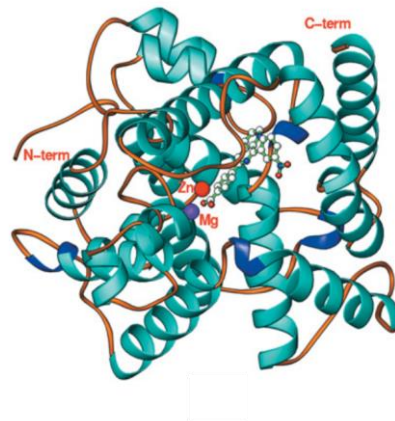


Abbildung 2-5: Das aktive Zentrum der PDE4A aus Wang *et al.* (2007).

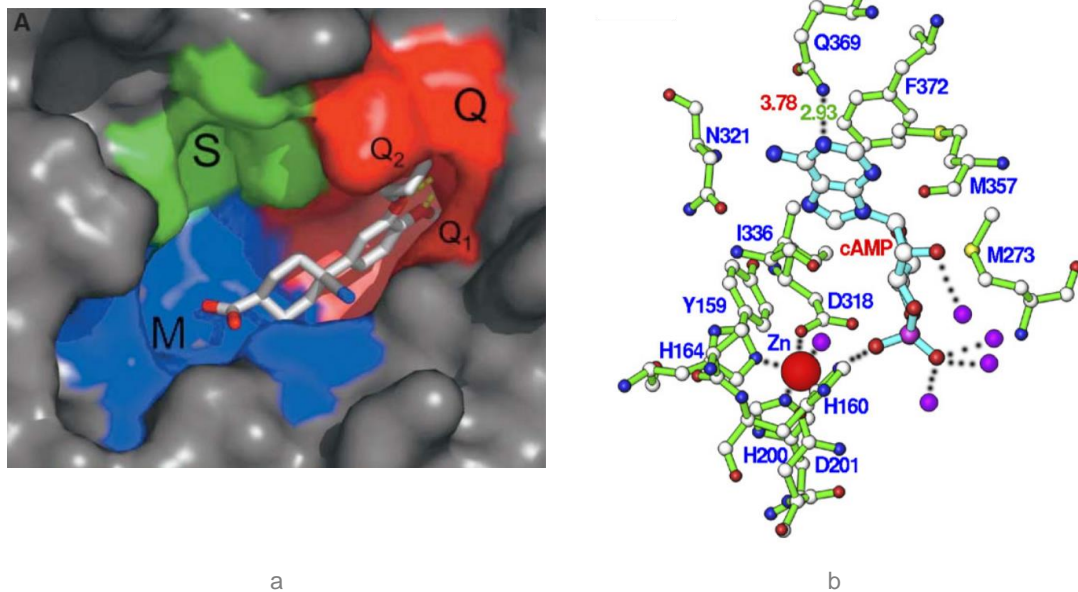


Abbildung 2-6: Bindung von cAMP im aktiven Zentrum der PDE. (a) Darstellung der Subdomänen aus Card *et al.* (2004); (b) Darstellung der Bindungen in PDE4D (liila gebundene Wassermoleküle) aus Wang *et al.* (2007).

Hydrolyse der Phosphodiesterbindung

Die Katalyse der Hydrolyse des cAMPs ist ein fünf-stufiger Prozess. Im ersten Schritt dissoziiert im leeren aktiven Zentrum ein Wassermolekül aus der Koordination des Mg^{2+} und überträgt ein Proton auf ein Histidin. Als nächstes bindet cAMP ins aktive Zentrum. Daraufhin bildet das deprotonierte Wassermolekül einen Übergangskomplex mit der Phosphatgruppe des cAMPs („*intermediate trigonal bipyramidal complex*“). Durch diese Bindung invertiert die Phosphatgruppe bis sich der Ring an 3'-Position aufspaltet. Im letzten Schritt dissoziiert das Hydrolyseprodukt aus dem aktiven Zentrum (Salter und Wierzbicki, 2007).

Regulation

PDEs liegen in der Regel in der Zelle in inaktiver Form vor. Sie werden gezielt aktiviert mit steigendem cAMP- bzw. cGMP-Spiegel. Die verschiedenen Familien von PDEs weisen unterschiedliche Aktivitätsregulationsmechanismen auf. Die translationale Regulation von PDE4, PDE7 erfolgt bspw. über „*cAMP response elements*“ (CRE) in der Promoterregion und deren Transkriptionsfaktoren (CREB). Die Expression von PDE4 wird weiterhin neben PDE5, PDE6 und PDE11 über den Transkriptionsfaktor Sp1 („*specificity protein*“) reguliert. Die post-translationale Regulation kann über sog. GAF-Domänen erfolgen. GAF ist eine N-terminale Domäne, zu deren Funktionen die allosterische Aktivitätsregulation über Bindung von cGMP oder cAMP und die Dimerisierung der genannten PDEs gehört. Zu den sogenannten GAF-PDEs zählen PDE2, PDE5, PDE6, PDE10, PDE11. PDE1 wird durch die

Bindung von aktiviertem Calmodulin („*calcium modulated protein*“) an eine Calmodulin-Bindungsstelle aktiviert. Calmodulin ist ein Effektormolekül des als *second messenger* fungierenden Ca^{2+} (Omori und Kotera, 2007). PDE3 besitzt spezifische aktivitätsregulierende Phosphorylierungsstellen, während man bei PDE9 weder Phosphorylierungsstellen noch GAF-Domänen identifiziert hat (Bender und Beavo, 2006). PDE4 und PDE8 nehmen Sonderstellungen ein. Bei PDE4 hat man zwei UCR-Domänen („*upstream conserved regions*“) identifiziert. Diese Domänen sind unmittelbar an der Aktivierung beteiligt. Nach Dimerisierung über diese Domänen kommt es zur Aktivierung der PDEs durch Ligandenbindung bzw. Phosphorylierung (Richter und Conti, 2004). Fehlt eine dieser Domänen, wie bei kurzen PDE4-Formen, verhalten sich die PDEs wie Monomere (Conti *et al.*, 2003). PDE8 besitzt sowohl eine N-terminale PAS-Domäne, welche die Aktivität über die Bindung von Liganden steuert, als auch eine REC-Domäne, eine spezielle Phosphorylierungsstelle (Bender und Beavo, 2006).

2.1.3 Phosphodiesterase Familie 4

Die Familie 4 der Phosphodiesterasen ist die am besten untersuchte Familie und kommt ubiquitär in Säugetierzellen vor. Sie besitzt für diese Arbeit besondere Bedeutung, da sie im für die *in vitro* Untersuchungen verwendete LXFL529L-Zellsystem hoch exprimiert wird (s. Kapitel 4.2.1). Für die PDE4 gibt es vier Gene *PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C* und *PDE4D*, die zahlreiche natürliche

Varianten beispielsweise durch Polymorphismen und Isoformen durch alternatives Spleißen etc. hervorbringen (siehe Tabelle 2-3). PDE4-Isoformen zeichnen sich aus durch cAMP-spezifische Hydrolyse und Sensitivität gegenüber dem PDE4-Hemmstoff Rolipram. Die PDE-Familie 4 ist ubiquitär in den verschiedenen Geweben und Organen des menschlichen Körpers zu finden. RNA-Produkte der vier Gene wurden u.a. in Gehirn, Leber, Niere und Lunge nachgewiesen (Müller *et al.*, 1996). Eine besondere Rolle spielen PDE4-Isoformen bei der Immunantwort. Die Transkripte von *PDE4A*, *PDE4B* und *PDE4D* können in CD4^{+} -, CD8^{+} -T-Lymphozyten, in T-Helferzellen des Typs 1, 2 und 17, in B-Lymphozyten, in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, dendritischen Zellen, Knorpelzellen, Mastzellen, Lungenepithelzellen, Endothelzellen und Sinneszellen nachgewiesen werden (Page und Spina, 2012). Transkripte von *PDE4C* können in Immunzellen nicht nachgewiesen werden und werden vorwiegend in Muskelzellen aber auch in Hoden gefunden (Müller *et al.*, 1996; Obernolte *et al.*, 1997; Barber *et al.*, 2004; Bingham *et al.*, 2006; Page und Spina, 2012).

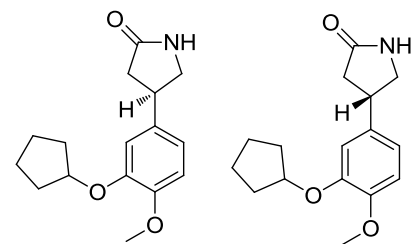


Abbildung 2-7: R- und S-Konformer von Rolipram

Tabelle 2-3: Natürliche Varianten und Isoformen der PDE4 (UniProt-Datenbank⁴)

	natürliche Varianten	Isoformen	letzte Eintragung	UniProt-Identifizier
PDE4A	2	8	20.02.2016	P27815
PDE4B	1	4	20.02.2016	Q07343
PDE4C	4	2	20.02.2016	Q08493
PDE4D	12	17	17.02.2016	Q08499

Den einzelnen Isoformen ihre Beteiligung an spezifischen Reaktionen nachzuweisen ist aufgrund überschneidender Expressionsmuster nur bedingt möglich. Im Zusammenhang mit Arteriosklerose ist allerdings bekannt, dass ein erhöhtes Risiko eines Schlaganfalles bei einer Fehlregulation des *PDE4D*-Gens besteht (Gretarsdottir *et al.*, 2003). Die Entwicklung von PDE4-Hemmstoffen in der Pharmakologie stellt sich schwierig dar, da PDE4-Hemmstoffe zu starken Nebenwirkungen führen, die das Verdauungssystem betreffen, allen voran eine emetische Wirkung (Robichaud *et al.*, 2001; Giembycz, 2002; Giembycz, 2005). Außerdem wirken PDE4-Hemmstoffe gegebenenfalls auf einzelne oder alle Isoformen des entsprechenden Gewebes. Sie zeigen antiinflammatorische (Souness *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2005), antidepressive (O'Donnell und Zhang, 2004) und vermutlich antidiabetische Wirkung (Vollert *et al.*, 2012). Roflumilast ist der einzige zugelassene Wirkstoff aus der Gruppe der PDE4-Hemmstoffe und er wird für die Behandlung von COPD in Kombination mit Bronchodilatoren eingesetzt (Giembycz und Field, 2010).

2.1.4 Zyklische Nukleotide und Thrombozytenaktivierung

Studien haben für Grüntee-, Arbutus- und Ingwerextrakte sowie einige Inhaltsstoffe eine anti-thrombotische Wirkung gezeigt (Srivastava, 1986; Kang *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2001; Son *et al.*, 2004; Mekhfi *et al.*, 2006; El Haouari *et al.*, 2007; Ok *et al.*, 2012). Während als Wirkmechanismus meist die Hemmung der Eicosanoidbiosynthese angeführt wurde, fanden Ok *et al.* (2012) für Epigallocatechin-3-gallat sowohl einen Anstieg an intrazellulärem cAMP als auch eine Hemmung der Thromboxan-A₂-Synthese. Generell kann ein direkter Zusammenhang zwischen PDE-Hemmung und Thrombozytenhemmung bestehen. Hemmstoffe der in Thrombozyten identifizierten Phosphodiesterasen werden als potentielle Hemmstoffe der Thrombozytenaktivierung beschrieben (Gresele *et al.*, 2011). Aufgrund dessen wird im Folgenden gesondert auf die Thrombozytenaktivierung in Zusammenhang mit zyklischen Nukleotiden eingegangen. Die Thrombozytenaktivierung ist ein wichtiger Schritt der Gerinnungskaskade, welche wiederum ein wichtiger Teil der Hämostase ist. Nach Verletzung eines Blutgefäßes erfolgt zuerst Vasokonstriktion. Anschließend wird die

⁴ "Universal Protein Resource" Datenbank, www.uniprot.org, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource

Gerinnungskaskade ausgelöst, in deren Verlauf zuerst ein Thrombozyten-Pfropf die betroffene Gefäßwand verschließt, der später von einem Fibrin-Netz gefestigt wird (Thrombus). Daran angeschlossen sind die Wundheilung und die Auflösung des Thrombus, sog. Fibrinolyse⁵.

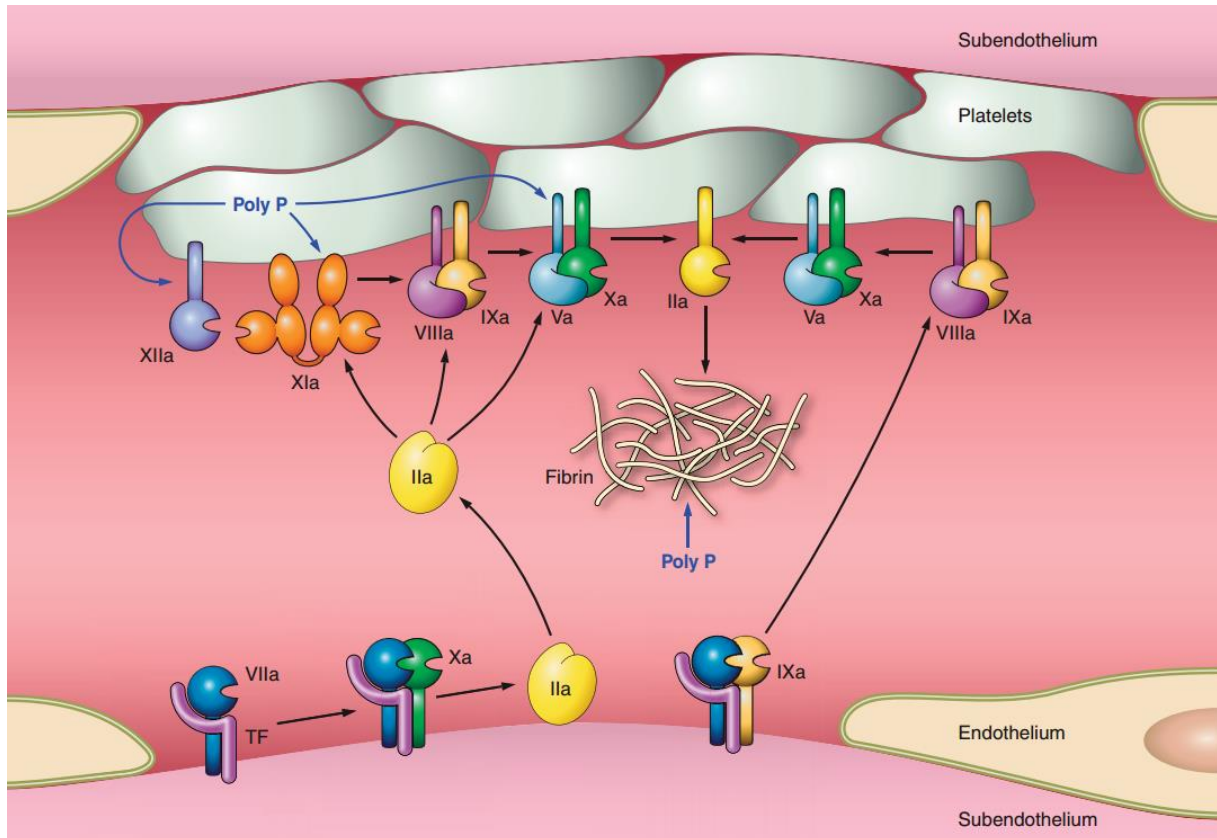


Abbildung 2-8: Aktivierungskaskade mit Initiations-, Amplifikations- und Verbreitungsphase aus Versteeg *et al.* (2013). Initiation (unteres Drittel): Thrombinbildung (IIa) an der Oberfläche subendothelialer Zellen nach Gefäßbeschädigung. Amplifikation (linke Bildhälfte): Thrombin aktiviert erste angehaftete Thrombozyten. Verbreitungsphase (rechte Bildhälfte): Aktivierte Thrombozyten aktivieren massive Mengen an Thrombin, welches weitere Thrombozyten aktiviert und Fibrin zur Vernetzung des Thrombus bildet.

Thrombozytenaktivierung

Die Schlüsselfunktionen der Thrombozyten bei Aktivierung bestehen in der Veränderung der Thrombozytenform zur Oberflächenvergrößerung (Pseudopodien), Aggregation und Sekretion weiterer Gerinnungsfaktoren über Granula (Colman, 2004; Smolenski, 2012). Die Aktivierung geht dabei u.a. von den G-Protein-Rezeptor-Liganden Thrombin, ADP, Thromboxan, Kollagen, von Willebrand Faktor, Fibrinogen (Smolenski, 2012) und Epinephrin aus (Colman, 2004). Diese binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, im Falle von Thrombin nach Freisetzung aus subendothelialelem Gewebe an PAR-1 und PAR-4 („protease activated receptor“). Dadurch werden die GTP-abhängigen Proteine G_q , $G_{12/13}$, und G_i aktiviert. Über Zwischenschritte kommt es u.a. zur Aktivierung der PDE3A durch Phosphorylierung durch die Proteinkinase B, einem Abfall an cAMP und zu einem Anstieg an

⁵ Aktories *et al.*, 2005, S. 526

Ca^{2+} (Zhang und Colman, 2007). Eine weitere Abnahme der cAMP-Konzentration während der Aktivierung wird durch die G_i -Protein abhängige Hemmung der Adenylatzyklase vermittelt (Yang *et al.*, 2002; Zhang und Colman, 2007; Smolenski, 2012). Die Folge des Abfalls des cAMP-Spiegels ist die Aktivierung der Thrombozyten-spezifischen Reaktionen der Gerinnungskaskade.

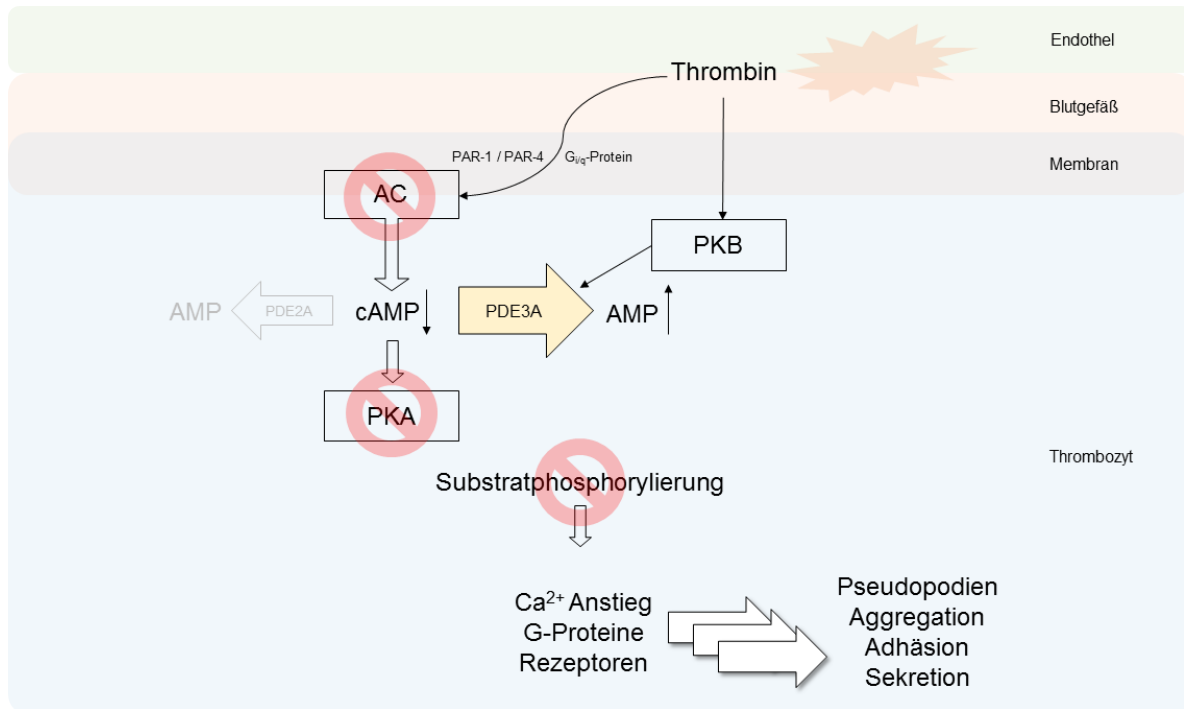


Abbildung 2-9: Regulierung des cAMP Spiegels bei Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin.

Thrombozytenhemmung

Der Aktivierung gegenüber steht die kontinuierliche Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch die Aufrechterhaltung eines basalen cAMP-Spiegels. Dies wird durch die Aktivierung der Adenylatcyclase und die Inaktivierung der cAMP-abhängigen Phosphodiesterase gewährleistet. Hierbei bindet von den Endothelzellen sekretiertes Prostacyclin (Prostaglandin I_2) an seinen Rezeptor IP auf der Oberfläche von Thrombozyten und aktiviert ein stimulierendes GTP-abhängiges Protein G_s , welches wiederum die Adenylatzyklase aktiviert und zur Bildung von cAMP führt. Adenosin wirkt in gleicher Weise über die Bindung an die Adenosin Rezeptoren A_{2A} und A_{2B} . Stickstoffmonoxid NO wirkt aktivierend auf nicht-membranständige Guanylatzyklasen sGC („soluble guanylate cyclase“), was zu einem Anstieg an cGMP in den Thrombozyten führt (Smolenski, 2012). cGMP konkurriert mit cAMP um die Bindung im aktiven Zentrum der PDE3A (Tabelle 2-4), wirkt damit hemmend auf PDE3A und trägt ebenfalls zum Anstieg des cAMP Spiegels bei. Das Zusammenspiel zwischen cAMP, cGMP und der drei exprimierten Phosphodiesterasen PDE2A, PDE3A, PDE5A stabilisiert den basalen cAMP Spiegel durch Kompartimentalisierung und

unterschiedliche zugrundeliegende Michaelis-Menten-Konstanten, siehe Tabelle 2-4. Durch die vorherrschenden cAMP- und cGMP-Spiegel kommt es zu Substratphosphorylierung durch die cAMP-anhängige Proteinkinase A (PKA) und die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) (Smolenski, 2012). Die Phosphorylierungen resultieren in der Hemmung vielzähliger Enzyme, Rezeptoren und Mechanismen der Thrombozytenaktivierung und in der Aktivierung entgegengerichteter Enzyme (Schwarz *et al.*, 2001). Eine Auswahl an Mechanismen, die hinter der Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch cAMP und cGMP vermutet werden, sind in Tabelle 2-5 dargestellt, siehe folgende Seite. Die Mechanismen betreffen die Störung der Ca^{2+} abhängigen Signaltransduktionen, die Fixierung des Cytoskeletts, die Verhinderung der Neuorganisation des Cytoskeletts, die Hemmung der Granula Sekretion und Translokation von Rezeptoren an die Zelloberfläche (Schwarz *et al.*, 2001).

Tabelle 2-4: Michaelis-Menten-Konstanten für die Thrombozyten PDEs (Colman, 2004; Gesele *et al.*, 2011).

PDE-Familie	K_M cAMP (μM)	K_M cGMP (μM)	Substrataffinität
PDE2	50	35	cGMP = cAMP
PDE3	0,5	0,02	cAMP > cGMP
PDE5	40	0,2	cGMP

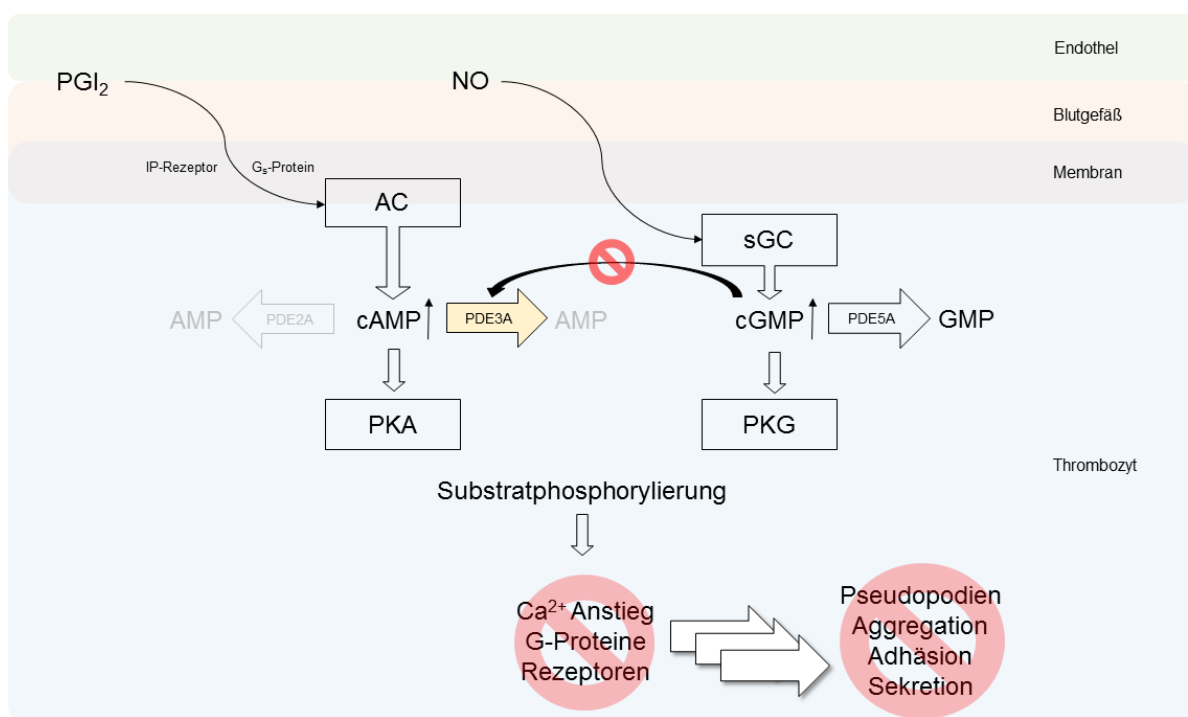


Abbildung 2-10: Regulierung der cyclischen Nucleotide bei inaktiven Thrombozyten.

Tabelle 2-5: Durch cyclische Nukleotide, PKA und PKG vermutete Hemmung der Thrombozytenaktivierung, z.T. adaptiert nach Schwarz *et al.* (2001)

Mechanismus	Substrat	Funktion im Thrombozyt	Folge der Phosphorylierung	Literatur
Störung des IP ₃ abhängigen Anstiegs von zellulärem Ca ²⁺ aus zellulären Depots und Influx	IP ₃ -Rezeptoren	Signaltransduktion, u.a. Ca ²⁺ Anstieg	Inaktivierung	a
	IP ₃ Bildung	<i>Second messenger</i> Bildung	Unbekannt, vermutlich Hemmung der PIP ₂ (Substrat) Resynthese	b
Fixierung des Cytoskeletts, Verhinderung der Formveränderung bei Aktivierung	Caldesmon	Bindung von Aktin und Myosin	Stabilisierung	c
	Aktin bindendes Protein (ABP)	Bindung von Aktin	Stabilisierung vor Proteolyse	d
Fixierung des Cytoskeletts durch verminderte „myosin light chain“ Phosphorylierung	„myosin light chain“ Kinase	Aktivierung der Myosinseitenkette	Inaktivierung	e
	„myosin light chain“ (MLC) Phosphatase	Deaktivierung der Myosinseitenkette	Aktivierung	f
	Thromboxane A ₂ Rezeptor Gα ₁₃	α-Untereinheit des G-Proteins am Thromboxanrezeptor, u.a. „myosin light chain“ Phosphorylierung	Inaktivierung	g
Hemmung der Aktin Polymerisierung und deshalb der Zelladhäsion	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein (VASP)	Bindung von Aktin und Profilin für Polymerisierung	Inaktivierung	h

a - (Cavallini *et al.*, 1996) (El-Daher *et al.*, 2000); b - (Ryningen *et al.*, 1998); c - (Hettasch und Sellers, 1991); d - (Chen und Stracher, 1989); e - (Hathaway *et al.*, 1981); f - (Aburima *et al.*, 2013), g - (Manganello *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2001); h - (Harbeck *et al.*, 2000)

PDE-Hemmer als Antikoagulantien

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in der Regulierung der intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel stellen PDE2A, PDE3A und PDE5A ein prädestiniertes Ziel zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung dar. Konkret zeigen die PDE3-Inhibitoren Milrinon, Anagrelide und Cilostazol starke Thrombozytenhemmung mit IC₅₀-Werten von 36 nM bis 1 µm (Gresele *et al.*, 2011). Dennoch ist die Anwendung von PDE-Hemmstoffen als Antikoagulantien durch die vielfältige Verteilung einzelner PDE-Isoformen über verschiedene Gewebe limitiert, wobei es zwangsläufig zu ungewollten Effekten in unbeteiligten Geweben kommt. Beispielsweise zeigt Sildenafil sowohl gefäßerweiternde, antikoagulative als auch erektile Effekte (Gresele *et al.*, 2011). Spezifische und unspezifische PDE-Hemmstoffe können ebenfalls in

zahlreichen Lebensmitteln wie Kaffee (Montoya, 2012; Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014) oder roten Weintrauben gefunden werden (Dell'Agli *et al.*, 2005). Eine Hemmung der PDEs über den Verzehr von Lebensmitteln, welche reich an PDE-Hemmstoffen sind, wird oftmals mit der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen gesehen und bedarf deshalb weiterer Untersuchungen.

2.1.5 Zyklische Nukleotide und Gefäßerweiterung

Erdbeerbaum ist ein traditionelles Phytotherapeutikum für Bluthochdruck in Marokko (Ziyyat *et al.*, 1997). In *in vitro* Studien konnte eine Gefäßerweiterung (Vasodilatation) als Wirkmechanismus gezeigt werden (Ziyyat *et al.*, 2002; Afkir *et al.*, 2008). Eine ähnliche Wirkung zeigen Flavonoide aus Artischocke (Li *et al.*, 2004). Die Vasodilatation steht in direktem Zusammenhang mit den zyklischen Nukleotiden cAMP und cGMP. Einem Anstieg von cAMP und/oder cGMP in der glatten Gefäßmuskulatur folgt Gefäßerweiterung. Ein möglicher Mechanismus der Erhöhung von cGMP ist die Bildung von Stickstoffmonoxid NO durch die endotheliale NO-Synthase. Das gebildete NO aktiviert wiederum eine lösliche Guanylatzyklase (sGC). Im folgenden Schritt bildet die sGC aus GTP den *second messenger* cGMP (Förstermann und Sessa, 2012). Die sGC kann ebenfalls durch CO aktiviert werden. Der cGMP-Spiegel kann auf einem alternativen Weg durch die Aktivierung einer Rezeptor-gekoppelten, partikulären GC durch natriuretische Peptide erfolgen. Der Anstieg der cAMP-Spiegel wird über eine G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt (vgl. Abbildung 2-11).

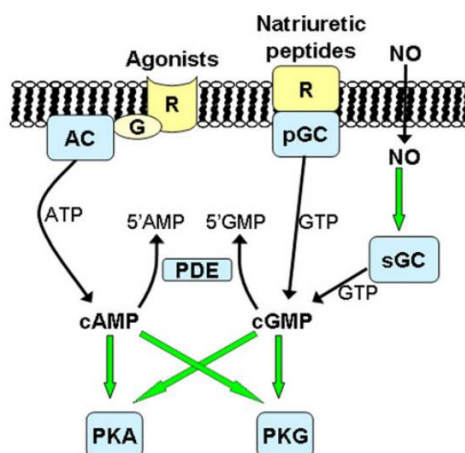


Abbildung 2-11: Wege der von zyklischen Nukleotiden abhängigen Vasodilatation aus Morgado *et al.* (2012).

Man versteht, dass die Vasodilatation auf mehreren Wegen durch die zyklischen Nukleotide vermittelt werden kann: Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, Hyperpolarisierung des Membranpotentials der glatten Gefäßmuskulatur und/oder die Reduzierung der Sensitivität des Kontraktionsapparates (Morgado *et al.*, 2012). Für die anti-hypertensiv wirkenden Substanzen Genistein oder Beraprost konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein Anstieg

der eNOS-Protein- und mRNA-Expression über das *cAMP-responsive element-binding protein* und die Bindung dessen an das *cAMP response element* in der Promoterregion vermittelt wird (Niwano *et al.*, 2003; Si *et al.*, 2012). Als Targets für die Vasodilatation und einen anti-hypertensiven Effekt kommen zum einen die NO-abhängige und NO-unabhängige Aktivierung der sGC (Bice *et al.*, 2013) und zum anderen die Hemmung der Phosphodiesterase in Frage (Polson und Strada, 1996). Vertreten sind in der glatten Gefäßmuskulatur folgende Familien: PDE1 (cGMP > cAMP), PDE2 (cAMP = cGMP), PDE3 (cAMP > cGMP), PDE4 (cAMP) und PDE5 (cGMP) (Polson und Strada, 1996; Gresele *et al.*, 2011). PDE1-, PDE3- und PDE5-Hemmstoffe besitzen vasodilatatorische Eigenschaften, während PDE4-Hemmstoffe lediglich synergistische Wirkung auf sGC-Agonisten besitzen (Polson und Strada, 1996).

2.1.6 Zyklische Nukleotide und Inflammation

Grüntee- und Ingwerextrakte sowie deren Inhaltsstoffe zeigen antiinflammatorische Wirkungen (Lin und Lin, 1997; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Grzanna *et al.*, 2005; Kürbitz *et al.*, 2011). Zwar wird diese Wirkung dem antioxidativen Effekt der Teecatechine und der Hemmung der Cyclooxygenase und Lipoxygenase durch Inhaltsstoffe des Ingwers zugeschrieben, ein Einfluss über die zyklischen Nukleotide wurde aber bisher nicht untersucht. Neben Reaktionen des Metabolismus steuern zyklische Nukleotide, insbesondere cAMP, auch Reaktionen des Immunsystems. Erhöhte Level an cAMP haben in *in vitro* Studien spezifische Reaktionen von Mastzellen, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten hemmen können (Moore und Willoughby, 1995). Tabelle 2-6 gibt einen Überblick über ausgewählte antiinflammatorische Mechanismen erhöhter cAMP-Level. In mehreren Immunzell-Typen konnte die verminderte Ausschüttung von Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Histamin, Leukotrienen, NO und lysosomaler Enzyme als antiinflammatorische Wirkmechanismen nachgewiesen werden. Aufgrund der Wirkung von cAMP auf Zellen des Immunsystems stellen Phosphodiesterasen in Leukozyten ein wertvolles Ziel für die Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems dar. PDE4 ist die am häufigsten exprimierte PDE in Leukozyten gefolgt von PDE3 und PDE7 (Gantner *et al.*, 1997; Gresele *et al.*, 2011). PDE4-Hemmstoffe sind daher im Fokus der Untersuchungen für die Entwicklung von antiinflammatorischen Arzneistoffen. Der PDE4-Hemmstoff Rolipram konnte beispielsweise in Tierstudien durch antiinflammatorische Mechanismen Kollagen-induzierte Arthritis lindern (Ross *et al.*, 1997; Francischi *et al.*, 2000). Außerdem sind die antiinflammatorischen PDE4-Hemmstoffe Roflumilast und Apremilast respektive zugelassen für die Therapie von COPD und Psoriasis (Giembycz und Field, 2010; Kavanaugh *et al.*, 2014; Felquer und Soriano, 2015).

Tabelle 2-6: Ausgewählte antiinflammatorische Mechanismen erhöhter cAMP-Level

Wirkung	Zelltyp	Studienart	Literatur
Reaktion ↓	T-Helfer Typ 1	<i>in vivo</i>	(Ross <i>et al.</i> , 1997)
TNF- α Aktivität und Ausschüttung ↓	*	<i>in vivo</i>	(Ross <i>et al.</i> , 1997; Francischi <i>et al.</i> , 2000)
LTC ₄ - und Histamin Ausschüttung ↓	Mastzellen, basophile Granulozyten, Lungengewebe	<i>in vitro</i>	(Marone <i>et al.</i> , 1987)
Ausschüttung lysosomaler Enzyme ↓	PMN-Leukozyten	<i>in vitro</i>	(Weissmann <i>et al.</i> , 1975)
LTB ₄ -Ausschüttung ↓	PMN-Leukozyten	<i>in vitro</i>	(Ham <i>et al.</i> , 1983)
LPS-induzierte NO-Ausschüttung ↓	Makrophagen	<i>in vitro</i>	(Bulut <i>et al.</i> , 1993)
LTB ₄ -, TNF- α , H ₂ O ₂ -Produktion ↓ bakterizide Wirkung ↓	Makrophagen, alveolar	<i>in vitro</i>	(Aronoff <i>et al.</i> , 2005)

*gemessen in Serum, keinem Zelltyp zugeordnet.

2.2 Kaffee – *Coffea arabica*

2.2.1 Allgemein

Nach der Kaffeeverordnung vom 15.11.2001 lautet die Definition von Kaffee: „gerösteter Rohkaffee, ungemahlen oder gemahlen, mit einem Wassergehalt von höchstens 50 Gramm in einem Kilogramm“, und die Definition von Rohkaffee: „der von der Frucht- und Samenschale befreite ungeröstete Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea*“. Wirtschaftlich relevant für die Kaffeeproduktion sind die Arten *Coffea arabica* und *Coffea canephora*, welcher auch als Robusta-Kaffee bezeichnet wird, und ihre zahlreichen Varietäten. Die Gattung *Coffea* gehört zur Familie der Rubiaceae. Deutschland liegt mit einem Import von 1.141.145 t Rohkaffee im Jahr 2013 an zweiter Stelle der Liste von Kaffee importierenden Ländern (FAOSTAT). Der Nettoimport von grünem und geröstetem Kaffee lag im Jahre 2013 bei 667.018 t (FAOSTAT). Der Deutsche trank im Jahre 2014 im Durchschnitt 162 l Kaffee (Deutscher Kaffeeverband). Die Anbauländer des Kaffees sind interkontinental und entlang des Äquators gelegen. Zu den Hauptproduktionsländern im Jahre 2013 mit einer Produktion von mehr als 550.000 t zählen Brasilien, Kolumbien, Indonesien und Vietnam (FAOSTAT).



Abbildung 2-12: *Coffea arabica*, Rubiaceae (Hamilton, 1852)

2.2.2 Gewinnung des Rohkaffees und Röstung

Nach der Ernte der reifen, tiefroten Kaffeekirschen folgt das Entpulpen. Man unterscheidet zwischen drei Verfahren. Beim „*natural*“ Verfahren werden die Kaffeekirschen von Hand sortiert und anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Kaffeebohnen mechanisch entpulpt. Beim „*washed*“ Verfahren werden die Kaffeekirschen in Wasserbecken sortiert. Die unreifen Kirschen schwimmen oben auf und können leicht entfernt werden. Anschließend wird die Hülle der Kirschen durch mechanische Verfahren entfernt, während die Pulpe auf den Bohnen verbleibt. Die restliche Pulpe wird in einem darauffolgenden

Fermentationsprozess in Wassertanks aufgelöst und ausgewaschen⁶. Die Pulpe besteht unter anderem aus Pektinen, die in einer pektinolytischen Fermentation durch Bakterien, Bacilli, Fungi oder zugesetzte Enzyme aufgelöst werden. Im Anschluss an die pektinolytische Fermentation kann eine Milchsäuregärung folgen⁷. Danach können die Bohnen getrocknet werden. Als dritte Möglichkeit steht das „*semi-washed*“ oder „*pulped natural*“ Verfahren zur Verfügung. Hierbei werden die Kaffeekirschen analog dem „*washed*“ Verfahren in Wasserbecken sortiert und anschließend größtenteils entpulpt. Statt einem Fermentationsprozess folgt nun aber die Trocknung und anschließende restliche Entfernung der Pulpe. Bei dem „*semi-washed*“ Verfahren gibt es Variationen wie z.B. das „*Honey*“ Verfahren oder das „*Wet-Hulled*“ Verfahren⁸. Beim „*Honey*“ Verfahren unterscheidet man außerdem die Endtrocknungsstufen „*yellow*“, „*red*“ und „*black*“. Je nach Verfahren werden die Zusammensetzung und die Aroma-Precursor verändert und somit bestimmte Geschmacks- und Aromenoten im Endprodukt erreicht. Die Wahl, welches Verfahren zum Einsatz kommt, hängt davon ab, ob ausreichende Mengen Wasser zur Verfügung stehen, welches Ausgangsprodukt vorliegt und welches Endprodukt erzielt werden soll⁹. Der so gewonnene Rohkaffee wird weltweit gehandelt und geröstet.

Die Röstung des Kaffees erfolgt konventionell durch Einleiten heißer Luft und kontinuierlicher Durchmischung des Rohkaffees. Dabei werden Hochtemperaturverfahren um 450°C und Niedertemperaturverfahren um 250°C unterschieden. Die Röstzeit liegt typischerweise zwischen acht und zwölf Minuten, kann in speziellen Verfahren auch zwischen ein bis vier Minuten liegen (Clarke und Vitzthum, 2008) oder aber auch bis 40 min ausgedehnt werden (Buffo und Cardelli-Freire, 2004). Betrachtet man die Bohnen makroskopisch, äußert sich die Röstung durch einen zunehmenden Bräunungsgrad, einen Gewichtsverlust durch Trocknung und Freisetzung von CO₂ sowie eine Volumenvergrößerung (Clarke und Vitzthum, 2008).



Abbildung 2-13: Arabica
Rohkaffeebohnen mit Silberhäutchen
(U.S. National Seed Herbarium)

2.2.3 Übersicht der Inhaltsstoffe von Kaffee

Durch die Röstung unterliegen einige Inhaltsstoffe des Rohkaffees Abbaureaktionen während gleichzeitig andere Inhaltsstoffe durch die Röstung erst gebildet werden. An der Maillard-Reaktion beteiligte Saccharide, Proteine und Peptide werden im Laufe der Röstung

⁶ Hoffmann, 2014, S. 33f

⁷ Sivasankar, 2002, S. 315

⁸ Hoffmann, 2014, S. 32 - 34, 37

⁹ Soares et al., 2015, S. 577

abgebaut. Aus ihnen entstehen Röstprodukte wie Melanoidine und Aromastoffe. Die hohen Gehalte an Chlorogensäuren im Rohkaffee dezimieren während der Röstung ebenfalls durch Abbaureaktionen oder die Inkorporation von Chlorogensäuren in Melanoidine. Das Alkaloid Trigonellin wird zur Nikotinsäure, einer Form des Vitamin B3. Unverändert durch die Röstung bleiben Lipide (Triglyceride, Sterole, Terpene, Tocopherole), Mineralstoffe (Kalium, Mangan, Eisen und Kupfer), Koffein, Diterpene und Carbonsäuren wie z.B. Zitronen-, Äpfel- und Essigsäure (Buffo und Cardelli-Freire, 2004). Tabelle 2-7 gibt eine Übersicht über die in Roh- und Röstkaffee enthaltenen Inhaltsstoffe. Durch einen Vergleich der Inhaltsstoffe des Roh- und Röstkaffees können Abbau- sowie Bildungsreaktionen während der Röstung aufgezeigt werden.

Tabelle 2-7: Zusammenfassende Inhaltsstofftabelle für *Coffea arabica* (Chu und Technologists, 2012 S. 28 + 38)

Inhaltsstoff	Rohkaffee (g/100 g)	Röstkaffee (g/100 g)
Saccharose	6,0 - 9,0	4,2
red. Zucker	0,1	0,3
Polysaccharide	34 - 44	31 - 33
Lignin	3,0	3,0
Pektin	2,0	2,0
Protein/Peptide	10,0 – 11,0	7,5 – 10
freie Aminosäuren	0,5	ND
Koffein	0,9 – 1,3	1,1- 1,3
Trigonellin	0,6 – 2,0	1,2 – 0,2
Nicotinsäure (Vit. B3)		0,016 – 0,026
Kaffeeöl	15 – 17,0	17,0
Diterpene	0,5 – 1,2	0,9
Mineralstoffe	3,0 – 4,2	4,5
Chlorogensäuren	4,1 – 7,9	1,9 – 2,5
Carbonsäuren	1,0	1,6
Chinasäure	0,4	0,8
Melanoidine		25

Zu den flüchtigen Verbindungen, die aufgrund ihres lipophilen Charakters mit dem Kaffeeöl extrahiert werden, zählen Schwefelverbindungen, Pyrazine insbesondere Alkylpyrazine (Kapitel 2.2.8), Pyridine, Pyrrole, Oxazole, Furane, Aldehyde, Ketone und Phenole. Sie werden im Laufe der Maillard-Reaktion, insbesondere ihrer Folgereaktionen gebildet. Auch der Abbau von Carotinoiden und Trigonellin führt zu Aromaverbindungen (Buffo und Cardelli-Freire, 2004). Das in Abbildung 2-14 dargestellte Schema zeigt die Bildung von Aromaverbindungen während der Maillard Reaktion. Einige ausgewählte Aromastoffe des Kaffees sind in Tabelle 2-11 dargestellt.

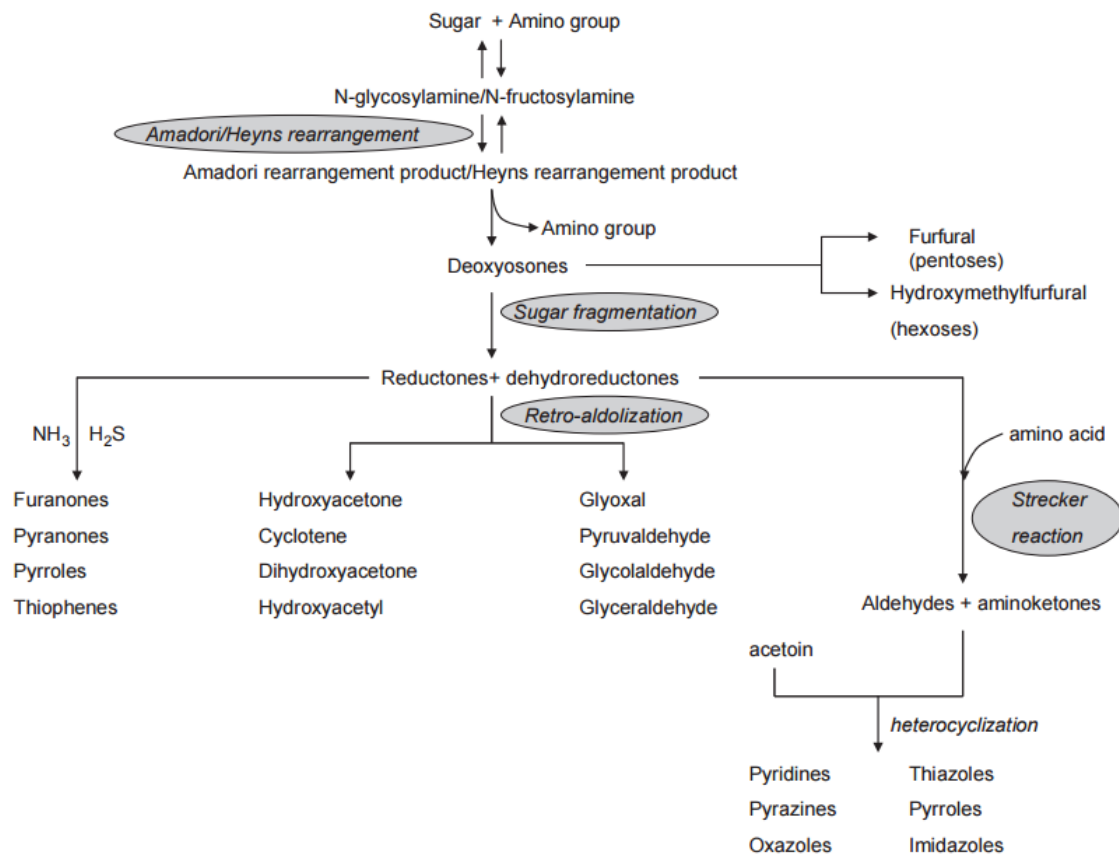


Abbildung 2-14: Bildung von Aromaverbindungen in der Maillard-Reaktion aus Van Boekel (2006).

In den folgenden Kapiteln wird auf ausgewählte Inhaltsstoffe und deren physiologische Bedeutung im Hinblick auf die Phosphodiesterase weiter eingegangen. Hierzu zählt Koffein (Kap. 2.2.6), das als PDE-Hemmstoff bekannt ist, und andere Methylxanthine; Chlorogensäuren (Kap. 2.2.7), deren nutritiver Nutzen eindeutig belegt ist, ein Zusammenhang mit der Phosphodiesterase bis dato aber nicht vollständig bestätigt werden konnte; Alkylpyrazine (Kap. 2.2.8), die in früheren *in vitro* Experimenten eine PDE-hemmende Wirkung zeigten; sowie Melanoidine (Kap. 0), die bei der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung eine besondere Rolle spielten und zu den Röstprodukten zählen, wodurch ein Zusammenhang mit der PDE-Hemmung vermutet wurde. Das Röstprodukt *N*-Methylpyridinium wurde im Rahmen der Dissertation von Frau Montoya auf die Hemmung der PDE getestet, zeigte jedoch keine hemmende Wirkung (Montoya, 2012) und wird in dieser Arbeit nicht gesondert behandelt.

2.2.4 Studien zum Kaffeekonsum und Erkrankungen

Kaffee ist reich an funktionellen Verbindungen. Der Konsum von Kaffee ist mit einem verringerten Risiko an degenerativen Krankheiten zu erkranken assoziiert. Eine epidemiologische Studie von 2002, die eine Kohorte von 17.111 holländischen Männern und

Frauen im Alter von 30 bis 60 begleitete, fand bei Konsum von sieben oder mehr Tassen Kaffee pro Tag eine höchst signifikante Verringerung des Risikos an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (Van Dam und Feskens, 2002). Generell konnte eine Verringerung des Risikos ab einer täglich konsumierten Menge von drei Tassen beobachtet werden.

Der Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und totaler Sterblichkeit wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien untersucht. Eine Metaanalyse zu diesem Sachverhalt berücksichtigte Studien aus dem Zeitraum von 1966 bis 2013 mit 21 Studien und insgesamt fast 1 Mio. Teilnehmern (Crippa *et al.*, 2014). Die gesammelten Daten zeigten eine starke umgekehrte Korrelation zwischen Kaffeekonsum und allgemeiner Sterblichkeit ab 4 Tassen/d sowie der Sterblichkeit durch kardiovaskuläre Erkrankungen ab 3 Tassen/d.

Nicht nur die Sterblichkeit durch kardiovaskuläre Erkrankungen, auch das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung zeigt einen inversen Zusammenhang mit dem Konsum von drei – fünf Tassen/d, wie in einer Metaanalyse von Daten aus 36 epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte (Ding *et al.*, 2013).

Eine Metaanalyse von vier epidemiologischen Studien, die den Zusammenhang von Kaffeekonsum und dem Risiko für Morbus Alzheimer untersuchte, fand zwar, dass die analysierten Studien zwischen 1990 und 2002 nicht direkt miteinander zu vergleichen sind, der Kaffeekonsum aber reziprok mit dem Risiko für Morbus Alzheimer korreliert (Quintana *et al.*, 2007).

Kaffeekonsum wird häufig assoziiert mit einem verminderten Risiko für bestimmte Krebsarten. Tatsächlich gibt es zahlreiche epidemiologische Studien, die sich dem Thema widmen. Es sollte jedoch nach der Art von Krebs unterschieden werden. Eine Überprüfung der epidemiologischen Datenlage erfolgte 2014 (Bøhn *et al.*, 2014). Die Daten deuten darauf hin, dass Kaffeekonsum mit dem Risiko von Prostatakrebs nicht assoziiert ist, wohl aber invers mit der Progression und der Wiederkehr des Prostatakrebses. Bei Brustkrebs konnte eine inverse Korrelation zwischen Kaffeekonsum und Risiko einer Erkrankung nur für spezielle Formen, nicht jedoch allgemein, gefunden werden. Das Risiko an kolorektalem Krebs oder Leberkrebs zu erkranken ist nach aktueller Datenlage eindeutig invers korreliert mit dem Kaffeekonsum.

2.2.5 Interventionsstudien zur PDE-Hemmung durch Kaffee

Kaffeextrakt zeigte *in vitro* stark PDE-hemmende Effekte (Montoya, 2012). In zwei unabhängigen humanen Interventionsstudien konnte ebenfalls eine Hemmung der PDE in Thrombozyten bei regelmäßigem Kaffeekonsum beobachtet werden (Montoya, 2012;

Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Beide Studien verfolgten zwei Interventionsphasen, die jeweils von einer Wash-out-Phase eingeleitet wurden. Die wichtigsten Informationen zum Studiendesign sind in Tabelle 2-8 einander gegenübergestellt.

Tabelle 2-8: Übersicht über das Studiendesign von Kurzzeit- und Langzeitstudie zur Hemmung der Thrombozyten-PDE

	Kurzzeitstudie	Langzeitstudie
Probanden	8, m/w	84, m/w
Design	sequentiell	cross-over (randomisiert)
wash-out-Phase	1 Woche	4 Wochen
Interventionsphase	2 Wochen	4 Wochen
Volumen/d	750 ml	750 ml
Koffein Kaffee 1/grau	12,3 g/kg	12,4 g/kg
Röstgrad Kaffee 1/grau	60 SKT	74 SKT
Koffein Kaffee 2/rot	2,7 g/kg	13,1 g/kg
Röstgrad Kaffee 2/rot	60 SKT	60 SKT

Kurzzeitstudie

In dieser Kurzzeitstudie mit jeweils zweiwöchigen Interventionsphasen sollte mit einem kleinen Kollektiv (n=8) die PDE-Hemmung durch Kaffee *in vivo* gezeigt werden. Da Koffein ein bekannter PDE-Inhibitor ist, wurde außerdem in einem sequentiellen Studiendesign nach einem Kaffee mit natürlichem Koffeingehalt ein Kaffee mit reduziertem Koffeingehalt verabreicht. Zu Beginn der Studie konnte beobachtet werden, dass die PDE-Aktivität in den Thrombozyten der Probanden zum Ende der einwöchigen Wash-out-Phase auf über 70 *pmol/min x mg Protein* ansteigt (siehe Abbildung 2-15), was sich auf den Verzicht von Kaffee zurückführen lässt. Bereits nach einer Woche der Intervention mit dem ersten Kaffee ließ sich eine höchst signifikante Abnahme der PDE-Aktivität (<10 *pmol/min x mg Protein*) beobachten. Die Aktivität blieb erniedrigt bis zum Ende der zweiten Wash-out-Phase und stieg während der zweiten Interventionsphase mit dem koffeinreduzierten Kaffee auf > 70 *pmol/min x mg Protein* bis zum Ende der letzten Wash-out-Phase an. Für die beobachteten Effekte wurden zwei Erklärungen diskutiert. Zum einen könnte der zweite Kaffee die PDE nur unzureichend hemmen durch den erniedrigten Koffeingehalt. Zum anderen wurde ein Adaptionsmechanismus der Thrombozyten auf erhöhte cAMP-Gehalte diskutiert.

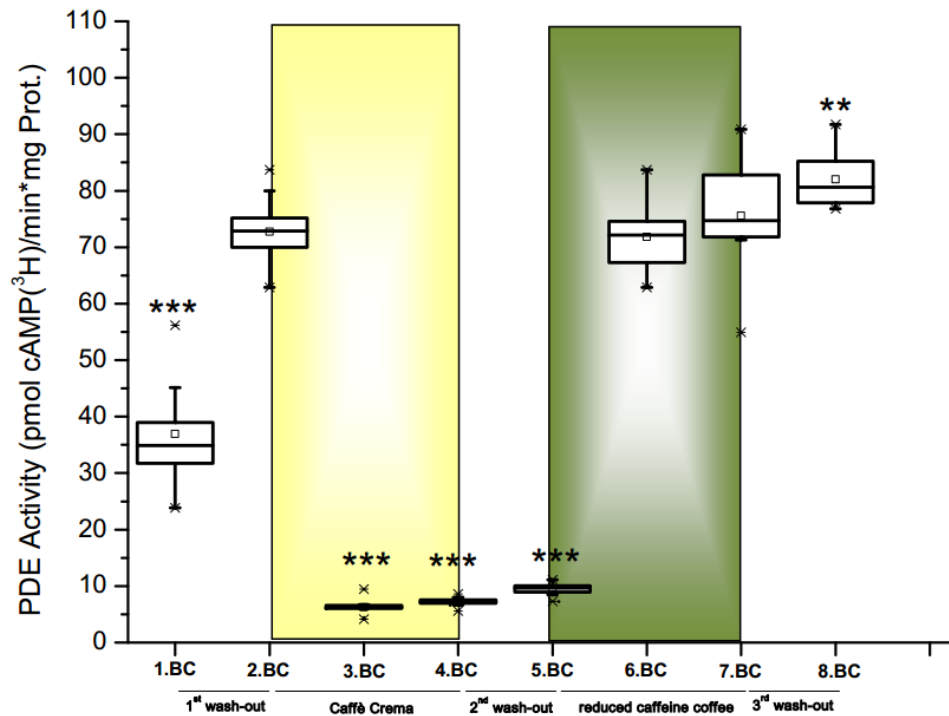


Abbildung 2-15: Ergebnisse der PDE-Aktivität in Thrombozyten nach Kaffeekonsum in einer Kurzzeitstudie (n=8) aus Montoya (2012). PDE-Aktivität normalisiert auf den Proteingehalt ist dargestellt im Box-Plot-Diagramm. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test gegen die Wash-out-Phase ermittelt (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Gelb: 2-wöchige Caffé Crema Phase; grün: 2-wöchige Phase koffeinreduziert.

Langzeitstudie

In der Langzeitstudie mit jeweils vierwöchigen Interventionsphasen mit einem größeren Kollektiv (n=84) sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse der Kurzzeitstudie auf den Koffeingehalt des Kaffees zurückzuführen sind, weshalb im Crossover-Design ein Referenzkaffee mit vergleichbarem Koffeingehalt eingesetzt wurde. Die Wash-out-Phasen wurden von einer auf vier Wochen verlängert um einen möglichen Adaptionsmechanismus der Thrombozyten auf die erhöhten cAMP-Gehalte zu unterbinden. Während der ersten Interventionsphase wurde für beide Kaffees eine höchst signifikante Abnahme der PDE-Aktivität beobachtet (siehe Abbildung 2-16). Dass die PDE-Aktivitäten zum Ende der jeweiligen Wash-out-Phasen erneut auf den Ausgangswert anstiegen, spricht dafür, dass kein Carry-Over-Effekt in die Wash-out-Phasen stattgefunden hat. Allerdings konnte wie bei der zuvor durchgeführten Kurzzeitstudie in der zweiten Interventionsphase keine bzw. nur geringe Abnahme der PDE-Aktivität festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass in beiden Studien ein Adaptionsmechanismus der Thrombozyten als Antwort auf die erhöhten cAMP-Spiegel stattgefunden hat. Mit dieser Studie konnte nicht endgültig geklärt werden, ob Koffein einen signifikanten Einfluss auf die PDE *in vivo* besitzt. Weiterhin blieb offen, ob und welche weiteren Inhaltsstoffe für die PDE-Hemmung (mit)verantwortlich sind.

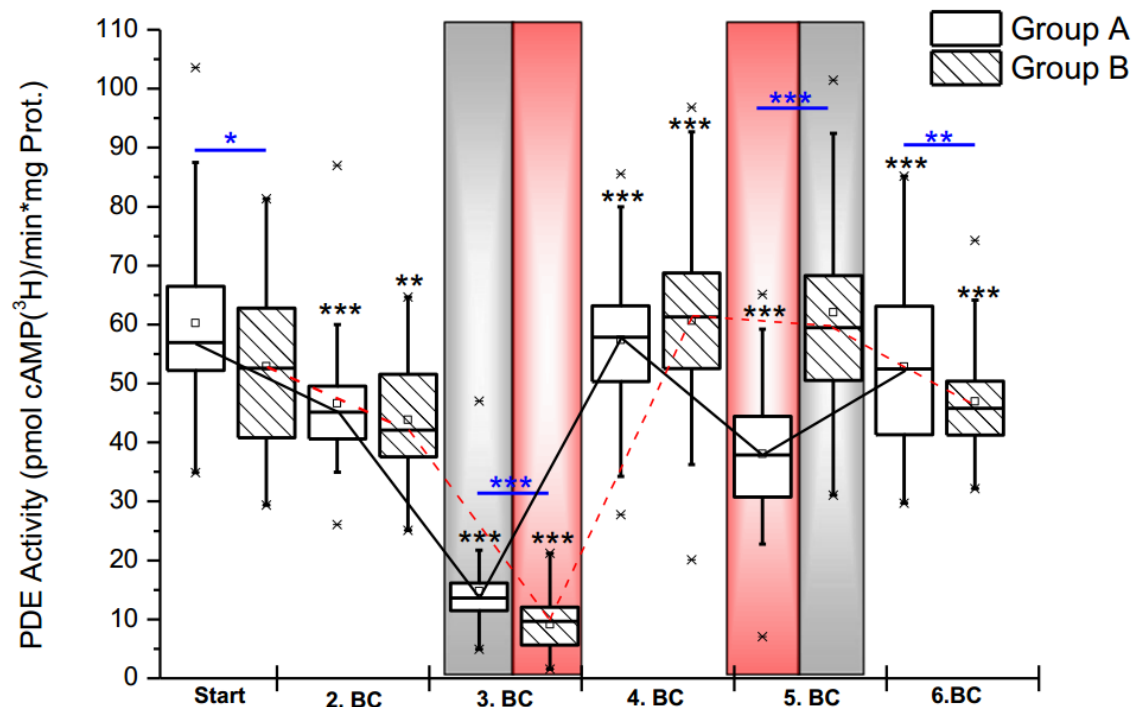


Abbildung 2-16: Ergebnisse der PDE-Aktivität in Thrombozyten nach Kaffeekonsum in einer Langzeitstudie (n=84) aus Montoya (2012). PDE-Aktivität normalisiert auf den Proteingehalt ist dargestellt im Box-Plot-Diagramm. Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon Test ermittelt (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). grau: 4-wöchige Phase Referenzkaffee; rot: 4-wöchige Phase Studienkaffee.

2.2.6 Koffein

Der wohl bekannteste Inhaltsstoff des Kaffees ist Koffein. Das zu den Methylxanthinen zählende Koffein, 1,3,7-Trimethylxanthin (s. Abbildung 2-17), ist ein Alkaloid, dessen physiologische Wirkung allgemein als anregend auf das Zentralnervensystem beschrieben wird. Durch den Verzehr über Lebensmittel und die pharmakologische Anwendung ist Koffein die meistgebrauchte pharmakologisch wirksame Substanz weltweit¹⁰. Der mittlere Gehalt an Koffein wird mit 85 mg/150 ml Kaffeegetränk angenommen (Barone und Roberts, 1996). Bei der Annahme, dass pro Liter ca. 50 – 60 g Kaffeepulver für das Aufbrühen verwendet werden, ergibt sich ein Gehalt von ca. 1% Koffein im Kaffeepulver. Entkoffeinierter Kaffee enthält weniger als 0,5 µg/g Kaffeepulver (Fujioka und Shibamoto, 2008). Die tägliche Aufnahme über Lebensmittel von Koffein bei Erwachsenen älter als 18 Jahre wurde in den USA im Rahmen einer NHANE-Studie („National Health and Nutrition Examination Survey“) ermittelt. Bei einer Kohortengröße von N = 24.808 lag in den Jahren 2001 – 2010 die täglich aufgenommene Menge an Koffein bei

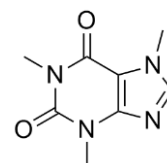


Abbildung 2-17: Koffein

¹⁰ Aktories et al., 2005, S. 189

186 mg/d. Der Median bei Koffein konsumierenden Individuen (N = 21.427) lag bei 165 mg/d, das 10. Perzentil bei 40 mg/d und das 90. Perzentil bei 439 mg/d (Fulgoni *et al.*, 2015).

Biosynthese

Die Biosynthese des Koffeins in *Coffea arabica* oder *Camellia sinensis*, dargestellt in Abbildung 2-18, ist ein vierstufiger Prozess ausgehend von Xanthosin, einem Xanthin-Ribosyl-Nukleosid aus dem Nucleosid-Stoffwechsel (Mizuno *et al.*, 2003; Ashihara *et al.*, 2008). Im ersten Schritt der Biosynthese wird die Methylgruppe des S-Adenosyl-L-methionins auf N7 durch die 7-Methylxanthosinsynthase (EC 2.1.1.158, Xanthosin-*N*-Methyltransferase) übertragen. Durch die *N*-Methylnucleosidase (EC 3.2.2.25) wird unter Abspaltung der Ribose 7-Methylxanthin erhalten. Danach erfolgen weitere *N*-Methylierungsreaktionen an N3 und anschließend N1 durch Monomethylxanthin-*N*-Methyltransferase („Theobrominsynthase“, nur N3, EC 2.1.1.159) und Dimethylxanthin-*N*-Methyltransferase („Koffeinsynthase“, N1 und N3, EC 2.1.1.160). Man geht heute davon aus, dass die Biosynthese der Methylxanthine in allen Methylxanthin-produzierenden Pflanzen wie Kaffee, Maté und Tee ähnlich abläuft. Weiterhin besitzen Pflanzen wie Kakao (*Theobroma cacao*), die reich an Theobromin sind, kaum oder keine 1-*N*-Methyltransferase-Aktivität, sodass Koffein im letzten Schritt der Biosynthese nicht gebildet wird (Ashihara *et al.*, 2008).

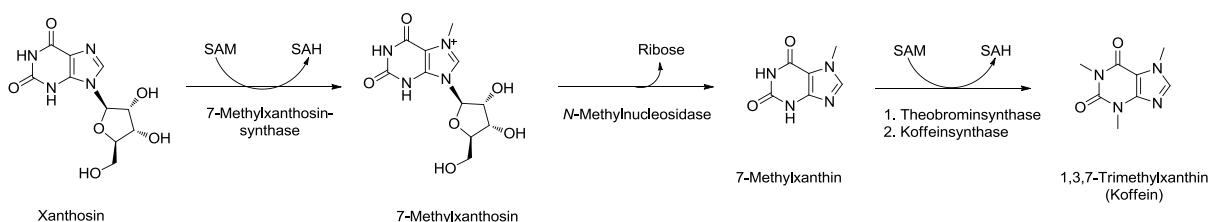


Abbildung 2-18: Vierstufige Biosynthese des Koffeins ausgehend von Xanthosin adaptiert nach (Mizuno *et al.*, 2003; Ashihara *et al.*, 2008). SAM, S-Adenosyl-L-methionin; SAH - S-Adenosyl-L-homocystein.

Aufnahme und Metabolismus

Nach dem Verzehr von Koffein erfolgt fast vollständige Aufnahme in den Organismus und die Ausscheidung mit einer Eliminationshalbwertszeit von 5 h¹¹. Der Metabolismus des Koffeins wird größtenteils von CYP1A2 katalysiert (Thorn *et al.*, 2012). Wie in Abbildung 2-19 dargestellt, besteht die erste Stufe des Abbaus aus Demethylierungsreaktionen an N1 zu Theobromin, N3 zu Paraxanthin und N7 zu Theophyllin sowie eine Oxidation an C8 zu 1,3,7-Trimethylharnsäure. Dabei hat die N3-Demethylierung zum Paraxanthin mit 70 – 80% den größten Anteil. Dementsprechend sind Paraxanthin und seine Folgemetabolite 1,7-Dimethylharnsäure, 1-Methylharnsäure, 5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU)

¹¹ Aktories *et al.*, 2005, S. 189

und 1-Methylxanthin in den größten Anteilen als Ausscheidungsprodukte im Urin zu finden (Begas *et al.*, 2007; Thorn *et al.*, 2012). Der zweite Schritt des Metabolismus von Koffein wird ebenfalls vorwiegend von CYP1A2 katalysiert, wobei die Bildung des AFMU durch die polymorphistische *N*-Acetyltransferase 2 katalysiert wird. CYP1A2 unterliegt ebenfalls einem Polymorphismus, der mit kolorektalen Adenomen in direkter Verbindung steht (Moonen *et al.*, 2005). Zur Phänotypisierung des CYP1A2 Polymorphismus' wird daher nach einer Gabe von Koffein das Verhältnis von Paraxanthin zu Koffein in Plasma und Urin bestimmt und die Phänotypen in schnell, intermediat und langsam oxidierende Klassen eingeteilt (Moonen *et al.*, 2005). Je größer das Verhältnis von Paraxanthin/Koffein, desto geringer die Aktivität an CYP1A2. Dieser Polymorphismus scheint ebenfalls für die unterschiedlich anhaltenden und empfundenen physiologischen Wirkungen des Koffeins verantwortlich zu sein (Carillo und Benitez, 1996). Im Tierexperiment konnte in CYP1A2-defizienten Mäusen eine Verlängerung der Clearance um das Achtfache beobachtet werden (Buters *et al.*, 1996).

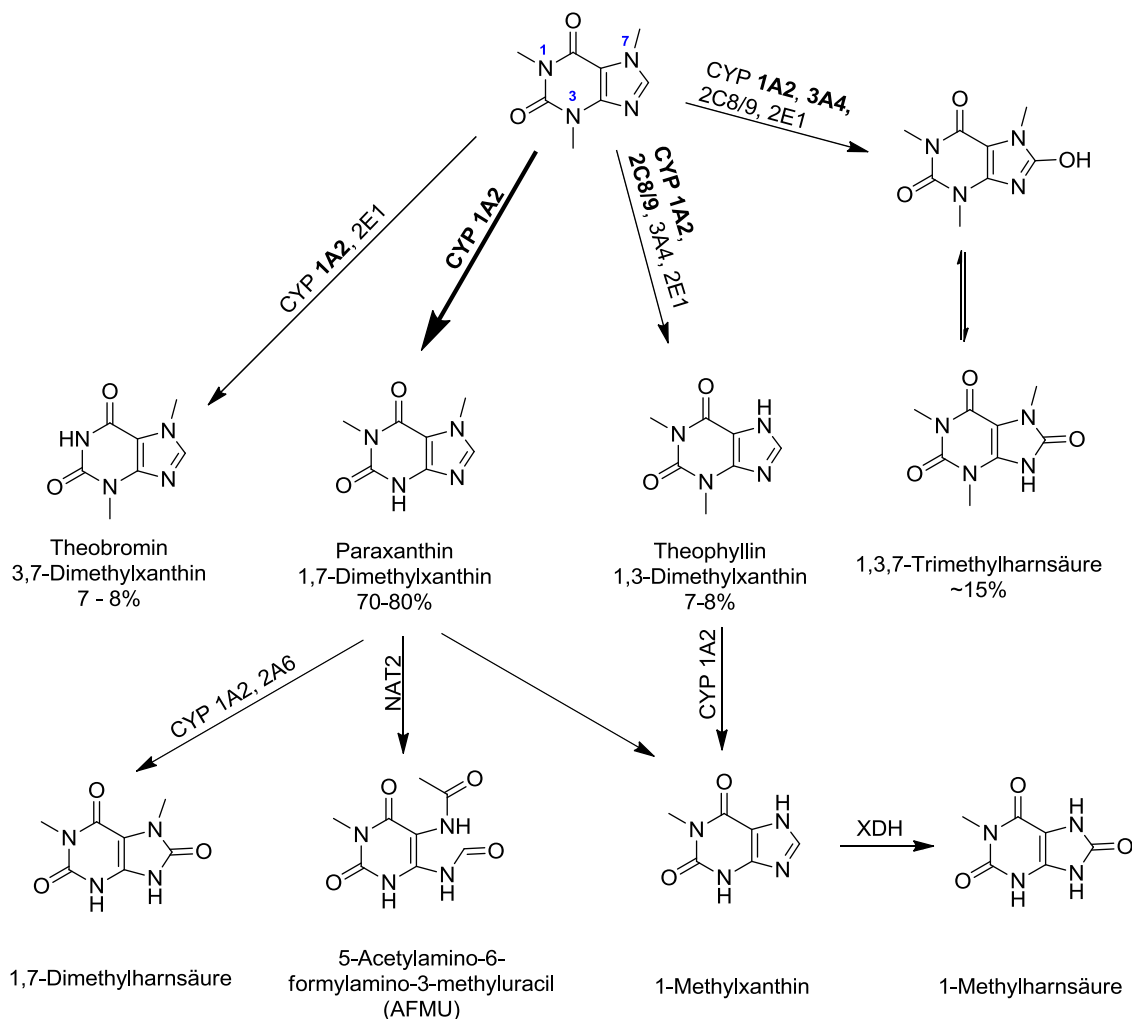


Abbildung 2-19: Metabolismus des Koffeins modifiziert nach Tassaneeyakol *et al.* (1994), Kot und Daniel (2008) und Thorn *et al.* (2012). CYP – Cytochrom P450 Isozym; NAT2 – *N*-Acetyltransferase Typ 2; XDH – Xanthindehydrogenase.

Physiologische Wirkungen

Für die physiologischen Wirkungen des Koffeins relevant sind drei verschiedene Mechanismen: (a) Adenosin-Rezeptor-Antagonismus, (b) Phosphodiesterase-Hemmung und (c) die direkte Beeinflussung von Ionenkanälen (Nehlig, 2004). Neben diesen drei Hauptwirkmechanismen gibt es zahlreiche Berichte über die direkte Beeinflussung von Enzymaktivitäten und weiteren Ionenkanälen sowie Rezeptoren. Diese werden jedoch aus verschiedenen Gründen vernachlässigt (Daly, 2000).

(a) Bis heute sind vier Isoformen der Adenosin-Rezeptoren bekannt: A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 . Die für den Antagonismus des Koffeins relevanten Isoformen sind A_1 und A_{2A} . Die Rezeptoren A_{2B} und A_3 sind aufgrund ihrer niedrigen Affinität bzw. ihrem Vorkommen weniger relevant (Nehlig, 2004). Der A_1 -Rezeptor ist ein G_i -Protein-gekoppelter Rezeptor, der bei Aktivierung zur Hemmung der Adenylatzyklase führt. Die nachstehende Öffnung von K^+ -Kanälen führt zur Funktionshemmung einiger zerebraler Neurone (Sympathikustonus \downarrow), zur Abnahme der Herzfrequenz und -kontraktilität¹². Der A_{2A} -Rezeptor ist im Gegensatz zum A_1 -Rezeptor ein G_s -Protein-gekoppelter Rezeptor. Bei Aktivierung kommt es über einen cAMP-abhängigen Mechanismus zur

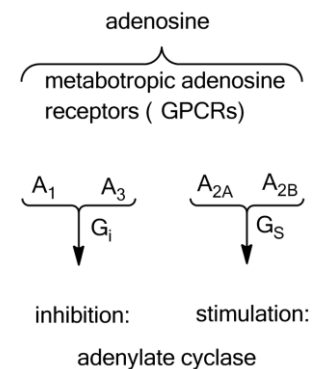


Abbildung 2-20:
Adenosinrezeptoren und
ihre G-Protein-vermittelten
Signalkaskaden modifiziert
nach Jacobsen (Jacobson,
2009)

Vasodilatation zerebraler Blutgefäße. Allgemein kann man die Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren als sedierend auf das Zentralnervensystem beschreiben. Ein Antagonismus der Adenosin-Rezeptoren, wie er durch die Methylxanthine auftritt, führt zur Umkehrung der sedierenden Effekte und zu einer anregenden Wirkung auf das Zentralnervensystem. Die Bindungsaffinitäten des Koffeins und seiner primären Metabolite für die beiden relevanten Adenosin-Rezeptoren sind für Theophyllin am größten, gefolgt von Paraxanthin, Koffein und Theobromin (Daly *et al.*, 1983). Ausgedrückt wird die Bindungsaffinität durch die Dissoziationskonstante K_i in $\mu\text{mol/l}$, bei der ein Gleichgewicht zwischen Target und gebundenem bzw. ungebundenem Effektor herrscht, s. Tabelle 2-9. Beachtet werden müssen dabei die physiologisch relevanten Plasmakonzentrationen. Ein Modell hierzu besagt, dass bei Aufnahme von 100 mg Koffein (ca. 175 ml Kaffee (Barone und Roberts, 1996)) eine Plasmakonzentration von 10 μM erreicht wird¹². Berücksichtigt man das 10. Perzentil der täglichen Koffeinaufnahme bei 40 mg/d sowie das 90. Perzentil bei 439 mg/d (Fulgoni *et al.*, 2015), so erscheinen Koffein-Plasmakonzentrationen von 4 bis 44 μM realistisch. Die Konzentrationen der Dissoziationskonstanten (s. Tabelle 2-9) von 27 bis 50 μM werden bei Koffein durch die Plasmakonzentrationen erreicht. Berücksichtigt man die

¹² Aktories *et al.*, 2005, S. 189

Verhältnisse der in Abbildung 2-19 dargestellten primären Metabolite Paraxanthin (70 - 80%), Theophyllin (7-8%) und Theobromin (7-8%) und deren Dissoziationskonstanten so wird klar, dass Paraxanthin und Theophyllin im Gegensatz zu Theobromin zum Adenosin-Antagonismus des Koffeins beitragen können.

Tabelle 2-9: Dissoziationskonstanten (K_i -Werte) in μM der Methylxanthine für die Bindung der Adenosin-Rezeptoren (Daly *et al.*, 1983).

Substanz	A ₁	A _{2A}
Koffein	50	27 - 30
Paraxanthin	30	16 - 22
Theophyllin	12	7 - 15
Theobromin	120	> 250

(b) Koffein, Theophyllin und Theobromin sind als unspezifischer Hemmer der Phosphodiesterasen seit deren Identifizierung bekannt (Rall und Sutherland, 1958; Butcher und Sutherland, 1962). Ihre Dissoziationskonstanten und IC_{50} -Werte liegen im einstelligen millimolaren Bereich, wie in Tabelle 2-10 zu erkennen. Es sei darauf hingewiesen, dass die Daten der Tabelle in unterschiedlichen Geweben und Isolaten ermittelt wurden und eine entsprechende Variation der PDE-Isoformen vorliegt. Vergleicht man die IC_{50} -Werte der Methylxanthine, zeigt sich, dass das Potential der verschiedenen Verbindungen in vergleichbarer Größe zwischen 0,48 und 8,5 μM liegt. Da die Adenosin-Rezeptoren ebenfalls mit der Aktivität von Phosphodiesterasen verbunden sind bzw. mit den intrazellulären Level an cAMP, ist es in *in vivo* Experimenten nicht ohne weiteres möglich, zwischen Adenosin-Antagonismus und PDE-Hemmung zu unterscheiden. Man geht allerdings davon aus, dass bei physiologischen Koffein-Konzentrationen von 4 - 44 μM im Anbetracht der um den Faktor 10 bis 100 niedrigeren K_i -Werte, der Adenosin-Antagonismus der überwiegende Wirkmechanismus des Koffeins ist.

Tabelle 2-10: K_i -Werte und IC_{50} -Werte der Methylxanthine für die PDE-Hemmung und -Bindung in mM mit PDE-Ursprungsgewebe.

Substanz	K_i	IC_{50}
Koffein	2,8 ^c - 7,1 ^b	0,525 ^d , 4,8 ^e , 0,7 ^f
Paraxanthin	-	1,9 ^e , 8,5 ^f
Theophyllin	0,1 ^a , 0,5 - 1,9 ^c , 8,0 ^b	0,48 ^d , 0,5 ^e , 0,9 ^f
Theobromin	-	0,690 ^d ,

^a - unspezifiziert (Butcher und Sutherland, 1962); ^b - Thrombozyten-PDE (Vigdahl *et al.*, 1971); ^c - Cerebrum Ratte (Murakami *et al.*, 1983); ^d - Cortex Rind (Stefanovich, 1979); ^e - PDE4 aus LXFL529L-Zellysat (Montoya, 2012); ^f - Thrombozyten-PDE (Montoya, 2012);

(c) Koffein und z.T. andere Methylxanthine sind in der Lage, bestimmte Ionenkanäle zu beeinflussen. Hierzu zählen die Ryanodin-sensitiven, Natrium-abhängigen und Inositoltriphosphat-abhängigen Calciumkanäle. Im millimolaren Bereich wird die Öffnung der Kanäle sowohl aktiviert als auch gehemmt mit dem Effekt des Anstiegs an intrazellulärem Calcium (Daly, 2000). Die dadurch vermutlich verursachte allosterische Beeinflussung der GABA- und Glycin-Rezeptoren resultiert in einem gesteigerten Chlorid-Flux (Nehlig, 2004). Da für die Interaktionen mit den Ionenkanälen jedoch millimolare Konzentrationen an Koffein benötigt werden, wird wie bei der PDE-Hemmung ausgeführt, davon ausgegangen, dass der Adenosin-Antagonismus der Hauptwirkmechanismus des Koffeins und seiner Metabolite ist. Es wird lediglich ein geringer Einfluss der Ionenkanäle auf die physiologische Wirkung des Koffeins angenommen.

2.2.7 Chlorogensäuren

Kaffee ist reich an einer Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, den Chlorogensäuren (CGA). CGAs sind eine Gruppe von phenolischen Verbindungen, die mit D-(-)-Chinasäure veresterte Hydroxyzimtsäuren umfasst. Die Veresterung ist dabei zwischen der Carboxylfunktion der Hydroxyzimtsäure und der Hydroxylfunktion der Chinasäure an Position 1, 3, 4 oder 5 lokalisiert (s. Abbildung 2-21). Die Chlorogensäuren

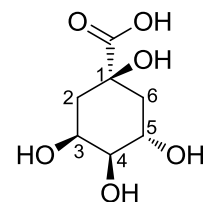


Abbildung 2-21:
D-(-)-Chinasäure

unterscheiden sich anhand ihrer Hydroxyzimtsäure, der Position des Esters und des Veresterungsgrades sowie der Heterogenität der Hydroxyzimtsäuren bei höherem Veresterungsgrad. Die Chlorogensäuren des Kaffees sind mit abnehmender Häufigkeit mit folgenden Hydroxyzimtsäuren verestert: Kaffeesäure, Ferulasäure oder *p*-Cumarsäure (s. Abbildung 2-22a-d). Die häufigste CGA in Kaffee ist 5-Caffeoylchinasäure (5-CQA). Der Gehalt an Chlorogensäuren liegt in der Summe zwischen 20 und 675 mg/200 ml in Kaffeegetränk (Clifford, 1999) und zwischen 5 und 17 mg/g in Kaffeepulver (Fujioka und Shibamoto, 2008). Die Gehalte der Einzelverbindungen liegen bei wenigen mg/g Kaffeepulver in der Reihenfolge: 5-CQA > 3-CQA ≈ 4-CQA > FQAs ≈ DiCQAs ≈ CQLs > FQLs ≈ DiCQLs (Farah *et al.*, 2006; Fujioka und Shibamoto, 2008). CGAs unterliegen einem thermischen Abbau während der Röstung. So entstehen Chlorogensäurelactone während der Röstung durch die intramolekulare Veresterung der β -ständigen 5-OH-Gruppe und 1-Carboxylfunktion. Die geschätzte Aufnahme von CGAs aus allen Lebensmittelquellen liegt bei normalem Kaffeeconsum zwischen 500 und 800 mg pro Tag (Clifford, 1999).

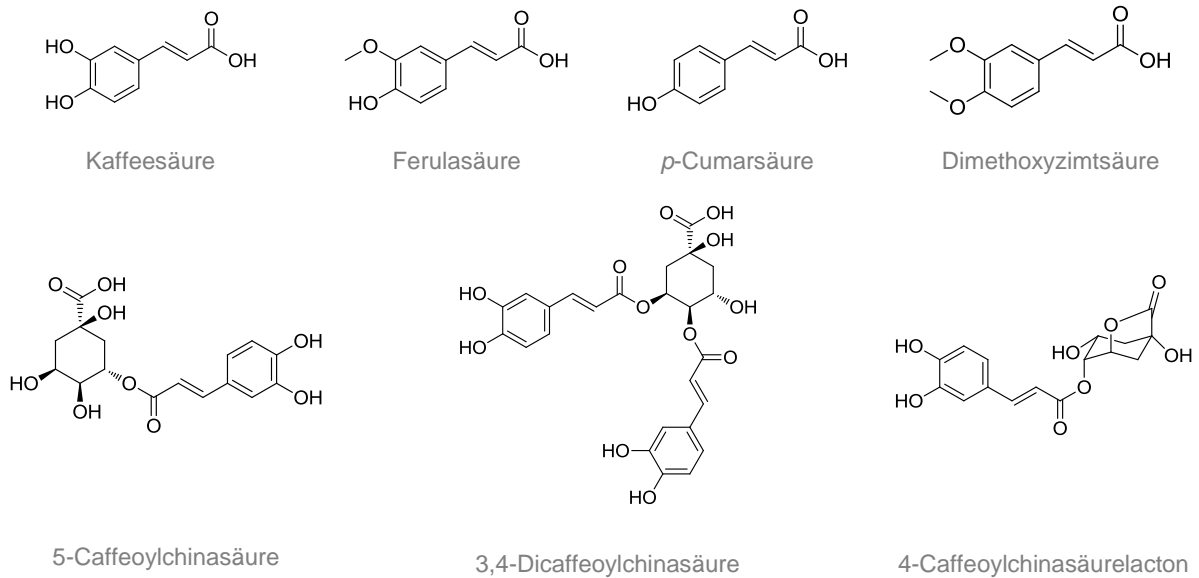


Abbildung 2-22: Relevante Hydroxyzimtsäuren (oben) und Chlorogensäuren (unten) in Kaffee.

Biosynthese

Die Biosynthese der Chlorogensäuren ist in zwei Stufen gegliedert. Die erste Stufe besteht aus der Phenylpropanoid-Biosynthese zu *p*-Cumaroyl-CoA ausgehend von Phenylalanin. Sie ist allen Polyphenolen gemeinsam und *p*-Cumaroyl-CoA ist Substrat für zahlreiche Biosynthesen, z.B. die der Flavonoide, aber auch der Lignane und Lignine (Ferrer *et al.*, 2008). Die zweite Stufe ist die Bildung des Chinasäure-Hydroxyzimtsäure-Esters, für die in der Literatur vier Wege beschrieben sind (Mahesh *et al.*, 2007). Dabei finden nicht alle vier Wege parallel in den Pflanzen statt. Die genetische Ausstattung an Enzymen entscheidet, welcher der vier Wege bevorzugt stattfindet. Eine schematische Darstellung der Chlorogensäure-Biosynthese ist in Abbildung 2-23 dargestellt. Der erste Weg führt über die direkte Modifikation von *p*-Cumaroyl-CoA zur gewünschten Hydroxyzimtsäure-CoA und die direkte Veresterung mit Chinasäure zu der gewünschten Chlorogensäure (Weg 1a). Der nächste Weg führt über eine Shikimisäure-abhängige Modifikation der Hydroxyzimtsäure-CoA und anschließender direkter Veresterung (Weg 1b). Der folgende Weg führt zuerst zur Veresterung von *p*-Cumaroyl-CoA mit Chinasäure und anschließender Modifikation der Hydroxyzimtsäure (Weg 2). Der letzte Weg zweigt ausgehend von Zimtsäure in der Phenylpropanoid-Biosynthese ab und führt über glykosidisch gebundene, modifizierte Hydroxyzimtsäuren unter Hydrolyse der glykosidischen Bindung zur Veresterung mit Chinasäure (Weg 3).

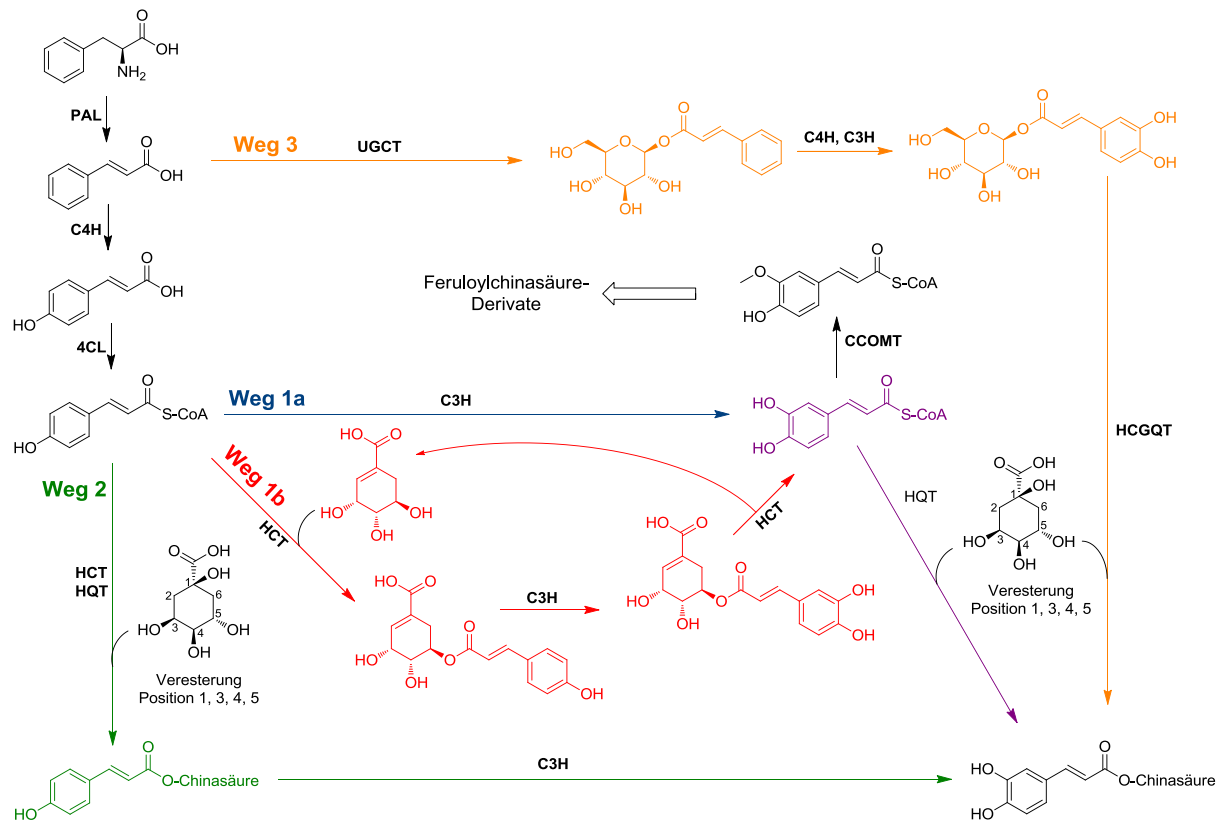


Abbildung 2-23: Biosynthese der Chlorogensäuren modifiziert nach Mahesh *et al.* (2007) und Ferrer *et al.* (2008). PAL - Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H - Zimtsäure-4-Hydroxylase; 4CL - *p*-Cumaroyl:CoA-Ligase; C3H - *p*-Cumaroyl-3-Hydroxylase; HCT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Shikimisäure/Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; HQT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; UGCT - UDP-Glucose:Zimtsäure-Glucosyltransferase; HCGQT - Hydroxyzimtsäure-D-glucosid:Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; CCOMT - Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase.

Aufnahme und Metabolismus

Die tägliche Aufnahmemenge an Chlorogensäuren liegt für den normalen Kaffeetrinker bei circa 500 - 800 mg, für Vielverzehrer sogar bei 1 g (Clifford, 1999). Die Bioverfügbarkeit der Chlorogensäuren wurde bereits in mehreren Studien untersucht. In einem Studienmodell von Olthof *et al.* (2001) wurde Ileostoma-Probanden eine Menge von 2,8 mmol 5-CQA verabreicht. In der Ileostomaflüssigkeit konnten etwa zwei Drittel der verabreichten Menge 5-CQA wiedergefunden werden, sodass man davon ausging, dass ein Drittel der Menge im Dünndarm resorbiert wurde. Über eine Zeitspanne von 24 Stunden konnten im Urin nur Spuren der Ausgangsverbindung nachgewiesen werden, was für eine starke Metabolisierung spricht. Ein ähnliches Ergebnis konnte in einer Studie mit Ileostoma-Probanden von Stalmach *et al.* (2010) nach dem Konsum von 200 ml eines Studienkaffees für alle Chlorogensäuren des Kaffees gefunden werden. In derselben Studie konzentrierte man sich außerdem auf die CQA-Metabolite im Urin über einen Zeitraum von 24 h. Hierbei konnten ca. 8% der ursprünglich verabreichten Menge an Chlorogensäuren in Form von Metaboliten im Urin der Probanden wiedergefunden werden. Als Metabolite traten vorwiegend konjugierte

Phase 2 Metabolite, aber auch hydrolysierte, hydroxylierte und dehydroxylierte Metabolite. In einem analogen Studienmodell konnten bei gesunden Probanden allerdings 29% der verabreichten Menge im Urin als Metaboliten wiedergefunden werden (Stalmach *et al.*, 2009), was die Theorie untermauert, dass die Chlorogensäuren zum größten Teil im Kolon resorbiert werden. Ferner werden die Chlorogensäuren durch mikrobielle Esterasen gespalten und weiteren Reaktionen unterzogen. Ein Hauptmetabolit dieser Reaktionen ist die aus der Chinasäure hervorgehende Hippursäure, die zu 50% in Urin wiedergefunden werden kann (Olthof *et al.*, 2003). Weitere Metabolite sind Dehydrokaffeesäure, Dehydroferulasäure oder Dehydroisoferulasäure¹³.

Physiologische Wirkungen

Chlorogensäuren besitzen zahlreiche physiologische Wirkungen. Sie können direkt und indirekt antioxidativ wirken. Neben der strukturellen Voraussetzung Radikale zu stabilisieren, induzieren Chlorogensäuren auch „*antioxidative response element*“-abhängige Enzyme, die gegen oxidative Zellschäden operieren (Bakuradze *et al.*, 2010). Weiterhin ist 5-CQA in der Lage Eisen-Kationen zu chelatisieren und somit Lipidperoxidation zu vermindern (Kono *et al.*, 1998). Als Wirkmechanismen einer antiinflammatorischen Wirkung konnten *in vitro* die Abschwächung von Cytokinen und Interleukinen sowie eine Verminderung der NO-Konzentration und COX-2-Expression identifiziert werden (Hwang *et al.*, 2014). Die antidiabetische Wirkung von Kaffee wird zurückgeführt auf die Chlorogensäuren und ist bis dato nicht vollständig verstanden. Ein Wirkmechanismus, der die Plasmaglukosewerte beeinflussen kann, ist die Hemmung der Glucose-6-Phosphatase, dem Schlüsselenzym der Gluconeogenese, das *in vitro* durch 5-CQA im millimolaren Bereich gehemmt werden konnte (Hemmerle *et al.*, 1997). Die Wirkung von Chlorogensäuren auf die Phosphodiesterase-Aktivität in isolierten Thrombozyten wurde *in vitro* untersucht. Hierbei konnte sowohl mit 5-CQA als auch mit Kaffeesäure eine Hemmung der PDE mit IC₅₀-Werten von ca. 500 µM beobachtet werden. Allerdings wird hier diskutiert, dass der pH-Wert möglicherweise zu einer ungewollten Inaktivierung des Enzyms geführt haben könnte (Montoya *et al.*, 2014).

2.2.8 Alkylpyrazine

Die Aromastoffe des Kaffees werden im Zuge der Maillard-Reaktion aus Aromastoff-Precursoren gebildet. Das Aroma setzt sich aus unterschiedlichen Aromastoffklassen zusammen: Pyrazine, insb. Alkylpyrazine Schwefelverbindungen, Pyridine, Pyrrole,

¹³ Scherbl *et al.*, submitted 2016, Eur. Food Res. Technol.

Oxazole, Furane, Aldehyde, Ketone und Phenole¹⁴. Tabelle 2-11 gibt einen Einblick in die Komplexität des Kaffeearomas.

Tabelle 2-11: Ausgewählte Kaffeearomastoffe mit Geruchseindruck (Deibler *et al.*, 1998), Geruchsschwellenwert in Wasser sowie Geruchsaktivität (Semmelroch *et al.*, 1995) und Mechanismus der Entstehung während der Röstung (Buffo und Cardelli-Freire, 2004).

Aroma- verbindung	Geruchs- eindruck	Geruchs- schwelle (µg/kg Wasser)	Geruchs- aktivität (Arabica, n=1)	Entstehungs- prozess
4-Vinylguajacol	Nelken	20	3200	Degradation phenol. Verbindungen
4-Ethylguajacol	Gewürz	50	32	Degradation phenol. Verbindungen
Vanillin	Vanille	25	192	Degradation phenol. Verbindungen
Furaneol	Karamell	10	11000	Maillard Reaktion
2-Ethyl-3,5- dimethylpyrazin	Verbrannt	2	165	Maillard Reaktion
2-Furfurylthiol	Toast	0,1	110000	Maillard Reaktion
β-Damascenon	fruchtig	0,00075	260000	Carotinoid-Abbau

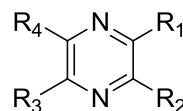


Abbildung 2-24: Grundstruktur der Alkylpyrazine

Die Pyrazine unterscheiden sich aufgrund ihrer Substitutionsmuster mit Alkyl-, Alkenyl-, und Alkoxy-Gruppen an den Resten R1, R2, R3 und R4 (siehe Abbildung 2-24). Der Gehalt der Alkylpyrazine liegt zwischen 80 und 200 mg/kg Kaffeepulver. 2-Methylpyrazin liegt dabei in den höchsten Konzentrationen im Kaffee vor gefolgt von 2,6-Dimethylpyrazin und 2,5-Dimethylpyrazin. Weitere Alkylpyrazine liegen in um den Faktor 10 geringeren Konzentrationen vor: 2-Ethylpyrazin, 2-Ethyl-6-methylpyrazin, 2-Ethyl-5-methylpyrazin, 2,3,5-Trimethylpyrazin, 2,3-Dimethylpyrazin, 2-Ethyl-3-methylpyrazin, 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (Pickard *et al.*, 2013). Unter den in Kaffee identifizierten Pyrazinen sind vier Einzelverbindungen ausschlaggebend für das Kaffeearoma: 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2-Ethenyl-3,5-dimethylpyrazin, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und 2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazin. Die Geruchsschwellen in Luft für diese vier Substanzen liegen mit

¹⁴ Grosch *et al.*, 1996, S. 201

0,01 ng/l um Faktor 100 geringer als bei anderen Pyrazinen¹⁵. Ihre Konzentration liegt ca. um den Faktor 100 unter der Hauptverbindung 2-Methylpyrazin (Czerny *et al.*, 1999). Die Bildung der Alkylpyrazine während der Röstung kann über zwei verschiedene Mechanismen ablaufen: Im Strecker Abbau oder durch die Pyrolyse der α -Hydroxylaminosäuren Serin und Threonin (Baltes und Bochmann, 1987).

Bildung

Abbildung 2-25 zeigt die Bildung der Alkylpyrazine ausgehend von α -Dicarbonylverbindungen über α -Aminoketone unter Generierung von sog. Strecker-Aldehyden (blau) und von α -Hydroxylaminosäuren über α -Hydroxylamine (grün).

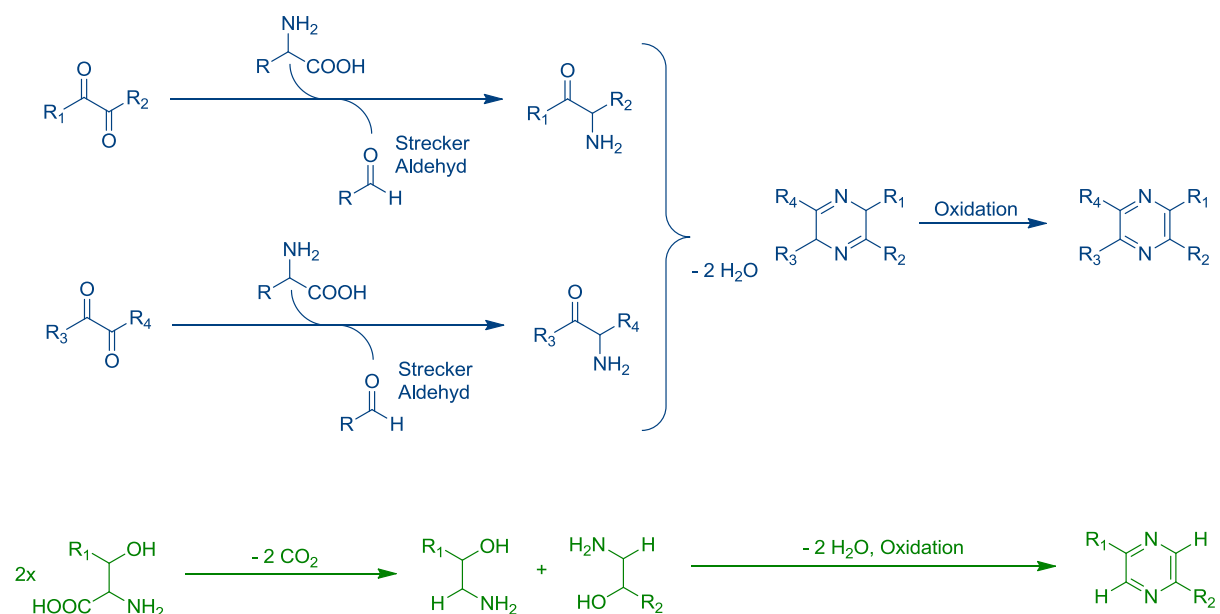


Abbildung 2-25: Bildung der Alkylpyrazine bei der Röstung modifiziert nach Baltes und Bochmann (1987) und Adams und De Kimpe (2009). Blau - ausgehend von α -Dicarbonylverbindungen über α -Aminoketone unter Generierung von Strecker Aldehyden. Grün - ausgehend von α -Hydroxylaminosäuren (Serin R=H, Threonin R=CH₃) über α -Hydroxylamine.

Aufnahme und Metabolismus

Die tägliche Aufnahmemenge für individuelle Alkylpyrazine liegt in den USA bei wenigen μ g/Tag (Adams *et al.*, 2002). Zur Bioverfügbarkeit im Menschen der Alkylpyrazine gibt es in der Literatur keine genauen Daten. In einer Rattenstudie konnten je nach verabreichtem Alkylpyrazin bis zu 90% der verabreichten Dosis im Urin als Metabolit innerhalb von 24 h wiedergefunden werden, was für eine fast vollständige Bioverfügbarkeit spricht (Hawksworth und Scheline, 1975). Die Metabolisierung der Alkylpyrazine umfasst die oxidative Modifikation der Seitenreste sowie eine Konjugation mit UDP-Glucuronsäure oder

¹⁵ Grosch *et al.*, 1996, S. 203

Glutathion. Eine Aufspaltung des Pyrazinringes gehört nicht zu den metabolischen Modifikationen (Müller und Rappert, 2010). Die Metabolisierung ist in Abbildung 2-26 schematisch dargestellt. In einer nicht publizierten Humanstudie mit 5 Probanden wurde die Ausscheidung der Alkylpyrazinsäuren nach dem Verzehr von 500 ml Kaffee untersucht. Die höchste Ausscheidung wurde mit 66,9% für 2-Pyrazinsäure, dem Metaboliten von 2-Methylpyrazin, gefunden. Für 5-Methyl-2-Pyrazinsäure bzw. 6-Methyl-2-Pyrazinsäure, den Metaboliten von 2,5-Dimethylpyrazin und 2,6-Dimethylpyrazin, wurden Ausscheidungen von respektive 38,1% und 38,9%¹⁶.

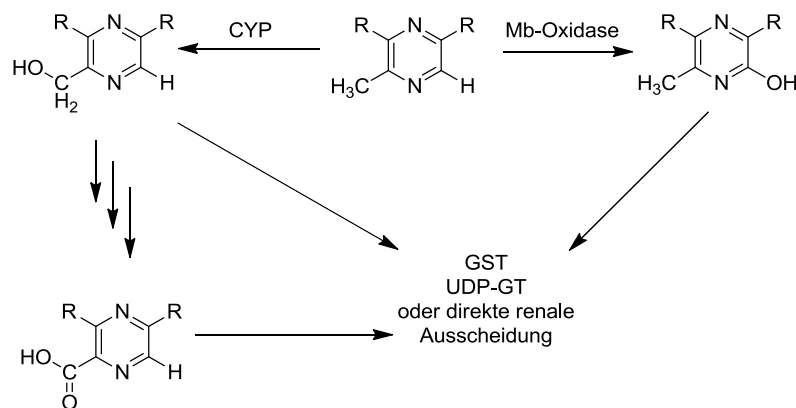


Abbildung 2-26: Metabolisierung der Alkylpyrazine in Mensch und Tier modifiziert nach Müller und Rappert (2010). CYP - Cytochrom P450; GST - Glutathion-S-Transferase; UDP-GT - Uridindiphosphat-Glucuronosyl-Transferase.

Physiologische Wirkungen

Physiologische Wirkungen von Alkylpyrazinen sind in der Literatur nur wenige beschrieben. Die beiden Alkylpyrazine 2-Methyl- und 2-Ethylpyrazin wurden auf eine antioxidative Wirkung getestet, zeigten jedoch kaum oder keine antioxidative Aktivität (Yanagimoto *et al.*, 2002). Das in Kaffee nicht nachgewiesene Alkylpyrazin Tetramethylpyrazin (TMP), auch Ligustrazin, zeigt im Tierversuch anti-apoptotische und neuroprotektive Wirkung (Fan *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008). Weiterhin konnte in einem Tierversuch gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TMP über einen cAMP-abhängigen Mechanismus eine durch Scopolamin ausgelöste Gedächtnisbeeinträchtigung aufhebt (Wu *et al.*, 2013). Zehn Alkylpyrazine, die z.T. in Kaffee vorkommen, zeigten in Konzentrationen bis 5 mM eine signifikante PDE-hemmende Wirkung *in vitro* (Montoya, 2012; Montoya *et al.*, 2014), siehe Tabelle 2-12. Keinen Effekt auf die getesteten Phosphodiesterasen zeigten die in Kaffee mengenmäßig vorwiegenden Alkylpyrazine 2-Methylpyrazin, 2,3-Dimethylpyrazin, 2,5-Dimethylpyrazin. Die in Tabelle 2-12 aufgeführten IC₅₀-Werte für die individuellen Alkylpyrazine liegen sowohl für LXFL529L-Lysat (vorwiegend PDE4) als auch

¹⁶ Pickard *et al.*, unpublished

Thrombozyten-Lysat (vorwiegend PDE3) im millimolaren Bereich und somit um den Faktor 100 - 1000 oberhalb einer physiologischen Plasmakonzentration von wenigen μM ¹⁷. Eine physiologische Wirkung der in Kaffee vorkommenden Alkylpyrazine durch den Mechanismus der PDE-Hemmung erscheint aufgrund dieser Berechnung unwahrscheinlich.

Tabelle 2-12: IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung der Alkylpyrazine nach Montoya Parra (2012)

Alkylpyrazin	IC ₅₀ -Wert in LXFL529L-Zelllysate (mM)	IC ₅₀ -Wert in Thrombozyten-Lysat (mM)
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	2,0	1,0
Tetramethylpyrazin	1,4	1,6
2,3-Diethyl-6-methylpyrazin	0,3	0,4
2-Ethyl-5-methylpyrazin	1,7	n.d.
2-Isobutyl-3-methoxy-pyrazin	0,6	1,0
2-Ethyl-3-methylpyrazin	> 5	n.d.
2,3,5-Trimethylpyrazin	> 5	n.d.
Pyrazin	> 5	n.d.
2,6-Dimethylpyrazin	> 5	n.d.
2-Ethyl-3-Methylpyrazin	> 5	n.d.

2.2.9 Melanoidine

Melanoidine sind eine heterogene Gruppe von gelb bis braun gefärbten, negativ geladenen, stickstoffhaltigen hochmolekularen Produkten der Maillard-Reaktion. In Röstkaffee machen Melanoidine einen Anteil von bis zu 35% aus (Morales *et al.*, 2012). Die tägliche Aufnahme unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lebensgewohnheiten liegt für einen Europäer bei ca. 1 g Melanoidinen in Röstkaffee (Fogliano und Morales, 2011). Melanoidine werden relativiert eingeordnet anhand ihres Molekulargewichtes und Polymerisierungsgrades in Melanoidine niederen Molekulargewichtes und hohen Molekulargewichtes. Von den Kaffee-Melanoidinen entfallen ca. 69% auf hochmolekulare (> 12 - 14 kDa) und 29% auf niedermolekulare (< 12 - 14 kDa) Melanoidine (Bekedam *et al.*, 2008).

¹⁷ Annahmen für die Berechnung der physiologischen Plasmakonzentration: Ausgangswert: 80 - 200 mg/kg Alkylpyrazine (Kaffeepulver); Kaffeebereitung mit 60g/l Kaffeepulver und vollständiger Extraktion (100%); 4,8 - 12 mg/l Alkylpyrazine (Kaffeetrink); Konsum 200 ml Kaffee; Resorption Alkylpyrazine annähernd vollständig (100%); Verteilung in mindestens 2,25 l Plasmavolumen → 0,4 - 1 mg/l Alkylpyrazine (Plasma); mittleres M_{DMP} = 110 g/mol; 3,6 - 9,1 μM (Plasma).

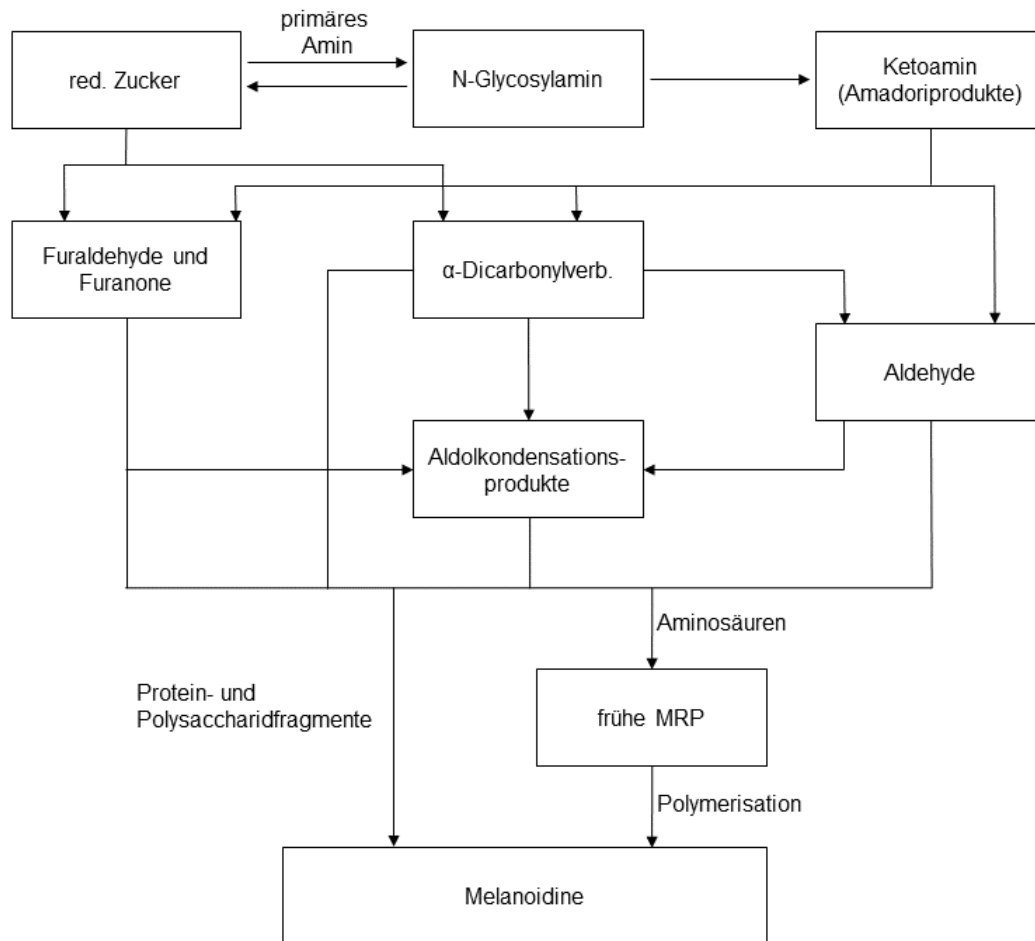


Abbildung 2-27: Schematische Darstellung der Bildung von Melanoidinen im Zuge der Maillard-Reaktion modifiziert nach Wang *et al.* (2011).

Aufbau und Bildung

Nieder- und hochmolekulare Melanoidine entstehen in sog. „*bottom-up*“ Kondensationen aus frühen Produkten der Maillard-Reaktion (frühe MRP). Die Bildung der Melanoidine ist schematisch in Abbildung 2-27 dargestellt. Besonders hochmolekulare Melanoidine mit Molekulargewichten größer 100 kDa entstehen aus Kondensationen der frühen Maillardprodukte mit Protein- und Polysaccharidfragmenten (Morales *et al.*, 2012), wie beispielsweise in Abbildung 2-28 bei der Bildung von Protein gebundenem Pyrrolinon-Reductonyl-Lysin, kurz Pronyl-*L*-Lysin dargestellt. Diskutiert wird ebenfalls die nicht kovalente Bindung von „niedermolekularen“ Melanoidinen an höhermolekulare Carrier wie Proteine und Polysaccharide, sodass das Nettomolekulargewicht über 100 kDa liegt (Gniechwitz *et al.*, 2008).

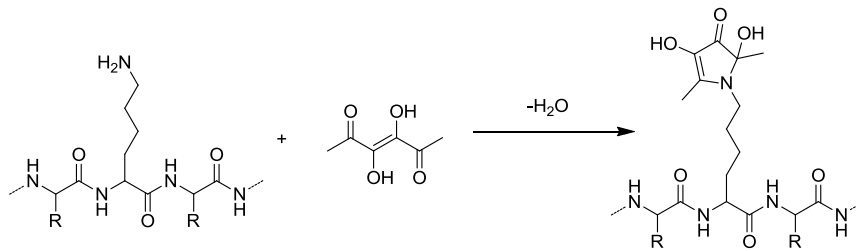


Abbildung 2-28: Bildung von Pronyl-Lysin im Zuge der Maillard Reaktion: Reaktion von Acetylformoin mit der freien Aminogruppe des Lysinrestes eines Proteins, modifiziert nach Somoza *et al.* (2005).

Kaffee enthält vorwiegend von Arabinogalaktanen des Typs II und Galaktomannanen abstammende Melanoidine (Bekedam *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2006; Bekedam *et al.*, 2007; Bekedam *et al.*, 2008). Arabinogalaktane des Typs II kommen gebunden an Proteinen und zusammen mit Galaktomannanen und Cellulose in den Zellwänden der Kaffeebohnen vor (Fischer *et al.*, 2001). Der Anteil an Polysacchariden in hochmolekularen Fraktionen von Röstkaffee sinkt ausgehend von Galaktomannanen über Arabinogalaktane und Glucane (Nunes *et al.*, 2006). Die Grundstruktur der Galaktomannane ist in Abbildung 2-29 zu sehen.

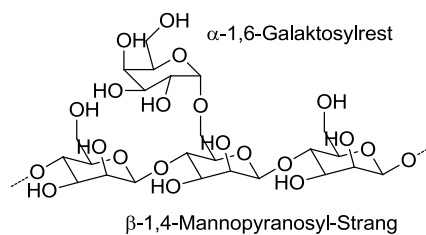


Abbildung 2-29: Grundstruktur von Galaktomannanen.

Galaktomannane sind aufgebaut aus einem Hauptstrang von β -1,4-verbundenen Mannopyranosyleinheiten mit einzeln verzweigten α -1,6-Galaktosylresten. Der Verzweigungsgrad der Galaktomannane in Arabica und Robusta Rohkaffee liegt ca. zwischen 10:1 (\cong 10%) und 30:1 (\cong 3,3%) (Fischer *et al.*, 2001). Er nimmt mit zunehmendem Röstgrad ab (Nunes *et al.*, 2006). Arabinogalaktane lassen sich aufgrund ihrer Struktur in drei Gruppen unterteilen. Während Typ I ein Rückgrat aus β -1,4-verknüpften Galaktanen besitzt, sind Arabinogalaktane des Typs II ausgehend von einem proteingebundenen β -1,3-Galaktopyranosylstrang aufgebaut (Clarke *et al.*, 1979). Die primäre Verzweigung erfolgt über β -1,6-verbundene Galaktosylreste und die sekundäre Verzweigung über β -1,3- und β -1,6-verzweigte Galaktosyl- und Arabinosylreste. Vereinzelt ist ein Glucuronsäurerest vorhanden. Das Verhältnis von Hauptstrang zu Verzweigung liegt bei 1,5 (Fischer *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2006). Die Grundstruktur der Arabinogalaktane des Typs II ist in Abbildung 2-30 dargestellt. Beim dritten Typ von Arabinogalaktanen handelt es sich um Polysaccharide mit Arabinogalaktan-Seitenkette (Clarke *et al.*, 1979).

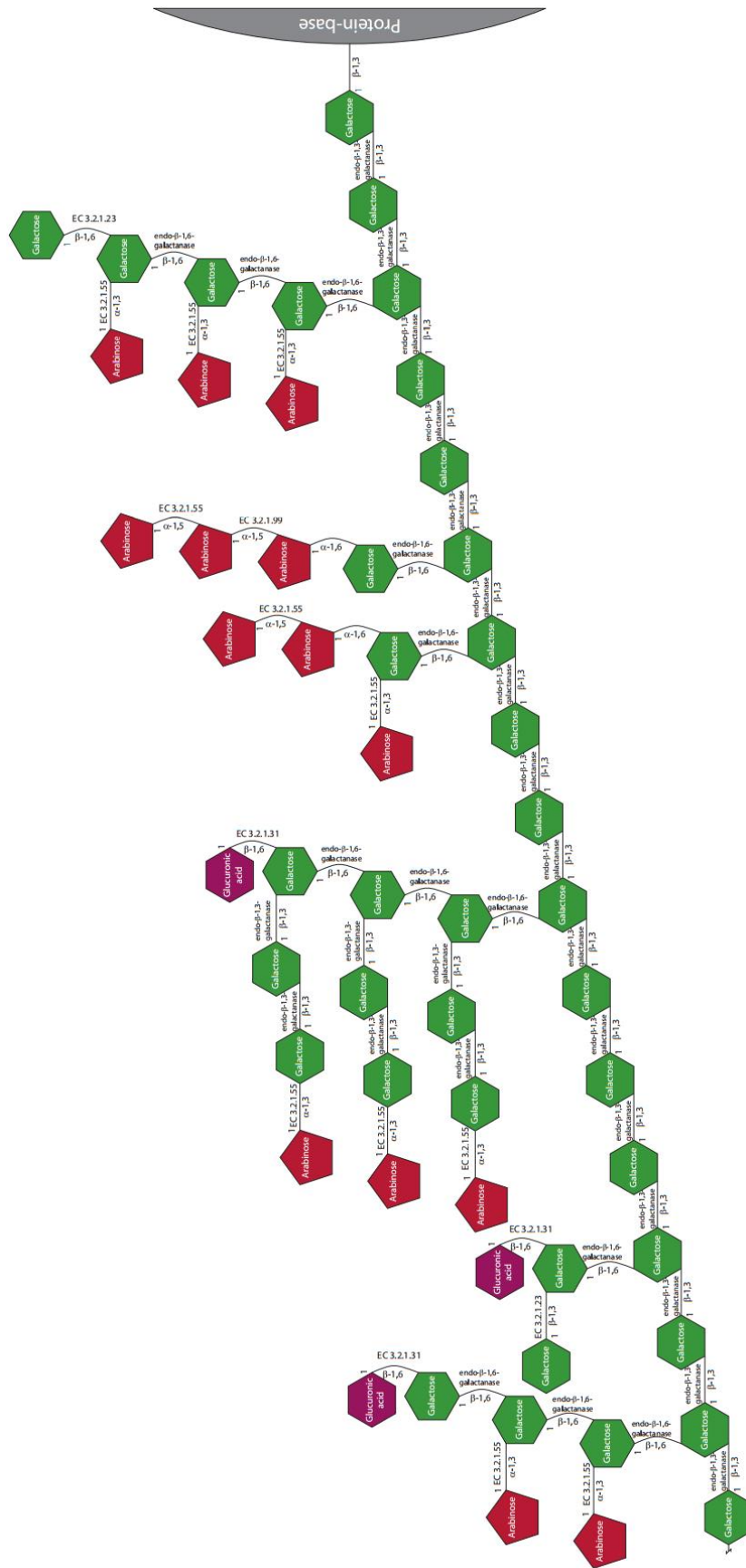


Abbildung 2-30: Grundstruktur der Arabinogalaktane des Typs II aus online Zusatzmaterial von Andersen *et al.* (2012).

Mit zunehmendem Röstgrad nimmt der Verzweigungsgrad der Arabinogalaktane analog der Galaktomannane ab. Zusätzlich nimmt die Zahl der Arabinosylendgruppen ab während die Zahl der Galaktosylendgruppen zunimmt (Nunes *et al.*, 2006), was einer simplen Abspaltung der Endgruppen entspricht.

Melanoidine besitzen eine negative Nettoladung mit heterogenem polyanionischem Charakter. Zum einen entsteht die negative Nettoladung durch die Inkorporation von Arabinogalaktanen und somit von Uronsäuren in die Melanoidine. Zum anderen kommt es vermutlich bei der Bildung der Melanoidine zur Inkorporation von weiteren sauren funktionellen Einheiten (Bekedam *et al.*, 2007), sodass die Gesamteigenschaft eines heterogenen polyanionischen Charakters entsteht. Beispielsweise werden bei der Röstung Chlorogensäuren in die Melanoidine inkorporiert. Die Bindung der Chlorogensäuren im Melanoidin erfolgt sowohl ionisch (Delgado-Andrade *et al.*, 2005) als auch über kovalente nicht-Ester Bindung über die Hydroxyzimtsäureeinheit (Bekedam *et al.*, 2008). Bei letzterem wird vermutet, dass die Chinasäure, die nicht an der Bindung beteiligt ist, zum anionischen Charakter der Melanoidine maßgeblich beiträgt.

Physiologische Wirkungen

Durch ihren polyanionischen Charakter sind Melanoidine prädestiniert für die Chelatisierung von mehrwertigen Kationen. Melanoidine chelatisieren Eisen-, Zink-, Kupfer-, Calcium- und Magnesium-Kationen und zeigen aufgrund dieser Eigenschaft antioxidative und antimikrobielle aber auch anti-nutritive Wirkungen (Rendleman, 1987; Takenaka *et al.*, 2005; Plavšić *et al.*, 2006; Rufian-Henares und de la Cueva, 2009). Weiterführend konnte auf verschiedene Enzyme eine hemmende Wirkung der Melanoidine beobachtet werden. Hierzu gehören das Zn²⁺-abhängige Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) (Rufián-Henares und Morales, 2007), eine Zn²⁺-abhängige Matrix Metalloprotease (MMP) (De Marco *et al.*, 2011) sowie Trypsin nicht aber Chymotrypsin (Hirano *et al.*, 1994; Brinen *et al.*, 1996), beide Ca²⁺-abhängig (Green *et al.*, 1952). Für die Hemmung der Enzyme wurde eine kompetitive Hemmung ausgeschlossen. Vielmehr wurden Mechanismen diskutiert wie allosterische Bindung der Melanoidine an das Enzym, die Chelatisierung der aktivierenden Kationen oder eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Enzym und negativ geladenen Melanoidinen.

Bioverfügbarkeit und Metabolismus

Über die Bioverfügbarkeit der Melanoidine nimmt man generell an, dass sie mit steigendem Molekulargewicht sinkt (Morales *et al.*, 2012). In einer Studie zur Bioverfügbarkeit wurde die

Braunfärbung des Rattenurins sowie ein Anstieg von Phase I und Phase II Enzymaktivitäten nach der Fütterung von Malz, Brotkruste oder pronyliertem BSA als Beweis der Aufnahme von Melanoidinen oder deren Abbauprodukten gesehen (Somoza *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurde eine nieder- und eine hochmolekulare Fraktion eines ^{14}C -markierten Maillard-Reaktion-Modells aus Casein erhitzt mit Glucose an Ratten verfüttert. Über die Radioaktivität des Urins konnte für die niedermolekulare Fraktion eine Wiederfindung von 27% und für die hochmolekulare Fraktion von 4,7% bestimmt werden (Finot und Magnenat, 1981). Dabei blieb in beiden Studien ungeklärt, ob die aufgenommenen Melanoidine im Darm in intakter Form oder als Abbauprodukte resorbiert wurden. In einer weiteren Studie wurden die frühen Maillardprodukte Lysinoalanin (LAL), N-Carboxymethyllysin (CML) und N-Fructoselysin (FL) an Casein gebunden verfüttert und zu 3,7 - 29% im Urin von Ratten als Monomere wiedergefunden (Somoza *et al.*, 2006). Die Ergebnisse dieser Studie lassen ebenfalls keine Aussage über den Bindungszustand der frühen Maillardprodukte zum Zeitpunkt der Resorption zu. Bekannt ist aus mehreren *in vitro* Studien, dass Melanoidine, insbesondere die inkorporierten Saccharide, durch Bakterien der Darmmikrobiota (Bakteroides) metabolisiert werden (Ames *et al.*, 1999; Gniechwitz *et al.*, 2007; Reichardt *et al.*, 2009). Weiterhin konnte in einer enzymatischen Simulation der gastrischen und pankreatischen Verdauung kein Abbau der Melanoidine beobachtet werden (Ames *et al.*, 1999). Dies spricht dafür, dass Melanoidine nur von der Darmmikrobiota metabolisiert werden. Ob die Resorption der Melanoidine in Form von Abbauprodukten oder größtenteils intakt erfolgt, konnte bisher nicht geklärt werden. Die Untersuchung der Bioverfügbarkeit der Melanoidine gestaltet sich schwierig, da unter anderem die Analytik der Melanoidine anspruchsvoll ist.

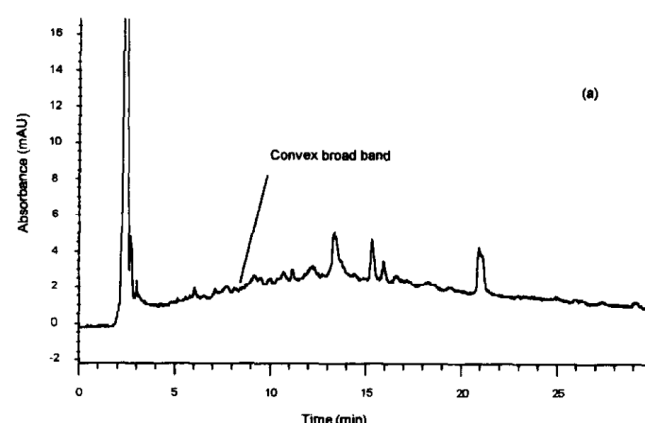


Abbildung 2-31: RP-HPLC-Chromatogramm eines Maillard-Reaktion-Modells bei 460 nm aus Monti *et al.* (1998).

Zum einen können Melanoidine nicht per HPLC analysiert werden, da ihre Größe und Heterogenität zu breiten unaufgelösten Banden im Chromatogramm führen wie in Abbildung 2-31 zu erkennen (Bailey *et al.*, 1996; Monti *et al.*, 1998; Bekedam *et al.*, 2008). Ein weiteres Problem bei der Analytik der Melanoidine stellt deren heterogene makroskopische Form dar.

Die Kalibrierung der Cut-Off-Größen von Ultrafiltrationseinheiten sowie der Größenausschlusschromatographie und auch der Gelelektrophorese erfolgt in der Regel ausgelegt auf globuläre Proteine - nicht auf heterogene Melanoidine. Bei niedermolekularen Melanoidinen wird zusätzlich die Analytik durch Verunreinigungen mit niedermolekularen nicht-Melanoidinen erschwert. Zur Analytik von niedermolekularen Melanoidinen gibt es Ansätze mittels FT-ICR-ESI-MS (Kuhnert, 2011; Jaiswal *et al.*, 2012) und MALDI-TOF (Borrelli *et al.*, 2002). Eine weitere Methode für die Analytik von Melanoidinen ist NMR (Gniechwitz *et al.*, 2008).

2.3 Artischocke – *Cynara scolymus*

2.3.1 Allgemein

Bei der als Gemüse bekannten Artischocke handelt es sich um *Cynara cardunculus* ssp. *scolymus* (*Cynara scolymus* L.) aus der Familie der Asteraceae. Kulinarische Bedeutung besitzt die im unreifen Zustand geerntete Blütenknospe. Die Blätter der Pflanze werden zu Tees, Nahrungsergänzungsmitteln und Arzneimitteln verarbeitet. Zu den physiologischen Wirkungen der Artischocke gehört ein lipidsenkender Effekt, insbesondere die Senkung des Cholesterin-Spiegels, weshalb Zubereitungen aus Artischockenblättern häufig in der Phytotherapie und zur Prävention von Arteriosklerose verwendet werden (Englich *et al.*, 2000; Bundy *et al.*, 2008). Antioxidative Effekte sind auf einen hohen Gehalt an Chlorogensäuren und Flavonen zurückzuführen (Gebhardt, 1997; Zapolska-Downar *et al.*, 2002). Neben einer verdauungsfördernden Wirkung zeigen Artischockenextrakte aber auch eine anti-hypertensive Wirkung. Wie in Kapitel 2.1.5 bereits dargestellt, steht die PDE in direktem Zusammenhang mit der Gefäßerweiterung und Blutdrucksenkung durch Stickstoffmonoxid (NO). In *ex vivo* Experimenten von Li *et al.* (2004) konnte durch die Inkubation mit Artischockenextrakt eine Steigerung der Acetylcholin-vermittelten Relaxation von Rattenaortenringen beobachtet werden, während in einer humanen Endothelzelllinie gleichzeitig eine Zunahme der NO-Synthese als auch eine Steigerung der Gen- und Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase beobachtet wurde. Diese Wirkung wurde den Flavonen aus Artischocke zugeordnet (Li *et al.*, 2004).



Abbildung 2-32: Artischocken, Asteraceae (Hill, 1762)
 Rechts oben: „Prickly Artichoke“ - *Cynara humilis*;
 Mitte links: „Withered Artichoke“ - *Cynara cardunculus*;
 unten rechts: „Fleshy Artichoke“ - *Cynara scolymus*

2.3.2 Chlorogensäuren

Artischocke ist reich an Chlorogensäuren. In der essbaren Blütenknospe konnten bis zu 9,4 g/kg Trockengewicht Chlorogensäuren gefunden werden während die höchsten Gehalte auf die Monocaffeoylchinasäure 5-CQA (bis 3,1 g/kg Trockengewicht) und die Dicafeoylchinasäure 1,5-DiCQA (bis 3,9 g/kg Trockengewicht) entfallen (Schütz *et al.*, 2004). Die Gehalte innerhalb der Blütenknospe unterscheiden sich stark zwischen inneren und äußeren Deckblättern, Blütenstiel und Blütenboden mit Höchstwerten von 14,8 g/kg Trockenmasse für 5-CQA und 7,5 g/kg Trockenmasse für 1,5-DiCQA in den inneren Deckblättern (Lombardo *et al.*, 2010; Pandino *et al.*, 2011). Durch thermische Einflüsse während der Verarbeitung kommt es zur Isomerisierung innerhalb der Caffeoylchinasäuren, wobei vermehrt 1,3-DiCQA (Cynarin) gebildet wird (Schütz *et al.*, 2004). Die Überprüfung des Gehaltes an phenolischen Verbindungen mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz ergab einen vielfach höheren Gehalt in Blättern als in den essbaren Teilen (Wang *et al.*, 2003). Biosynthese, Bioverfügbarkeit und Metabolismus sowie physiologische Wirkungen der Chlorogensäuren wurden bereits in Kapitel 2.2.7 behandelt. Durch die Wasserlöslichkeit der Chlorogensäuren wird ein hoher Anteil an Chlorogensäuren im 60%-methanolischen Extrakt erwartet.

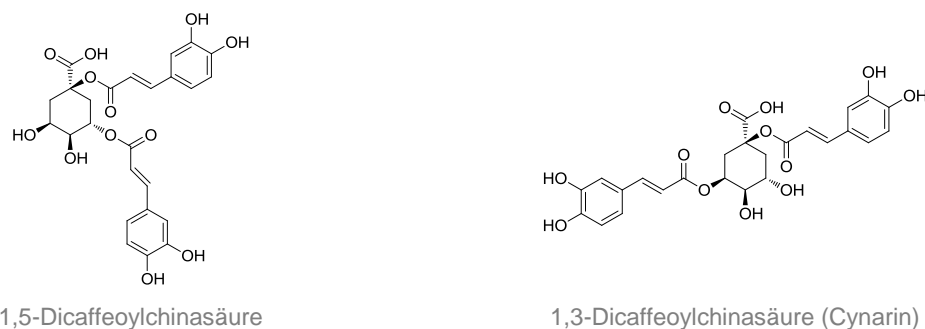


Abbildung 2-33: Dicafeoylchinasäuren der Artischocke

2.3.3 Flavonoide

Neben Chlorogensäuren ist Artischocke reich an Flavonen, insbesondere Luteolin- und Apigenin-Glykosiden. Glucuronide und Glucoside sind vorherrschend gegenüber Rutinosiden mit Apigenin-7-O-glucuronid (siehe Abbildung 2-34) als vorherrschende Verbindung (Schütz *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2010; Pandino *et al.*, 2011). Freie Aglyka können in Spuren nachgewiesen werden. Die Gehalte der Flavone schwanken ebenso wie die Gehalte der Chlorogensäuren abhängig vom Teil der Blütenknospe. Höchstwerte liegen bei 6,3 g/kg Trockenmasse für Apigenin-7-O-glucuronid im Blütenboden (Lombardo *et al.*, 2010; Pandino *et al.*, 2011).

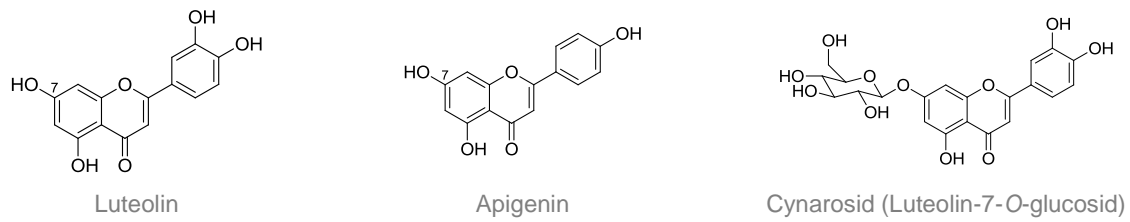


Abbildung 2-34: Flavone der Artischocke

Aus der Gruppe der Flavanone kann in Artischocke Naringenin-7-O-glucosid, sog. Prunin, und Naringenin-7-O-rutinosid, sog. Narirutin, gefunden werden. Die Konzentrationen liegen hierbei unterhalb 100 mg/kg Trockenmasse (Schütz *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2010). Die in Artischocke enthaltenen Flavonoide werden erwartet, fast vollständig mit 60% Methanol extrahiert werden zu können.

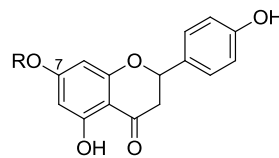


Abbildung 2-35: Naringenin (R=H), Prunin (R=Glucose), Narirutin (R=Rutinose).

Biosynthese der Flavonoide

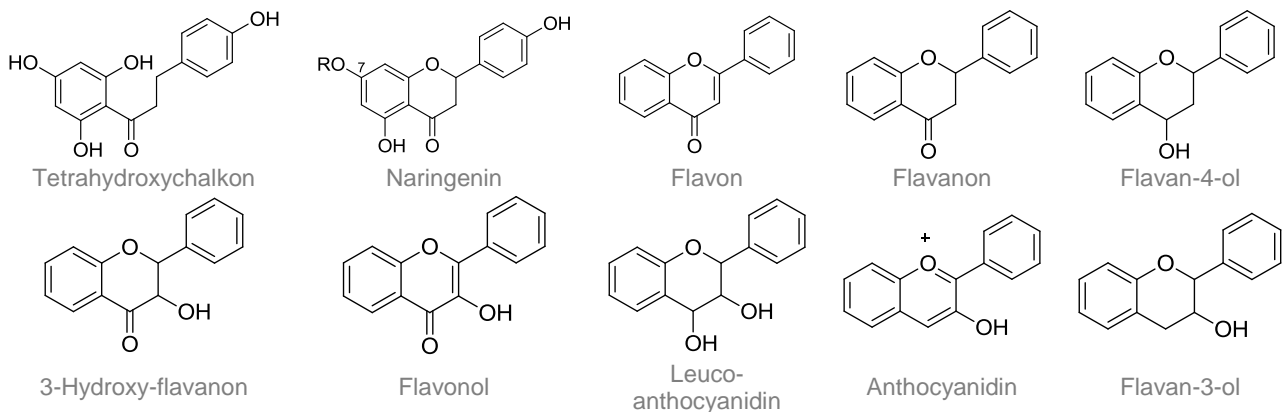


Abbildung 2-36: Grundstrukturen der für die Biosynthese relevanten Flavonoide.

Die Biosynthese der verschiedenen Flavonoide weist gemeinsame Wege auf. Sie beginnt ausgehend von aus Phenylalanin gebildetem *p*-Cumaroyl-CoA (Phenylpropanoid-Biosynthese, siehe Abbildung 2-23 Biosynthese Chlorogensäuren). Die Biosynthese ist in Abbildung 2-37 schematisch dargestellt. *p*-Cumaroyl-CoA wird mit 3 Äquivalenten Malonyl-CoA durch Chalkon-Synthase zu Trihydroxychalkon bzw. Tetrahydroxychalkon umgesetzt. Während die Isoflavone über Zwischenschritte aus beiden Verbindungen gebildet werden können, werden die Flavonoide über das Tetrahydroxychalkon, auch Naringenin-Chalkon,

gebildet. Chalkon-Isomerase bildet im folgenden Schritt Naringenin, welches Ausgangsverbindung für die Bildung von Isoflavonoiden, Flavonen, Flavanonen, Flavan-4-olen und 3-Hydroxy-flavanonen ist. Letztere sind wiederum Ausgangsverbindungen für die Bildung von Flavonolen und Leucoanthocyanidinen, den Vorläuferverbindungen der Anthocyanidine, Flavan-3-ole und Proanthocyanidine (Winkel-Shirley, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Petrusa *et al.*, 2013). Die Strukturformeln der Zwischenverbindungen sind in Abbildung 2-36 dargestellt.

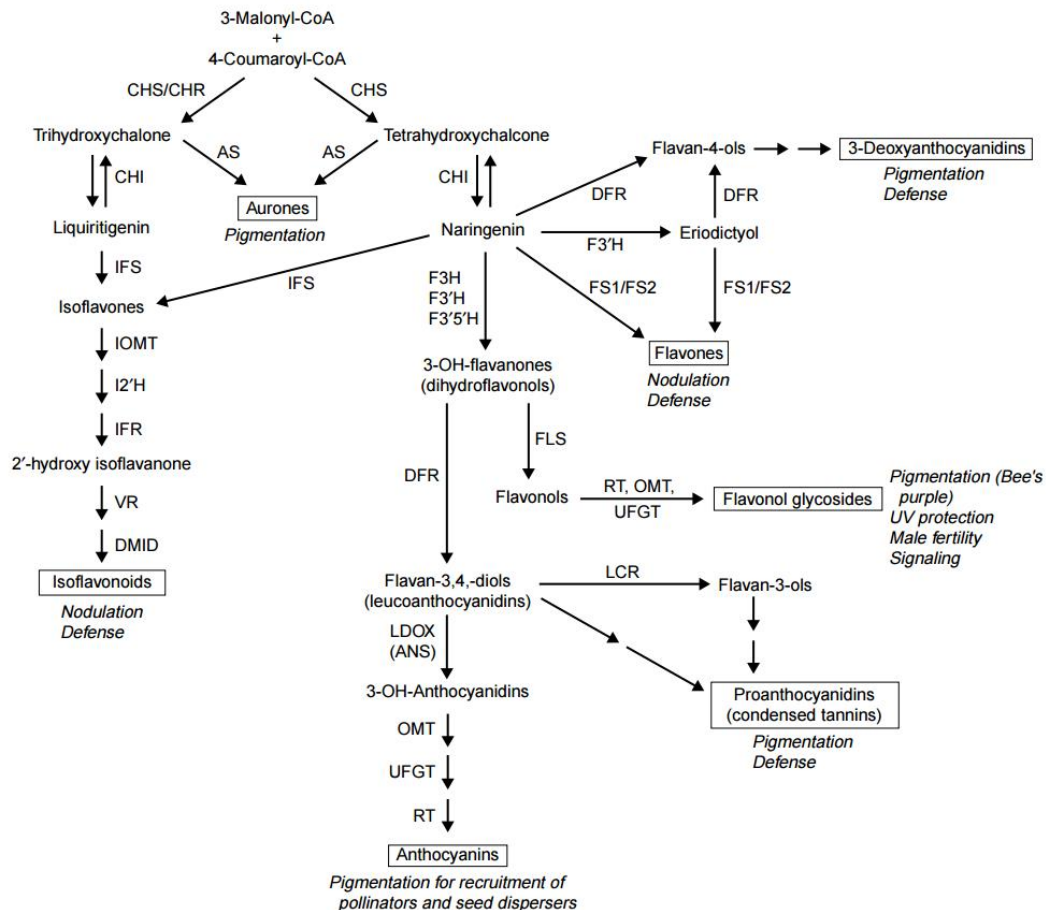


Abbildung 2-37: Biosynthese der Flavonoide aus Winkel-Shirley (2002). ANS, Anthocyanidin-Synthase; AS, Aureusidin-Synthase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CHI, Chalkon-Isomerase; CHR, Chalkon-Reduktase; DFR, Dihydroflavonol-4-Reduktase; DMID, 7,2'-Dihydroxy-4'-Methoxyisoflavanol-Dehydratase; F3H, Flavanone-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; F3'5'H, Flavonoid-3'5'-Hydroxylase; FS1/FS2, Flavon-Synthase; I2'H, Isoflavon-2'-Hydroxylase; IFR, Isoflavon-Reduktase; IFS, Isoflavon-Synthase; IOMT, Isoflavon-O-Methyltransferase; LCR, Leucoanthocyanidin-Reduktase; LDOX, Leucoanthocyanidin-Dioxygenase; OMT, O-Methyltransferase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; RT, Rhamnosyl-Transferase; UFGT, Flavonoid-UDP-Glucosyltransferase; VR, Vestiton-Reduktase.

Bioverfügbarkeit und Metabolismus

Die Bioverfügbarkeit der Flavone ist vergleichbar mit anderen Flavonoiden. In einer Studie mit Ratten lag die orale relative Bioverfügbarkeit von Apigenin-7-O-glucosid bei 11 - 13% in Urin und Plasma in Form von Metaboliten (Hanske *et al.*, 2009). In einer Humanstudie mit acht Probanden konnten im Urin nur 0,22% der verabreichten Dosis Apigenin in der

ursprünglichen Form wiedergefunden werden, wobei Metabolite nicht betrachtet wurden (Meyer *et al.*, 2006). Ähnliche Werte der urinären Ausscheidung (0,25% der verabreichten Dosis) konnten in einer Studie mit dem Flavon Chrysin gefunden werden (Walle *et al.*, 2001). In einer weiteren Humanstudie wurde den Probanden Artischockenblätterextrakt entsprechend 14 oder 35 mg Luteolin Äquivalenten verabreicht. Mit t_{\max} -Werten zwischen 30 und 40 Minuten konnten hierbei für Luteolin-Glucuronide und -Sulfate C_{\max} Konzentrationen im Plasma von 59 - 157 ng/ml detektiert werden. Die Wiederfindung der verabreichten Dosis im Urin in Form von Phase-II-Konjugaten lag bei 1,7 - 2,0% (Wittemer *et al.*, 2005). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Flavone vor bzw. nach der Resorption stark metabolisiert werden.

Physiologische Wirkungen

Zu den physiologischen Wirkungen der Flavone zählen antioxidative, antiinflammatorische und anti-allergische Wirkung (Lee *et al.*, 2007; Seelinger *et al.*, 2008; Funakoshi-Tago *et al.*, 2011). Daneben wurde Luteolin als Topoisomerase-I-Gift identifiziert (Chowdhury *et al.*, 2002). Flavone sind außerdem als Hemmstoffe der Phosphodiesterase bekannt. Unter den Flavonoiden zeigen sie dabei neben Anthocyanen und Flavonolen das stärkste Potenzial, siehe Tabelle 2-13. Flavanone und Flavan-3-ole sind verglichen mit anderen Flavonoiden eher schwache PDE-Hemmer. Catechin und Epicatechin zeigten in der Studie von Kuppusamy *et al.* (1992) paradoxerweise stimulierende Wirkung. Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung besagte für die Flavonoide, dass das Potential mit der Planarität des Moleküls abnimmt. Dies wird erklärt durch die Imitation des Pyrimidin-Ringes der zyklischen Nukleotide durch den Pyranon-Ring der Flavonoide (Ferrell *et al.*, 1979), siehe Abbildung 2-38. Dies erklärt das niedrigere Potential der Flavanone und Flavan-3-ole gegenüber den Flavonoiden mit Doppelbindung in 2,3-Position.

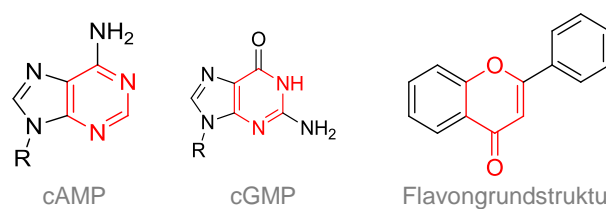


Abbildung 2-38: cAMP, cGMP und Flavongrundstruktur.
Rot hervorgehoben: Pyrimidin-Ring und Pyranon-Ring.

In Zusammenhang mit dem PDE-hemmenden Potential steht außerdem die Anzahl an π -Elektronen im Chroman-Ring (Amic *et al.*, 1995). Weiterhin kann in allen Gruppen beobachtet werden, dass ein glykosidischer Rest das Potential der PDE-Hemmung herabsetzt. Eine Erklärung hierfür könnte die sterische Hinderung der Bindung ins aktive Zentrum durch Mono- und Dissaccharide liefern.

Tabelle 2-13: IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung durch Flavonoide.

Klasse	Verbindung	IC ₅₀ (µM)	PDE-Isoform	Ref.
Flavone	Luteolin	10,1 - 20,5	1 - 5	a
		8,7	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		38	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
	Luteolin-7-O-glucosid	35 - >100	1-5	a
		250	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
	Apigenin	10,5 - >100	1-5	a
			9,2	„beef heart“-PDE (cAMP)
		64	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
		35 (cGMP)	„bovine lung“-PDE	d
		53 (cAMP)		
Flavan-3-ole	(-)-Catechin	300	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
	(+)-Catechin	500	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		170 (cGMP)	„bovine lung“-PDE	d
		640 (cAMP)		
Anthocyane	(-)-Epicatechin	500	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
	Malvidin	23	4	e
	Pelargonidin	7,8	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		23 (cGMP)	„bovine lung“-PDE	d
Flavanone	Naringenin	45	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		164	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
	Naringenin-7-O-neohesperidosid (Naringin)	>250 (30%)	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
	Hesperetin	28 - >100	1 - 5	a
		26	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		>250 (22%)	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
Flavonole	Quercetin	5,6 - >100	1 - 5	a
		3,6	„beef heart“-PDE (cAMP)	b
		32	„adipocyte“-PDE (cAMP)	c
		15 (cGMP)	„bovine lung“-PDE	d
		23 (cAMP)		
	Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin)	>250 (0%)	„bovine lung“-PDE	d

a - (Ko *et al.*, 2004); b - (Beretz *et al.*, 1978); c - (Kuppusamy und Das, 1992); d - (Ruckstuhl *et al.*, 1979); e - (Marko *et al.*, 2004)

2.3.4 Weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

In Artischockenblättern können die Sesquiterpen-Laktone Cynaropikrin und Grosheimin gefunden werden, die u.a. für die Bitterkeit der Blätter verantwortlich sind (Fritsche *et al.*, 2002). In der Varietät *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* konnte in einem aus Blättern hergestellten Extrakt bis zu 95 g/kg Trockengewicht dieser Verbindungen quantifiziert werden, wobei 87 g/kg auf Cynaropikrin zurückzuführen sind (Ramos *et al.*, 2013). Daneben

konnten in den Blättern weitere Sesquiterpen-Laktone wie Aguerin B sowie Cynarascoloside A, B, und C identifiziert werden (Shimoda *et al.*, 2003).

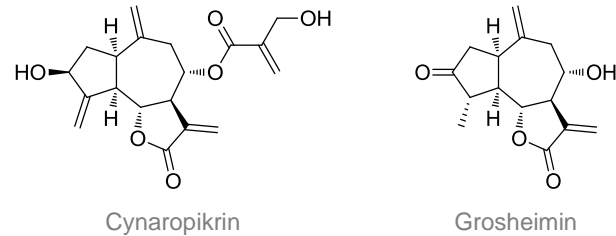


Abbildung 2-39: Sesquiterpen-Laktone in *Cynara scolymus*.

Das pentazyklische Triterpen Lupeol wurde als ein Inhaltsstoff in Artischockenblättern identifiziert (Noldin *et al.*, 2003). In der Varietät *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* wurden insgesamt zehn dieser Triterpene quantifiziert mit 14 g/kg Trockengewicht eines Blätterextraktes (Ramos *et al.*, 2013).

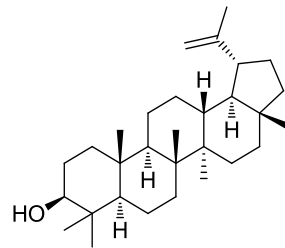


Abbildung 2-40: Lupeol

Sowohl Cynaropikrin als auch Lupeol zeigen ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung *in vitro* und *in vivo* (Cho *et al.*, 2000; Geetha und Varalakshmi, 2001; Saleem, 2009; Tanaka *et al.*, 2013). Die Mechanismen, die der antiinflammatorischen Wirkung zugrunde liegen, beinhalten die Beeinflussung von „*nuclear factor kappa B*“ und „*tumor necrosis factor alpha*“. Ein direkter Zusammenhang dieser Substanzen mit der Hemmung der Phosphodiesterase ist in der Literatur nicht zu finden. Allerdings zeigen bspw. pentazyklische Triterpene aus *Vochysia pacifica* PDE4-hemmende Wirkung mit IC₅₀-Werten von 115 bis über 300 µM (Weniger *et al.*, 2005), sodass eine PDE-Hemmung nicht ausgeschlossen ist. Die Terpene werden aufgrund ihrer limitierten Löslichkeit in Wasser nur zu einem geringen Anteil im 60%-methanolischen Extrakt erwartet.

2.4 Ingwer – *Zingiber officinale*

2.4.1 Allgemein

Bei *Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae handelt es sich um eine mehrjährige krautige Pflanze. Der Beiname „*officinale*“ aus dem lateinischen bedeutet frei Übersetzt „Apotheke“ und weist damit auf den medizinischen Nutzen des Ingwers hin. Vom unterirdisch gelegenen Wurzelstamm (Rhizom) wachsen oberirdisch gelegene Triebe (Pseudostämme) mit zweizeiligen Blättern. Die Vermehrung und Aussaat erfolgt durch Teilung der Rhizome und Einpflanzen, wobei in der Regel eine der apikal gelegenen Keimknospen austreibt¹⁸. Der Blütenstand mit mehrfarbigen Blüten entwickelt sich am Ende eines Pedunkels, wobei Ingwer selten bis gar nicht blüht¹⁹. Das aromatische Ingweröl, sog. Oleoresin, wird in Ölzellen (Idioblasten) in fast allen Teilen der Pflanze gebildet mit Konzentrierung im Rhizom²⁰ (Remashree *et al.*, 1999). Aufgrund des besonders hohen Gehaltes an Oleoresin im Rhizom besitzt das *Rhizoma zingiberis* kulinarische und phytotherapeutische Bedeutung. Das Oleoresin lässt sich einteilen in eine flüchtige und nicht-flüchtige Fraktion, wobei die flüchtige Fraktion vor allem für das angenehme Aroma und die nicht-flüchtige Fraktion für den scharfen Geschmack verantwortlich ist. Die kulinarische und phytotherapeutische Verwendung des Ingwers ist steigend. Der Nettoimport in Europa stieg von 2002 bis 2012 um ca. 150% (FAOSTAT). Die phytotherapeutische Anwendung erstreckt sich von Antiemetikum über Antidiabetikum und Analgetikum bis zu Antikoagulans.



Abbildung 2-41: *Zingiber officinale*, Zingiberaceae (Brandt *et al.*, 1887)

Das aromatische Ingweröl, sog. Oleoresin wird von Ölzellen vorwiegend im Rhizom gebildet. Diese Ölzellen sind in Blättern, Wurzeln, Rhizom und Blattstielen epidermal und subepidermal lokalisiert. Die Ölzellen umgeben dabei einen sekretorischen Ölkanal. Dieser Ölkanal wird entweder durch das Auflösen mehrerer Mittellamellen zwischen Meristemzellen

¹⁸ Ravindran und Babu, 2004, S. 17ff

¹⁹ Ravindran und Babu, 2004, S. 37f

²⁰ Ravindran und Babu, 2004, S. 24f

(schizogen) oder durch die Lyse einer im Zentrum mehrerer Ölzellen gelegenen Zelle (lysogen, s. Abbildung 2-42) gebildet²¹ (Remashree *et al.*, 1999).

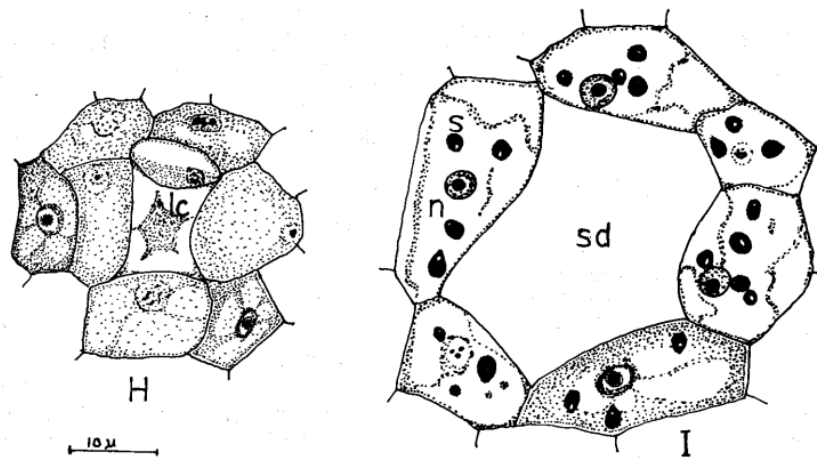


Abbildung 2-42: Lysogene Bildung der Ölkanäle. H: Lyse der zentralen Ölzelle (lc). I: Ausgebildeter Ölkanal umgeben von Ölzellen mit Stärkekörnern (S), Nukleus (n) und spärlichem Cytosol aus Remashree *et al.* (1999)

Aus getrocknetem Ingwer können in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode bis zu 10% Oleoresin extrahiert werden (Catchpole *et al.*, 2003). Das Oleoresin enthält mehr als 160 Einzelverbindungen (Chen und Ho, 1988). Die Zusammensetzung ist stark abhängig von Wachstumsfaktoren sowie Extraktionsmethoden (Singh *et al.*, 2008).

2.4.2 Monoterpene und Sesquiterpene

Die flüchtige Fraktion des Oleoresins, auch ätherisches Öl genannt, wird durch Wasserdampfdestillation gewonnen und besteht in den größten Anteilen aus Sesquiterpenen des Bisabolen-Typs und Monoterpenen (Wohlmuth *et al.*, 2006; Golebiowski *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung der flüchtigen Fraktion schwankt analog der Zusammensetzung des Oleoresins in Abhängigkeit von den Wachstumsfaktoren des Ingwers und seiner Verarbeitung. Dabei ist der Gehalt an Sesquiterpenen invers abhängig vom Gehalt an Monoterpenen (Wohlmuth *et al.*, 2006). Unter den Sesquiterpenen dominiert Zingiberen vor *ar*-Curcumen, (*E,E*)- α -Farnesen, β -Sesquiphellandren und Bisabolen (Zancan *et al.*, 2002; Wohlmuth *et al.*, 2006), hierzu siehe Abbildung 2-43. Mit großem Abstand macht den größten Anteil der Monoterpene das Isomerengemisch Citral aus Geranial und Neral aus. Gefolgt wird dies von Geraniol, Citronellol, (-)-Borneol, Linalool, 1,8-Cineol und α -Terpineol (Zancan *et al.*, 2002; Wohlmuth *et al.*, 2006), siehe Abbildung 2-44. Die Hauptinhaltsstoffe Citral, Zingiberen, Sesquiphellandren und Bisabolen können bis zu 73%

²¹ Ravindran und Babu, 2004, S. 24f

des Oleoresins ausmachen (Bartley und Foley, 1994). Aufgrund ihrer Flüchtigkeit werden sie nicht in den gefriergetrockneten Extrakten erwartet.

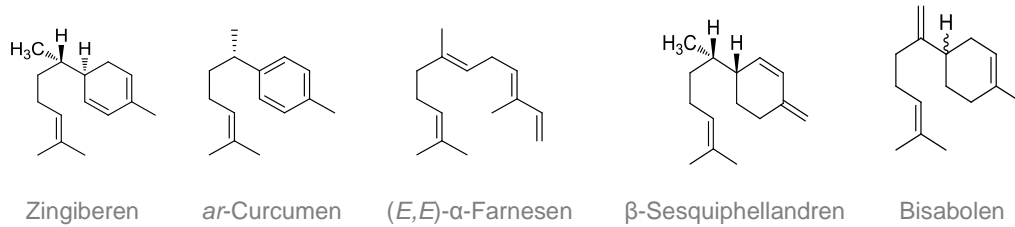


Abbildung 2-43: Die wichtigsten Sesquiterpene in Ingwer.

Biosynthese

Mono- (C_{10}) und Sesquiterpene (C_{15}) sind wie alle Terpene aus Isopreneinheiten (C_5) aufgebaut. Ihre Biosynthese beginnt mit dem gemeinsamen Precursor Isopentenyl-diphosphat (IPP). Unter Isomerisierung und Abspaltung von Diphosphat erfolgt die sequentielle Verlängerung mit IPP zu den entsprechenden Intermediaten Geranyldiphosphat (C_{10}) und Farnesyl-

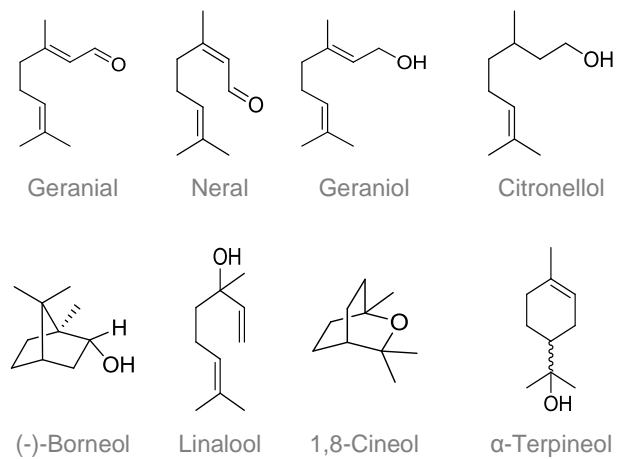


Abbildung 2-44: Die wichtigsten Monoterpene in Ingwer.

diphosphat (C_{15}). Mono- und Sesquiterpene werden aus diesen Intermediaten über verschiedene enzymkatalysierte Reaktionen wie Cyclisierung, Oxidation oder Aromatisierung gebildet. Dabei entscheidet die genetische Enzymausstattung über das Inhaltsstoffmuster²².

Bioverfügbarkeit und Metabolismus

Über die Bioverfügbarkeit der Mono- und Sesquiterpene ist wenig bekannt. Erste Studien zeigen jedoch eine rasche Aufnahme und starke Metabolisierung (Kohlert *et al.*, 2000).

Physiologische Wirkungen

Mono- und Sesquiterpene zeigen sowohl fungizide als auch antibakterielle Wirkung *in vitro* (Himejima *et al.*, 1992; Caccioni *et al.*, 1998).

²² Leeper *et al.*, 2003, S. 54f

2.4.3 Gingerole

Die nach der Wasserdampfdestillation des Oleoresins verbleibende nicht-flüchtige Fraktion wird auch Scharfstofffraktion genannt. Sie enthält neben Triglyceriden die sog. Scharfstoffe. Hierbei handelt es sich um von der homologen Reihe der Gingerole verwandte oder abstammende Verbindungen mit unterschiedlichen Oxidations-, Methoxylierungs- und Acetylierungsmustern. Bisher wurden mindestens 88 Einzelsubstanzen identifiziert (Jolad *et al.*, 2005). Zu ihnen zählen Gingerole, Shogaole, Paradole, Acetoxyingerole, Gingerdione, Gingerdiol, Dehydrogingerdione, Diacetoxyingerdione und Acetoxyingerdione, siehe Abbildung 2-45. Eher außergewöhnliche Scharfstoffe sind Arylheptanoide wie Curcumin (Yeh *et al.*, 2014) mit unterschiedlichen O-Oxidationsstufen und O-Substitutionsmustern (Jolad *et al.*, 2005). Die Scharfstoffe werden zu einem geringen Anteil in den wässrigen Extrakten erwartet, während ihr Anteil im lipiden Extrakt als hoch eingeschätzt wird.

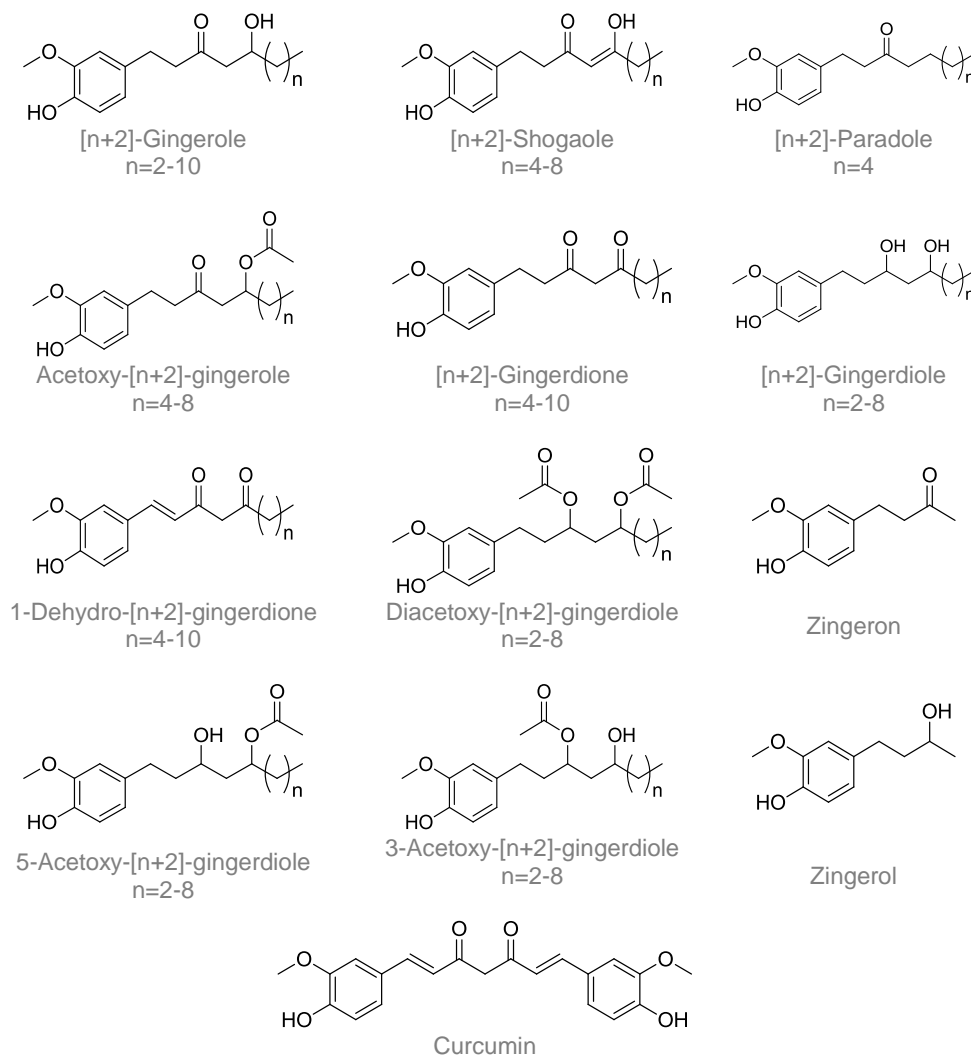


Abbildung 2-45: Scharfstoffe und Abbauprodukte des Ingwers

Im frischen Rhizom und auch in getrocknetem Ingwer sind vorwiegend die Gingerole [6]-, [8]- und [10]-Gingerol zu finden (Jolad *et al.*, 2004). Das [6]-Gingerol zeigt mit 120 - 2100 µg/g frischem Rhizom die höchsten Gehalte (Wohlmuth *et al.*, 2005). Supplemente auf Basis von getrocknetem oder extrahiertem Rhizom können einzelne Gingerole in Konzentrationen bis 10 mg/g enthalten. Mit Ingwer hergestellte Lebensmittel übersteigen einen Gehalt von 5 mg/g bzw. 5 µg/ml in der Regel nicht (Schwertner und Rios, 2007; Alqasoumi, 2009; Tao *et al.*, 2009). Mit zunehmender Lagerungszeit oder unter thermischer Behandlung wie z.B. Trocknung nimmt der Gehalt an Gingerolen ab und der Gehalt an Shogaolen und Dehydrogingerdionen zu (Jolad *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2008). Shogaole entstehen aus Gingerolen über Dehydratisierung der β-Hydroxylfunktion. [6]-Shogaol, das aus [6]-Gingerol entsteht, zeigt dabei die höchsten Gehalte (Jolad *et al.*, 2005). Die weitere Reduktion der Shogaole führt zu Paradolen. Die Oxidation von Gingerolen führt zu Gingerdionen, die Reduktion zu Gingerdiolen. Weitere Abbauprodukte der Gingerole sind Zingeron (auch Zingiberon) und Zingerol.

Biosynthese

Die Biosynthese der Gingerole beginnt ausgehend von *p*-Cumaroyl-CoA, welches aus der Phenylpropanoid-Biosynthese stammt (siehe Biosynthese Chlorogensäuren S. 34, Abbildung 2-23). Die Biosynthese führt über den Shikimisäureweg zu Feruloyl-CoA (siehe Abbildung 2-46, rot), welches mit Malonyl-CoA zum Feruloyldiketid-CoA verestert wird. Anschließend erfolgt ein weiterer Veresterungsschritt mit Fettsäure-CoA zum entsprechenden Dehydro-[n]-gingerdion. Durch Reduktion wird dieses zu [n]-Gingerol umgesetzt. [n]-Gingerol kann in seine Derivate umgesetzt werden: durch Dehydratisierung zu [n]-Shogaol und durch Reduktion schließlich zu [n]-Paradol (siehe Abbildung 2-46, blau). Feruloyl-CoA ist außerdem Ausgangsverbindung der Curcuminoid-Biosynthese (siehe Abbildung 2-46, grün). Hierbei wird Feruloylketid-CoA im Gegensatz zur Gingerol-Biosynthese nicht mit Fettsäure-CoA verestert sondern mit Hydroxycinnamoyl-CoA (del Carmen Ramirez-Ahumada *et al.*, 2006; Flores-Sanchez und Gang, 2013).

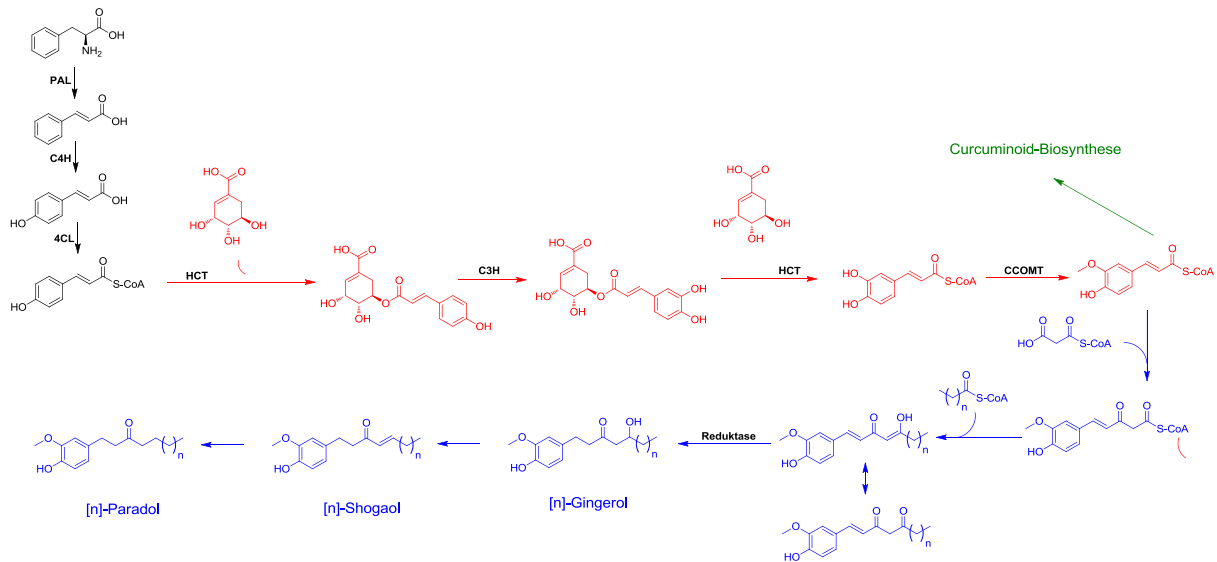


Abbildung 2-46: Biosynthese der Gingerole adaptiert nach del Carmen Ramirez-Ahumada (2006) und Flores-Sanchez und Gang (2013) mit Shikimisäureweg (rot), Gingerol-Synthese-Pfad (blau) und Curcuminoid-Synthese-Abzweigung (grün). PAL - Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H - Zimtsäure-4-Hydroxylase; 4CL - p-Cumaroyl:CoA-Ligase; C3H - p-Cumaroyl-3-Hydroxylase; HCT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Shikimisäure/Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; CCOMT - Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase.

Bioverfügbarkeit und Metabolismus

Entscheidend für die physiologischen Wirkungen der Scharfstoffe ist deren Bioverfügbarkeit. In einer Studie hierzu wurde Probanden eine Dosis von 1,0, 1,5 oder 2,0 g Ingwerextrakt entsprechend 50, 75 oder 100 mg Gingerolen verabreicht und die Metaboliten von [6]-, [8]- und [10]-Gingerol sowie [6]-Shogaol im Plasma untersucht. Phase-II-Metabolite der Gingerole lagen dabei fast ausschließlich als glucuronidierte Metabolite vor. In der höchsten Dosisgruppe konnten auch entsprechende Sulfate gefunden werden, die vermutlich durch eine Sättigung der Glucuronidierung zurückzuführen ist. Freie Gingerole konnten nicht detektiert werden. Die t_{max} -Werte lagen zwischen 45 und 120 min, was für eine schnelle Resorption spricht. Die c_{max} -Werte für die [6]-Gingerol-Metabolite lagen unter 1 $\mu\text{g/ml}$ (Zick *et al.*, 2008). Die absolute humane Bioverfügbarkeit wurde dabei nicht untersucht. In einer Rattenstudie, in der [6]-Gingerol peroral verabreicht wurde, konnten 90 - 99% der verabreichten Dosis als Metabolite in Gallenflüssigkeit und Urin innerhalb von 60 h wiedergefunden werden. Eine Darmsterilisation der Tiere hatte zur Folge, dass im Urin 20 - 85% weniger Metabolite detektiert wurden (Nakazawa und Ohsawa, 2002). Dies spricht für eine anteilige Metabolisierung der Gingerole durch die Darmmikrobiota vor der Resorption. In einer weiteren Rattenstudie wurde radioaktiv markiertes [6]-Shogaol an Ratten verfüttert. Hierbei konnte nach 48 h 78% der Radioaktivität der verabreichten Dosis in Gallenflüssigkeit und 12% in Urin detektiert werden. [6]-Shogaol konnte dabei nicht in der ursprünglichen Form gefunden werden (Asami *et al.*, 2010). Als Hauptmetabolit des [6]-Shogaols stellte sich in einer ähnlichen Rattenstudie das [6]-Paradol heraus (Tokuhara *et al.*, 2013). *In vitro*

Inkubationen mit Mikrosomen verschiedenen Ursprungs zeigen ähnliche Metabolisierungsmuster für Ratte und Mensch (Chen *et al.*, 2013). In einer Pilotstudie mit zwei Probanden konnten auch unmetabolisierte Gingerole in Plasma detektiert werden. So wurden nach Verzehr von 1 l Ingwertee mit einem Gehalt von 96,6 µmol [6]-Gingerol C_{max} -Werte von 42,0 nmol/l für das unmetabolisierte [6]-Gingerol erreicht (Schoenknecht *et al.*, 2016).

Physiologische Wirkungen

Die Scharfstoffe des Ingwers sind starke Antioxidantien, deren antioxidativer Effekt *in vivo* beobachtet werden kann. So konnten die Aktivität der Superoxiddismutase sowie die zellulären Level an Malondialdehyd als Marker der Lipidperoxidation bei Ethionin-behandelten Ratten durch die Gabe von ethanolischem Ingwerextrakt (100 mg/kg BW, Gavage) gesenkt werden (Yusof *et al.*, 2009). Die starken antioxidativen Effekte durch Ingwerinhaltsstoffe lassen sich mit einem Synergismus mit endogenen und exogenen antioxidativen Mechanismen und Verbindungen wie bspw. Glutathion und Ascorbinsäure erklären (Patro *et al.*, 2005). Weiterhin sind die Scharfstoffe des Ingwers bekannt als Serotonin-Antagonisten. Spezielle Bedeutung hat Ingwer dadurch als alternatives Antiemetikum und Antidiabetikum erreicht. Serotonin steht aber auch in direktem Zusammenhang mit der Funktion von Thrombozyten und dem Gefäßendothel (Berger *et al.*, 2009). Der antiemetische Wirkmechanismus des Ingwers beruht auf der Blockade der 5-HT₃-Rezeptorfamilie in der Area Postrema und dem Ileum und der damit verbundenen Unterdrückung des Brechreizes (Abdel-Aziz *et al.*, 2005; Abdel-Aziz *et al.*, 2006). Der antidiabetische Mechanismus beruht auf der Steigerung der Insulinsekretion, welche vermutlich durch die Blockade extrabetazellulärer Serotonin-Rezeptoren entsteht (Heimes *et al.*, 2009; Paulmann *et al.*, 2009). Neben dem 5-HT₃-Rezeptor sind die Scharfstoffe aber auch in der Lage, andere 5-HT-Rezeptoren zu hemmen, wie bspw. den 5-HT_{1A}-Rezeptor (Nievergelt *et al.*, 2010). Eine weitere Eigenschaft der Scharfstoffe ist die Hemmung der Cyclooxygenase (COX) mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung wurde *in vitro* untersucht. Dabei fand man, dass mindestens eine Hydroxylfunktion am Aromaten sowie eine Carbonyl- und/oder Hydroxylfunktion am Seitenrest elementar für die Hemmung sind. Weiterhin bestimmt die Länge der Seitenkette die Lipophilie mit welcher das hemmende Potential steigt (Tjendraputra *et al.*, 2001). Physiologisch bedeutet die Hemmung der COX durch Inhaltsstoffe des Ingwers eine verminderte Eicosanoidbiosynthese und als Folge dessen eine verminderte Aktivierungsfähigkeit der Thrombozyten (Srivastava, 1986; Koo *et al.*, 2001) sowie Analgesie (Chrubasik *et al.*, 2007). Weiterhin wurden einige Scharfstoffe als 5-Lipoxygenase-Hemmstoffe identifiziert. Die IC₅₀-Werte sind dabei vergleichbar mit der Hemmung der COX

(Flynn *et al.*, 1986). Aus der Literatur ist bisher bekannt, dass Ingwer oder [6]-Gingerol keine hemmenden Effekte auf die Phosphodiesterase haben. Thein *et al.* (1995) fanden keine cAMP-PDE-inhibitorische Wirkung mit einem wässrigen Ingwerwurzelextrakt *in vitro*. Kobayashi *et al.* (1987) beobachteten keine signifikante PDE-Hemmung *in vitro* durch [6]-Gingerol. In einer Rattenstudie wurde zusätzlich eine Beteiligung der PDE bei anti-hypertensiven Eigenschaften von Ingwer ausgeschlossen (Ghayur *et al.*, 2005). Mögliche Hinweise auf die PDE-hemmenden Eigenschaften von Ingwer stammen aus einem *in silico screening* Verfahren. Dabei wurden drei potentielle PDE-Hemmstoffe aus der Familie der Zingiberaceae identifiziert, wovon einer das in *Zingiber officinale* vorkommende Demethoxy-[6]-Shogaol sein soll, jedoch nicht der dort abgebildeten Strukturformel entspricht (Chang *et al.*, 2011).

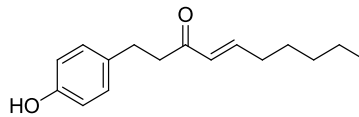


Abbildung 2-47: Demethoxy-[6]-Shogaol

2.4.4 Weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

In manchen Varietäten wurden nach saurer Hydrolyse die Flavonole Quercetin und Myricetin sowie die Flavone Apigenin und Luteolin im Rhizom nachgewiesen. Die Konzentrationen reichten von 28 bis 986 µg/g Trockengewicht mit Quercetin in den höchsten Konzentrationen und liegen damit in den Konzentrationen ca. um den Faktor 10 niedriger als die Gingerole. Weiterhin wurden die Phenolsäuren Gallussäure und Vanillinsäure sowie die Hydroxymizsäuren Ferulasäure und Kaffeesäure im Rhizom in einer ähnlichen Größenordnung quantifiziert (Ghasemzadeh und Ghasemzadeh, 2011). Die im Ingwer in geringeren Konzentrationen enthaltenen Flavone und Flavonole sind bereits als PDE-Hemmstoffe bekannt (siehe Kap 2.3.3).

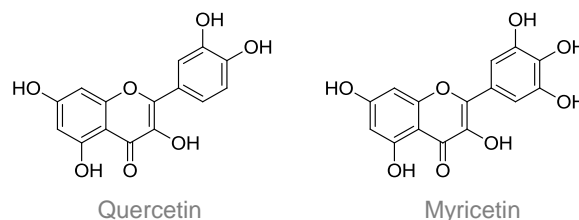


Abbildung 2-48: Flavonole des Ingwers

2.5 Erdbeerbaum – *Arbutus unedo*

2.5.1 Allgemein

Bei *Arbutus unedo* aus der Familie der Ericaceae handelt es sich um einen großen Strauch bzw. kleinen immergrünen Baum mit einer Größe von 2 bis 3 m. Beheimatet ist der sog. Erdbeerbaum in den Küstenregionen des Mittelmeerraumes und wird dort als Obstbaum genutzt. Die im Winter heranreifenden roten Beeren zeichnen sich durch eine mehligfleischige Textur und eine warzige Oberfläche aus. Ihr Erscheinungsbild ähnelt dem von Erdbeeren²³. Diese Früchte werden verarbeitet zu Konfitüren, Likören und Getränken, welche regional vertrieben werden. Die Früchte enthalten ca. 50% Wasser und 20% Zucker (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011), wobei die größten Anteile auf Fructose gefolgt von Glucose zurückgehen (Ayaz *et al.*, 2000; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011).



Abbildung 2-49: *Arbutus unedo*, Ericaceae (Du Monceau und Arts, 1825).

2.5.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Die Früchte des Erdbeerbaumes enthalten neben Proanthocyanidinen, Catechinen und Gallussäure- sowie Ellagsäure-Derivaten als farbgebende Inhaltsstoffe Anthocyane (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008). Sie können in den Früchten in Konzentrationen von 0,5 mg (Pawlowska *et al.*, 2006) über 9,7 mg (Pimpão *et al.*, 2013) bis 517,4 mg (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014) pro 100 g Frischgewicht enthalten sein. Unter den Anthocyanen ist Cyanidin-3-O-galaktosid das am häufigsten vorkommende (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008; Pimpão *et al.*, 2013; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014). Der Gehalt an Anthocyanen schwankt stark in Abhängigkeit von der Reife der Früchte, wie in Abbildung 2-50 erkennbar ist (Oliveira *et al.*, 2011).

²³ Heubl *et al.*, 2013, S. 326 f



Abbildung 2-50: Erdbeerbaumfrüchte in unterschiedlichen Reifestadien.

Die Biosynthese und PDE-Hemmung der Anthocyane wurden bereits in Kapitel 2.3.3 Flavonoide abgehandelt. Die Bioverfügbarkeit der Anthocyane ist mit 0,004 bis 0,1% verglichen mit anderen Flavonoiden gering (Manach *et al.*, 2005). Als Grund hierfür gilt die Degradation der Anthocyane während der Magen-Darm-Passage durch pH-Wert-bedingte Strukturveränderung und die Deglykosylierung durch Verdauungsenzyme und Darmmikrobiota (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007). In einer neueren Studie wurde die urinaire Wiederfindung der Anthocyane mithilfe von ^{13}C -markiertem Cyanidin-3-O-glucosid untersucht. Dabei fand man zwar eine geringe Bioverfügbarkeit für die intakten Anthocyane, die relative Bioverfügbarkeit in Form von aufgenommenen oder generierten Metaboliten lag mit mehr als 12% aber in ähnlicher Größenordnung wie die anderer Flavonoide (Czank *et al.*, 2013).

In den Früchten und den Blättern des Erdbeerbaums enthalten ist außerdem das Hydrochinon- β -D-glucosid Arbutin (Pawlowska *et al.*, 2006; Pavlović *et al.*, 2009). Der Gehalt wurde in Blättern mit 1,21% bestimmt (Pavlović *et al.*, 2009). Arbutin ist der primäre Wirkstoff von Bärentraubenblättern (*Arctostaphylos uva ursi*) in der alternativen Behandlung von Harnwegsinfekten und konnte in den Blättern mit Gehalten von 4,71% nachgewiesen werden (Pavlović *et al.*, 2009). In basischem Urin freigesetztes Hydrochinon hindert

Bakterien an der Einnistung im urinären Endothel (Head, 2008). Allerdings ist das Aglykon Hydrochinon ein Mutagen und kann durch Deglykosylierung von der Darmmikrobiota aus Arbutin im Darm freigesetzt werden (Blaut *et al.*, 2006). Hydrochinon wurde aufgrund seiner mutagenen Eigenschaften von der IARC („*International Agency for Research on Cancer*“) in die Gruppe 3 („*not classifiable as to its carcinogenicity to humans*“) der Kanzerogene eingestuft. Grund hierfür sind fehlende Daten für die Kanzerogenität im Menschen, wohl aber im Tier. Eine Folge der Mutagenität von Hydrochinon ist die Anwendungsbegrenzung von Arbutin-haltigen Arzneimitteln auf maximal fünf einwöchige Anwendungen pro Jahr mit einer Tagesdosis von 420 mg Arbutin. Die relative Bioverfügbarkeit von Arbutin liegt zwischen 60 und 70% in Form seiner in Urin vorkommenden Metabolite Hydrochinon, -Sulfat und -Glucuronid (Schindler *et al.*, 2002).

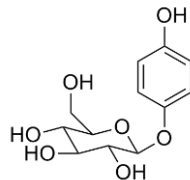
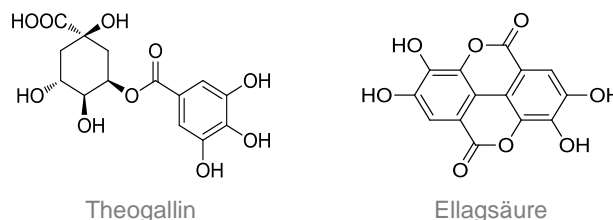


Abbildung 2-51: Arbutin

Theogallin (3-O-Galloylchinasäure) kommt verglichen mit anderen Galloylchinasäuren in den höchsten Konzentrationen in Erdbeerbaumfrüchten vor (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008). Als Nebenverbindungen kommen Gallussäure-1-O-glucosid (Glucogallin), Gallussäure-4-O-glucosid, 5-O-Galloylchinasäure, 5-O-Galloylshikimisäure und 3-O-Galloylshikimisäure vor (Pawlowska *et al.*, 2006).

Neben Gallussäure-Derivaten sind außerdem Ellagsäure-Glykoside beschrieben, die mit Summengehalten von 1,54 mg/100 g Frischgewicht in den Früchten detektiert wurden (Pallauf *et al.*, 2008).

Abbildung 2-52: Phenolische Verbindungen in *Arbutus unedo*

Die Proanthocyanidine und Catechine machen mit 27,5 mg/100 Frischgewicht in den Früchten den größten Anteil der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe aus. Unter den Proanthocyanidinen sind die Verbindungen B1, B2, B3 und B7 zu finden sowie nicht weiter bestimmte Proanthocyanidine und die Monomere Epicatechin, Gallocatechin und Catechin (Pallauf *et al.*, 2008). Es wird für alle aufgeführten Inhaltsstoffe eine vollständige Extraktion

mit 60% Methanol und eine Aufkonzentrierung der Gehalte im Extrakt durch die Aufreinigung am XAD-Material erwartet.

2.5.3 Physiologische Wirkungen

Die Blätter und Wurzeln des Erdbeerbaumes werden als phytotherapeutische Arzneimittel für die Behandlung von Bluthochdruck und Diabetes verwendet (Ziyyat *et al.*, 1997). In einem *ex vivo* Versuch mit Ratten-Aorten konnte als Wirkmechanismus des anti-hypertensiven Effektes die endotheliale Relaxation der Aorten gezeigt werden (Ziyyat *et al.*, 2002). In einer ergänzenden Tierversuchsstudie mit Ratten konnten hypertensive Effekte eines NO-Synthase-Hemmers durch die Gabe von wässrigen Blätter- und Wurzelextrakten umgekehrt werden (Afkir *et al.*, 2008). Der Wirkmechanismus von Arbutus-Extrakten steht dadurch in direktem Zusammenhang mit der relaxierenden Wirkung des Stickstoffmonoxid (NO), die über cGMP vermittelt wird (siehe Kapitel 2.1.5)(Ziyyat *et al.*, 2002; Afkir *et al.*, 2008). In *in vitro* Experimenten haben *Arbutus unedo* Blätterextrakte zusätzlich anti-thrombotische Effekte gezeigt indem sie die Aktivierung der Thrombozyten verhinderten (Mekhfi *et al.*, 2006; El Haouari *et al.*, 2007). Über physiologische Wirkungen der Erdbeerbaumfrüchte ist nichts bekannt. Sowohl die anti-diabetische als auch anti-hypertensive und anti-koagulative Wirkung der verarbeiteten Blätter lässt eine PDE-Hemmung als Mechanismus vermuten.

2.6 Tee – *Camellia sinensis*

2.6.1 Allgemein

Bei *Camellia sinensis* handelt es sich um den immergrünen Teestrauch aus der Familie der Teegewächse (Theaceae)²⁴. Genau genommen werden zwei Varietäten unterschieden: Assam-Tee (*Camellia sinensis* var. *assamica*) und China-Tee (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). Tee wird weltweit angebaut und zu weißem, grünem, schwarzem oder dem speziellen Oolong oder Pu-Erh Tee verarbeitet²⁵. Man unterscheidet die klassischen Teesorten aufgrund ihrer Fermentationsstufen. Die Ernte der jungen Triebe nach der Vorgabe „two leaves and a bud“ erfolgt größtenteils manuell. Für die Herstellung von grünem Tee werden die Blätter mit Wasserdampf auf über 70°C erhitzt, evtl. gerollt und anschließend getrocknet. Bei der Erhitzung wird das Enzym Polyphenoloxidase inaktiviert, wodurch die enzymatische Fermentation gehemmt wird²⁶. Neben der Verwendung als Lebensmittel, besitzt Tee auch phytotherapeutische Bedeutung. Wässrige Extrakte, die aus den Blättern gewonnen werden, werden in der alternativen Medizin bspw. für die Behandlung von Bluthochdruck und Entzündungen eingesetzt²⁴.



Abbildung 2-53: *Camellia sinensis*, Theaceae (Brandt et al., 1887)

2.6.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Tee ist eine koffeinhaltige Pflanze. Die Gehalte an Koffein in Teeblättern liegen durchschnittlich zwischen 2 und 4% (Goto et al., 1996; Astill et al., 2001; Zuo et al., 2002; Perva-Uzunalić et al., 2006). In Ausnahmefällen kann der Gehalt auch auf 8% ansteigen. Die Dimethylxanthine Theobromin und Theophyllin kommen in Konzentrationen von entsprechend 0,6% und 0,06% vor (Lin et al., 1998). Biosynthese, Bioverfügbarkeit und

²⁴ Ross, 2007, S. 2

²⁵ Pizzorno und Murray, 2013, S. 627

²⁶ Nair, 2010, S. 827

relevante physiologische Wirkungen der Methylxanthine wurden in Kapitel 2.2.6 bereits behandelt.

Grüntee ist besonders reich an Catechinen, da diese durch die Hemmung des Fermentationsprozesses unverändert bleiben. Ihr Gehalt liegt zwischen 8 und 30% des Trockengewichts. Die in Abbildung 2-54 gezeigten Catechine können im Tee vorkommen, wobei (-)-Epigallocatechin-3-O-gallat (EGCG) die Hauptverbindung ist (Goto *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998; Astill *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Bonoli *et al.*, 2003; Perva-Uzunalić *et al.*, 2006; Sharangi, 2009). Die Biosynthese und PDE-Hemmung der Catechine wurden in Kapitel 2.3.3 behandelt.

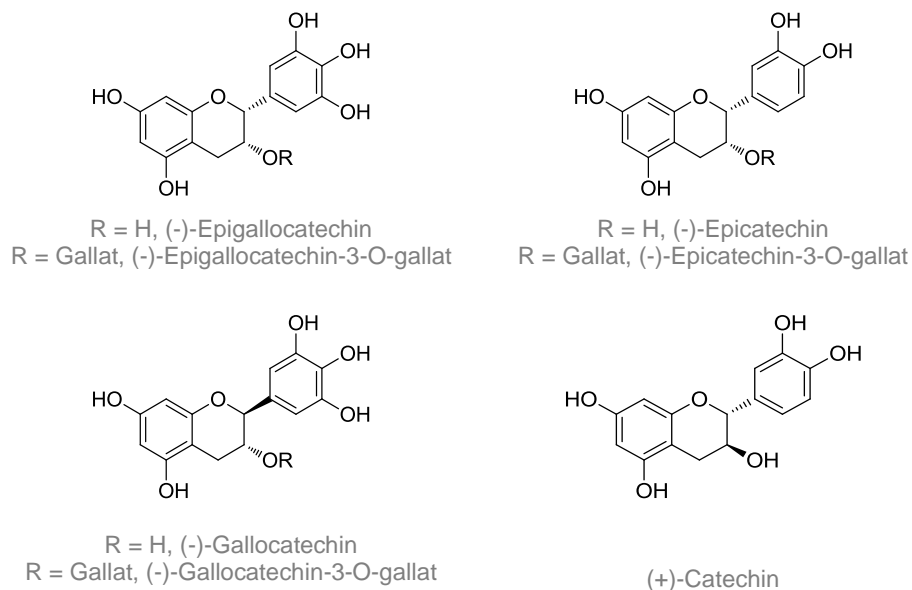


Abbildung 2-54: Catechine des Grüntees

Die Bioverfügbarkeit der Catechine unterliegt starken individuellen Schwankungen. Nicht galloylierte Catechine weisen intakte Bioverfügbarkeiten zwischen 1,2 und 3,3% auf, während die Galloylierung zu einer starken Abnahme der Bioverfügbarkeit führt. Der Großteil der verabreichten Dosen wurde in den Studien in Form von methylierten Catechinen mit oder ohne Phase-II-Konjugation mit Sulfat und Glucuronsäure wiedergefunden, mit Ausnahme von EGCG, welches im Plasma zu 77 - 90% in freier Form detektiert werden konnte. Mikrobielle Metabolite tauchen ebenfalls im Plasma und Urin auf und machen zwischen 6 und 39% der verabreichten Dosis aus (Manach *et al.*, 2005). Nach wässriger Extraktion und Aufreinigung mittels XAD-Material wird ein hoher Gehalt an Koffein und Catechinen im Grünteeextrakt erwartet.

2.6.3 Physiologische Wirkungen

Epidemiologische Studien zeigen, dass der Konsum von Grüntee mit einem verminderten Risiko von degenerativen Erkrankungen korreliert ist. Ein direkter Zusammenhang besteht

zwischen der im Durchschnitt täglich konsumierten Menge und der Gesamtmortalität, insbesondere durch koronare Herzkrankheit. Diesen Zusammenhang fand man in der sog. Ohsaki-Studie, einer prospektiven Kohorten-Studie mit 40.530 Japanern im Alter von 40 bis 79 Jahren (Kuriyama *et al.*, 2006). Hierbei spielen vermutlich antioxidative (Ruch *et al.*, 1989), antiinflammatorische (Lin und Lin, 1997; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Kürbitz *et al.*, 2011) und anti-thrombotische Effekte der Catechine eine große Rolle. Letztere Effekte resultieren aus einer Hemmung der Plättchenaktivierung durch Catechine in Verbindung mit einem erhöhten cAMP-Spiegel in den Plättchen (Kang *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2004; Ok *et al.*, 2012). Diese Tatsache gibt erste Hinweise auf den möglichen Mechanismus einer PDE-Hemmung.

2.7 Kinetik der Enzymhemmung

2.7.1 Grundlegende Enzymkinetik

Kompetitive, unkompetitive, nicht-kompetitive und gemischt-kompetitive Hemmungsprozesse von Enzymen können durch die Beschreibung mit kinetischen Parametern unterschieden werden. Grundlage hierfür sind die kinetischen Parameter der allgemeinen Enzymkinetik. Eine Enzymreaktion zwischen Enzym E und Substrat S kann beschrieben werden als 1) die reversible Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES und 2) die irreversible Bildung von Produkt P aus dem Komplex ES.



Abbildung 2-55: Reaktionsschema einsubstratiger Enzymkatalyse (Cheng und Prusoff, 1973).

Die Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung k_f und der Komplexlösung k_r sowie die Produktbildungskonstante k_{cat} stehen in direktem Zusammenhang zueinander (Chen *et al.*, 2010):

$$K_M \equiv \frac{k_r + k_{cat}}{k_f} \quad (1)$$

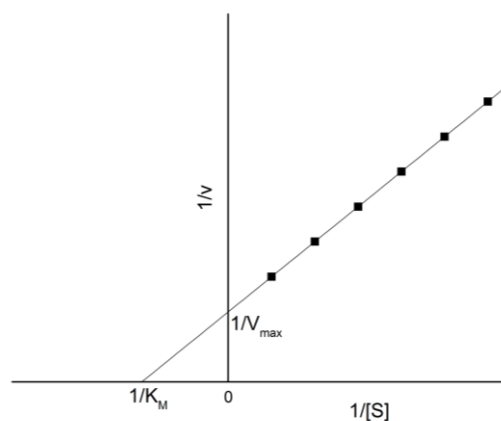


Abbildung 2-56: Lineweaver-Burk-Plot

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M wird experimentell bestimmt durch die Ermittlung der Produktbildungsrate v bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen $[S]$ mithilfe des Lineweaver-Burk-Plots (Bjornsson *et al.*, 2003). K_M entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler, gesättigter Bildungsrate $v_{1/2max}$ und wird bestimmt aus dem Schnittpunkt mit

der x-Achse ($1/K_M$). Die maximale Produktbildungsrate V_{max} kann aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse ($1/V_{max}$) bestimmt werden.

Der Zusammenhang zwischen Produktbildungsrate oder auch Geschwindigkeit v wird durch die Substratkonzentration S , die maximale Produktbildungsrate V_{max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M definiert (Cheng und Prusoff, 1973).

$$v = \frac{V_{max} S}{K_M + S} \quad (2)$$

Inhibitoren können durch unterschiedliche Mechanismen hemmend auf die Enzymaktivität wirken. Die Mechanismen der kompetitiven, unkompetitiven und nicht-kompetitiven Enzymhemmung lassen sich mit Michaelis-Menten-Parametern beschreiben. Nicht durch Michaelis-Menten-Parameter beschreibbare Mechanismen sind bspw. Kooperativität (Änderung der Substrataffinität durch Bindung eines Liganden), Enzymaktivierung oder Substratinhibition (Bjornsson *et al.*, 2003).

2.7.2 Kompetitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert das Substrat S mit dem Inhibitor I um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms bzw. steht die Bildung des Komplexes ES in direkter Konkurrenz zu der Bildung des Komplexes EI .

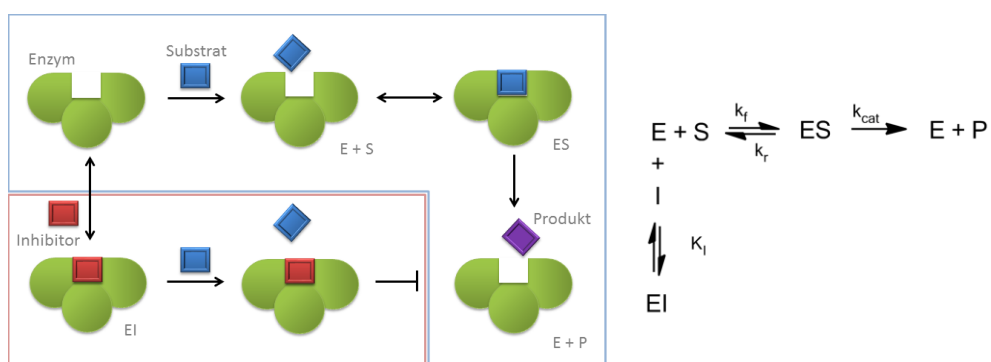


Abbildung 2-57: Schematische Darstellung der kompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)

Die Produktbildungsrate v_i hängt bei der kompetitiven Hemmung zusätzlich von der Inhibitorkomplexdissoziationskonstante K_i und der Inhibitorkonzentration I ab (Cheng und Prusoff, 1973).

$$v_I = \frac{V_{max} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (3)$$

Für eine kompetitive Hemmung kann der Zusammenhang von Dissoziationskonstante K_I , halbmaximaler, inhibitorischer Konzentration IC_{50} und der Michaelis-Menten-Konstante K_M wie folgt beschrieben werden (Cheng und Prusoff, 1973).

$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) \quad (4)$$

2.7.3 Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung geht der Inhibitor I als solcher erst Wechselwirkungen mit dem Enzym ein, wenn das Substrat gebunden ist, bzw. mit dem Komplex ES. Es wird ein neuer Komplex ESI gebildet.

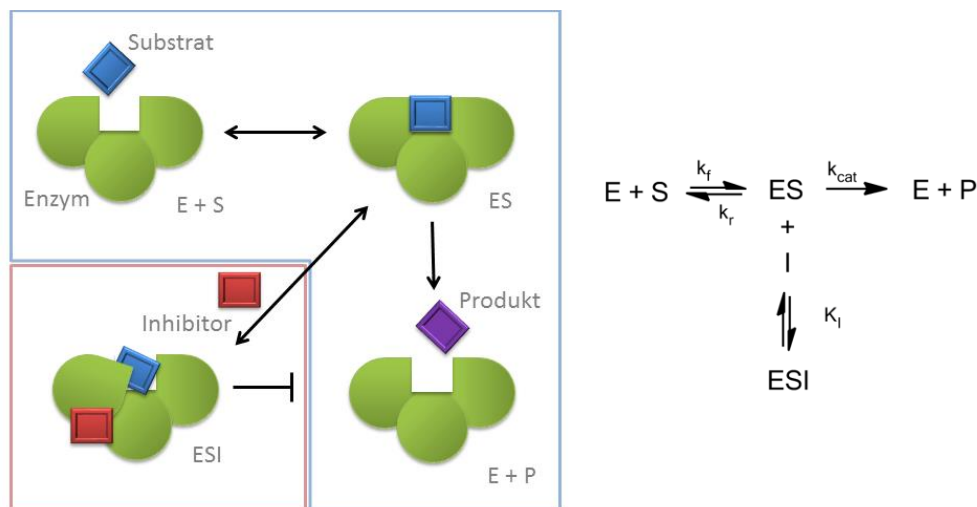


Abbildung 2-58: Schematische Darstellung der unkompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)

Für die Produktbildungsrate v_I und die daraus abgeleiteten Parameter gelten die gleichen Zusammenhänge wie für die kompetitive Hemmung (Cheng und Prusoff, 1973).

2.7.4 Nicht-kompetitive Hemmung

Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor I das Enzym E bspw. in allosterischer Position, was zu einer aktivitätssenkenden Konformationsänderung führt. Die nicht-kompetitive Hemmung kann in manchen Fällen rückgängig gemacht werden (bspw. Kinase oder Phosphatase), weshalb man sie häufig bei der post-translationalen Aktivitätsregulation aber auch bei Feedback-Mechanismen findet.

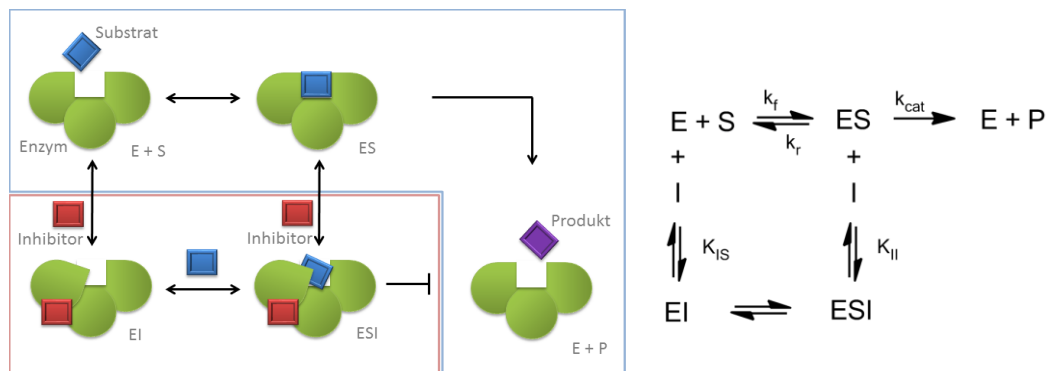


Abbildung 2-59: Schematische Darstellung der nicht-kompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)

Bei der allosterischen Hemmung muss für die Produktbildungsrate v_i die Dissoziationskonstante K_{IS} und K_{II} berücksichtigt werden (Cheng und Prusoff, 1973):

$$v_i = \frac{V_{max} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_{IS}}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_{II}}\right)} \quad (5)$$

Für die halbmaximale inhibitorische Konzentration ergibt sich somit folgendes (Cheng und Prusoff, 1973):

$$IC_{50} = \frac{K_M + S}{\frac{K_M}{K_{IS}} + \frac{S}{K_{II}}} \quad (6)$$

Zur Ermittlung des vorliegenden Hemmungsmechanismus zieht man den Lineweaver-Burk-Plot heran und kann aus der Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ für verschiedene $[I]$ den zugrundeliegenden Mechanismus ablesen. Die Geraden bei der kompetitiven Hemmung

haben einen Schnittpunkt oberhalb der x-Achse. Bei der unkompetitiven Hemmung haben die Geraden keinen Schnittpunkt, sind also parallel zueinander. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der x-Achse (s. Abbildung 2-60). Der Schnittpunkt dient außerdem der Bestimmung von K_i .

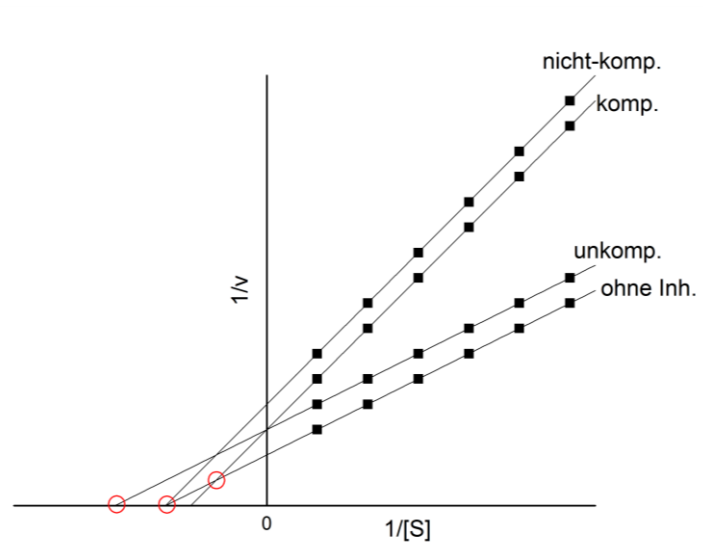


Abbildung 2-60: Lineweaver-Burk-Plot für unterschiedliche Hemmungsmechanismen und Inhibitorkonzentrationen.

3 Problemstellung

Die *second messenger* cAMP und cGMP vermitteln durch Signalkaskaden eine Vielzahl physiologischer Funktionen im Organismus wie z.B. die Gefäßkontraktion, Thrombozytenaktivierung sowie Reaktionen des Immunsystems. Neben Adenylat- und Guanylatzyklen regulieren Phosphodiesterasen (PDE) die intrazellulären Level dieser *second messenger*. PDE-Hemmstoffe führen zu einer Akkumulation der *second messenger* in der Zelle und besitzen antiinflammatorische, anti-hypertensive und anti-thrombotische Wirkungen. Als Arzneimittel werden PDE-Hemmstoffe daher u.a. als Vasodilatoren oder Antikoagulantien eingesetzt. Neben zahlreichen synthetischen PDE-Hemmstoffen sind eine Reihe natürlich vorkommender Hemmstoffe in Arzneipflanzen und Lebensmitteln, wie Methylxanthine, Flavonoide und Alkylpyrazine, bekannt. Eine PDE-Hemmung *in vivo* durch den Konsum eines Lebensmittels wurde bisher nur für Kaffee gezeigt. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass der langzeitige Konsum von Kaffee zu einer Abnahme der PDE-Aktivität in den Thrombozyten führte (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Dabei blieben die für diesen Effekt verantwortlichen Substanzen unbekannt. Eine Hemmung der PDE durch den Konsum eines Lebensmittels ist von besonderem Interesse für die alimentäre Prävention von Erkrankungen, insbesondere von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Im Rahmen dieser durch ein Promotionsstipendium der TU Kaiserslautern finanzierten Arbeit sollten im ersten Teil die PDE-hemmenden Substanzen in Kaffee identifiziert werden. Dies sollte zur Aufklärung der *in vivo* beobachteten, stark hemmenden Effekte auf die Thrombozyten-PDE durch langzeitigen Kaffeekonsum dienen. Hierzu wurde eine Aktivitätsgeleitete Fraktionierung angewandt. Dabei sollte ein ausgewählter Kaffee mit unterschiedlichen Methoden fraktioniert und die Fraktionen *in vitro* auf ihre PDE-hemmenden Eigenschaften getestet werden bis die verantwortlichen Substanzen identifiziert werden konnten. Bei der Auswahl des Kaffees sollte zusätzlich überprüft werden, welchen Einfluss die Röstung bzw. der Röstgrad und die Brühmethode auf das PDE-hemmende Potential besitzen. Weiterhin sollte der Einfluss des bekannten, jedoch schwachen PDE-Inhibitors Koffein überprüft werden. Dazu wurde ein entkoffeinierter Kaffee mit Koffein versetzt und im PDE-Assay getestet.

Weiterhin von Interesse für die vorliegende Arbeit waren Arzneipflanzen, die eine kulinarische Bedeutung besitzen. Artischocke ist eine Arznei- und Lebensmittelpflanze, die aufgrund ihrer gefäßerweiternden Effekte und ihres Inhaltsstoffprofils auf eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus hinweist. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb ein Artischockenextrakt auf PDE-hemmende Eigenschaften untersucht werden. Hierzu sollte ein Extrakt aus getrockneten Artischockenblättern hergestellt und auf PDE-hemmende Wirkung

in vitro getestet werden. Weiterhin sollten mittels Einzelsubstanz-Testung (Luteolin, Apigenin, Luteolin-glucosid, Luteolin-glucuronid) die ggf. PDE-hemmenden Inhaltsstoffe identifiziert und anschließend quantifiziert werden.

Zusätzlich für die vorliegende Arbeit von Interesse war Ingwer, welcher durch seine Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin bekannt ist. Antiinflammatorische und anti-thrombotische Effekte von Ingwer deuten neben anderen Wirkmechanismen auf eine PDE-Hemmung als einen möglichen Wirkmechanismus hin. Allerdings wurden weder Ingwerextrakte noch die Leitsubstanz [6]-Gingerol in früheren Studien als PDE-Hemmer identifiziert. Eine neuere *in silico* Studie bot Hinweise darauf, dass der Inhaltsstoff Demethoxy-[6]-shogaol PDE-hemmendes Potential besitzen könnte. Aufgrund der steigenden Verwendung von Ingwer in der westlichen Küche und als Nahrungsergänzungsmittel gilt es potentiell gesundheits-fördernde Eigenschaften zu untersuchen. Daher sollte im dritten Teil der Arbeit ein Ingwerextrakt aus getrocknetem Rhizom hergestellt und *in vitro* auf PDE-hemmende Eigenschaften getestet werden. Durch grobe Fraktionierung des Extraktes und Einzelsubstanztestung ([6]-Gingerol) sollten die PDE-hemmenden Inhaltsstoffe identifiziert werden.

Darüber hinaus war für die vorliegende Arbeit der Erdbeerbaum von Bedeutung. Es handelt sich dabei um eine Arzneipflanze, deren Zubereitungen in Marokko als traditionelles Heilmittel für die Behandlung von Bluthochdruck verwendet werden. Zusammen mit dem Inhaltsstoffprofil wurde auch hier eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus vermutet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein aus Früchten des Erdbeerbaumes hergestellter Extrakt sowie die Leitsubstanz Arbutin *in vitro* auf PDE-Hemmung getestet werden.

Eine weitere Arzneipflanze mit Hinweisen auf eine PDE-Hemmung ist Grüntee. Wässrige Extrakte des Grüntees zeigen ähnlich wie Ingwer antiinflammatorische und anti-thrombotische Effekte. Ein Wirkmechanismus, der mit einer PDE-Hemmung in Verbindung steht, erscheint für Teeextrakte wahrscheinlich. Zusätzlich enthält Tee den bekannten PDE-Hemmstoff Koffein. Daher sollte anschließend ein Grüntee-Extrakt nach Herstellung im PDE-Assay eingesetzt und auf seine PDE-hemmenden Eigenschaften hin untersucht werden.

Für alle Untersuchungen des Einflusses von Extrakten, Fraktionen und Einzelsubstanzen auf die PDE-Aktivität wurde ein Radioaktivitätsassay eingesetzt. Als geeignetes Zellsystem für die *in vitro* Testungen wurde die LXFL529L-Zelllinie verwendet. Sie zeichnet sich besonders aus durch eine hohe Expressionsrate der cAMP-spezifischen PDE-Familie 4. Sie ist hauptsächlich in Geweben vertreten, die sich durch eine starke Immunantwort auszeichnen, bspw. Lunge und Lymphozyten.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterial

Cryovials 2 ml	Greiner Bio One
Gewebekulturschalen Ø 10 cm	Greiner Bio One
HPLC-Vials / Inserts / Deckel	Buddeberg
Kaffeefilter	Filtropa
Membranfilter 0,45 µm PVDF	Pall
Membranfilter 0,45 µm Nylon	Restek, Machery Nagel
Monovette K ₂ -EDTA-Gel	Sarstedt
Multipettenspitzen	Eppendorf
Objektträger „Super Frost“	Roth
PP-Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio One
PP-Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio One
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio One
Rundfilter	Macherey-Nagel
Sterilfilter, Celluloseacetat, 0,2 µm	Sartorius
Well-Platten, 96-Well	Greiner Bio One
Zellschaber	Greiner Bio One
Zellkulturflasche „Nunclon Delta“	Nunc

4.1.2 Geräte

Autoklav 5075EL	Systemec
Axioskop	Zeiss
Biofreezer VIP Series	Sanyo
Brutschränke „CB 210 E3“	Binder
Gefriertrocknung „Alpha 1-4 LSC“	Christ
Feinwaage „210 S“	Sartorius
Feinwaage „410 S“	Sartorius
Feinwaage „CP 244S“	Sartorius

HPLC	siehe jeweiliges Kapitel
Kaffeefiltermaschine	TCM
Neubauer Zählkammer	Roth
Mikroskop „Primo Vert“	Zeiss
Multipetten	Eppendorf
pH Meter	Hanna Instruments
Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, 1000 - 5000 µl	Gilson, Eppendorf
Pipetten „Research pro“	Eppendorf
Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann Laborgeräte
Plattenlesegerät „Synergy 2“	Biotek
Rotavapor “CVC 3000”, “IKA RV 10 digital”, “IKA HB 10 digital”	Vacuubrand, VWR
Sterilbank „Biowizard Golden Line 2009“	Kojair
Sterilfiltrationsapparatur	Nalgene
Szintillationszähler „Tri Carb 2100 TR“	Packard
Szintillationszähler „Tri Carb 2200 CA“	Packard
Ultrafeinwaage “XP6U Comparator”	Mettler Toledo
Ultrazentrifuge „Sorvall Discovery 90 SE“	Thermo Scientific
Vakuumkonzentrator	Eppendorf
Vortex	Bender und Hobein
Wasserbad „SW 20C“	Julabo
Wasserbad G, Thermostat D3	Haake
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge Multifuge 1 L - R	Heraeus

4.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma Aldrich, Roth oder Merck in p.A. Qualität bezogen.

Acetonitril (HPLC Gradient Grade)	J.T. Baker
-----------------------------------	------------

Ameisensäure	Chem Solute
Bradford-Reagenz, 5x	BioRAD
BSA Standard (2 mg/ml)	Uptima Interchim
3-Caffeoylchinasäure	Eigensynthese
3-Caffeoylchinasäurelacton	Eigensynthese
[2,8- ³ H]-3',5'-cyclisches Adenosinmono- phosphatammoniumsalz, 1 Ci/ml	Hartmann Analytic
DAPI-Sulforhodamin101-Lösung	Partec
3,4-Dicaffeoylchinasäure	Eigensynthese
Fetales Kälberserum (Charge 199K)	Gibco Invitrogen
[6]-Gingerol	Phytolab
Isobutylmethylxanthin IBMX	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Alexis
Methanol (HPLC Gradient Grade)	J.T. Baker
Penicillin (5000 U/ml)	Gibco Invitrogen
Pepstatin A	Alexis
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alexis
RPMI 1640 + L-Gln	Gibco Invitrogen
Streptomycin (5000 µg/ml)	Gibco Invitrogen
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich
Trypsin 1:250 (bovine pancreas)	Serva
Rolipram	Calbiochem
Szintillationscocktail „Rotiszint Eco Plus“	Roth
XAD-16N	Sigma

4.2 Allgemeine Zellkultur

4.2.1 LXFL529L Zelllinie

Bei der „Lung Xenograft Fiebig Large 529 Linie“ handelt es sich um eine aus einem Xenograft Tumor eines großzelligen Lungenkarzinoms (LXFL 529) erhaltene permanente Zelllinie. Der Tumor entstammt einer 34-jährigen Patientin ohne regionalen Lymphknotenbefall und erkennbare Metastasenbildung. Die Überlebenszeit nach Tumorentnahme betrug 115 Tage. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. H. H. Fiebig (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Sie wird kultiviert in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin Zusatz, 10% fetales Kälberserum (FKS), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37°C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit.

4.2.2 Phosphodiesterase-Ausstattung von LXFL 529L und LXFL 529

Die Hauptaktivität der cAMP hydrolysierenden Phosphodiesterasen befindet sich im Cytosol. Wenig Aktivität befindet sich im Partikular. Im Xenograft Tumor LXFL 529 beträgt das Verhältnis von cytosolischer zu partikulärer Aktivität 80:20, in der Zelllinie LXFL 529L 88:12²⁷. Die mittels Anionenaustauschchromatographie ermittelte Isoenzymverteilung der cAMP-Phosphodiesterasen im Cytosol des Xenograft Tumors LXFL 529 zeigte, dass die Hydrolyse von cAMP zu 85% auf Familie 4, zu 9% auf Familie 1 und zu 6% auf Familie 3 der Phosphodiesterasen zurückgeht²⁸. Dies stimmt überein mit der prozentualen Hemmbarkeit der Phosphodiesterase-Aktivität durch Rolipram, einem PDE4-Inhibitor. Die Hemmbarkeit liegt beim Tumor bei 84% und bei der Zelllinie bei vergleichbaren 88%²⁹. Aufgrund dieser Tatsachen wird davon ausgegangen, dass die Isoenzymverteilung der Zelllinie vergleichbar mit dem Ursprungs-Xenograft-Tumor ist.

4.2.3 Mediumwechsel

Um ein optimales Wachstum und eine stabile Stoffwechselsituation für die Zellen zu gewährleisten, wird zwischen den Passagen das Medium gewechselt. Durch den Verbrauch oder Zerfall von Nährstoffen und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten durch die Zellen sinkt der pH-Wert des Mediums, was durch den Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators Phenolrot von rot nach gelb signalisiert wird³⁰.

Circa einmal pro Woche wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und je nach Flaschengröße 10 – 40 ml frisches, erwärmtes Medium hinzugefügt.

²⁷ Kunz, 2000, S. 70 ff

²⁸ Marko, 1994, S. 39

²⁹ Kunz, 2000, S. 71 f

³⁰ Lindl, 2013, S. 109

4.2.4 Subkultivieren - Passagieren

Wenn die Oberfläche der Kulturflasche keine freien Flächen mehr aufweist (Konfluenz), kommt es bei strikt adhärent wachsenden Zellen zu einer Abnahme der Proliferationsrate (Kontaktinhibition) bis zum vollständigen Einstellen der Proliferation. Daher sollte die Kultur vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert werden (Passagieren)³¹.

Die LXFL 529L Zellen wurden ab Erreichen von 80% Konfluenz passagiert, jedoch nicht öfter als einmal wöchentlich. Dazu wurde der Zellrasen mit erwärmtem PBS (5 ml, 37°C) abgespült um Mediumreste zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Trypsin (5 ml) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, in Medium (10 ml) resuspendiert, vereinzelt und in Verdünnung weiterkultiviert³².

4.2.5 Kryokonservierung

Nach Testung auf Mycoplasmenkontamination wurden Stocks von 10^6 /ml Zellen mit 10% DMSO bei -80°C eingefroren³³. Zum Reaktivieren wurden die Zellen rasch aufgetaut und in 9 ml Medium mit 20% FKS überführt. Nach Zentrifugation (800 x g, Raumtemperatur) wurde das DMSO enthaltende Medium entfernt und die Zellen in frischem Medium mit 20% FKS resuspendiert und in eine 25 cm² Flasche überführt und bei 37°C, 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Erreichen von 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in einer 75 cm² Flasche in Medium mit 10% FKS weiterkultiviert. Nach 4 Passagen wurden die Zellen zum PDE-Assay verwendet.

4.2.6 Zellzahlbestimmung und Viabilitätstest

Eine schnelle Methode zur Bestimmung der Viabilität ist das Anfärben mit Trypanblau. Tote Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau, da sie den Farbstoff nicht mehr aktiv ausschleusen können, während lebende Zellen noch in der Lage dazu sind und daher im Lichtmikroskop farblos erscheinen.

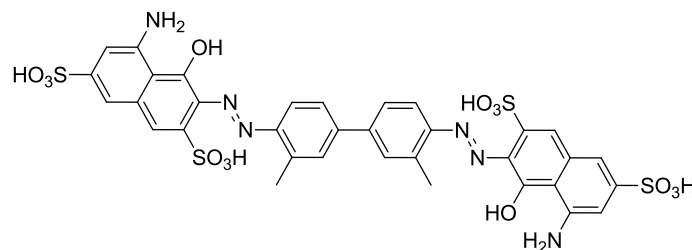


Abbildung 4-1: Trypanblau

Aus der mit Hilfe der Neubauerzählkammer ermittelten lebenden sowie toten Zellzahl pro ml lässt sich die Viabilität in % berechnen. Die beim Passagieren erhaltene Zellsuspension

³¹ Lindl, 2013, S. 110 f

³² Lindl, 2013, S. 115 f

³³ Lindl, 2013, S. 137 ff

wurde mit Trypanblau-Lösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Der Mittelwert der vier Eckquadrate multipliziert mit dem Neubauerfaktor (10.000) und dem Verdünnungsfaktor ergibt die Zellzahl pro ml Zellsuspension³⁴.

4.2.7 Test auf Mycoplasmenkontamination

Mycoplasmen sind die kleinsten, sich vermehrenden Prokaryonten. Eine Kontamination mit Mycoplasmen ist als kritisch anzusehen, da sie aufgrund ihrer Größe von 0,3 - 0,8 µm ohne spezielle Detektionsmethoden nicht erkennbar sind und somit eine Kontamination oft unerkant bleibt. Sie befallen Zellkulturen parasitär und greifen in den Stoffwechsel der Zellen ein. Dies kann zu verfälschten Ergebnissen der *in vitro* Tests führen. Durch das Fehlen einer rigiden Zellwand sind sie resistent gegen beta-Lactam Antibiotika (Drexler und Uphoff, 2002). Trotz Verwendung von Streptomycin im Medium muss regelmäßig auf einen Befall getestet werden. Eine schnelle Methode zur Identifizierung von Mycoplasmen ist das Anfärben der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), einem Interkalationsfarbstoff, mit dem sich die DNA im Fluoreszenzmikroskop blau erkennen lässt.

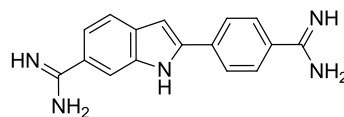


Abbildung 4-2: 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Mycoplasmen zeigen sich als blaue Punkte auf den Zellen³⁵. Um das Cytosol der Zellen hervorzuheben und die Detektion von Mycoplasmen zu erleichtern, kann man die Proteine des Cytosols mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin B rot färben.

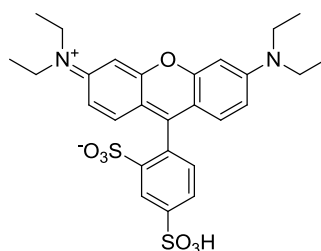


Abbildung 4-3: Sulforhodamin B

Monatlich wurde auf Mycoplasmenkontamination getestet. Dazu wurden einige Tropfen der Zellsuspension auf einen Super Frost Objektträger ausgestreut und für 24 – 48h im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in Methanol (-18°C) fixiert, mit einer Lösung von DAPI und Sulforhodamin B angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop auf Kontamination hin untersucht.

³⁴ Lindl, 2013, S. 122

³⁵ Lindl, 2013, S. 27 ff

4.2.8 Verwendete Lösungen

Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)

Für die Herstellung von PBS (10x) wurden 100 g NaCl, 16,83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g KCl, 2,5 g KH_2PO_4 in ca. 800 ml bidest. H_2O gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit bidest. H_2O auf 1 l aufgefüllt. PBS (1x) wurde aus der Stammlösung (10x) durch Verdünnung hergestellt.

Trypsin-EDTA

500 mg Trypsin, 250 mg EDTA und 100 ml PBS (10x) wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst und über Nacht auf Eis gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft (7,0 – 7,4), steril filtriert, aliquotiert (5 ml) und bei -20°C gelagert.

Fetales Kälberserum (FKS)

FKS (Charge 199K) wurde bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert, aliquotiert (50 ml) und bei -20°C gelagert.

4.3 cAMP-Phosphodiesterase Aktivitäts-Assay

4.3.1 Isolation der Phosphodiesterasen

Eine Million Zellen wurden in 10 cm Petrischalen ausgestreut und für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl eiskaltem Run III Puffer (2x, siehe Tabelle 4-2) abgeschabt. Die auf Eis vereinigte Zellsuspension wurde mittels Ultraschall auf Eis lysiert und die cytosolische Fraktion wurde durch Zentrifugation (4°C, 12.000 x g, 15 Minuten) vom Partikular getrennt. Die cytosolische Fraktion wurde mit Run III (2x) verdünnt und für den PDE-Assay eingesetzt. Ein Aliquot dieser Lösung wurde zur Proteinbestimmung nach Bradford bei -20°C zwischen gelagert.

4.3.2 cAMP-Phosphodiesterase-Aktivitäts-Assay

Die cAMP-Phosphodiesterase Aktivität wurde mittels eines modifizierten Radioassays (Pösch, 1971) bestimmt. Hierzu wurde eine bekannte Menge Tritium-markiertes cAMP mit der zu testenden Substanz und der cytosolischen Fraktion von LXFL529L Zellen in Triplikaten inkubiert (siehe Pipettierschema). Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass eine Hydrolyserate von 20 – 25% erreicht wurde. Anschließend wurde die Inkubation gestoppt und das Reaktionsprodukt der Hydrolyse, Tritium-markiertes AMP, durch aufeinander folgende Zugabe von je 250 µl ZnSO₄ und Ba(OH)₂ ausgefällt. Das im Überstand verbleibende Tritium-markierte cAMP konnte mittels Szintillationszähler bestimmt werden.

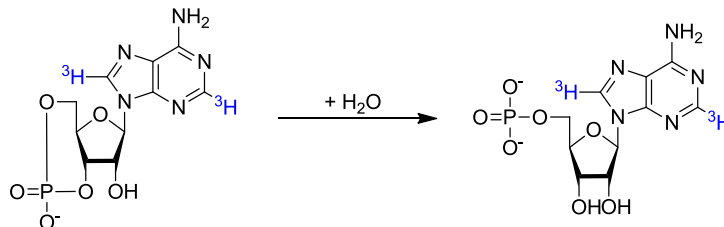


Abbildung 4-4: Hydrolyse von [2,8-³H]-cAMP zu [2,8-³H]-AMP

Die erhaltenen „counts per minute“ (cpm) sind proportional zur [2,8-³H]-cAMP Konzentration im Überstand und antiproportional zur Hydrolyserate. Zur Auswertung wurden alle Proben auf den Blank bezogen und daraus die Enzymaktivität in pmol cAMP pro Minute normalisiert auf den Proteingehalt des Zelllysats (siehe Kapitel 4.3.3) berechnet (*pmol cAMP / min x mg Protein*). Der T/C in % wurde erhalten indem die PDE-Aktivität der Testsubstanz auf die PDE-Aktivitätskontrolle bezogen wurde. Die Berechnung der IC₅₀ Werte erfolgte nach linearer Regression der Auftragung von Modulator-Konzentration gegen den T/C in %.

Tabelle 4-1: Pipettierschema PDE-Assay

	RUN III Proben¹	wässrige Proben²
Blank (Leerwert)	100 µl RUN III	50 µl RUN III 2x
	50 µl [³ H]-cAMP-Mix	50 µl H ₂ O 50 µl [³ H]-cAMP-Mix
Aktivitätskontrolle	50 µl RUN III	50 µl H ₂ O
	50 µl Zellysat (RUN III)	50 µl Zellysat (RUN III 2x)
	50 µl [³ H]-cAMP-Mix	50 µl [³ H]-cAMP-Mix
PDE-Modulator	50 µl Modulator (RUN III)	50 µl Modulator (H ₂ O)
	50 µl Zellysat (RUN III)	50 µl Zellysat (RUN III 2x)
	50 µl [³ H]-cAMP-Mix	50 µl [³ H]-cAMP-Mix

1: Proben, die kurz vor Verwendung aus Stocks (100% DMSO) mit RUN III Puffer auf einen Gehalt von 3% DMSO verdünnt werden können (Wasserlöslichkeit begrenzt) 2: Proben, die als wässrige Lösungen eingesetzt werden (DMSO-Löslichkeit begrenzt)

4.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die unterschiedlichen PDE-Aktivitäten untereinander vergleichen zu können, wurde nach dem Proteingehalt normalisiert. Hierzu wurde der Proteingehalt der cytosolischen Fraktionen mittels Bradford Assay bestimmt (Bradford, 1976). Der Bradford Assay nutzt die Proteinbindung an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, dessen Absorptionsmaximum sich durch die Bindung von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration der Probe und kann nach linearer Regression einer externen Kalibrierung (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/ml „bovine serum albumin“, BSA) berechnet werden. Zur Durchführung wurden 10 µl der cytosolischen Fraktion oder Standard BSA-Lösung in eine 96-Well Platte vorgelegt und mit 190 µl Bradford Reagenz (1x) angefärbt. Die Messung erfolgte mittels Plattenlesegerät bei 595 nm.

4.3.4 Verwendete Lösungen

Run III Puffer 2x

Der Run III Puffer wurde stets frisch hergestellt und bei 4°C gekühlt.

Tabelle 4-2: Run III Puffer 2x

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,4	100 mM
MgCl ₂	20 mM
EDTA	0,2 mM
Pepstatin A (DMSO)	2 µM
Leupeptin	2 µM
PMSF (DMSO)	1 mM
Benzamidin	10 mM
Trypsin Inhibitor	1 µM
β-Mercaptoethanol	1 mM

Run III Puffer 1x

Der Run III Puffer wurde stets frisch hergestellt und bei 4°C gekühlt.

Tabelle 4-3: Run III Puffer 1x

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,4	50 mM
MgCl ₂	10 mM
EDTA	0,1 mM
Pepstatin A (DMSO)	1 µM
Leupeptin	1 µM
PMSF (DMSO)	0,5 mM
Benzamidin	5 mM
Trypsin Inhibitor	0,5 µM
β-Mercaptoethanol	0,5 mM

cAMP Mix

Tabelle 4-4: cAMP Mix

Komponente	Konzentration
cAMP	3 µM
Tris/HCl pH 7,4	30 mM
MgCl ₂	9 mM
AMP	3 mM

Kurz vor Verwendung wurde dem cAMP Mix eine definierte Menge [2,8-³H]-cAMP zugegeben, siehe nachfolgende Tabelle.

Tabelle 4-5: Zugabe [2,8-³H]-cAMP

cAMP Mix	Zugabe [2,8-³H]-cAMP
5 ml	13 $\mu\text{Ci} \equiv 13 \mu\text{l}$
4,0 ml	10,4 $\mu\text{Ci} \equiv 10,4 \mu\text{l}$
3,75 ml	9,75 $\mu\text{Ci} \equiv 9,75 \mu\text{l}$
3,0 ml	7,8 $\mu\text{Ci} \equiv 7,8 \mu\text{l}$
2,5 ml	6,5 $\mu\text{Ci} \equiv 6,5 \mu\text{l}$
2,0 ml	5,2 $\mu\text{Ci} \equiv 5,2 \mu\text{l}$
1,25 ml	3,25 $\mu\text{Ci} \equiv 3,25 \mu\text{l}$
1,0 ml	2,6 $\mu\text{Ci} \equiv 2,6 \mu\text{l}$

Phosphate buffered saline (PBS)

siehe Kapitel 4.2.8

4.4 Aufarbeitung und Charakterisierung der Kaffees

Folgende Kaffees wurden für die Extrakterstellung verwendet. Ganze Bohnen wurden vor der Aufarbeitung zerkleinert. Rohkaffees wurden zusätzlich getrocknet.

Tabelle 4-6: Eigenschaften verwendeter Kaffees

Code	Röstgrad	Form	Mahlprozedur	Herkunft
K1, K2	medium	Pulver	-	Blend Mittel- und Südamerika
K3, K4	stark	ganze Bohnen	gewerbliche Mühle	unbekannt
Rohkaffee	-	ganze Bohnen	Mixer	Brasilien
Röstkaffee	medium	ganze Bohnen	Mixer	Brasilien
Rohkaffee (entkoffeiniert)	-	ganze Bohnen	Mixer	Kolumbien
Röstkaffee (entkoffeiniert)	medium	ganze Bohnen	Mixer	Kolumbien

4.4.1 Extrakterstellung K2, K4

Je 60 g Kaffeepulver wurden mit 1000 ml Wasser in einer handelsüblichen Kaffeefiltermaschine mit Papierfiltern zubereitet (6:45 Minuten Brühzeit). Das erhaltene Kaffeetränk wurde ohne Verzögerung auf Eis gekühlt, gefriergetrocknet und homogenisiert. Die Kaffeeextrakte wurden mittels HPLC-DAD und externer Kalibrierung hinsichtlich der Koffeingehalte untersucht (4.4.7).

4.4.2 Extrakterstellung K1, K3

Je 60 g Kaffeepulver wurden in eine sog. French Press („Chambord“, Bodum) vorgelegt und mit 1000 ml kochendem Wasser übergossen, gerührt und verschlossen. Nach 5 min Brühzeit wurde der Stempel zur Beendigung der Extraktion heruntergedrückt, das erhaltene Kaffeetränk ohne Verzögerung auf Eis gekühlt, gefriergetrocknet und homogenisiert. Die Kaffeeextrakte wurden mittels HPLC-DAD und externer Kalibrierung hinsichtlich der Koffeingehalte untersucht (4.4.7).

4.4.3 Extrakterstellung Roh- und Röstkaffee

Die Bohnen des Roh- und Röstkaffees wurden mithilfe eines handelsüblichen Mixers (Moulinette, Moulinex) zerkleinert und anschließend gefriergetrocknet. Je 12 g Kaffeepulver wurde mit 200 ml kochendem Wasser übergossen und für 5 min unter Rühren extrahiert. Anschließend wurde die Suspension über einen Büchnertrichter filtriert, gefriergetrocknet und homogenisiert. Die Kaffeeextrakte wurden mittels HPLC-DAD und interner Kalibrierung hinsichtlich der Koffeingehalte untersucht (4.4.7).

4.4.4 Extraktherstellung entkoffeinerter, rekoffeinerter Kaffee

Der entkoffeinierte Kaffee wurde analog 4.4.3 extrahiert und getrocknet. Zum Lösen des entkoffeinierten Kaffees für die Verwendung im PDE-Assay wurde H₂O und im Falle des rekoffeinierten Kaffees eine Lösung von 1500 µg/ml Koffein auf 30 mg Extrakt in H₂O verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils mit H₂O hergestellt.

4.4.5 Grobfraktionierung K2

Für die Fraktionierung wurde Kaffeeextrakt K2 gewählt. Die Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD und externer Kalibrierung hinsichtlich der Koffeingehalte (4.4.7) sowie der Kaffeeextrakt K2 mittels GC-MS mit Stabilisotopenverdünnung im „*selected ion monitoring*“-Modus (SIM) hinsichtlich der Alkylpyrazingehalte untersucht (Pickard *et al.*, 2013).

Lipidextrakt: 500 ml auf Eis gekühltes Kaffeegetränk wurden mit 4 x 200 ml Petrolether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und im Stickstoffstrom getrocknet.

Abtrennung unlöslicher Polymere und Lebensmittelmatrix (FN): Rekonstituierter Kaffee (2 g/l) wurde bei 100.000 x g, Raumtemperatur, 3 h ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt und beide Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Erhalten wurden so zwei Fraktionen, eine unlösliche (Pellet, FN) und eine lösliche (Überstand, FS) Fraktion.

4.4.6 Fraktionierung der löslichen Kaffeeextraktion

Die lösliche Fraktion (2 g/l) wurde mittels präparativer HPLC aufgetrennt. F0 wurde aufgesammelt bis zum Injektionspeak, danach erfolgte die Fraktionierung in Zeitintervallen von 3 Minuten. Insgesamt wurden in diesem ersten Lauf neun Fraktionen erhalten (siehe Abbildung 5-3). Da Fraktion 4 neben Koffein weitere physiologisch wirksame Verbindungen enthielt (4-CQA, 5-CQA), wurde F4 rechromatographiert und das Koffein abgetrennt (siehe Abbildung 5-4). Es wurden die Fraktionen 4a und 4b erhalten. Insgesamt wurden somit elf Fraktionen erhalten, von denen zehn im PDE-Assay getestet wurden. Die Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD und externer Kalibrierung hinsichtlich der Koffeingehalte untersucht.

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1361A
Pumpe:	G1361A Prep Pump
UV-Detektor:	G1315C DAD SL
Wellenlänge UV-Detektor:	270 nm, 325 nm
Säule:	Reposil 100 C18, 5 µm, 250 x 20 mm

Gradient:	siehe Abbildung 5-3
Fließmittel A:	0,1% Ameisensäure
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	10 ml
Software:	ChemStation for LC 3D Analysis

4.4.7 Subfraktionierung der Fraktion F8

Die Fraktion F8 (250 µg/ml) wurde mit den Parametern aus 4.4.6 subfraktioniert, wobei die zeitgesteuerte Fraktionierung von 24 bis 29 Minuten in 1-minütigen Schritten durchgeführt wurde, sodass insgesamt 5 Subfraktion erhalten wurden (s. Abbildung 5-9).

4.4.8 Hydrolyse der Fraktion F8

Die Hydrolyse der Fraktion F8 erfolgte in Anlehnung an (Mattila *et al.*, 2006). 1,7 mg F8 wurden in 1 ml H₂O bidest gelöst. Zuerst wurden 1,2 ml einer 1% Ascorbinsäure und 0,415% Na₂-EDTA haltigen Lösung hinzugegeben, dann 0,5 ml einer 10 molaren NaOH Lösung und über Nacht gerührt. Der pH-Wert des Ansatzes wurde mit Phosphorsäure auf pH = 2,2 eingestellt und anschließend mit 3 x 3 ml Diethylether/Ethylacetat (1:1) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 1,889 ml 3% DMSO aufgenommen und für den PDE-Assay verwendet sowie analog zu Fraktion 8 charakterisiert (0).

4.4.9 Ultrafiltration der Fraktion F8

Die Ultrafiltration von Fraktion F8 wurde in Anlehnung an (Delgado-Andrade und Morales, 2005) durchgeführt. 1 mg F8 wurden in 2 ml 1 molarer NaCl Lösung gelöst und in eine Ultrafiltrationseinheit vorgelegt (Vivaspin, 5ml, 3kDA, Sartorius). Nach einer ersten Zentrifugation (4000 *rcf*, 1 h, RT) wurde einmal mit 1 ml NaCl (1 M) gewaschen und zweimal mit je 1 ml H₂O bidest. (4000 *rcf*, je 1,5 h, RT). Das Filtrat wurde gefriergetrocknet und anschließend in frisch destilliertem Aceton (Siedepunkt 82°C) aufgenommen. Nicht gelöstes NaCl wurde durch Zentrifugation entfernt (20000 *rcf*, 30 min, RT), der Überstand im Stickstoffstrom getrocknet und in 10% Acetonitril aufgenommen und analog zu Fraktion 8 charakterisiert.

4.4.10 Darstellung N-Caffeoyltryptophan und N-p-Cumaroyltryptophan

Die Darstellung von N-p-Cumaroyltryptophan (**5**) und N-Caffeoyltryptophan (**10**) erfolgte nach Stark *et al.* (2006) sowie Stark und Hofmann (2005) mit marginalen Veränderungen.

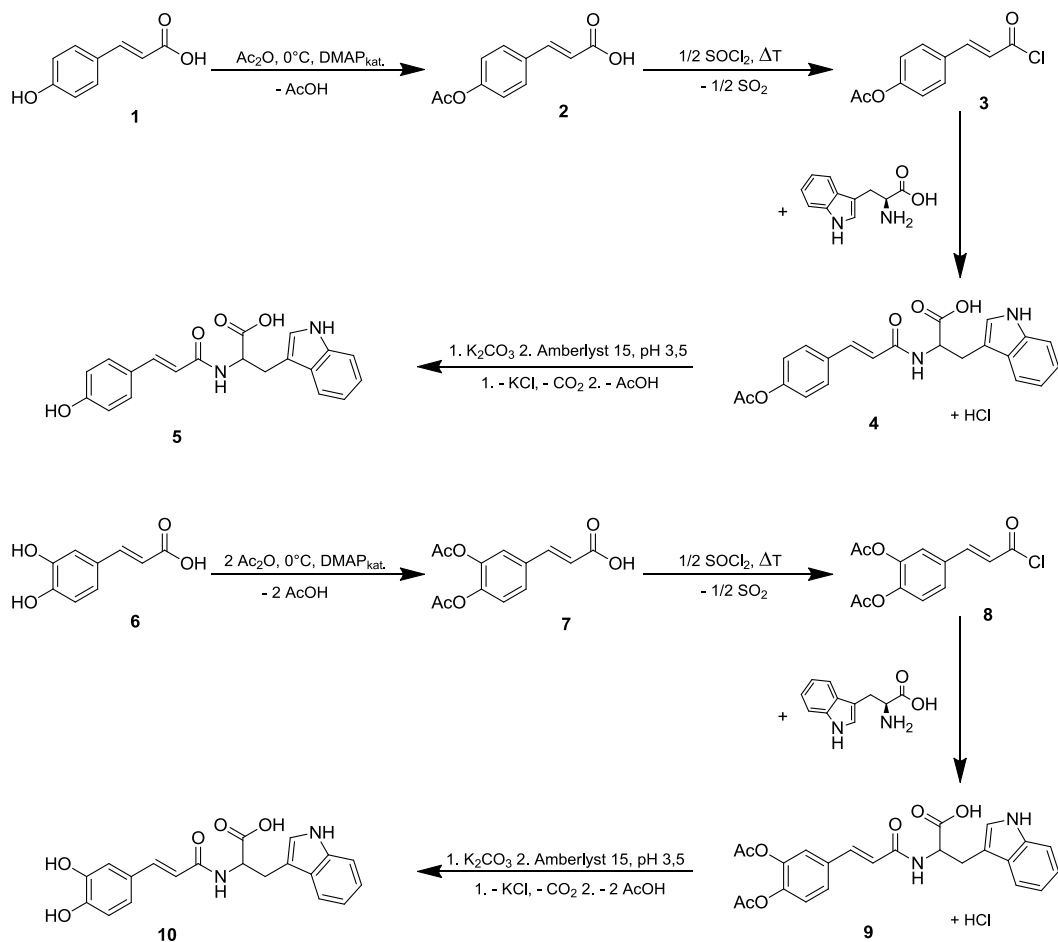


Abbildung 4-5: Syntheseroute für N-Cumaroyltryptophan und N-Caffeoyltryptophan. DMAP: 4-(Dimethylamino)-pyridin, Ac₂O: Essigsäureanhydrid, AcOH: Essigsäure.

Schritt 1 (Acetylierung): 6,25 mmol Essigsäureanhydrid (Ac₂O) wurden langsam zu einer Lösung von p-Cumarsäure (1) oder Kaffeesäure (6) (2,5 mmol) in 5 ml Pyridin (über NaOH getrocknet) mit 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP, katalytische Menge) gegeben und die Mischung für 1 h auf Eis gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Eis gestoppt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (2 M) auf 2,0 eingestellt. Anschließend wurde insgesamt dreimal mit je 50ml Ethylacetat/Tetrahydrofuran (3:1 v/v) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum (40°C) entfernt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (Acetoxycimtsäure 2, 7).

Schritt 2 (Chlorierung): 1 mmol der Acetoxycimtsäure aus Schritt 1 gelöst in 3 ml Tetrahydrofuran (THF, getrocknet) wurden mit 200 µl frisch destilliertem Thionylchlorid (SOCl₂, Siedepunkt 75°C) unter Rückfluss erhitzt bis keine SO₂ Entstehung mehr beobachtet werden konnte (Blasenzähler). Nach Abkühlen des Ansatzes wurde das Lösungsmittel im Vakuum (40°C) entfernt. Erhalten wurde ein farbloser Feststoff (Acetoxycimtsäurechlorid 3, 8).

Schritt 3 (Nukleophile Substitution): Zu dem getrockneten Ansatz aus Schritt 2 wurde 1 mmol L-Tryptophan in 30 ml getrocknetem THF zugegeben und für 24-72 h abhängig von der Bildungsrate des Produktes bei RT gerührt (Reaktionskontrolle). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum (40°C) entfernt. Erhalten wurde ein gelb-rötlicher Feststoff (N-(Acetoxycinnamoyl)-tryptophan **4, 9**).

Schritt 4 (Deacetylierung): Der Rückstand aus Schritt 3 wurde in 0,25 M K₂CO₃ in H₂O (20 ml) aufgenommen und für 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurde equilibriertes Amberlyst 15 (Kationentauscherharz) bis zu einem pH-Wert von 3,5 hinzugegeben. Die Lösung wurde filtriert und Amberlyst 15 im Filter nochmals mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde in der Gefriertrocknung getrocknet (-50°C, 0,470 mbar). Es wurde ein hellbrauner Feststoff erhalten (N-(Hydroxycinnamoyl)-tryptophan), **5, 10**).

Schritt 5 (Aufreinigung): Die Aufreinigung erfolgte an der präparativen HPLC. Hierzu wurde der erhaltene hellbraune Feststoff in einer Konzentration von 7 mg/ml in H₂O gelöst und mit den folgenden Parametern aufgereinigt. Acetonitril wurde im Vakuum (40°C) entfernt bevor der wässrige Rückstand gefriergetrocknet wurde (-50°C, 0,470 mbar).

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1361A
Pumpe:	G1361A Prep Pump
UV-Detektor:	G1315C DAD SL
Wellenlänge UV-Detektor:	260 nm
Säule:	Reposil 100 C18, 5 µm, 250 x 20 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-7
Fließmittel A:	0,1% Ameisensäure
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	10 µl
Software:	ChemStation for LC 3D Analysis
Retentionszeiten:	CuW ca. 19 min; CaW ca. 17 min.

Tabelle 4-7: HPLC-Gradientenprofil präparativ CaW/CuW

Schritt	Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Flow (ml/min)
0	0	75,0	25	8,0
1	15,0	50,0	50	8,0
2	16,0	2,0	98	8,0
3	18,0	2,0	98	8,0
4	19,0	75,0	25	8,0
5	22,0	75,0	25	8,0

Tabelle 4-8: Profil des Fraktionensammlers für die präparative Aufreinigung von CaW und CuW

Zeit (min)	Modus	Slices
0	off	-
10,0	time based	0,5 min
22,0	off	-

Die Fraktionen mehrerer Durchgänge wurden jeweils vereint, Acetonitril im Vakuum entfernt und der wässrige Rückstand in der Gefriertrocknung getrocknet. Die Charakterisierung erfolgte mittels HPLC-MS (4.4.12) und ¹H-NMR.

4.4.11 Charakterisierung der Kaffeeextrakte und Fraktionen mittels HPLC-DAD

Zur Bestimmung der Koffeinkonzentrationen in den Kaffeeextrakten und Fraktionen wurde eine HPLC-UV/Vis Methode mit externer Kalibrierung angewendet.

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1312B
Degasser:	G1379B
Pumpe:	G1312B Bin-Pump SL
Autosampler:	G1317C HIP-ALS, 4°C
UV-Detektor:	G1315
Wellenlänge UV-Detektor:	270 nm, 325 nm, 280 nm, 260 nm
Säulenofen:	G1316B TCC SL
Säule:	Phenomenex Synergie 4u polar RP 80 Å, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-9
Fließmittel A:	0,1% Ameisensäure
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	20 µl

Software:	ChemStation
LOD	0,04 µg/ml
LOQ	0,1 µg/ml

Tabelle 4-9: HPLC-Gradientenprofil Charakterisierung Kaffee, Kaffeeextrakte und Fraktionen

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,01	0,8	98,0	2,0
1	5,0	0,8	88,0	12,0
2	20,0	0,8	70,0	30,0
3	21,0	0,8	10,0	90,0
4	24,0	0,8	10,0	90,0
5	25,0	0,8	98,0	2,0
6	29,0	0,8	98,0	2,0

4.4.12 Strukturaufklärung der Fraktionen F7 und F8 mit HPLC-ESI-MS/MS

Zur Strukturaufklärung der Fraktionen wurden Fraktion F7 und Fraktion F8 in einer Konzentration von 1 mg/ml in Acetonitril : 0,1% Ameisensäure = 10 : 90 gelöst und membranfiltriert. Die Geräteparameter können aus Tabelle 4-9 und Tabelle 4-10 entnommen werden.

Massenspektrometer:	PE Sciex API 2000 Triple Quad
Ionisationsmethode:	Turbo Spray (ESI)
Degasser:	PE Series 200 Vacuum Degasser
Pumpe A / B:	PE Series 200 Micro Pump
Autosampler:	PE Series 200 Autosampler
UV-Detektor:	PE 785A UV/VIS Detektor
Wellenlänge UV-Detektor:	260 nm
Säule:	Phenomenex Synergie 4u polar RP 80 Å, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-10
Fließmittel A:	0,1% Ameisensäure
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	50 µl
Software:	Analyst 1.4.2

Tabelle 4-10: HPLC-Gradientenprofil der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,1	0,8	90,0	10,0
1	9,0	0,8	90,0	10,0
2	10,0	0,8	75,0	25,0
3	19,0	0,8	75,0	25,0
4	34,0	0,8	50,0	50,0
5	35,0	0,8	2,0	98,0
6	40,0	0,8	2,0	98,0
7	41,0	0,8	90,0	10,0
8	45,0	0,8	90,0	10,0

Tabelle 4-11: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen im Q1-Scan-Modus

	ESI positiv	ESI negativ
Curtain Gas N ₂ (psi)	20	20
Ionisationsspannung (V)	4700	-4500
Temperatur (°C)	450	450
Nebulizer Gas (psi)	30	30
Turbo Heater Gas (psi)	30	30
Interface Heater	on	on
Declustering Potential (V)	50	-50
Focusing Potential (V)	340	-340
Entrance Potential (V)	10,50	-10,50
Scanbereich (amu)	100 - 700	100-700

Tabelle 4-12: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen im MS²-Modus

	ESI positiv	ESI negativ
Curtain Gas N ₂ (psi)	20	20
Ionisationsspannung (V)	4700	-4500
Temperatur (°C)	450	450
Nebulizer Gas (psi)	30	30
Turbo Heater Gas (psi)	30	30
Interface Heater	on	on
Declustering Potential (V)	50	-50
Focusing Potential (V)	340	-340
Entrance Potential (V)	10,5	-10,50
Collision-activated Dissociation Gas (units)	2	2
Collision Cell Entrance Potential (V)	12-30	-10-20
Collision Energy (V)	30	-30

4.5 Aufarbeitung und Charakterisierung der Artischocke

4.5.1 Extrakterstellung aus Artischockenblättern (ALE)

12,3 g getrocknete Artischockenblätter (*Cynarae folium* von *Cynara scolymus* L., Asteraceae, Redwood, ApoFit, Bamberg, Deutschland, LOT 01160-033) wurden mit 300 ml Methanol (60%) homogenisiert und für 3 h bei Raumtemperatur unter Rühren extrahiert. Die Suspension wurde filtriert, das Methanol im Vakuum bei 40°C entfernt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet (-50°C, 0,470 mbar). Der erhaltene Extrakt wurde homogenisiert (*artichoke leaf extract*, ALE).

4.5.2 Strukturaufklärung des Artischockenextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS

Der Artischockenblätterextrakt ALE wurde in 15% Methanol gelöst (900 µg/ml) und zur Strukturaufklärung der Hauptkomponenten mittels HPLC-ESI-MS/MS mit den Parametern aus Kapitel 4.4.11 vermessen.

4.5.3 Charakterisierung des Artischockenextraktes mittels HPLC-DAD

Die Konzentration an Dicafeoylchinasäure (DiCQA) im ALE wurde mittels interner Kalibrierung mit Koffein bestimmt. Standards wurden in 15% MeOH gelöst. Alle DiCQA Isomere wurden als 3,4-DiCQA bestimmt. Die Parameter der HPLC-UV/Vis Methode sind Kapitel 4.4.11 zu entnehmen.

Der Gehalt an Luteolin-7-O-glucosid und -glucuronid wurde durch eine Methode mit folgenden Parametern bestimmt:

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1312B
Degasser:	G1379B
Pumpe:	G1312B Bin-Pump SL
Autosampler:	G1317C HIP-ALS, 4°C
UV-Detektor:	G1315
Wellenlänge UV-Detektor:	270 nm, 347 nm
Säulenofen:	G1316B TCC SL
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18(2) 1000 Å, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-13
Fließmittel A:	H ₂ O / Methanol / HCOOH: 74,7 / 25 / 0,3 (v/v/v)
Fließmittel B:	Acetonitril / HCOOH: 99,7 / 0,3 (v/v)
Injektionsvolumen:	50 µl

Software: ChemStation
LOD: 0,08 µg/ml
LOQ: 0,3 µg/ml

Tabelle 4-13: HPLC-Gradientenprofil der Quantifizierung von Luteolin-Glykosiden in Artischockenextrakt mittels HPLC-DAD

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,1	0,5	100	0
1	8,0	0,5	100	0
2	38,0	0,5	0	100
3	44,0	0,5	0	100
4	48,0	0,5	100	0
5	54,0	0,5	100	0

4.6 Aufarbeitung und Charakterisierung des Ingwers

4.6.1 Kommerzieller Extrakt (GRE)

Die Truw Arzneimittel GmbH (Gütersloh, Deutschland) stellte freundlicherweise einen Extrakt von Ingwerrhizomen (*Rhizoma zingiberis* von *Zingiber officinalis* Roscoe, Zingiberaceae, LOT 431018) zur Verfügung, der durch Extraktion mit überkritischem CO₂ gewonnen wurde (*ginger rhizome extract*, GRE). Für analytische Messungen wurde der GRE in Methanol gelöst (0,5 mg/ml), für die Messung im PDE-Assay in 3% DMSO mit 0,04% Triton X100.

4.6.2 Extraktherstellung aus Ingwerpulver (GPE)

6 g getrockneter, pulverisierter Ingwer (Ostmann Gewürze, Dissen a T.W., Deutschland, *Zingiber officinalis* Rosc. Zingiberaceae, LOT 3326AB) wurden in 200 ml H₂O gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die nicht gelöste Matrix abfiltriert, die Lösung gefriergetrocknet und homogenisiert. Der so hergestellte Extrakt (*ginger powder extract*, GPE) lieferte eine Ausbeute von 1,6 g.

4.6.3 Fraktionierung des Ingwerpulverextraktes (GPE)

530,6 mg des Ingwerpulverextraktes GPE wurden in 50 ml H₂O gelöst und der pH-Wert mit Ameisensäure auf 3,0 eingestellt. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO₄ getrocknet, das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Von der wässrigen Fraktion (*ginger watery extract*, GWE) wurden ca. 95% des Ausgangsmaterials erhalten, von der organischen Fraktion (*ginger lipid extract*, GLE) wurden ca. 5% des Ausgangsmaterials erhalten.

4.6.4 Strukturaufklärung der Ingwerextrakte mittels HPLC-ESI-MS

Die Strukturaufklärung der einzelnen Gingerol- und Shogaolverbindungen in den Extrakten erfolgte mittels HPLC-ESI-MS im Q1 Modus. Die HPLC-Methode wurde aus der Literatur übernommen (He *et al.*, 1998). Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand des Vergleichs der bereits im Q1-Modus auftretenden Fragmente und Retentionsindices mit Literaturdaten (Jiang *et al.*, 2005).

Massenspektrometer:	PE Sciex API 2000 Triple Quad
Ionisationsmethode:	Turbo Spray (ESI)
Degasser:	PE Series 200 Vacuum Degasser
Pumpe A / B:	PE Series 200 Micro Pump
Autosampler:	PE Series 200 Autosampler

UV-Detektor:	PE 785A UV/VIS Detektor
Wellenlänge UV Detektor:	280 nm
Säule:	Waters Symmetry C18 5 µm, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-14
Fließmittel A:	H ₂ O
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	25 µl
Software:	Analyst 1.4.2

Tabelle 4-14: HPLC-Gradientenprofil der Identifizierung und Quantifizierung der Gingerole in Ingwerextrakten

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,1	0,4	55,0	45,0
1	12,0	0,4	50,0	50,0
2	25,0	0,4	35,0	65,0
3	45,0	0,4	0	100,0
4	55,0	0,4	0	100,0
5	60,0	0,4	55,0	45,0
6	70,0	0,4	55,0	45,0

Tabelle 4-15: MS-Geräteparameter zur Identifizierung der Gingerole in Ingwerextrakten im Q1-Scan-Modus

ESI positiv	
Curtain Gas N ₂ (psi)	20
Ionisationsspannung (V)	4700
Temperatur (°C)	450
Nebulizer Gas (psi)	30
Turbo Heater Gas (psi)	45
Interface Heater	on
Declustering Potential (V)	41
Focusing Potential (V)	370
Entrance Potential (V)	12
Scanbereich (amu)	100 - 700

4.6.5 Charakterisierung der Ingwerextrakte mittels HPLC-DAD

Zur Bestimmung der Gingerol- und Shogaolkonzentrationen in den Ingwerextrakten wurde eine HPLC-UV/Vis Methode mit interner Kalibrierung angewendet. Sämtliche Analyte wurden als [6]-Gingerol bestimmt. Als interner Standard wurde 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure verwendet. Alle Standards wurden in Methanol gelöst.

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1312B
Degasser:	G1379B
Pumpe:	G1312B Bin-Pump SL
Autosampler:	G1317C HIP-ALS, 4°C
DAD-Detektor:	G1315
Wellenlänge UV-Detektor:	230 nm
Säulenofen:	G1316B TCC SL
Säule:	Waters Symmetry C18 5 µm, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-14
Fließmittel A:	H ₂ O
Fließmittel B:	Acetonitril
Injektionsvolumen:	8 µl
Software:	ChemStation
LOD:	0,3 µg/ml
LOQ:	0,9 µg/ml

4.7 Aufarbeitung und Charakterisierung der Erdbeerbaumfrüchte

4.7.1 Extrakterstellung aus Erdbeerbaumfrüchten (SFE)

91 g der reifen *Arbutus unedo* L., Ericaceae, Früchte (geerntet Oktober, 2014, Najac, Südfrankreich) wurden zerkleinert und für 4 h bei Raumtemperatur mit Methanol/H₂O/Ameisensäure (60/38/2, v/v/v) extrahiert, filtriert und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 100 ml 2% Ameisensäure aufgenommen und an einer XAD16N-Säule (Bettvolumen 50 ml) von Zuckern und Säuren entfernt. Die Phase wurde zu Beginn mit 500 ml 2% Ameisensäure äquilibriert. Nach Aufgabe der Probe (33 ml) wurden Zucker, Salze und organische Säuren durch Spülen mit 300 ml 2% Ameisensäure entfernt. Im Anschluss wurde der aufgereinigte Extrakt mit 300 ml 90% Ethanol von der Säule eluiert. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet und homogenisiert (Ausbeute 0,7g).

4.7.2 Strukturaufklärung des Erdbeerbaumextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die Hauptkomponente des Erdbeerbaumextraktes (SFE) Theogallin wurde mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert. Dazu wurde der Extrakt in 50% Methanol gelöst (1 mg/ml) und die Precursor Masse der im UV Chromatogramm identifizierten Hauptkomponente bestimmt. Anschließend erfolgte die Fragmentierung und Identifizierung der Komponente mittels LC-ESI-MS/MS im *Product Ion Scan* Modus (MS²-Modus). Der Gradient wurde von Cui *et al.* (2005) übernommen und entsprechend angepasst. Gradient und MS-Geräteparameter sind in Tabelle 4-16 und Tabelle 4-17 dargestellt.

Massenspektrometer:	PE Sciex API 2000 Triple Quad
Ionisationsmethode:	Turbo Spray (ESI)
Degasser:	PE Series 200 Vacuum Degasser
Pumpe A / B:	PE Series 200 Micro Pump
Autosampler:	PE Series 200 Autosampler
UV-Detektor:	PE 785A UV/VIS Detektor
Wellenlänge UV-Detektor:	280 nm
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-16
Fließmittel A:	0,04% Ameisensäure
Fließmittel B:	Methanol
Injektionsvolumen:	20 µl
Software:	Analyst 1.4.2

Tabelle 4-16: HPLC-Gradientenprofil der Identifizierung der Hauptkomponente des Erdbeerbaumextrakts und Quantifizierung von Arbutin

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,1	0,6	98,0	2,0
1	3,0	0,6	98,0	2,0
2	4,0	0,6	75,0	25,0
3	11,0	0,6	75,0	25,0
4	16,0	0,6	50,0	50,0
5	26,0	0,6	20,0	80,0
6	33,0	0,6	20,0	80,0
7	35,0	0,6	98,0	2,0
8	40,0	0,6	98,0	2,0

Tabelle 4-17: MS-Geräteparameter zur Identifizierung der Hauptkomponente des Erdbeerbaumextrakts im MS²- und Q1-Scan-Modus

	ESI negativ
Curtain Gas N ₂ (psi)	20
Ionisationsspannung (V)	-4500
Temperatur (°C)	450
Nebulizer Gas (psi)	30
Turbo Heater Gas (psi)	30
Interface Heater	on
Declustering Potential (V)	-50
Focusing Potential (V)	-340
Entrance Potential (V)	-10,5
Collision-activated Dissociation Gas (units)	2
Collision Cell Entrance Potential (V)	-16,15
Collision Energy (V)	-30
Scanbereich Q1 (amu)	100 - 600
Scanbereich MS 2 (amu)	50 - 400

4.7.3 Charakterisierung des Erdbeerbaumextraktes mittels HPLC-DAD

Die Methode zur Quantifizierung von Arbutin im Erdbeerbaumextrakt wurde von Cui *et al.* (2005) übernommen und entsprechend angepasst. Die Quantifizierung erfolgte mit HPLC-DAD. Der Gradient der HPLC-Methode kann Tabelle 4-16 entnommen werden.

System:	Agilent Technologies 1200 Series
Model:	G1312B
Degasser:	G1379B
Pumpe:	G1312B Bin-Pump SL

Autosampler:	G1317C HIP-ALS, 4°C
DAD-Detektor:	G1315
Wellenlänge UV-Detektor:	230 nm
Säulenofen:	G1316B TCC SL
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe Tabelle 4-16
Fließmittel A:	0,04% Ameisensäure
Fließmittel B:	Methanol
Injektionsvolumen:	20 µl
Software:	ChemStation
LOD:	0,1 µg/ml
LOQ:	0,5 µg/ml

4.8 Aufarbeitung und Charakterisierung des Grüntees

4.8.1 Extrakterstellung aus Grünteeblättern (TXE)

Getrocknete *Camellia sinensis* L., Theaceae, Blätter (Bio Grüntee Gunpowder, Alnatura, Bickenbach, Deutschland, LOT 65651) wurden zerkleinert und für 5 min unter Rühren mit 300 ml nicht mehr siedendem H₂O extrahiert. Nach Filtration wurden 100 ml dieser Lösung mittels XAD16N aufgereinigt. Hierzu wurde das Material in der Säule (Bettvolumen 50 ml) mit 500 ml H₂O äquilibriert und mit 50 ml der Teelösung beladen. Zucker, Salze und organische Säuren wurden mit 300 ml Wasser eluiert, der verbleibende Extrakt wurde mit 150 ml 90% Ethanol eluiert. das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der wässrige Rückstand wurde gefriergetrocknet und homogenisiert. Die Ausbeute des TXE (*tea XAD extract*) betrug 0,8 g.

4.8.2 Strukturaufklärung des Grünteeextraktes mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die Strukturaufklärung der im Grünteeextrakt vorkommenden Catechine wurde mittels LC-ESI-MS(/MS) durchgeführt. Hierzu wurde der TXE in 50% Methanol gelöst (1 mg/ml) und mit den folgenden Parametern gemessen. Die Identifizierung der Catechine erfolgte durch Literaturvergleich der Precursor und Fragment Massen sowie des Retentionsindexes. Die Parameter wurden teilweise von (Bonoli *et al.*, 2003) übernommen.

Massenspektrometer:	PE Sciex API 2000 Triple Quad
Ionisationsmethode:	Turbo Spray (ESI)
Degasser:	PE Series 200 Vacuum Degasser
Pumpe A / B:	PE Series 200 Micro Pump
Autosampler:	PE Series 200 Autosampler
UV-Detektor:	PE 785A UV/VIS Detektor
Wellenlänge UV-Detektor:	270 nm
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18, 250 x 4,6 mm
Gradient:	siehe
Fließmittel A:	H ₂ O / Methanol / HCOOH: 74,7 / 25 / 0,3 (v/v/v)
Fließmittel B:	Acetonitril / HCOOH: 99,7 / 0,3 (v/v)
Injektionsvolumen:	20 µl, 40 µl
Software:	Analyst 1.4.2

Tabelle 4-18: HPLC-Gradientenprofil zur Identifizierung der Catechine in Grünteeextrakt mittels HPLC-ESI-MS/MS

Schritt	Zeit (min)	Flow (ml/min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	0,1	0,5	100,0	0
1	8,0	0,5	100,0	0
2	32,0	0,5	0	100,0
3	38,0	0,5	0	100,0
4	42,0	0,5	100,0	0
5	48,0	0,5	100,0	0

Tabelle 4-19: MS-Geräteparameter der Identifizierung der Catechine in Grünteeextrakt TXE im MS²- und Q1-Scan-Modus

	ESI positiv
Curtain Gas N ₂ (psi)	20
Ionisationsspannung (V)	5500
Temperatur (°C)	450
Nebulizer Gas (psi)	30
Turbo Heater Gas (psi)	30
Interface Heater	on
Declustering Potential (V)	61
Focusing Potential (V)	370
Entrance Potential (V)	12
Collision-activated Dissociation Gas (units)	5
Collision Cell Entrance Potential (V)	14
Collision Energy (V)	21
Scanbereich Q1 (amu)	100 - 600
Scanbereich MS ² (amu)	100 - 400

4.8.3 Charakterisierung des Grünteeextraktes mittels HPLC-UV/Vis

Die Quantifizierung von Koffein im Grünteeextrakt TXE erfolgte analog der Quantifizierung in Kaffee wie in Kapitel 4.4.11 beschrieben.

Die Quantifizierung der Catechine in TXE erfolgte qualitativ anhand der Flächenverhältnisse der MS²-Messungen mit HPLC-ESI-MS/MS.

4.9 Deskriptive Statistik und Berechnungen

4.9.1 Untersuchung der Varianzen

Die Varianzanalyse erfolgte mittels einseitigem Zwei-Stichproben F-Test. Bei $p < 0,05$ wurde von unterschiedlichen Varianzen zwischen Kontrolle und Stichprobe ausgegangen.

4.9.2 Untersuchung der Unterschiede auf Signifikanz

Zur Signifikanzanalyse wurde der einseitige Zwei-Stichproben t-Test (*student's t-test*) gewählt. Bei der Analyse der *in vitro* Daten wurde unterschieden zwischen gleicher und unterschiedlicher Varianz. Als Kontrollgruppe diente die Lösungsmittelkontrolle. Die Signifikanzniveaus wurden eingeteilt wie folgt: $p < 0,05$: * - signifikant unterschiedlich; $p < 0,01$: ** - hoch signifikant unterschiedlich; $p < 0,001$: *** - höchst signifikant unterschiedlich. Die Berechnungen der p-Werte wurden mit Microsoft Excel durchgeführt

4.9.3 Korrelation

Korrelationen wurden nach Pearson und/oder Spearman berechnet. Korrelationskoeffizienten über 0,7 beschreiben eine starke Korrelation, über 0,9 eine sehr starke Korrelation.

4.9.4 Ausreißertest

Innerhalb der *in vitro* Untersuchungen zur PDE-Hemmung wurden die Werte auf Ausreißer nach Nalimov untersucht. Wurde ein Wert als Ausreißer identifiziert, wurde er nicht in die Berechnung einbezogen.

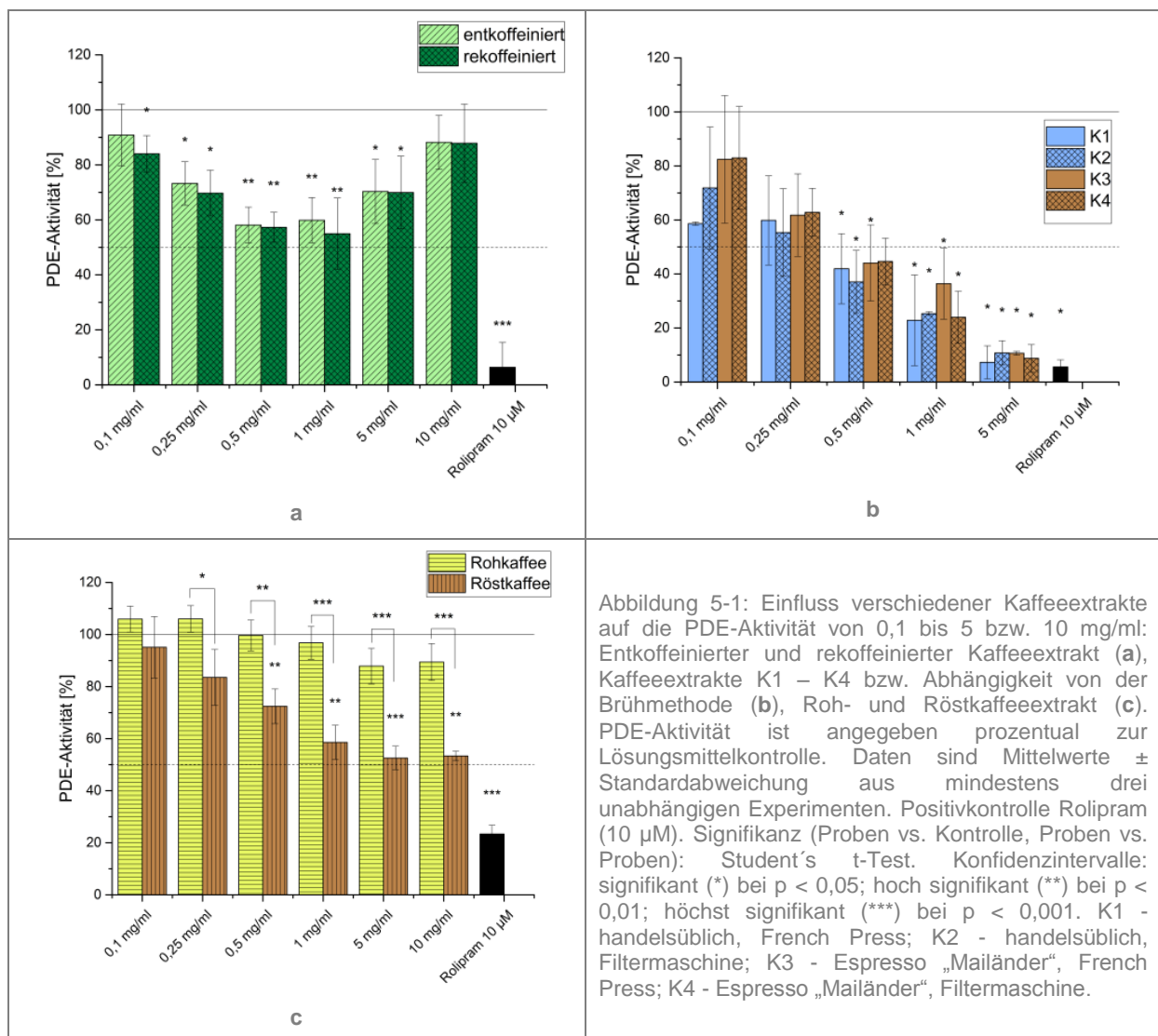
5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Einfluss von Koffein, Brühmethode und Röstprozess des Kaffees auf die Phosphodiesterase-Aktivität

5.1.1 Einfluss des Koffeins auf die Phosphodiesterase-Aktivität *in vitro*

Dass Koffein ein Hemmstoff der PDE ist, ist bekannt seit den ersten Berichten über Phosphodiesterasen und zyklische Nukleotide (Rall und Sutherland, 1958). Obwohl Koffein ein schwacher und unspezifischer Inhibitor der PDE ist, wurden *in vivo* und *in vitro* starke PDE-hemmende Effekte durch Kaffee beobachtet (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Aufgrund der Konzentration und des niedrigen Potentials von Koffein ging man davon aus, dass die durch Kaffee beobachtete Wirkung nicht alleine dem Koffein zugeschrieben werden konnte. Inwieweit Koffein in Kaffee zur PDE-Hemmung beiträgt, sollte daher *in vitro* geklärt werden. Um den Einfluss des Koffeins bei der Hemmung der PDE durch Kaffee zu untersuchen, wurde ein entkoffeinierter Kaffeeextrakt, der mit Ethylacetat vor der Röstung entkoffeiniert wurde, im PDE-Assay untersucht und gegen den gleichen mit 5% Koffein versetzten Kaffeeextrakt verglichen. Bei den untersuchten Extraktkonzentrationen 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml konnte für beide Kaffees eine Abnahme der PDE-Aktivität zwischen 0,1 mg/ml bis 0,5 bzw. 1 mg/ml auf 60 - 55% beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen kam es wieder zu einer Zunahme der PDE-Aktivität (siehe Abbildung 5-1a). Ein IC_{50} -Wert konnte deshalb nicht bestimmt werden. Für eine Zusammenfassung der getesteten Kaffees siehe Tabelle 5-1. Die Positivkontrolle Rolipram zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M eine Hemmung der PDE von über 90% und lag damit über den erwarteten 80%. Zwar ist die Hemmung der PDE-Aktivität durch die Kaffeeextrakte um 40 – 45% insgesamt gering, jedoch zeigt der direkte Vergleich des entkoffeinerten und des rekooffeinerten Kaffees keinen Unterschied. Auch statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Mittels HPLC wurde der Koffeingehalt des entkoffeinerten Kaffeeextraktes auf $1,0 \pm 0,1$ μ g/mg bestimmt. Der Zusatz von 5% Koffein führt bei dem rekooffeinerten Kaffeeextrakt zu einem Gehalt von $51,0 \pm 0,1$ μ g/mg. Der Koffeingehalt in Kaffees schwankt allgemein sehr stark und ist abhängig von z.B. Sorte und Wachstumsbedingungen. Der mittlere Koffeingehalt eines Röstkaffees wird mit 85 mg in 150 ml Getränk angenommen (Barone und Roberts, 1996). Vergleichsweise liegen der entkoffeinerte Kaffee mit 2 mg pro 150 ml weit darunter und der rekooffeinerte Kaffee mit umgerechnet 108 mg in 150 ml Getränk leicht über dem Literaturwert. Zwar ist Koffein mit einem IC_{50} von $0,9 \pm 0,1$ mg/ml (Montoya, 2012) und einer Inhibitionskonstante K_i (PDE-Isoform unbekannt) im millimolaren Bereich (Vigdahl *et al.*, 1971; Murakami *et al.*, 1983) ein schwacher, kompetitiver Inhibitor, ein Effekt wurde dennoch insbesondere bei höheren Extraktkonzentrationen des rekooffeinerten Kaffees

erwartet. Insbesondere, da Koffein als Reinstoff Effekte zeigt (Montoya, 2012). Ein Erklärungsversuch dieser Ergebnisse könnte die Komplexbildung von Koffein sein, wie sie bei der Bildung sogenannter Koffein-Chlorogenat Komplexe zwischen Koffein und Chlorogensäuren oder bei der Bildung von Koffeindimeren beobachtet wird (Horman und Viani, 1972; D'Amelio *et al.*, 2009). Hiergegen sprechen allerdings Assoziationskonstanten im zweistelligen molaren Bereich sowie die deutlichen Effekte bei reinem Koffein. Eine weitere Erklärung könnte die Konkurrenz des Hemmmechanismus' von Koffein mit einem Hemmmechanismus eines anderen Inhaltsstoffes des Kaffees mit PDE-hemmender Wirkung sein. Hiergegen spricht, dass in Kapitel 5.1.3 kein Effekt auf die PDE-Aktivität für einen Rohkaffeeextrakt (≤ 10 mg/ml) beobachtet werden konnte, obwohl der Extrakt einen Koffeingehalt von $41,9 \mu\text{g}/\text{mg}$ aufwies. Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass Koffein in einem komplexen Gemisch wie Kaffee gebunden vorliegen könnte und daher keine Wirkung auf die PDE zeigt. Weiterhin lässt sich zwischen Koffeingehalten von Kaffeeextrakten und deren PDE-Hemmung keine statistische Korrelation feststellen ($R^2 = 39,58\%$). Abschließend lässt sich formulieren, dass die PDE-Aktivität *in vitro* nicht durch Koffein beeinflusst wird.



5.1.2 Einfluss der Brühmethode und des Röstgrades auf die Phosphodiesterase-Aktivität *in vitro*

Die Hemmung der Phosphodiesterase durch Kaffeeextrakt wurde in Abhängigkeit von der Brühmethode und vom Röstgrad untersucht. Hintergrund dieser Untersuchung war die in der Literatur beschriebene Retention von sehr lipophilen Substanzen wie Kahweol und Cafestol in Filterpapier, nicht aber in Filtern aus Metall (van Dusseldorp *et al.*, 1991). Hierzu wurden ein handelsüblicher Kaffee mit mittlerem Röstgrad und ein Espresso jeweils mit einer herkömmlichen Filtermaschine (Papierfilter) oder einer „French Press“ (Metallfilter) gebrüht und anschließend gefriergetrocknet. Die Extrakte K1 (handelsüblich, French Press), K2 (Espresso, Filtermaschine), K3 (Espresso, French Press) und K4 (Espresso, Filtermaschine) wurden in den Konzentrationen 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 mg/ml im PDE-Assay eingesetzt (siehe Abbildung 5-1b). Der Einfluss der Kaffeeextrakte auf die PDE-Aktivität war mit IC_{50} Werten zwischen 0,32 und 0,43 mg/ml im Rahmen der in der Literatur beschriebenen PDE-Hemmung (Montoya, 2012; Montoya *et al.*, 2014). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Brühmethoden und den Röstgraden konnte nicht festgestellt werden. Da keine Unterschiede zwischen den Brühmethoden beobachtet wurden, konnten sehr lipophile Substanzen wie Kahweol und Cafestol als verantwortliche PDE-Hemmer in Kaffee ausgeschlossen werden. Eine Zusammenfassung der Kaffeeextrakte und ihrer Inhaltsstoffe und IC_{50} -Werte befindet sich in Tabelle 5-1.

5.1.3 Einfluss der Röstung der Kaffees auf die Phosphodiesterase-Aktivität *in vitro*

Der Einfluss des Röstprozesses auf die Hemmung der Phosphodiesterase wurde durch einen Vergleich von Rohkaffee und Röstkaffee und deren Wirkung auf die PDE-Aktivität untersucht. Um den Flüssigkeitsverlust durch das Rösten auszugleichen und einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden ein Roh- und der entsprechende Röstkaffee nach dem Mahlen getrocknet. Nach Extraktion und Gefriertrocknung wurden die Extrakte im PDE-Assay in den Konzentrationen 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-1c dargestellt. Während der Röstkaffeeextrakt ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml eine signifikante Hemmung zeigte und diese konzentrationsabhängig zunahm konnte eine signifikante Hemmung der PDE-Aktivität für den Rohkaffeeextrakt nicht beobachtet werden. Die maximal beobachtete Hemmung betrug etwa 10%, welche aufgrund der Standardabweichung vernachlässigbar war. Der Unterschied zwischen Roh- und Röstkaffeeextrakt war signifikant ab einer Konzentration von 0,25 mg/ml. Der Röstprozess wurde durch dieses Experiment als zwingend erforderlich für die PDE-Hemmung *in vitro* identifiziert. Im Laufe des Röstprozesses werden Kaffeeinhaltsstoffe wie Chlorogensäuren, Proteine und Polysaccharide thermisch abgebaut und Röstprodukte wie Melanoidine, Alkylpyrazine und weitere Aromakomponenten gebildet.

Während der Röstprozess essentiell für die Bildung der PDE-hemmenden Substanzen ist, kann zusammenfassend der Einfluss der Brühmethode, des Röstgrades und des Koffeins als gering betrachtet werden. Die durchgeführten Experimente liefern zusätzliche Informationen um die Ergebnisse der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung zu bewerten. Eine zusammenfassende Tabelle über die getesteten Kaffeeextrakte ist auf Seite 109 zu finden.

Tabelle 5-1: Eigenschaften der getesteten Kaffees

Kaffeextrakt	Beschreibung	BI ($A_{420\text{ nm}}$) ^a	Extraktgewicht (g/L) ^b	Koffeingehalt ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Monocaffeoyl- chinasäure-gehalt ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IC ₅₀ (mg/ml)
K1	handelsüblich, French Press	0,896	17,6	50,8 ± 1,4	52,9 ± 0,7	0,32 ± 0,1
K2	handelsüblich, Filtermaschine	1,134	20,8	51,3 ± 0,4	54,1 ± 0,6	0,34 ± 0,05
K3	Espresso, French Press	1,011	17,4	45,8 ± 0,8	30,3 ± 0,6	0,42 ± 0,1
K4	Espresso, Filtermaschine	1,230	16,7	51,0 ± 2,2	32,8 ± 1,2	0,43 ± 0,09
K2*	K2, Fraktionierung	1,102	18,8	42,2 ± 0,2	46,4 ± 0,7	0,35 ± 0,05
Rohkaffeeextrakt		0,015	11,5	41,9 ± 1,5	128,1 ± 3,7	n.b.
Röstkaffeeextrakt	„Yellow Bourbon“	0,761	10,9	52,2 ± 0,3	33,3 ± 0,3	n.b.
Entkoffeiniert	Ethylacetat entkoffeiniert	1,129	14,1	2,1 ± 0,2	51,5 ± 2,3	n.b.
Rekoffeiniert	mit 5% Koffein			52,1		n.b.

* n.b.: nicht bestimmbar aufgrund zu niedriger PDE-Hemmung

a) 5 mg/ml, 200 μl je Well, 96-Well Platte

b) bei Zubereitung mit 60 g Pulver je Liter Wasser

5.2 Aktivitäts-geleitete Fraktionierung

Um die PDE-hemmenden Substanzen in Kaffee zu identifizieren wurde eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung eines Kaffeeextraktes durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise kann in den Kapiteln 4.4.5 - 4.4.10 nachgelesen werden. Damit ein direkter Vergleich der einzelnen Fraktionen möglich war, wurden die Verhältnisse der Ausbeuten auf den PDE-Assay übertragen.

5.2.1 Grobfraktionierung

Zu Beginn wurde K2 als der zu fraktionierende Kaffeeextrakt ausgewählt (K2*). Durch Flüssig-Flüssig-Extraktion eines frisch gebrühten Kaffees wurde ca. 1% einer lipoiden Fraktion, dem Kaffee fett, erhalten. Das Kaffee fett zeigte in den eingesetzten Konzentrationen von 1 bis 100 µg/ml keinen nennenswerten Effekt auf die PDE (nicht gezeigt) und wurde daraufhin bei der weiteren Fraktionierung nicht weiter berücksichtigt.

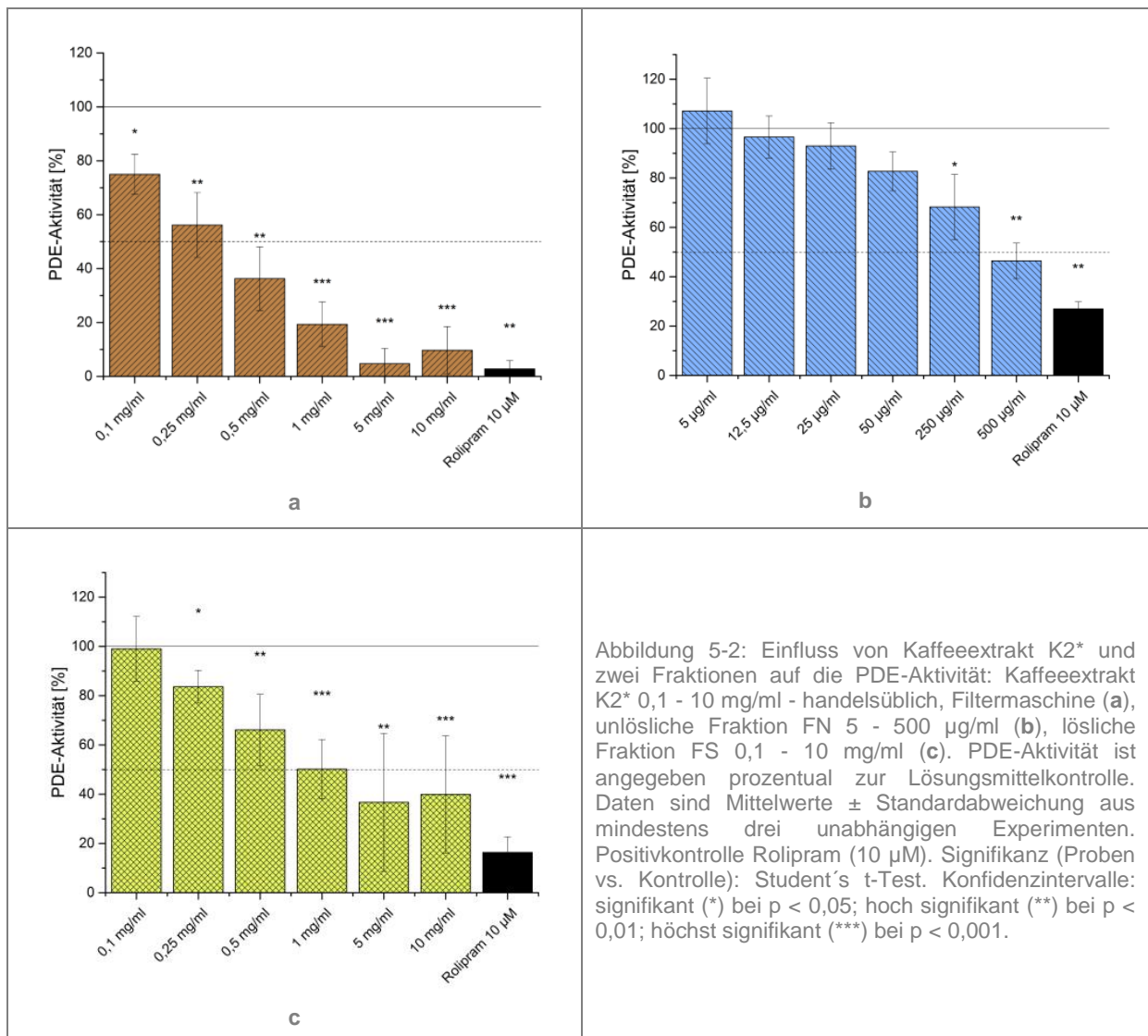


Abbildung 5-2: Einfluss von Kaffeeextrakt K2* und zwei Fraktionen auf die PDE-Aktivität: Kaffeeextrakt K2* 0,1 - 10 mg/ml - handelsüblich, Filtermaschine (a), unlösliche Fraktion FN 5 - 500 µg/ml (b), lösliche Fraktion FS 0,1 - 10 mg/ml (c). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

Die nach Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen FN (nicht löslich) und FS (löslich) wiesen Ausbeuten von jeweils 4,3% und 95,7% auf, in denen sie für den PDE-Assay eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 5-2). Verglichen mit K2* ($IC_{50} = 0,35 \pm 0,05$ mg/ml) zeigte FN eine stärkere Hemmung ($IC_{50} = 0,46 \pm 0,03$ mg/ml) als FS ($IC_{50} = 0,96 \pm 0,21$ mg/ml). Signifikante Hemmung trat bei beiden Fraktionen ab einer Konzentration von 0,25 mg/ml auf. Da FS den höheren Anteil des Kaffeeextraktes darstellte, wurde FS weiterfraktioniert. Zusätzlich wurde angenommen, dass der Effekt von FN durch geringe niedermolekulare Verunreinigungen zustande kam, denn per HPLC-Analyse konnten in FN wider Erwarten monomere Verunreinigungen wie Koffein (1,2%) und Monocaffeoylchinasäuren (1,2%) detektiert werden (siehe Tabelle 5-4).

5.2.2 Feinfraktionierung der löslichen Fraktion FS

Die Feinfraktionierung der löslichen Fraktion FS mittels präparativer HPLC und zeitbasierter Fraktionensammlung ergab neun Feinfraktionen, siehe Abbildung 5-3. Fraktion F4 wurde rechromatographiert um Koffein von 4- bzw. 5-CQA zu trennen, siehe Abbildung 5-4. Die Ausbeuten der nach Fraktionierung mittels präparativer HPLC erhaltenen zehn Feinfraktionen sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Von allen im Verhältnis der Ausbeute eingesetzten Fraktionen, zeigten die Fraktionen F4b, F7, F8 signifikante Hemmung der PDE (s. Abbildung 5-6a). Fraktion F6 zeigte hingegen nicht signifikante Hemmung der PDE bis ca. 25,3%.

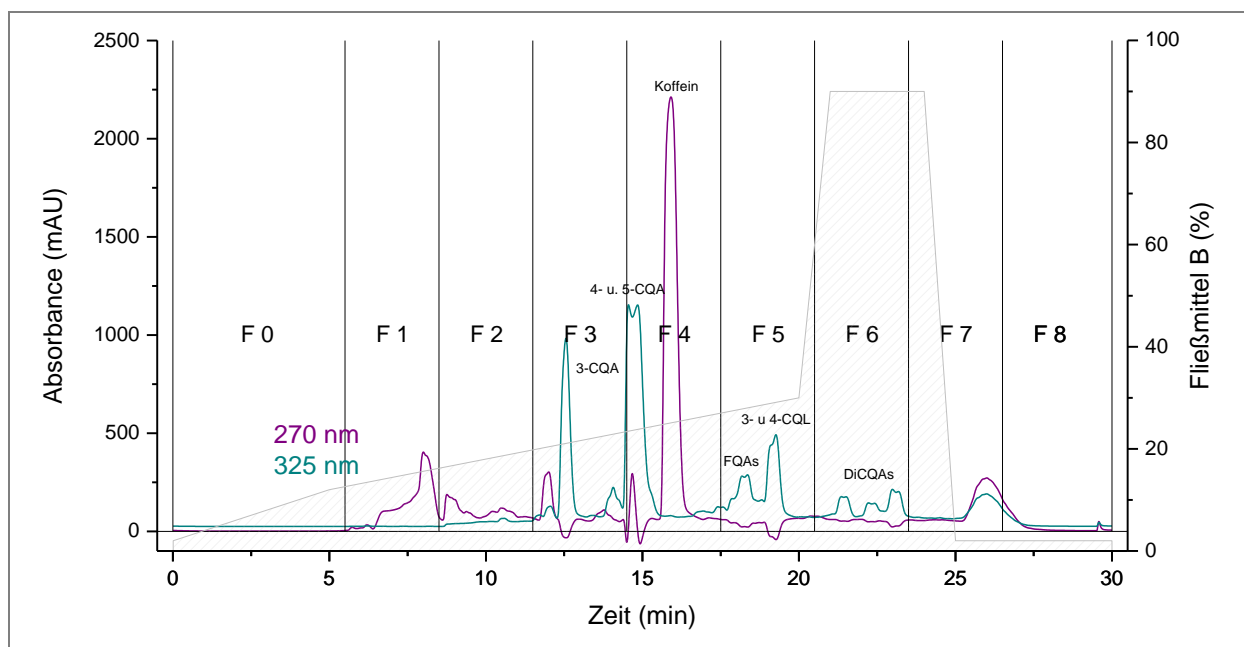


Abbildung 5-3: Chromatogramm der präparativen Fraktionierung der löslichen Fraktion FS in neun Fraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.6) bei unterschiedlichen Wellenlängen (270 nm, 325 nm).

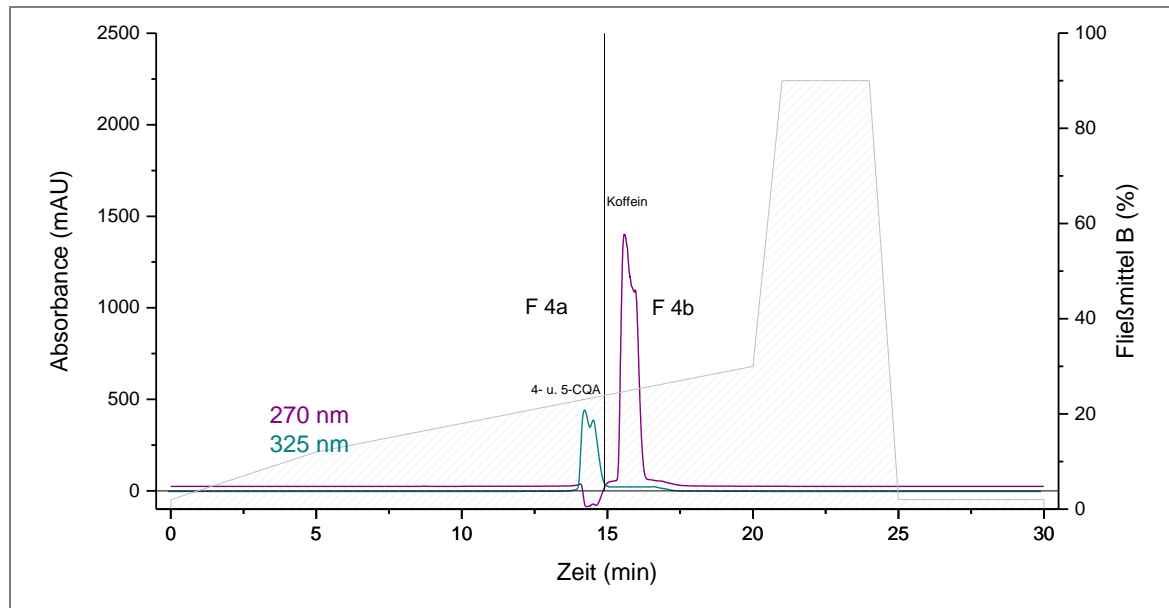


Abbildung 5-4: Chromatogramm der präparativen Subfraktionierung der Fraktion 4 in zwei Subfraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.6) bei unterschiedlichen Wellenlängen (270 nm, 325 nm).

Fraktion F4b wurde in Konzentrationen von 8 / 20 / 40 / 80 / 400 / 800 µg/ml eingesetzt (siehe Abbildung 5-6b) und die verbleibende PDE-Aktivität in der höchsten Konzentration betrug $50,7 \pm 6,7$ %, sodass kein IC_{50} bestimmt werden konnte. Mit 53% ist Koffein der Hauptbestandteil dieser Fraktion. Im Laufe der Fraktionierung wurde Fraktion F4 so aufgetrennt, dass 4- bzw. 5-CQA (F4a) und Koffein (F4b) in getrennten Fraktionen vorlag. Dass Fraktion F4b eine Wirkung zeigte, obwohl in Kapitel 5.1.1 der Einfluss des Koffeins im Kaffee als vernachlässigbar gering eingestuft wurde, lässt sich mit der Aufreinigung des Koffeins durch die Fraktionierung erklären.

Fraktion F6 wurde in den Konzentrationen 5 / 12,5 / 25 / 50 / 250 / 500 µg/ml eingesetzt (siehe Abbildung 5-6c). Zwar zeigte sich bis zur höchsten Konzentration keine signifikante Hemmwirkung, kann aber andeutungsweise beobachtet werden. In der höchsten Konzentration bei 500 µg/ml betrug der T/C $74,7 \pm 14,7$ %.

Fraktion F7 wurde im PDE-Assay mit 5 / 12,5 / 25 / 50 / 250 / 500 µg/ml eingesetzt (siehe Abbildung 5-6d) und zeigte eine signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 25 µg/ml und einer PDE-Hemmung von $10,1 \pm 0,6$ %. Die maximale Hemmung betrug 54,3% bei 500 µg/ml. Der IC_{50} wurde als 415 ± 80 µg/ml bestimmt.

Fraktion F8 wurde mit 3 / 7,5 / 15 / 30 / 150 / 300 µg/ml für den PDE-Assay eingesetzt (siehe Abbildung 5-6e). Signifikante Hemmung trat ab einer Konzentration von 150 µg/ml und einem T/C von $47,8 \pm 14,2$ % auf. Die maximale Hemmung bei 300 µg/ml betrug 61,9%. Der IC_{50} wurde bestimmt mit 130 ± 42 µg/ml.

Für die stärkste der drei Fraktionen, Fraktion 8, wurde die zugrundeliegende Kinetik der Hemmung untersucht, siehe folgende Tabelle und Abbildung:

Tabelle 5-2: PDE-Kinetik-Daten der Fraktion 8

Parameter	Wert	Methode
Mechanismus	nicht-kompetitiv	Lineweaver-Burk-Plot (doppelt reziprok)
$K_{IS} = K_{II}$	94,8 $\mu\text{g/ml}$	Dixon-Plot-Plot
K_M	85,2 $\mu\text{g/ml}$	Cornish-Bowden-Plot
V_{\max}	1,0 μM	Lineweaver-Burk-Plot (doppelt reziprok)
	595 pmol/min x mg Protein	Lineweaver-Burk-Plot (doppelt reziprok)

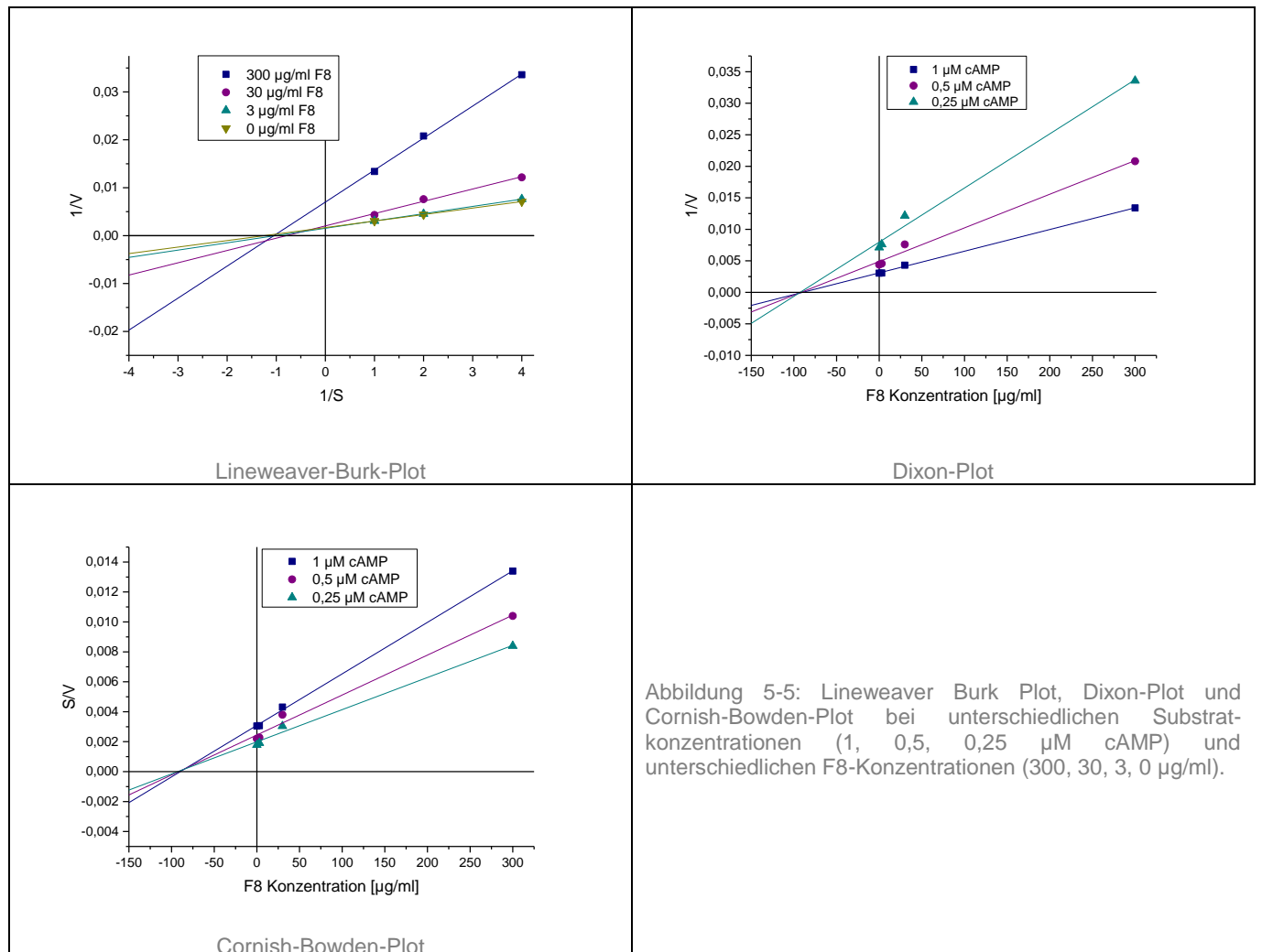


Abbildung 5-5: Lineweaver Burk Plot, Dixon-Plot und Cornish-Bowden-Plot bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (1, 0,5, 0,25 μM cAMP) und unterschiedlichen F8-Konzentrationen (300, 30, 3, 0 $\mu\text{g/ml}$).

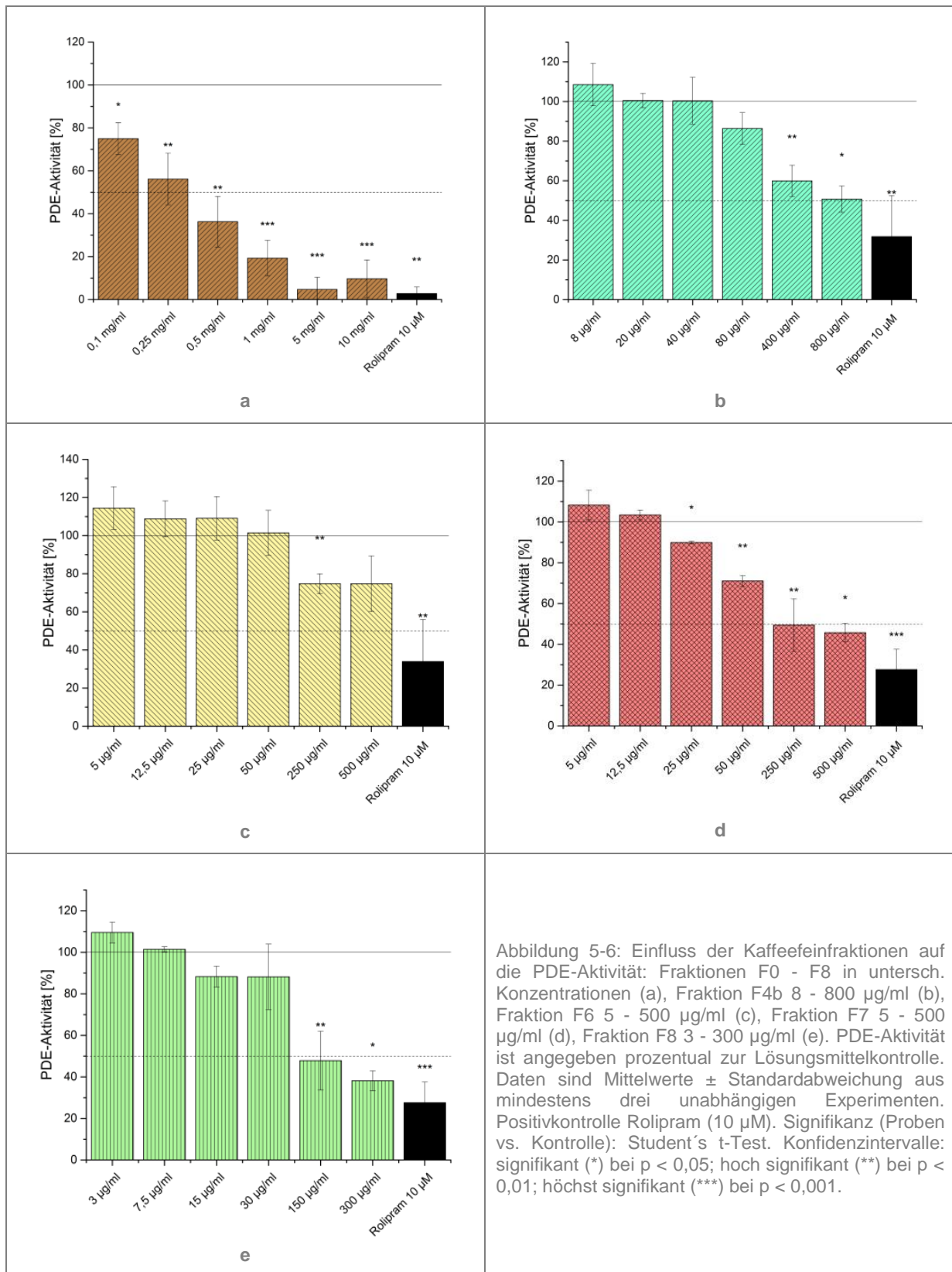


Abbildung 5-6: Einfluss der Kaffeeefraktionen auf die PDE-Aktivität: Fraktionen F0 - F8 in untersch. Konzentrationen (a), Fraktion F4b 8 - 800 μ g/ml (b), Fraktion F6 5 - 500 μ g/ml (c), Fraktion F7 5 - 500 μ g/ml (d), Fraktion F8 3 - 300 μ g/ml (e). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 μ M). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

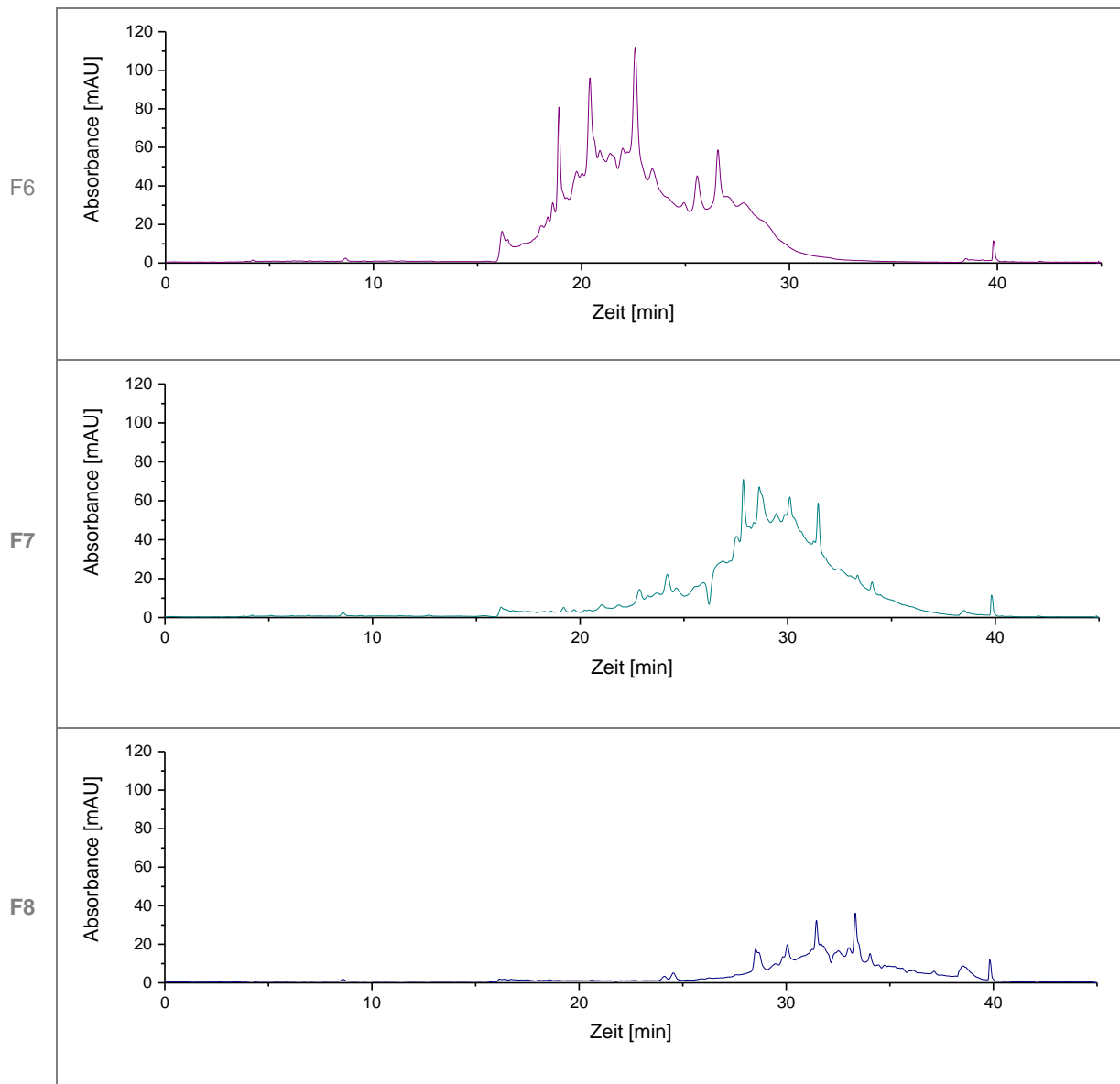


Abbildung 5-7: RP-HPLC-UV-Chromatogramme der Fraktionen F6, F7, F8 bei 280 nm (Methode siehe 4.4.11).

5.2.3 Identifizierung der Leitsubstanzen in Fraktion F8

Die Charakterisierung der Fraktionen F6, F7, F8 zeigte mittels HPLC-UV bei 280 nm einzelne Analyten, die auf breiten Untergrundbanden eluierten (siehe Abbildung 5-7). Zur Identifizierung der bei 280 nm detektierten Einzelsubstanzen in den Fraktionen F7 und F8 wurden zuerst mittels HPLC-ESI-MS Precursor-Ionen im Q1 (ESI positiv und negativ) bestimmt, siehe Abbildung 5-8a. Anschließend wurden diese m/z -Verhältnisse als Grundlage für eine Produkt-Ionen-Scan verwendet (MS^2 , Methode siehe 4.4.12). Sicher identifiziert werden konnten mit dieser Methode die beiden Substanzen N-Caffeoyltryptophan (CaW) und N-Cumaroyltryptophan (CuW), deren gefundene Precursor- und Produkt-Ionen mit den angegebenen m/z -Verhältnissen aus der Literatur übereinstimmten (Clifford und Knight,

2004; Stark *et al.*, 2006) – siehe Tabelle 5-3 und Abbildung 5-8b und c. Dabei wies CaW den flächenmäßig größten Peak bei 280 nm auf. CaW und CuW gehören zu einer Gruppe an N-Hydroxycinnamoyl-Aminosäurekonjugaten mit Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin, Hydroxytyrosin und Tryptophan. Diese Verbindungen sind mit Konzentrationen im dreistelligen µg/mg-Bereich vorwiegend in Kakaosamen (*Theobroma cacao*) zu finden, konnten jedoch auch in geringen Mengen bis ~4µg/mg in Röstkaffee quantifiziert werden (Stark *et al.*, 2006). Nach Identifizierung dieser zwei Komponenten wurden sie laut 4.4.10 dargestellt, ihre Identität mittels NMR und HPLC-ESI-MS/MS bestätigt und im PDE-Assay in den Konzentrationen 5 / 12,5 / 25 / 50 / 250 / 500 µg/ml eingesetzt. Es konnte keine Hemmung bis 500 µg/ml beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies wurde bestätigt dadurch, dass diese Substanzen ebenfalls in Rohkaffee nachgewiesen wurden (Clifford und Knight, 2004) und sie daher keine thermisch bedingten Kondensationsprodukte aus dem Röstprozess sind. Und in Kapitel 5.1.3 wurde beobachtet, dass die verantwortlichen Substanzen während des Röstprozesses entstehen.

Tabelle 5-3: MS-Parameter der Identifizierung von CaW und CuW (Methode siehe 4.4.12)

Retentionszeit	Substanz	Precursor <i>m/z</i>	Produkt-Ionen <i>m/z</i>	Precursor <i>m/z</i> Lit.	Produkt-Ionen <i>m/z</i> Lit.	Literatur
30,7 min	CaW	367,3	163,1; 188,0; 145,1; 205,0; 135,1	367,3 367,2	163,7 163,0; 89,2; 117,0; 135,2; 144,8; 188,2; 205,0	(Clifford und Knight, 2004) (Stark <i>et al.</i> , 2006)
33,3 min	CuW	351,5	147,1; 119,3	351,3 351,3	147,6 147,0	(Clifford und Knight, 2004) (Stark <i>et al.</i> , 2006)

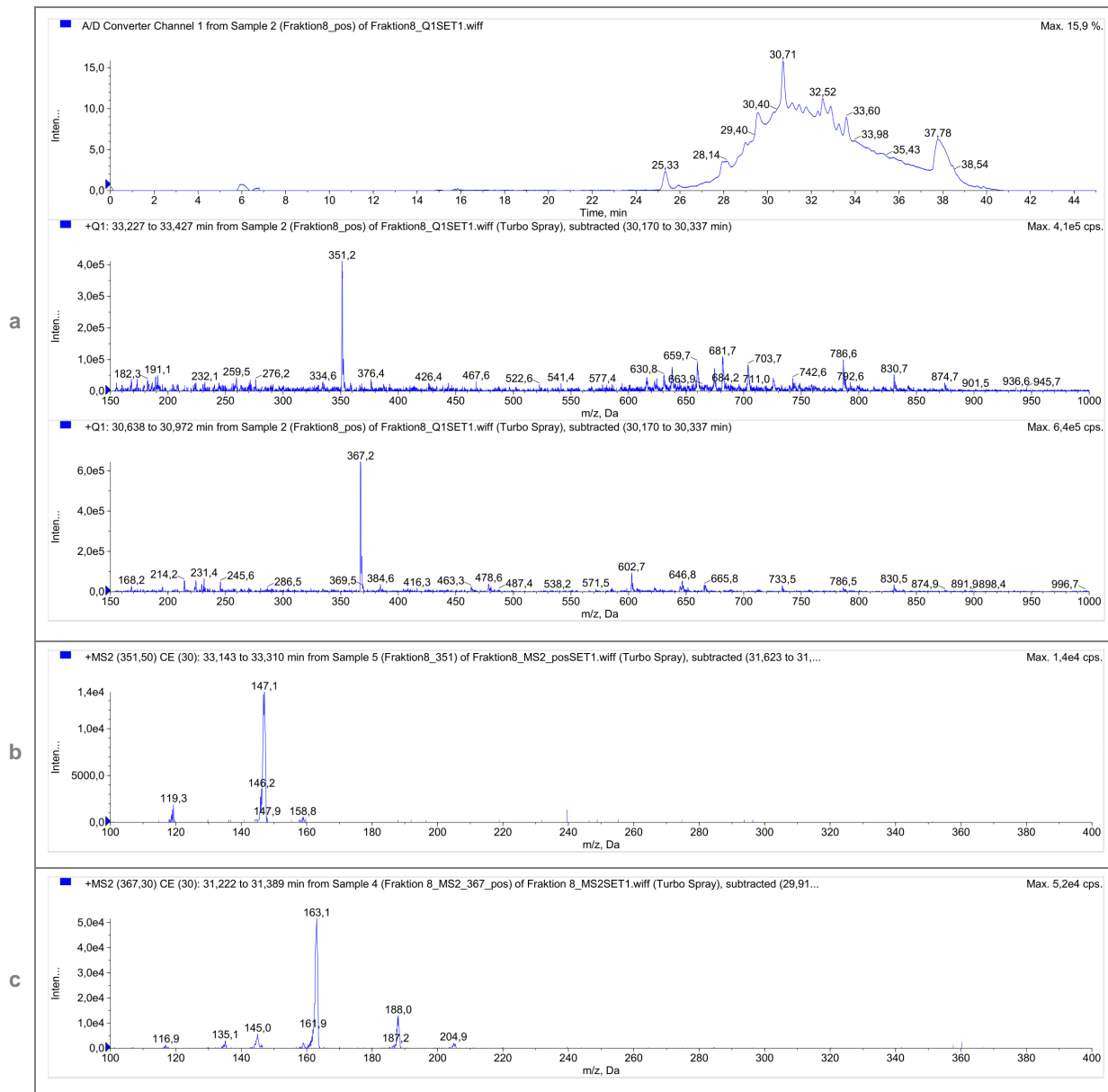


Abbildung 5-8: HPLC-UV-Chromatogramm von F8 bei 260 nm mit Q1-Spektren von 33,2-33,4 min und von 30,7-31,0 min (a), MS²-Spektrum von F8 bei m/z 351,5 und 33,3 min, identifiziert als CuW (b), MS²-Spektrum von F8 bei m/z 367,3 und 30,7 min, identifiziert als CaW (c), Methode siehe Kapitel 4.4.12.

5.2.4 Subfraktionierung von Fraktion F8

Da die Bemühungen aus Kapitel 5.2.3 zu keinem Ergebnis führten, wurde F8 mittels präparativer RP-HPLC subfraktioniert, siehe Abbildung 5-9. Ausbeutenverhältnisse für die erhaltenen Feinfraktionen F8.1, F8.2, F8.3, F8.4 und F8.5 konnten aufgrund zu geringer Ausbeuten nicht bestimmt werden. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde deshalb der nach der Trocknung erhaltene Rückstand in äquivalentem Volumen gelöst und für den PDE-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse für die sich ergebende Ausgangskonzentration sind in Abbildung 5-11a dargestellt. Die höchste PDE-Hemmung wurde mit 50,9% für Fraktion F8.3 gefunden. Auffällig ist hierbei, dass vier von fünf Fraktionen eine signifikante Hemmung zeigen. Dies war der erste Hinweis darauf, dass die PDE-Hemmung nicht von einer Einzelsubstanz ausgehen konnte. Es wurde vermutet, dass die PDE-hemmende/n Substanz/en mit der breiten Bande, wie sie in Abbildung 5-9 erkennbar ist, assoziiert ist. Breite Banden konnten ebenfalls bei der Einzelanalyse mittels HPLC für die einzelnen Fraktionen detektiert werden, siehe Abbildung 5-10. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um eine Fraktion von wasserlöslichen Melanoidinen handeln könnte. Dies konnte in Kapitel 5.2.7 bestätigt werden.

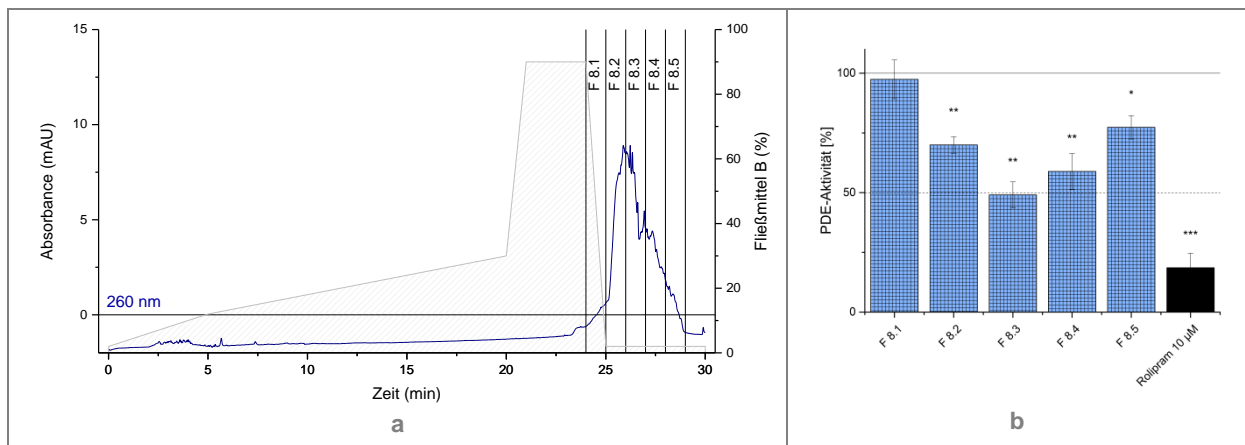


Abbildung 5-9: Chromatogramm der präparativen Subfraktionierung der Fraktion F8 in fünf Feinfraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.7) bei 260 nm (a) und Einfluss der Subfraktionen F8.1 – F8.5 auf die PDE-Aktivität (b). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. PDE-Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 μ M). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

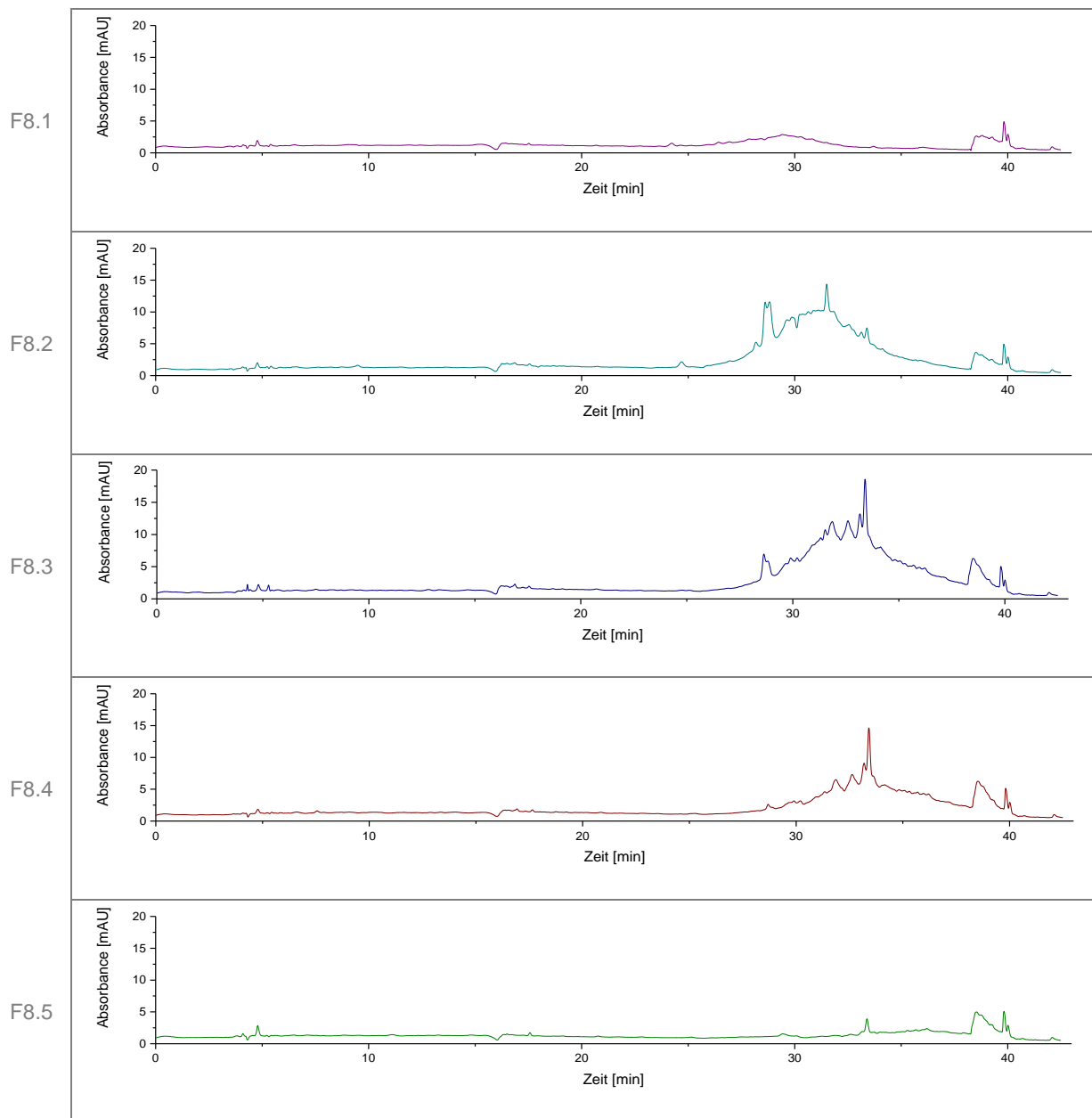


Abbildung 5-10: RP-HPLC-UV-Chromatogramm der Subfraktionen F8.1 - F8.5 bei 260 nm (Methode siehe 4.4.11).

5.2.5 Hydrolyse der Fraktion F8

Fraktion F8 wurde im PDE-Assay nach alkalischer Hydrolyse (siehe 4.4.8) untersucht. Ziel der Hydrolyse war es, herauszufinden ob die Melanoidine oder evtl. bei der Entstehung eingeschlossene Verbindungen für die PDE-Hemmung verantwortlich sind. Damit die Hydrolyseparameter selbst die PDE-Aktivität nicht beeinflussen, wurde eine „Kontrollhydrolyse“ mit Wasser durchgeführt und analog zum F8-Hydrolysat im PDE-Assay getestet (siehe Abbildung 5-11). Das Hydrolysat und die als „Positivkontrolle“ verwendete, unhydrolysierte Fraktion F8 wurden in Konzentrationen von 150 und 300 µg/ml für den PDE-

Assay eingesetzt. Als Positivkontrolle diente außerdem Rolipram (10 μ M). Die Hemmung der PDE erreichte sowohl durch das Hydrolysat der Fraktion F8 als auch des Kontrollhydrolysats kein Signifikanzniveau. Das Hydrolysat der Fraktion F8 erreichte zwar eine Hemmung der PDE bis 25,4%, die Standardabweichung lag aber gleichzeitig bei 28,1%. Im Vergleich dazu lag die Hemmung durch das Kontrollhydrolysat bei 6,8% mit einer Standardabweichung von 31,4%. Die Ergebnisse der Fraktion F8 unterschieden sich signifikant von den einzelnen Hydrolysaten (s. Abbildung 5-11b), während sich die Hydrolysate nicht signifikant unterschieden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die PDE-hemmenden Substanzen durch die alkalische Hydrolyse abgebaut werden.

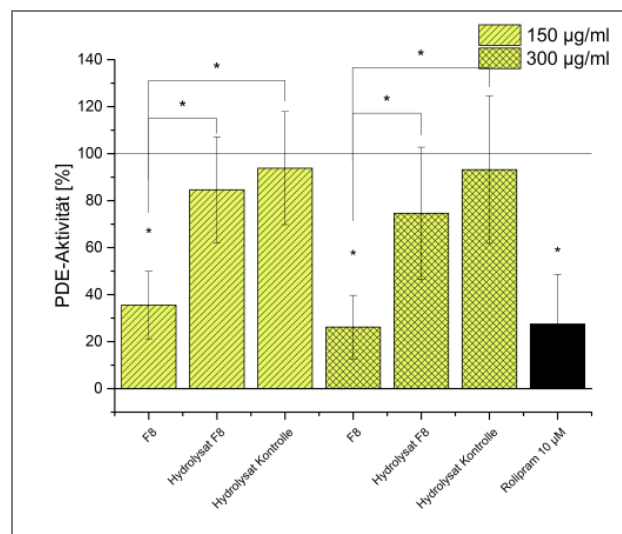


Abbildung 5-11: Einfluss der Hydrolysate der Fraktion F8 auf die PDE-Aktivität: Hydrolysat Fraktion F8, Kontrollhydrolysat und Fraktion F8 (150 und 300 μ g/ml). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 μ M). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle, Proben vs. Proben): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

5.2.6 Ultrafiltration der Fraktion F8

Um Fraktion F8 darauf zu untersuchen, ob die Co-Eluenten ionisch (nicht-kovalent) an die Melanoidine gebunden sind, wurde Fraktion F8 mit 1 M NaCl ultrafiltriert (Cut-Off Größe 3 kDa). Dabei sollten nicht-kovalent gebundene Inhaltsstoffe den Filter passieren während die Melanoidine im Retentat verbleiben. Dazu sollte die RP-HPLC-Analyse des Filtrats und von Fraktion F8 Unterschiede zeigen. Allerdings konnten keine Unterschiede in den Chromatogrammen festgestellt werden, sodass angenommen wurde, dass die Melanoidine den Filter passiert haben. Die Wiederfindung der Melanoidine im Filtrat lag bei 94,5%, berechnet aus der Fläche der breiten, unaufgelösten Bande abzüglich scharfer Peaks. Daraufhin ließ sich über die in Fraktion F8 befindlichen Melanoidine aussagen, dass die

molekulare Größe um oder unter 3 kDa liegt. Die Chromatogramme von Fraktion 8 und des Filtrats bei 260 nm sind in Abbildung 5-12 dargestellt.

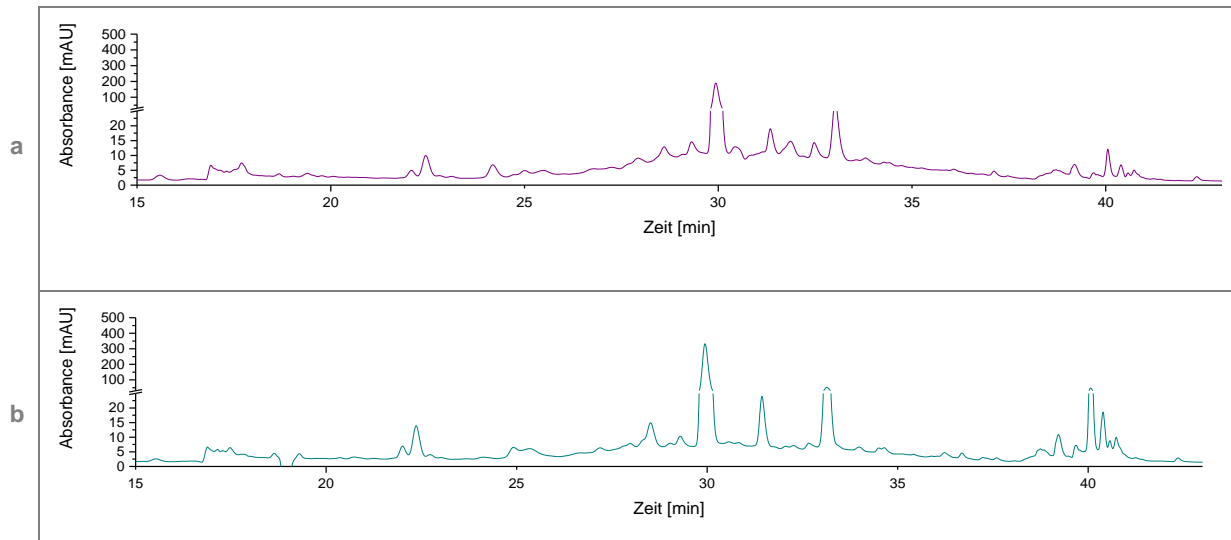


Abbildung 5-12: RP-HPLC-UV Chromatogramme von Fraktion F8 (a) und dem Filtrat nach Ultrafiltration mit einer Cut-Off-Größe von 3 kDa (b) bei 260 nm (Methode siehe 4.4.11).

5.2.7 Identifizierung der PDE-hemmenden Stoffklasse in Fraktionen F6, F7, F8

Nachdem wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben mit der Testung und Identifizierung der Hauptbestandteile von Fraktion F8 die verantwortlichen PDE-Hemmstoffe nicht identifiziert werden konnten, wurde sich mehr auf die breiten, unaufgelösten Banden, welche in den RP-HPLC-Chromatogrammen von F6, F7, F8 (siehe Abbildung 5-7), F8.1 - F8.5 (siehe Abbildung 5-10) zu erkennen waren, konzentriert. Auffallend hierbei war, dass sowohl die breiten, unaufgelösten Banden als auch die PDE-Hemmung über mehrere Fraktionen hinweg beobachtet werden konnten. Eine monomere, niedermolekulare, nicht-melanoidine Verbindung konnte dadurch als PDE-Hemmstoff ausgeschlossen werden. Die RP-HPLC-UV-Analytik der Fein- und Subfraktionen zeigt für F6, F7, F8 (Abbildung 5-7) und die Fraktionen F8.1 - F8.5 (Abbildung 5-10) diese breite, unaufgelöste Untergrundbanden bei mehreren Wellenlängen von 230 bis 325 nm. Diese breiten Banden werden in der Literatur bei hitzebehandelten Lebensmitteln als Melanoidine beschrieben (Bailey *et al.*, 1996; Monti *et al.*, 1998; Bekedam *et al.*, 2008). Aufgrund der heterogenen Struktur und der hohen molekularen Größe der Melanoidine erscheinen sie in Chromatogrammen als unaufgelöste Banden mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm. Um die in den Fraktionen F6 - F8.5 detektierten Banden als Melanoidine zu identifizieren wurde der Bräunungsindex BI der Fraktionen bei 420 nm gemessen und mit der Bandenfläche ohne Einzelanalyten verglichen. Der quadratische Korrelationskoeffizient von Bandenfläche und Bräunungsindex BI wurde mit $R^2 = 99,33\%$ bestimmt. Die Melanoidin-Identität der Banden konnte damit mit hoher

Wahrscheinlichkeit bestätigt werden. Weiterhin musste der Zusammenhang zwischen PDE-Hemmung und Melanoidinen bestätigt werden. Auffallend beim Vergleich der Chromatogramme von Fraktion F6, F7 und F8 ist, dass die Menge an detektierten Melanoidinen abnahm (vgl. Abbildung 5-7), die PDE-Hemmung jedoch zunahm (vgl. Abbildung 5-6). Gleichzeitig nahm jedoch auch mit zunehmender Retentionszeit, also mit zunehmender Fraktionsnummer, die Polarität bzw. Hydrophilie ab, sodass offensichtlich die PDE-Hemmung mit der Zunahme an unpolaren Melanoidinen stieg (F6 > F7 > F8). Der Vergleich von PDE-Aktivität der Subfraktionen F8.1 - F8.5 und des BI zeigt eine sehr starke, negative Korrelation ($R = -0,89$; $\rho = -0,90$), sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass Fraktion F8 zum größten Teil aus Melanoidinen mit PDE-hemmenden Eigenschaften besteht und es sich bei Fraktion F7 und F6 um Mischungen von Melanoidinen mit und ohne PDE-hemmende Eigenschaften handelte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die PDE-Hemmstoffe des Kaffees als eine Gruppe von wasserlöslichen Melanoidinen mit niedriger Polarität und einem Molekulargewicht um oder unter 3 kDa identifiziert wurden.

Sollte eine spezielle Gruppe von Melanoidinen verantwortlich für die PDE-Hemmung durch Kaffee sein, ließe sich eventuell auch ein Zusammenhang zwischen dem Bräunungsindex der getesteten Kaffees und Fraktionen mit der PDE-Hemmung erkennen. Allerdings zeigt der Vergleich des BIs dieser Kaffees und Fraktionen mit der PDE-Hemmung (vgl. Abbildung 5-13) lediglich eine moderate, negative Korrelation ($R = -0,77$; $\rho = -0,73$). Es wird daher stark vermutet, dass nicht alle Melanoidine in Kaffee zur PDE-Hemmung beitragen. Zur Bestimmung des BI sollte angemerkt werden, dass dabei nur lösliche Melanoidine erfasst werden können.

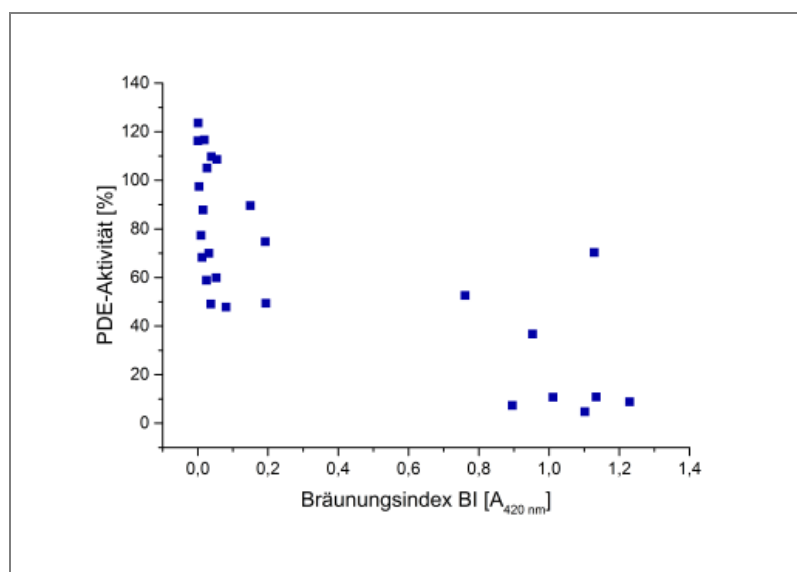


Abbildung 5-13: Pearson-Korrelation der PDE-Hemmung in Abhängigkeit vom Bräunungsindex BI der getesteten Kaffeeextrakten und Fraktionen.

Tabelle 5-4: Zusammenfassung der PDE-hemmenden Wirkung und Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen

Fraktion	Ausbeute (%)	IC ₅₀	Mono-CQA-Gehalt (µg/mg)	Koffeingehalt (µg/mg)	BI (A ₄₂₀ nm) / mg / 200 µl / Well
K2*	100	0,35 ± 0,05 mg/ml	46,4 ± 0,7	42,2 ± 0,2	0,220 ^a
FN	4,3	0,46 ± 0,03 mg/ml	12,2 ± 1,1	12,0 ± 0,9	0,049 ^a
FS	95,7	0,94 ± 0,21 mg/ml	52,1 ± 0,4	44,2 ± 0,3	0,191 ^a
F0		-	-	-	0,001 ^b
F1		-	-	-	0,001 ^b
F2		-	-	-	0,031 ^b
F3		-	138,0 ± 2,2	-	0,155 ^b
F4a		-	509,3 ± 23,0	-	0,062 ^b
F4b		-	-	534,3 ± 4,7	0,131 ^b
F5		-	10,1 ± 2,4	-	0,428 ^b
F6		-	-	-	0,770 ^b
F7		415 ± 80 µg/ml	-	-	0,776 ^b
F8		130 ± 42 µg/ml	-	-	0,539 ^b
F8.1	n.b.	n.b.	-	-	0,012 ^{b,c}
F8.2	n.b.	n.b.	-	-	0,095 ^{b,c}
F8.3	n.b.	n.b.	-	-	0,112 ^{b,c}
F8.4	n.b.	n.b.	-	-	0,075 ^{b,c}
F8.5	n.b.	n.b.	-	-	0,028 ^{b,c}

n.b.: nicht bestimmbar

a: Messung erfolgte in 100% Wasser

b: Messung erfolgte in 20% DMSO

5.2.8 Diskussion

Melanoidine zu charakterisieren ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Durch ihren heterogenen und komplexen Charakter sowie ihre molekulare Größe ist es nicht möglich, Melanoidine mit üblichen chromatographischen Methoden zu bestimmen. Die Analyse von niedermolekularen Melanoidinen, welche in unseren Studien eine hemmende Wirkung auf die PDE gezeigt haben, wird zusätzlich durch das Auftreten von niedermolekularen monomeren Verbindungen erschwert, deren vergleichbare Molekularmasse eine Größenausschlusschromatographie unmöglich machen. Melanoidine aus Kaffee weisen Molekulargewichte von 1,5 bis über 100 kDa auf. Dabei liegen 29% der Melanoidine unterhalb einem Molekulargewicht von 12 - 14 kDa und 69% oberhalb von 12 -14 kDa (Bekedam *et al.*, 2008). Während nieder-, mittel- und hochmolekulare Melanoidine aus den frühen Maillard-Produkten in sog. „*bottom-up*“ Reaktionen kondensieren, werden Melanoidine mit sehr hohen Molekulargewichten (~100 kDa) auch durch Kondensation von frühen Maillard-Produkten an Protein- oder Polysaccharidfragmente gebildet. Im Falle von Kaffee sind Arabinogalaktane und Galaktomannane an der Bildung der hochmolekularen Melanoidine beteiligt (Hofmann *et al.*, 2001; Bekedam *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2006; Bekedam *et al.*, 2007; Bekedam *et al.*, 2008; Gniechwitz *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2012). Weiterführend wird diskutiert, dass die hochmolekularen Melanoidine mit einem Molekulargewicht größer 100 kDa mit hoher Wahrscheinlichkeit sogar aus hochmolekularen, nicht-melanoidinen Carriern wie Proteinen oder Polysacchariden und nicht-kovalent gebundenen niedermolekularen Melanoidinen bestehen (Gniechwitz *et al.*, 2008). Die Resultate von Gniechwitz *et al.* (2008) zeigen, dass auch die Bestimmung des Molekulargewichtes der Melanoidine zu falschen Ergebnissen führen kann.

Die Hemmung der PDE-Aktivität, die mit der nicht-löslichen Fraktion FN erzielt worden ist, wurde bisher über eine Verunreinigung mit niedermolekularen, monomeren Substanzen wie Koffein und 5-CQA erklärt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Gniechwitz *et al.* (2008) ist allerdings auch eine Freisetzung von Melanoidinen mit niedrigerem Molekulargewicht aus den unlöslichen Polymeren denkbar, die zu einer Inhibition der PDE führten.

Aufgrund der Größe - auch von kleinsten Melanoidinen - erscheint eine Bindung in das aktive Zentrum des Enzyms als eher unwahrscheinlich. Dies konnte mit der Analyse der Hemmungskinetik von Fraktion F8 bestätigt werden, siehe Tabelle 5-2. Bei Bindung ins aktive Zentrum wird das Substrat verdrängt und man spricht von einer kompetitiven Hemmung. Die Enzymkinetik zeigt allerdings einen nicht-kompetitiven Hemmmechanismus durch Fraktion F8. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bleibt die Substrat-Bindungs-

Affinität (K_m) des aktiven Zentrums erhalten, die Funktion des katalytischen Zentrums wird jedoch durch z.T. unterschiedliche Mechanismen verändert. Ein solcher Mechanismus kann die Chelatisierung bzw. das Abstrahieren von Metallionen sein, die für die Funktionalität des Enzyms essentiell sind. Zwar ist über die Struktur der Melanoidine wenig bekannt, man weiß jedoch von ihren chelatisierenden Eigenschaften gegenüber zwei- und dreiwertigen Kationen. Diese Eigenschaft erklärt bspw. die anti-mikrobiellen, antinutritiven und antioxidativen Effekte von Melanoidinen (Rendleman, 1987; Takenaka *et al.*, 2005; Plavšić *et al.*, 2006; Rufian-Henares und de la Cueva, 2009). In diesem Zusammenhang zeigten Melanoidine mit einem Molekulargewicht > 10 kDa aus Kaffee, Bier und Maillard-Reaktions-Modellen mit Glucose und Glycin hemmende Wirkung auf Metall-abhängige Enzyme, wie das Zn^{2+} -abhängige Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) (Rufián-Henares und Morales, 2007), die Zn^{2+} -abhängige Matrix-Metalloprotease (MMP) (De Marco *et al.*, 2011) und Ca^{2+} -abhängiges Trypsin, jedoch nicht Ca^{2+} -abhängiges Chymotrypsin (Green *et al.*, 1952; Hirano *et al.*, 1994; Brinen *et al.*, 1996). Zum einen wurde das chelatisierende Potential der Melanoidine als Mechanismus diskutiert (Rufián-Henares und Morales, 2007), zum anderen wurde eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Melanoidin diskutiert, was die Unterschiede zwischen Trypsin und Chymotrypsin erklären würde (Hirano *et al.*, 1994). Eine allosterische Bindung der Melanoidine an das Enzym wurde ebenfalls als Wirkmechanismus der Melanoidine diskutiert (Hirano *et al.*, 1994).

Überträgt man die Chelatisierungshypothese auf die PDE, so ist bekannt, dass die Aktivität der PDE sowohl von Mg^{2+} als auch Zn^{2+} abhängig ist (Rall und Sutherland, 1958; Omburo *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1995; Bender und Beavo, 2006). Die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum der PDE wird durch zwei Metallionen, Zn^{2+} und Mg^{2+} , vermittelt (Bender und Beavo, 2006). Ein Entfernen dieser Ionen aus dem aktiven Zentrum würde in einer kompetitiven Kinetik resultieren. Srivastava *et al.* (1995) haben jedoch über eine nicht-kompetitive Kinetik gezeigt, dass die Bindung des Substrates unabhängig von der Mg^{2+} -Pufferkonzentration stattfand. Weitergehend haben Omburo *et al.* (1995) gezeigt, dass die Aktivität der PDE durch Mn^{2+} , Mg^{2+} und Co^{2+} erhöht wurde, und durch Zugabe von größeren Mengen Zn^{2+} oder Cd^{2+} reduziert wurde. Zusammen mit den Resultaten von Srivastava *et al.* (1995) deutet dies auf allosterische Bindungsstellen für Metallionen hin und damit auf eine tiefergehende allosterische Aktivitätsregulation. Somit wäre die mit Fraktion F8 bestimmte nicht-kompetitive Kinetik vereinbar mit den chelatisierenden Eigenschaften der Melanoidine.

Ebenfalls wurde die Hypothese aufgestellt, dass Melanoidine durch allosterische Bindung die Aktivität von Enzymen beeinflussen können (Hirano *et al.*, 1994). PDEs besitzen N-terminale, regulatorische Domänen, die in der allosterischen und post-translationalen Aktivierung/Inaktivierung in Form von Phosphorylierung und Liganden-Bindung eine wichtige

Rolle spielen. In der PDE-Familie 4 ermöglichen diese sog. UCR-Domänen („*upstream conserved regions*“) die Dimerisierung und Aktivierung der PDE durch Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierung und Konformationsänderung (Richter und Conti, 2004). Es wurde gezeigt, dass die Konformationsänderung die Bindung des Inhibitors und des Substrates verändert (Conti *et al.*, 2003; Richter und Conti, 2004). Eine allosterische Bindung der Melanoidine an die UCR-Domänen resultiert theoretisch in einer Veränderung von K_m und somit einer kompetitiven Kinetik. Demnach erscheint diese Theorie für die Melanoidine als nicht zutreffend.

Eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse sind nicht ohne weiteres auf eine *in vivo* Situation übertragbar. Hierbei spielt die Bioverfügbarkeit der Melanoidine eine entscheidende Rolle. Aufgrund eingeschränkter analytischer Methoden ist eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit schwierig. Der allgemeine Konsens, dass Melanoidine aufgrund ihrer Größe schlecht bioverfügbar sind (Morales *et al.*, 2012), wurde bis dato weder belegt noch widerlegt. In einer Rattenstudie in der Malz, Brotkruste und pronyliertes BSA an Ratten verfüttert wurde, hat man die signifikante Änderung von Phase I und II Enzymaktivitäten sowie die dunkle Verfärbung des Urins mit der Aufnahme von Melanoidinen interpretiert (Somoza *et al.*, 2005). Modellstudien zur Bioverfügbarkeit der frühen Maillard-Produkte Lysinoalanin, *N*-Carboxymethyllysin und Fructoselysin, welche an Caseine gebunden an Ratten gefüttert wurden, zeigten Wiederfindungen der Monomere von 3,7 – 29% im Urin abhängig von der beobachteten Verbindung (Somoza *et al.*, 2006). In einer der ersten Studien zur Bioverfügbarkeit der Melanoidine wurde eine hochmolekulare und eine niedermolekulare Fraktion eines Maillard-Reaktion-Modells aus Casein und ^{14}C -markierter Glucose an Ratten verfüttert. Die Wiederfindung der Radioaktivität im Urin betrug für die niedermolekulare Fraktion 27% und für die hochmolekulare Fraktion 4,3% (Finot und Magnenat, 1981). Zwar weisen diese Studien auf moderate bis hohe Bioverfügbarkeiten für Melanoidine unterschiedlicher Molekularmassen hin, jedoch wurde in keiner dieser Studien untersucht, ob die Melanoidine intakt aufgenommen wurden oder als Degradationsprodukte bzw. Melanoidinfragmente geringeren Molekulargewichts resorbiert wurden. Die eigentliche Bioverfügbarkeit der Melanoidine bleibt somit ungeklärt. Demnach kann auch eine Übertragung der Ergebnisse von den *in vitro* Experimenten nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen werden um die Ergebnisse früherer Studien zu interpretieren (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Zudem müssen zusätzlich zur Bioverfügbarkeit beispielsweise Effekte von Metaboliten ebenso wie Akkumulationseffekte und die Möglichkeit des Inhibitionsmechanismus unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden. Ebenfalls scheint ein Einfluss des Koffeins in der *in vivo* Situation eine Rolle zu spielen, obwohl die Ergebnisse der *in vitro* Experimente darauf hindeuten, dass die Koffeinhemmung durch andere Mechanismen verdrängt wird. Die Wirkung von reinem Koffein ist verglichen mit der Wirkung

der Melanoidinfraktion F8 um ein vielfaches geringer. Allerdings weiß man nicht, in welchem Umfang der Adenosin-Antagonismus des Koffeins zu einer Verringerung der PDE-Aktivität sowohl translational als auch post-translational führt.

Weitere Ergebnisse der *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass Fraktionen, die physiologisch relevante Inhaltsstoffe wie N-Methylpyridiniumion (NMP), 3-Caffeoylchinasäure, 4-Caffeoylchinasäure, 5-Caffeoylchinasäure, Trigonellin, Caffeoylchinasäurelactone und Dicaffeoylchinasäuren enthalten, keine Effekte auf die PDE gezeigt haben. Da diese Stoffe nur in der vorliegenden anteiligen Konzentration getestet wurden, kann ein eindeutiger Ausschluss als PDE-Hemmstoffe jedoch nur erfolgen, wenn sie als Reinstoffe in höheren Konzentrationen getestet werden und keinen Effekt zeigen, wie bei NMP der Fall (Montoya, 2012; Montoya *et al.*, 2014). Abschließend lässt sich sagen, dass mit der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung gezeigt werden konnte, dass eine Gruppe von wasserlöslichen, niedermolekularen (≤ 3 kDa) Melanoidinen eine starke Hemmwirkung auf die PDE *in vitro* besitzt und auf die PDE *in vivo* besitzen könnte.

5.3 Einfluss des Artischockenextraktes (ALE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität

In *in vitro* und *ex vivo* Studien konnte eine anti-hypertensive Wirkung eines wässrigen Artischockenextrakts aufgrund einer Erhöhung der NO-Synthese gezeigt werden (Li *et al.*, 2004). Da der Wirkmechanismus dabei in direktem Zusammenhang mit einer Erhöhung der *second messenger* cAMP und cGMP steht, sollte untersucht werden, ob ein Artischockenextrakt einen Einfluss auf die PDE-Aktivität besitzt.

Getrocknete und grob zerkleinerte Artischockenblätter zur Herstellung von medizinischen Tees (Redwood, ApoFit, Bamberg, LOT 01160-033) wurden über eine lokale Apotheke bezogen. Der daraus gewonnene 60%-methanolische Extrakt ALE (*artichoke leaf extract*) wurde auf seine PDE-hemmende Wirkung in den Konzentrationen 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml untersucht. Innerhalb dieses Bereiches konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der PDE-Aktivität beobachtet werden (siehe Abbildung 5-15a). Für Konzentrationen $\geq 0,05$ mg/ml war die Hemmung hoch und höchst signifikant mit $p < 0,01$. Der IC_{50} wurde für den ALE mit $0,9 \pm 0,1$ mg/ml bestimmt und liegt damit im Rahmen der bei Kaffeeextrakten beobachteten IC_{50} -Werte. Die Artischocke ist bekannt für ihre physiologischen Eigenschaften auf den Fettstoffwechsel (Englisch *et al.*, 2000; Bundy *et al.*, 2008), die u.a. den hohen Gehalten an Chlorogensäuren zugeschrieben werden. Schütz *et al.* (2004) fanden in Teilen der essbaren Artischockenblüte Gehalte für vier Mono- und sechs Dicafeoylchinasäuren von insgesamt 4,2 bzw. 5,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht. Als Hauptverbindung der Chlorogensäuren wurden 5-Caffeoylchinasäure (5-CQA) und 1,3-Dicafeoylchinasäure (1,3-DiCQA) identifiziert (Schütz *et al.*, 2004). Mittels HPLC-ESI-MS(/MS) und Retentionszeitenvergleich konnte im ALE 5-CQA und eine nicht weiter identifizierte DiCQA als Hauptkomponenten nachgewiesen werden. Die DiCQA konnte mit $2,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ quantifiziert werden, 5-CQA war in höherer, unbestimmter Konzentration enthalten. In früheren Experimenten zeigte 5-CQA eine hemmende Wirkung auf die PDE-Aktivität. Allerdings wurde ein potentieller Einfluss eines pH-Wert-Shifts und einer resultierenden Proteindeformation nicht sicher ausgeschlossen (Montoya *et al.*, 2014). Bei gleichzeitiger Kontrolle des pH-Wertes wurde deshalb 3,4-DiCQA in den Konzentrationen 1 / 5 / 10 / 50 / 100 / 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im PDE-Assay eingesetzt. Zu beobachten war eine konzentrationsabhängige Abnahme der PDE-Aktivität ab 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,05$), siehe Abbildung 5-15b. Die bei 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhaltene, stärkste PDE-Hemmung lag bei 49%. Der IC_{50} -Wert von 3,4-DiCQA konnte nicht berechnet werden und wird > 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~ 1 mM) erwartet. Unter Berücksichtigung des DiCQA-Gehaltes von 2,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kann jedoch ausgeschlossen werden, dass DiCQAs alleine für die PDE-hemmenden Eigenschaften des ALE verantwortlich sind. Eher muss davon ausgegangen werden, dass die starke PDE-hemmende Wirkung des ALE von mehreren Inhaltsstoffen verursacht wird, zu der DiCQA

beiträgt. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die in Artischocke in hohen Konzentrationen vorkommende 1,3-DiCQA nicht getestet wurde und unter Umständen eine andere Wirkung als die hier getestete 3,4-DiCQA aufweisen könnte. Strukturell betrachtet erfüllen DiCQAs und CQAs die Grundvoraussetzungen um in das aktive Zentrum der PDE zu binden. Diese sind zum einen eine hydrophobe Struktur (z.B. Aromat), die im aktiven Zentrum durch eine hydrophobe Klammer verankert wird, und eine polare Struktur (z.B. Chinasäure), die in der Lage ist mit den Metallionen zu wechselwirken (Card *et al.*, 2004). Vergleicht man jedoch die Struktur der CGAs mit den cyclischen Monophosphat-Nukleosiden, findet man keine übereinstimmenden Strukturelemente. Auch eine Imitation des Pyrimidin-Ringes oder des Purin-Ringsystems erscheint unwahrscheinlich. Da der Mechanismus der Hemmung nicht bestimmt wurde, kann ebenfalls, wie beim Kaffee vermutet, eine nicht-kompetitive Hemmung durch z.B. Zn^{2+} -Komplexierung möglich sein.

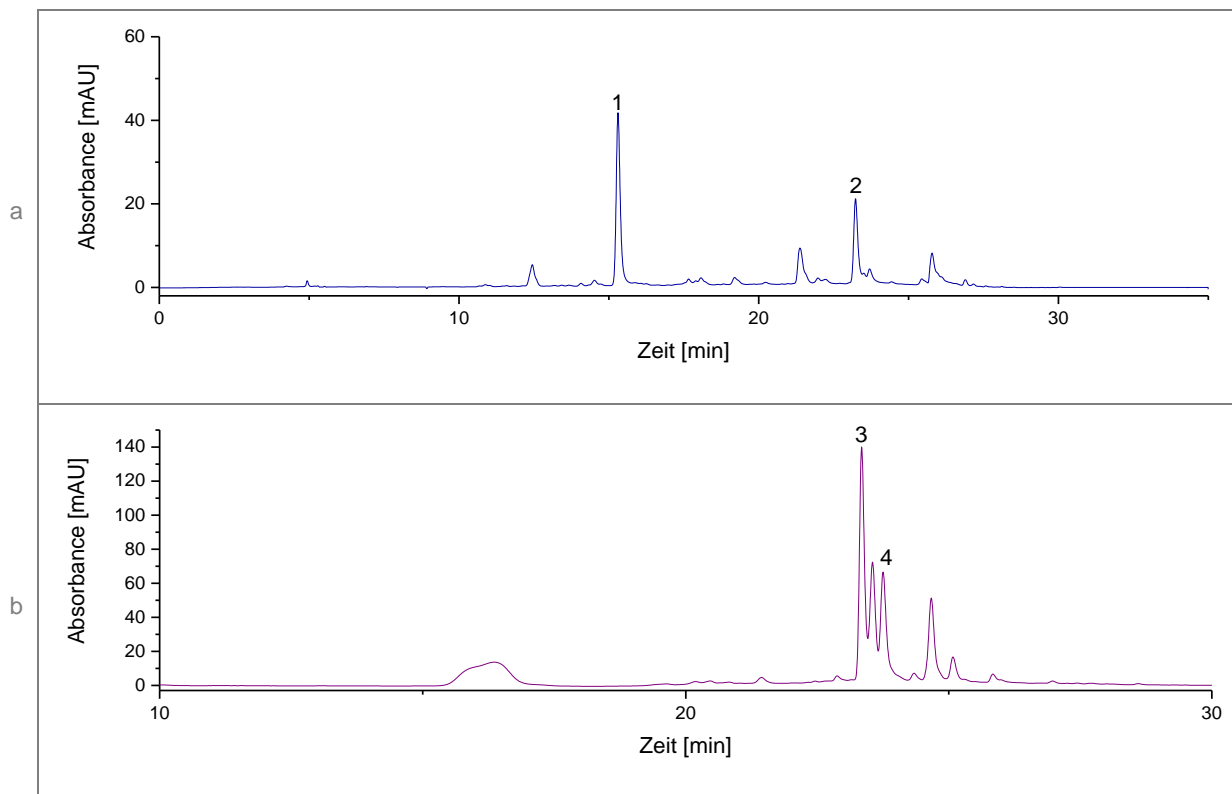


Abbildung 5-14: HPLC-UV Chromatogramme des ALE. Chromatogramm (a): kurze Methode bei 325 nm (4.4.11), 1: 5-Caffeoylchinasäure, 2: nicht näher bestimmte Dicafeoylchinasäure. Chromatogramm (b): lange Methode bei 347 nm (4.5.3) 3: Luteolin-7-O-glucosid, 4 - Luteolin-glucuronid.

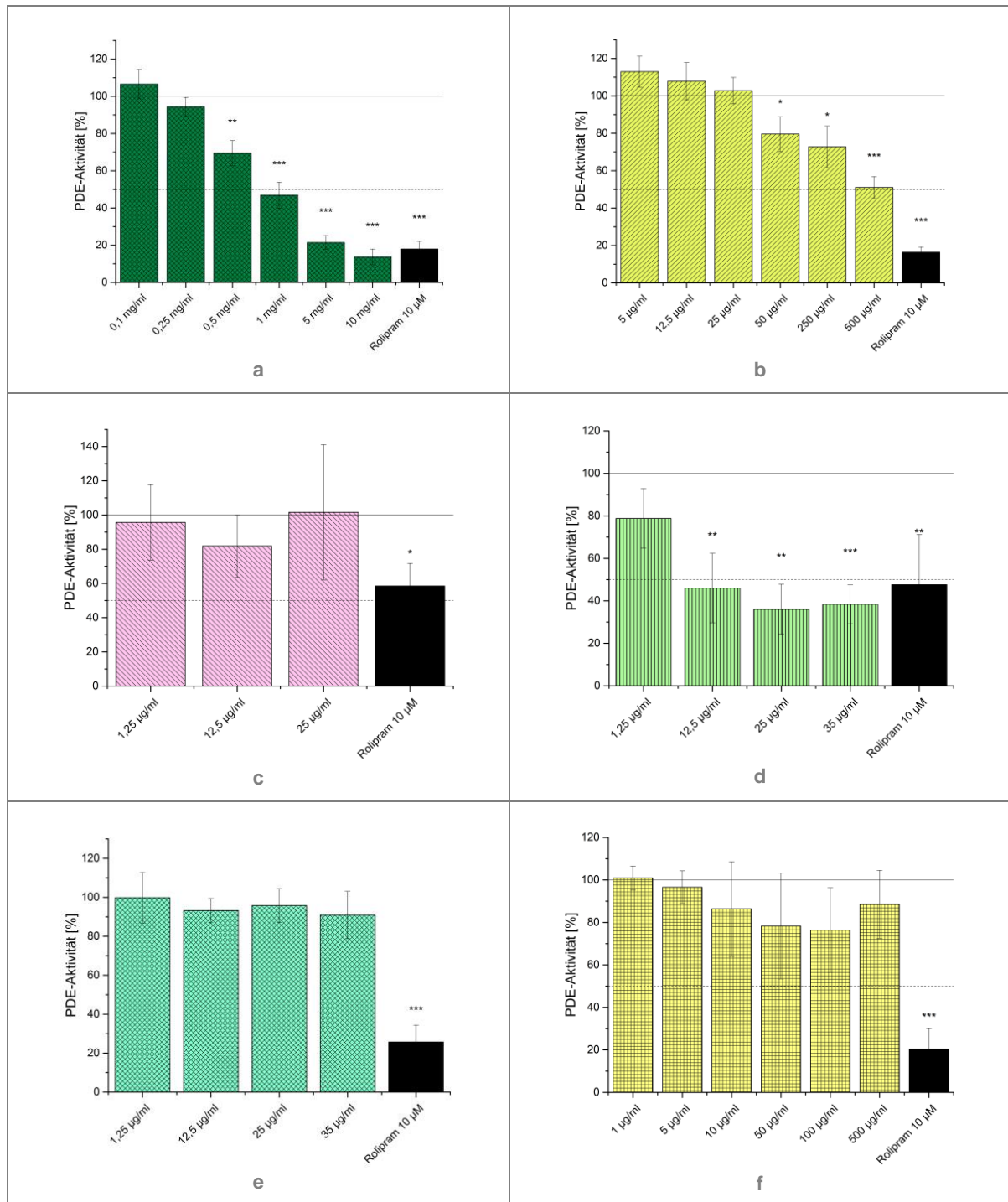


Abbildung 5-15: Einfluss des Artischockenextraktes ALE und verschiedener Inhaltsstoffe der Artischocke auf die PDE-Aktivität: ALE 0,1 - 10 mg/ml (a), 3,4-DiCQA 5 - 500 µg/ml (b), Apigenin 1,25 - 25 µg/ml (c), Luteolin 1,25 - 35 µg/ml (d), Luteolin-glucosid 1,25 - 35 µg/ml (e), Luteolin-glucuronid 1 - 500 µg/ml (f). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

Neben Chlorogensäuren physiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe der Artischocke sind die Flavon-Glykoside von Luteolin und Apigenin. Da Flavone bereits als PDE-Hemmstoffe beschrieben wurden und unter den Flavonoiden zu den stärksten PDE-Hemmstoffen gehören (Beretz *et al.*, 1978; Ferrell *et al.*, 1979; Kuppusamy und Das, 1992; Ko *et al.*, 2004), galt es zu überprüfen, in welchem Umfang diese Stoffe im ALE enthalten sind und die PDE-Aktivität hemmen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse kann Tabelle 5-5 entnommen werden. Zu diesem Zweck wurden die Flavon-Aglyka Apigenin und Luteolin sowie die im ALE identifizierten Glykoside Luteolin-7-O-glucuronid und Luteolin-7-O-glucosid im PDE-Assay getestet. Abhängig von der Löslichkeit in 1% bzw. 10% DMSO wurde Apigenin bis 25 µg/ml (1,25 / 12,5 / 25 µg/ml), Luteolin bis 35 µg/ml (1,25 / 12,5 / 25 / 35 µg/ml), Luteolin-glucosid bis 35 µg/ml (1,25 / 12,5 / 25 / 35 µg/ml) und Luteolin-glucuronid bis 500 µg/ml (1 / 5 / 10 / 50 / 100 / 500 µg/ml) getestet. Für Apigenin, Luteolin-glucosid und -glucuronid konnte in den getesteten Konzentrationen keine Hemmung der PDE beobachtet werden (siehe Abbildung 5-15c, e, f). Für Luteolin konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der PDE-Aktivität beobachtet werden (Abb. Abbildung 5-15d). Die maximale Hemmung betrug 63,9% bei 25 µg/ml ($p < 0,01$). Der IC_{50} -Wert wurde mit $11,8 \pm 2,9$ µg/ml bestimmt. Mittels HPLC-UV und HPLC-ESI-MS-Analytik konnten die Aglyka Apigenin und Luteolin allerdings nicht sicher im Extrakt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden Luteolin-glucosid und Luteolin-glucuronid mit $4,9 \pm 1,0$ µg/mg bzw. $2,7 \pm 0,3$ µg/mg im ALE quantifiziert. Die von Schütz *et al.* (2004) in Artischockenblüten untersuchten Apigenin- und Luteolin-Glykoside lagen in Konzentrationen von 1,9 µg/mg bzw. 0,7 µg/mg Trockenmasse vor. Untersuchungen an Artischockenblättern unterschiedlicher Züchtungen/Kultivare haben gezeigt, dass die Gehalte an Flavonen und Chlorogensäuren stark schwanken können (Pandino *et al.*, 2011; Farag *et al.*, 2013). Die Gehalte an Flavon-Glykosiden im ALE sind vergleichbar mit den in der Literatur berichteten Trockenmassen. Allerdings erscheinen die Gehalte im ALE unter Berücksichtigung der IC_{50} -Werte als zu gering um die starke beobachtete PDE-Hemmung zu begründen. Zusätzlich haben Studien zur Bioverfügbarkeit von Flavonen gezeigt, dass diese stark metabolisiert werden, sodass Luteolin im Plasma lediglich als Phase-II-Metabolit verfügbar ist und dabei die Bioverfügbarkeit des Luteolins unter 2% liegt (Wittermer *et al.*, 2005). Da Luteolin-7-O-glucosid und -glucuronid im PDE-Assay außerdem keine Effekte gezeigt haben, erscheint eine PDE-Hemmung durch Flavone unter physiologischen Bedingungen nach dem Verzehr von Artischockenextrakt unrealistisch.

Tabelle 5-5: Gehalte und IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung der getesteten ALE-Inhaltsstoffe

Inhaltsstoff	Gehalt (µg/mg Extrakt)	IC ₅₀ -Wert bzw. PDE-Restaktivität bei höchster Konzentration	IC ₅₀ -Wert (Literatur)
3,4-DiCQA	2,5 ± 0,5*	n.b., 51,1 ± 5,8% bei 500 µg/ml	
Luteolin	< 0,08 (LOD)	11,8 ± 2,9 µg/ml (41 µM)	8,7 µM ^a , 38 µM ^b , 19 µM ^c
Apigenin	< 0,08 (LOD)	n.b., 101,6 ± 39,5% bei 25 µg/ml	9,2 µM ^a , 64 µM ^b
Luteolin-7-O-glucuronid	2,7 ± 0,3	n.b., 88,5 ± 16,0% bei 500 µg/ml	
Luteolin-7-O-glucosid	4,9 ± 1,0	n.b., 90,9 ± 12,2% bei 35 µg/ml	43 µM ^c

* nicht identifizierte DiCQA; a - (Beretz *et al.*, 1978); b - (Kuppusamy und Das, 1992); c - (Ko *et al.*, 2004);

Neben Cholesterin-senkender Wirkung (Gebhardt, 1998; Englisch *et al.*, 2000; Bundy *et al.*, 2008) und antioxidativen Eigenschaften (Gebhardt, 1997; Zapolska-Downar *et al.*, 2002), konnte für einen wässrigen Artischockenextrakt eine anti-hypertensive Wirkung *in vitro* und *ex vivo* gezeigt werden (Li *et al.*, 2004). Die Behandlung einer humanen Endothelzelllinie (EA.hy926) mit dem Artischockenextrakt resultierte in einer gesteigerten Promoteraktivität und einem Anstieg der mRNA der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie einer gesteigerten Proteinexpression der eNOS. Dies wiederum führte zu einem Anstieg der NO-Synthese in den Zellen. Die Inkubation von isolierten Rattenaortenringen mit dem Artischockenextrakt führte zu einer Verstärkung der durch Acetylcholin eingeleiteten und NO-vermittelten Dilatation des Endothels (Li *et al.*, 2004). Die NO-vermittelte Gefäßdilatation steht in direktem Zusammenhang mit einem Anstieg der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP. Durch den Anstieg der beiden *second messenger* im Gefäßendothel werden, wie in Kapitel 2.1.5 erläutert, die glatte Gefäßmuskulatur und der Kontraktionsapparat gefäßerweiternd beeinflusst. Außerdem kann die Expression der eNOS über das *cAMP response element binding protein* vermittelt werden. Die PDE-hemmende Wirkung des ALE lassen einen Zusammenhang vermuten zu den von Li *et al.* (2004) beobachteten anti-hypertensiven Effekten *in vitro* und *ex vivo*. Li *et al.* (2004) haben gezeigt, dass die anti-hypertensive Wirkung durch Artischocke auf die im Artischockenextrakt enthaltenen Flavone, insbesondere Luteolin-glucosid, zurückzuführen war. Von den im PDE-Assay getesteten Inhaltsstoffen der Artischocke zeigte das Flavon Luteolin den stärksten hemmenden Einfluss auf die PDE-Aktivität, Luteolin-glucosid zeigte jedoch keinen Effekt. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse, was die Wirksamkeit von Luteolin-glucosid betrifft, kann eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus einer anti-hypertensiven Wirkung von Artischockenextrakt nicht bestätigt werden.

Abschließend lässt sich über den ALE sagen, dass eine starke Hemmung der PDE-Aktivität beobachtet wurde, die sich nicht alleine mit den hier untersuchten Inhaltsstoffen erklären lässt. In vergleichbaren Mengen von wenigen µg/g Extrakt waren 3,4-DiCQA, Luteolin-7-O-glucuronid und -glucosid im ALE enthalten. 3,4-DiCQA zeigte im PDE-Assay eine moderate Hemmung, wobei aufgrund der geringen Hemmung (< 50%) kein IC₅₀-Wert bestimmt werden konnte. Die Testung der Flavone konnte durch Löslichkeitsprobleme lediglich in niedrigen Konzentrationsbereichen durchgeführt werden. Luteolin zeigte ein starkes PDE-hemmendes Potential, während Apigenin, Luteolin-glucosid und -glucuronid keinen Effekt auf die PDE-Aktivität besaßen. Die für die PDE-Hemmung verantwortlichen Stoffe des ALE konnten schlussendlich nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Weiterhin konnte PDE-Hemmung als Wirkmechanismus eines anti-hypertensiven Effektes (Li *et al.*, 2004) aufgrund der fehlenden PDE-Hemmung durch Luteolin-glucosid nicht bestätigt werden.

5.4 Einfluss des Ingwerextraktes (GPE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität

Als eine traditionell chinesische Medizin (TCM) besitzt Ingwer antiinflammatorische, anti-hypertensive und anti-thrombotische Wirkungen (Flynn *et al.*, 1986; Srivastava, 1986; Koo *et al.*, 2001; Tjendraputra *et al.*, 2001; Ghayur *et al.*, 2005; Chrubasik *et al.*, 2007). Dabei wurde bereits in mehreren Studien untersucht, ob neben der Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxygenase sowie einem Serotonin-Antagonismus eine Hemmung der PDE als Wirkmechanismus zugrunde liegt. Während *in vitro* und *in vivo* Studien eine Beteiligung einer PDE-Hemmung ausschlossen (Kobayashi *et al.*, 1987; Thein *et al.*, 1995; Ghayur *et al.*, 2005), zeigte eine *in silico* Studie, dass der Inhaltsstoff aus Ingwer Demethoxy-[6]-Shogaol PDE-hemmendes Potential besitzt (Chang *et al.*, 2011). Zur Klärung dieser widersprüchlichen Datenlage sollte ein Ingwerextrakt auf sein PDE-hemmendes Potential getestet werden.

Ingwerpulver wurde über einen lokalen Supermarkt bezogen (Ostmann Gewürze, Dissen a.T.W., LOT 3326AB). Der daraus durch Fest-Flüssig-Extraktion mit Wasser gewonnene Extrakt GPE („ginger powder extract“) wurde im PDE-Assay auf seine PDE-hemmende Wirkung in den Konzentrationen 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml untersucht. Mit zunehmender Konzentration nahm auch die Hemmung der PDE zu. Ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml war signifikante Hemmung zu beobachten. Der IC₅₀-Wert lag bei 1,7 ± 0,2 mg/ml. Um zu klären, ob die verantwortlichen Substanzen hydrophiler oder lipophiler Natur sind, wurde ein aus dem GPE mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat gewonnene GLE („ginger lipid extract“) und der wässrige Rückstand GWE („ginger watery extract“) ebenfalls im PDE-Assay eingesetzt. Die beiden Extrakte wurden in den Verhältnissen ihrer Ausbeute eingesetzt (GLE: 5 / 12,5 / 25 / 50 / 250 / 500 µg/ml; GWE: 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml). GWE zeigt keine konzentrationsabhängige Hemmung. Erst bei einer Konzentration von 10 mg/ml ist eine Hemmung zu erkennen (p < 0,001). Der daraus berechnete IC₅₀-Wert liegt bei 10,5 ± 1,9 mg/ml. Beim GLE ist eine konzentrationsabhängige Hemmung ab einer Konzentration von 50 µg/ml zu beobachten. Diese war ab 250 µg/ml hoch signifikant (p < 0,01). Der IC₅₀-Wert wurde mit 455 ± 19 µg/ml bestimmt. Somit kann daraus geschlossen werden, dass die Inhaltsstoffe, die für die Hemmung der PDE durch Ingwerpulverextrakt lipophiler Natur sind. Da Ingwer bekannt ist für die lipophile Gruppe der Gingerole, wurde [6]-Gingerol als Leitsubstanz in Ingwer ebenfalls im PDE-Assay eingesetzt. In den getesteten Konzentrationen 5 / 12,5 / 25 / 50 / 25 / 500 µg/ml zeigte [6]-Gingerol eine konzentrationsabhängige Abnahme der PDE-Aktivität, die sich ab 50 µg/ml signifikant von der Kontrolle unterschied. Im eingesetzten Konzentrationsbereich erreichte die Hemmung keine Werte über 50%, sodass für [6]-Gingerol kein IC₅₀-Wert berechnet werden konnte. Die bei 500 µg/ml (1,7 mM) beobachtete, höchste Hemmung lag bei 38,2%. Die mittels HPLC-

UV bestimmten Gehalte an [6]-Gingerol in den Extrakten lagen für GPE bei $10,0 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ und für GLE bei $205,4 \pm 11,7 \mu\text{g}/\text{mg}$. [6]-Gingerol konnte im GWE nicht nachgewiesen werden ($< 0,27 \mu\text{g}/\text{mg}$). Zusätzlich zu den selbst hergestellten Fraktionen und dem Extrakt stellte die Firma Truw Arzneimittel einen Ingwerrhizom-Extrakt (GRE) für die Testung im PDE-Assay zur Verfügung. Dieser Extrakt wurde mittels Extraktion mit überkritischem CO_2 erhalten, konnte aufgrund seiner Lipophilie allerdings auch mit Tensiden nicht in wässrige Lösung gebracht werden, sodass eine Testung in adäquaten Konzentrationen nicht durchgeführt werden konnte. Eine HPLC-Analyse des Extraktes erfolgte trotzdem analog zu GPE, GWE und GLE, siehe Abbildung 5-18. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 5-6 gezeigt.

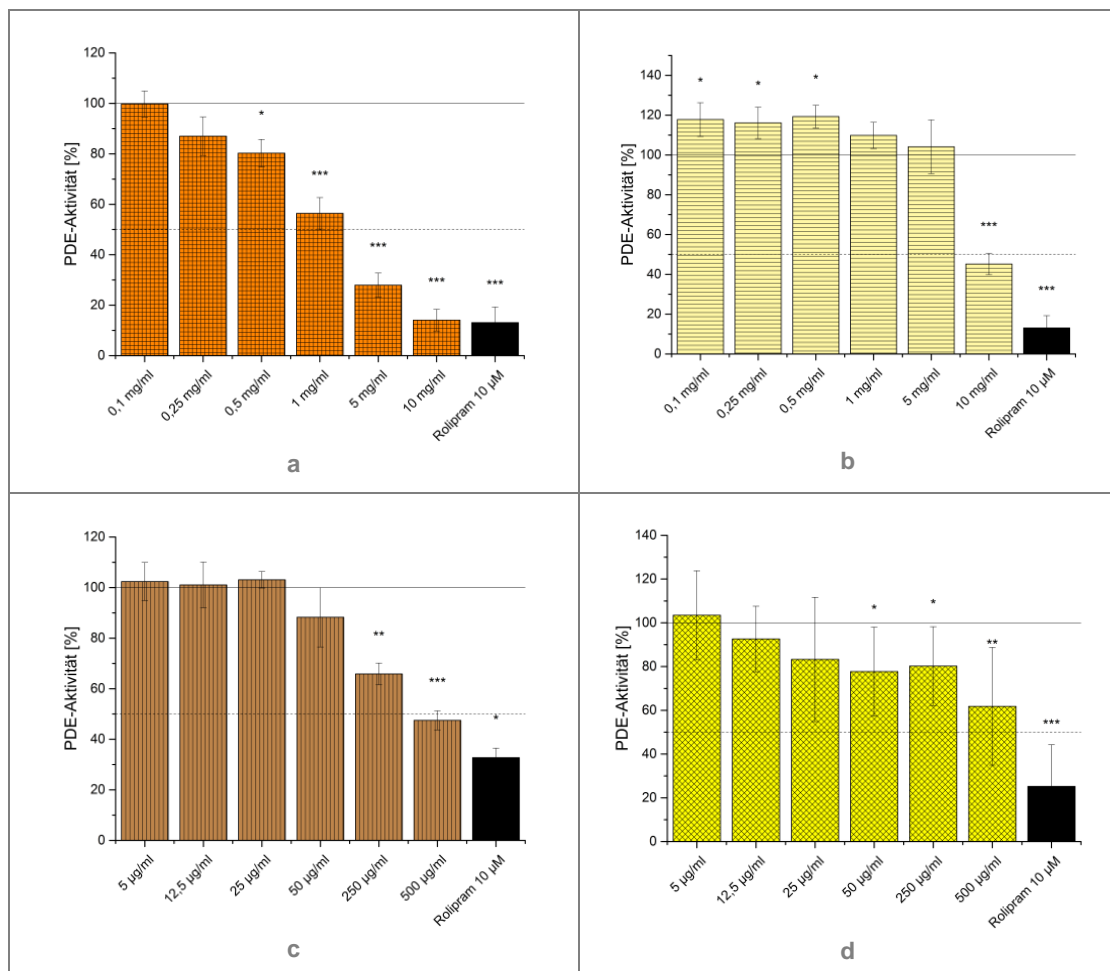


Abbildung 5-16: Einfluss verschiedener Ingwerextrakte auf die PDE-Aktivität: GPE 0,1 - 10 mg/ml (a), GWE 0,1 - 10 mg/ml (b), GLE 5 - 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c) und [6]-Gingerol 5 - 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (d). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 μM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

Tabelle 5-6: Gehalte und IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung der getesteten Ingwerextrakte GPE, GWE, GLE und [6]-Gingerol.

Substanz / Extrakt	IC ₅₀ -Wert oder höchste Hemmung / Konzentration	Gehalt im GPE (µg/mg)	Gehalt im GLE (µg/mg)	Gehalt im GWE (µg/mg)
GPE	1,7 ± 0,2 mg/ml	-	-	-
GLE	455 ± 19 µg/ml	50	-	-
GWE	10,5 ± 1,9 mg/ml	950	-	-
[6]-Gingerol	38,2% bei 500 µg/ml	10,0 ± 0,6	205,4 ± 11,7	< 0,27

[6]-Gingerol zeigte zwar einen nennenswerten PDE-hemmenden Effekt, die Konzentration und das Potential waren allerdings zu gering um allein für die PDE-hemmende Wirkung des Extraktes verantwortlich zu sein. Zusammen mit den Ergebnissen des GLE lässt sich vermuten, dass nicht getestete, verwandte Gingerol-Verbindungen einen synergistischen Effekt aufweisen. Neben Gingerolen kann Ingwer auch Flavonole und Flavone enthalten. Diese konnten nach saurer Hydrolyse im Ingwerrhizom nachgewiesen werden (Ghasemzadeh und Ghasemzadeh, 2011), was für die vorwiegende glykosidische Bindung dieser Substanzen spricht. Wie in Kapitel 5.3 bereits diskutiert, wiesen Flavonglykoside keine PDE-hemmende Wirkung auf, weshalb der Einfluss durch Flavone und Flavonole im Ingwer als geringwertig eingeschätzt wird.

Betrachtet man frühere Studien aus der Literatur, konnten bisher keine PDE-hemmenden Effekte durch Ingwer oder [6]-Gingerol beobachtet werden. Thein *et al.* (1995) fanden keine cAMP-PDE-inhibitorische Wirkung mit einem wässrigen Ingwerwurzelextrakt *in vitro*. Kobayashi *et al.* (1987) beobachteten keine signifikante PDE-Hemmung *in vitro* durch [6]-Gingerol. In einer Rattenstudie wurde zusätzlich eine Beteiligung der PDE bei anti-hypertensiven Eigenschaften von Ingwer ausgeschlossen (Ghayur *et al.*, 2005). Mögliche Hinweise auf die PDE-hemmenden Eigenschaften von Ingwer stammen aus einem *in silico screening* Verfahren. Dabei wurden drei potentielle PDE-Hemmstoffe aus der Familie der Zingiberaceae identifiziert, wovon einer das in *Zingiber officinale* vorkommende Demethoxy-[6]-shogaol sein soll (siehe Abbildung 5-17), jedoch nicht der abgebildeten Strukturformel entspricht (Chang *et al.*, 2011). Dennoch sind die Strukturen der potentiellen PDE-Hemmstoffe mit den in *Zingiber officinale* vorkommenden Gingerolen verwandt und erfüllen die strukturellen Voraussetzungen, ins aktive Zentrum der PDE zu binden (Card *et al.*, 2004). Die physiologische Bedeutung der PDE-Hemmung durch Ingwer ist maßgeblich abhängig von den physiologisch erreichbaren Konzentrationen. Überträgt man die Bioverfügbarkeit von ca. 90% aus Tierstudien (Nakazawa und Ohsawa, 2002) auf den Menschen und geht von maximalen Gingerol-Gehalten von 10 mg/g in Supplementen aus (Schwertner und Rios, 2007; Alqasoumi, 2009; Tao *et al.*, 2009), so sind Plasmakonzentrationen von wenigen µg/ml

erreichbar³⁶. In einer Humanstudie von Zick *et al.* (2008) wurden nach Verabreichung eines Ingwerextraktes in den Dosen 1,0, 1,5 und 2,0 g entsprechend 50, 75 und 100 mg Gingerolen c_{\max} -Werte für [6]-Gingerol-Metabolite zwischen 0,2 und 4,4 $\mu\text{g/ml}$ im Plasma der Probanden detektiert (Zick *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie wurden nach dem Trinken von Ingwertee aus frischem Rhizom c_{\max} -Werte für [6]-, [8]- und [10]-Gingerol von 12,4 ng/ml (42 nM), 1,7 ng/ml (5,3 nM) und 1,7 ng/ml (4,8 nM) im Plasma von zwei Probanden erreicht (Schoenknecht *et al.*, 2016). Die konsumierte Menge an [6]-, [8]- und [10]-Gingerol betrug dabei 28,4 mg, 1,4 mg und 0,8 mg. Diese Studien zeigen, dass die physiologisch erreichbaren c_{\max} -Werte weit unter den *in vitro* bestimmten IC_{50} -Werten liegen.

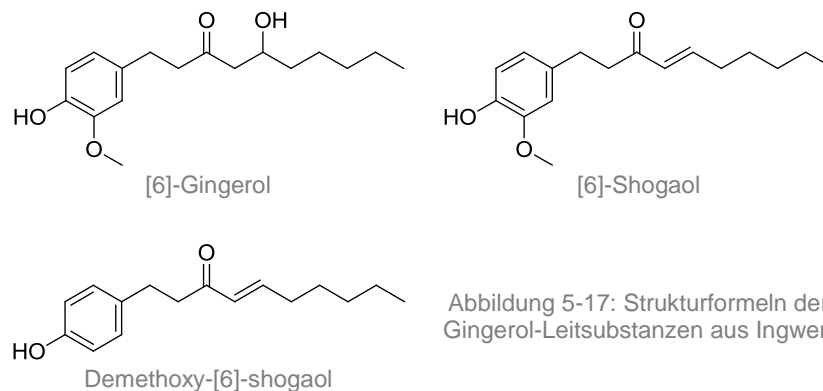


Abbildung 5-17: Strukturformeln der Gingerol-Leitsubstanzen aus Ingwer.

Die physiologischen Effekte des Ingwers umfassen antiinflammatorische, anti-thrombotische und anti-hypertensive Wirkungen. Als Wirkmechanismen wurden in zahlreichen Studien die Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Hemmung sowie Serotonin-Antagonismus der Scharfstoffe identifiziert. Dennoch ist ein zusätzlicher Effekt durch eine PDE-Hemmung denkbar. Die antiinflammatorische Wirkung des Ingwers wird zurückgeführt auf die Hemmung der COX-1, COX-2 und 5-LOX (Flynn *et al.*, 1986; Tjendraputra *et al.*, 2001), wodurch die Biosynthese der Thromboxane, Leukotriene und Prostaglandine gehemmt wird. Diese sog. Eicosanoide binden an G_s - oder G_i -gebundene Rezeptoren und führen zu einer Erniedrigung oder Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Funk, 2001). Die Hemmung der Eicosanoidbiosynthese, insbesondere von Prostacyclin und der Thromboxane, spielt auch für die anti-thrombotische (Srivastava, 1986) und anti-hypertensive (Ghayur *et al.*, 2005) Wirkung des Ingwers eine grundlegende Rolle. Durch die Hemmung der PDE wäre ein Eingreifen in diese Signalkaskaden und somit eine ergänzende antiinflammatorische, anti-thrombotische und anti-hypertensive Wirkung durch Ingwer denkbar. Auch der Serotonin-Antagonismus der Ingwerinhaltsstoffe stellt einen anti-hypertensiven und anti-thrombotischen Wirkmechanismus dar (Koo *et al.*, 2001). Der Neurotransmitter Serotonin bindet

³⁶ Annahmen zur Berechnung: Verzehr von 1 g Supplement entspricht 10 mg Gingerol, Bioverfügbarkeit 90% (9 mg) und Verteilung auf durchschn. Plasmavolumen 2,5 l, erreichbare Plasmakonzentration 3,6 $\mu\text{g/ml}$ (9 mg/2,5 l).

überwiegend an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, darunter zahlreiche G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hannon und Hoyer, 2008), wie der durch Inhaltsstoffe des Ingwers gehemmte Rezeptor 5-HT_{1A} (Nievergelt *et al.*, 2010). Auch hier hätten eine PDE-Hemmung und der resultierende, steigende, intrazelluläre cAMP-Spiegel einen verstärkenden Effekt auf den Serotonin-Antagonismus der Inhaltsstoffe des Ingwers. Diese Vermutungen sind jedoch rein spekulativ und bedürfen gezielter Untersuchung.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutlich inhibierende Wirkung von Ingwerextrakten auf die PDE-Aktivität *in vitro* entgegen der Beobachtungen aus früheren Studien (Kobayashi *et al.*, 1987; Thein *et al.*, 1995). Die Wirkung des GPE konnte zurückgeführt werden auf die lipoide, Gingerol-reiche Fraktion GLE. Es wird aufgrund des PDE-hemmenden Potentials von [6]-Gingerol vermutet, dass die beobachteten Effekte auf Gingerole und Gingerol-verwandte Substanzen zurückzuführen sind. Die unter physiologischen Bedingungen realistischen C_{max}-Werte der Gingerole liegen allerdings deutlich unterhalb der festgestellten IC₅₀-Werte, sodass ein physiologischer Einfluss durch PDE-Hemmung fraglich bleibt. Zwar stellen die Cyclooxygenase-, Lipoxygenase-Hemmung und der Serotonin-Antagonismus die physiologischen Hauptmechanismen des Ingwers dar, allerdings kann im Bereich der antiinflammatorischen, anti-hypertensiven und anti-thrombotischen Wirkungen eine verstärkende Wirkung aufgrund einer PDE-Hemmung auftreten. Dies ist in Zukunft genauer zu untersuchen.

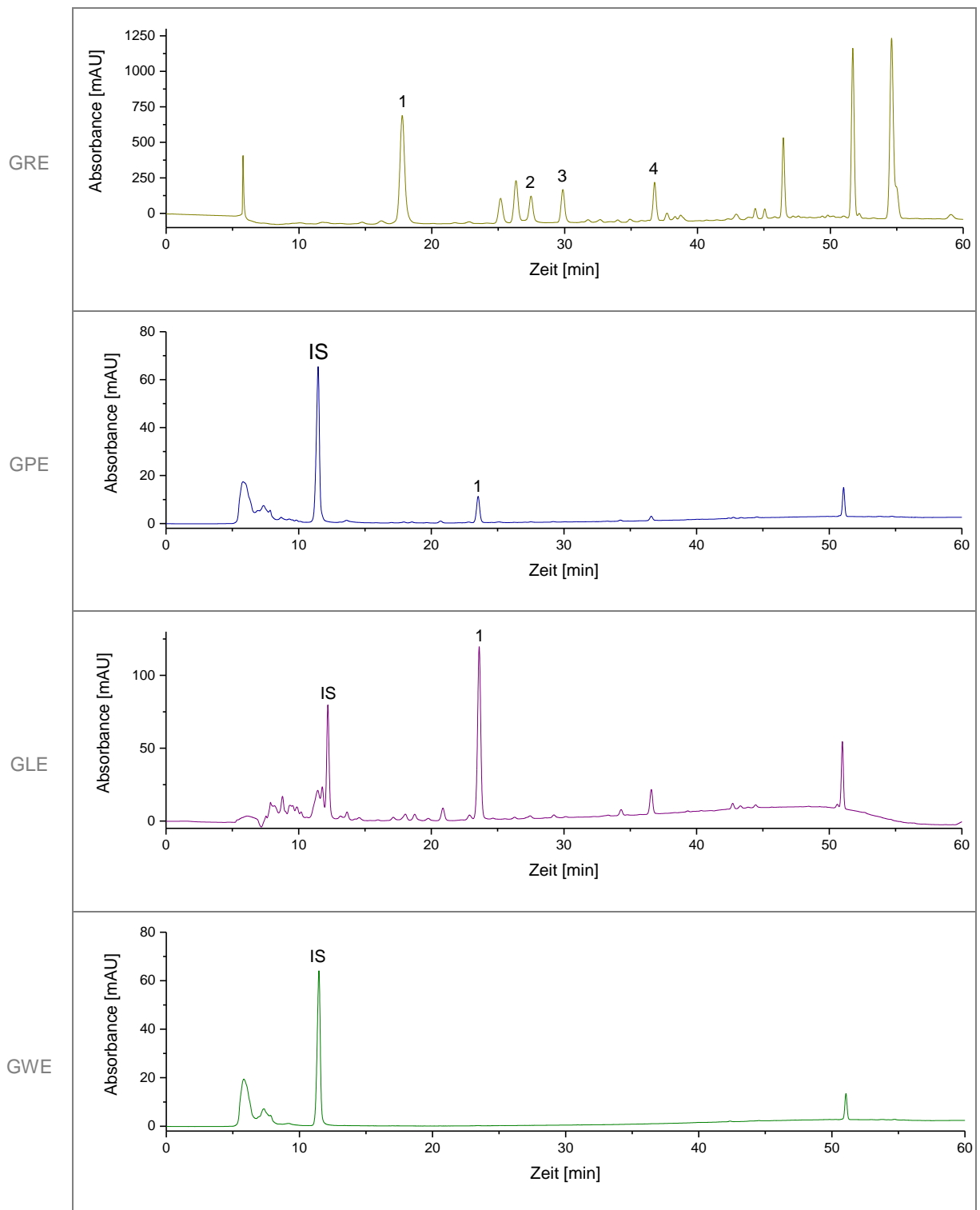


Abbildung 5-18: HPLC-UV-Chromatogramme der Ingwerextrakte GRE, GPE, GLE, GWE bei 230 nm (Methode siehe Kap. 4.6.5). 1: [6]-Gingerol, 2: [8]-Gingerol, 3: [6]-Shogaol, 4: [10]-Gingerol, IS: 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure. GRE: „ginger rhizome extract“ bereitgestellt von Truw Arzneimittel GmbH. Verschiebung der Retentionszeit kommt zustande durch Verwendung von Säulen unterschiedlichen Alters.

5.5 Einfluss des Erdbeerbaumextraktes (SFE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität

Arbutus unedo ist ein traditionelles marokkanisches Heilmittel für die Behandlung von Bluthochdruck und Diabetes (Ziyyat *et al.*, 1997). Neben anti-hypertensiven Effekten wurden in zahlreichen Studien auch anti-thrombotische Wirkmechanismen für wässrige *Arbutus*-Extrakte gezeigt (Ziyyat *et al.*, 2002; Mekhfi *et al.*, 2006; El Haouari *et al.*, 2007; Afkir *et al.*, 2008). Eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus erscheint dabei plausibel. Als Droge werden sowohl die Blätter als auch die Wurzeln von *Arbutus unedo* verwendet. Es sollte überprüft werden, ob eine PDE-Hemmung durch die als Lebensmittel regional vertriebenen Früchte des Erdbeerbaumes beobachtet werden kann.

Reife Früchte von *Arbutus unedo* (Ericaceae) wurden im Oktober 2014 in Najac, Region Aude in Südfrankreich gesammelt. Der aus den Früchten von *Arbutus unedo* (Ericaceae) gewonnene, mit XAD aufgereinigte Extrakt („strawberry fruit extract“, SFE) wurde hinsichtlich des Einflusses auf die PDE-Aktivität in den Konzentrationen 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/ml untersucht. Wie in Abbildung 5-19a zu erkennen, zeigte der SFE bis Konzentrationen von 5 mg/ml keine signifikanten Effekte auf die PDE-Aktivität. Bei einer Konzentration von 10 mg/ml konnte eine signifikante Hemmung von $23 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) beobachtet werden. Verglichen mit den Ergebnissen der Testung des Kaffees (vgl. Kap. 5.1), des Artischockenextraktes (vgl. Kap.5.3) und des Ingwerextraktes (vgl. Kap. 5.4), sind die Resultate des SFE als vernachlässigbar gering einzuschätzen.

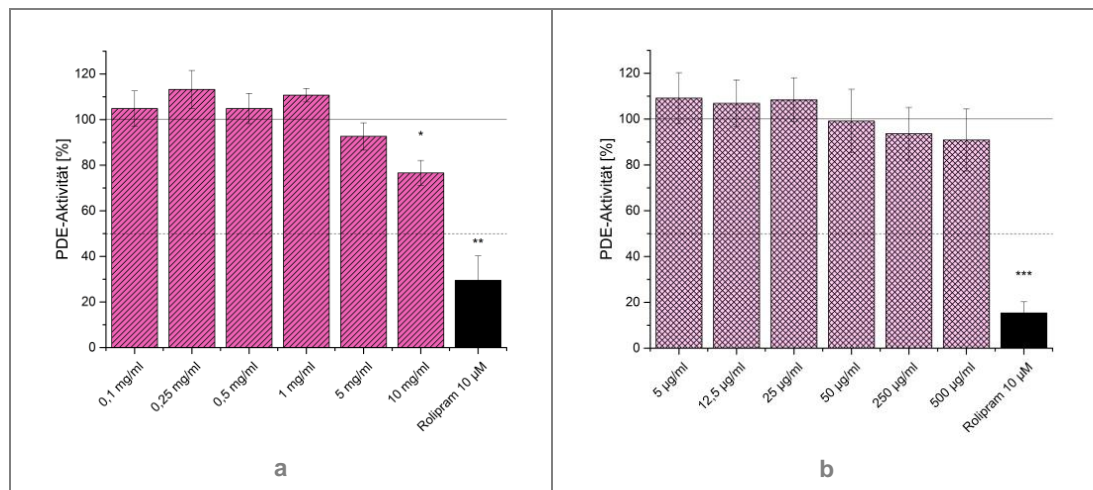


Abbildung 5-19: Einfluss des Erdbeerbaumextraktes SFE 0,1 - 10 mg/ml (a) und von Arbutin 5 - 500 µg/ml (b) auf die PDE-Aktivität. PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

In *Arbutus unedo* enthalten ist das Hydrochinon- β -D-glucopyranosid Arbutin (Abbildung 5-19c), welches für seine antibakterielle Wirkung bei Harnwegsinfekten bekannt ist (Schindler *et al.*, 2002). Es wurde neben dem SFE ebenfalls auf seine Wirkung auf die PDE-Aktivität untersucht. In den getesteten Konzentrationen bis 1,8 mM (5 / 12,5 / 25 / 50 / 100 / 500 μ g/ml) konnte keine Hemmung der PDE beobachtet werden (s. Abbildung 5-19b). Die Quantifizierung von Arbutin mittels HPLC-UV ergab einen Gehalt von $20,0 \pm 1,3$ μ g/mg im SFE (n=2). Durch hohe Verluste bei der Aufarbeitung des Extraktes kann der Gehalt an Arbutin nicht auf die Ausgangsmenge in Früchten zurückgerechnet werden. Literaturdaten liegen zum jetzigen Zeitpunkt nur über Gehalte in Blättern vor. Pavlovic *et al.* (2009) berichteten dort einen Arbutingehalt von 12 μ g/mg Trockengewicht (n = 1).

Als Hauptkomponente des SFE konnte mittels HPLC-MS/MS eine nicht näher bestimmte Galloylchinasäure bei einer Retentionszeit von 12,7 min identifiziert werden (s. Abbildung 5-20). Die im +Q1-Modus identifizierten m/z -Verhältnisse von 345,1 und 362,1 konnten dem $[M+H]^+$ und dem $[M+NH_4]^+$ der Galloylchinasäure mit einer Masse von 344,07 g/mol zugeordnet werden, siehe Abbildung 5-21a und b. Die Fragmentierung im MS²-Modus (m/z 362,1) zeigte ein einzelnes starkes Signal bei m/z 152,7, siehe Abbildung 5-21c, was mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Gallussäure-Fragment (-H₂O) zugeordnet werden kann. Das im -Q1-Modus detektierte m/z -Verhältnis von 342,8 wurde dem $[M-H]^-$ zugeordnet und das überwiegende MS²-Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 190,6 wurde durch Literaturvergleich dem Chinasäure-Fragment zugeordnet, siehe Abbildung 5-21d (Ruiz *et al.*, 2015). Die Position des Chinasäureesters wurde nicht weiter bestimmt. Pawlowska *et al.* (2006) identifizierten in *Arbutus unedo* Früchten die beiden Isomere 3-Galloylchinasäure und 5-Galloylchinasäure, siehe Abbildung 5-22. Ein Zusammenhang zwischen Galloylchinasäure und PDE-Hemmung konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

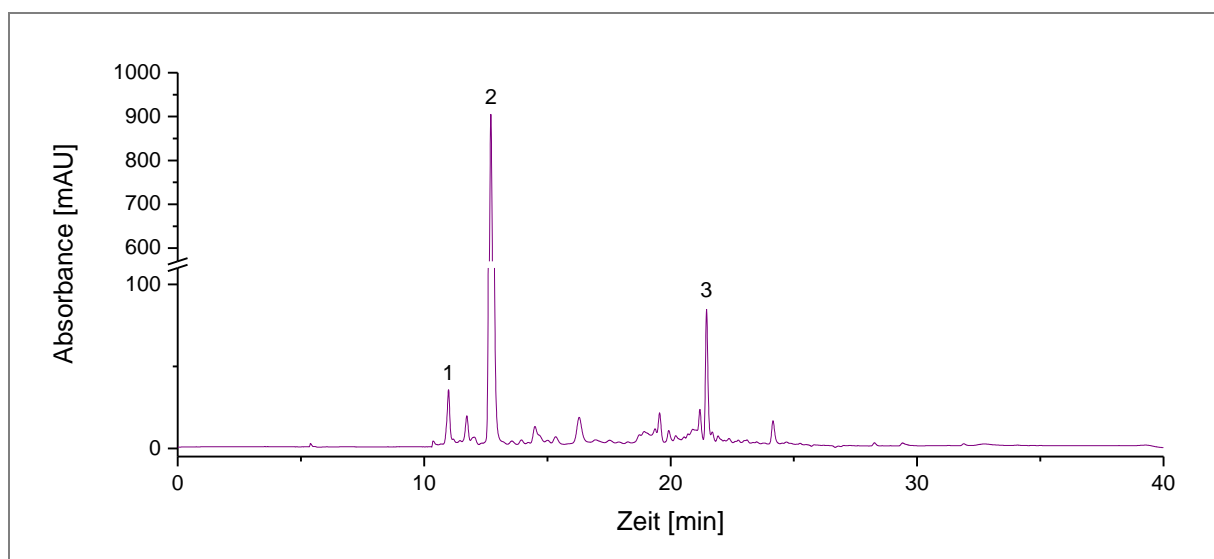


Abbildung 5-20: HPLC-UV-Chromatogramm des SFE bei 280 nm (Methode siehe Kap. 4.7.3). 1: Arbutin bei 11,0 min, 2: Galloylchinasäure bei 12,7 min, 3: Coffein (IS) bei 21,5 min.

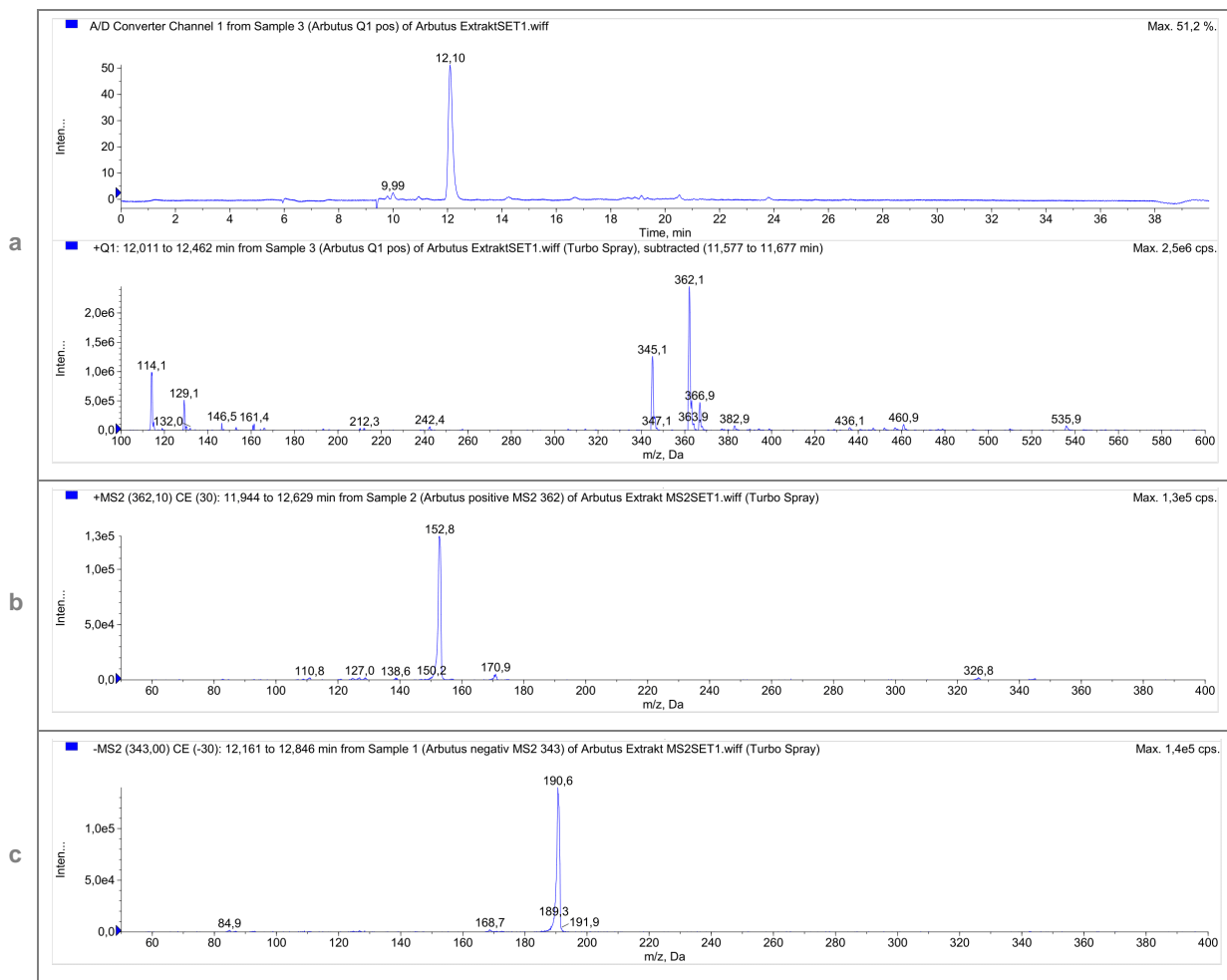


Abbildung 5-21: HPLC-UV-Chromatogramm des SFE bei 280 nm und Q1-Spektrum positiv 12,1-12,5 min (a), +MS²-Spektrum m/z 362,1 von 12,1-12,5 min (b), -MS²-Spektrum m/z 343,0 von 12,1-12,5 min (c), Methode siehe Kapitel 4.7.2.

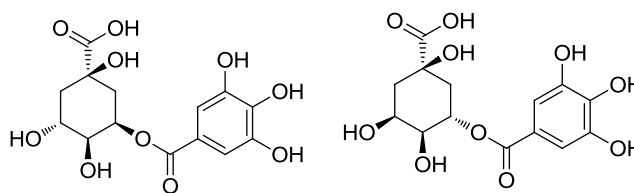


Abbildung 5-22: Galloylchinasäuren in Erdbeerbaumfrüchten: 3-Galloylchinasäure links, 5-Galloylchinasäure rechts.

Anthocyane und besonders deren Aglyka sind als PDE-Hemmer mit IC₅₀ Werten im ein- bis dreistelligen mikromolaren Bereich bekannt - wie in Tabelle 5-7 zusammengefasst (Beretz *et al.*, 1978; Marko *et al.*, 2004; Dell'Agli *et al.*, 2005). Anthocyane, die in *Arbutus unedo* Früchten generell vorkommen, sind Delphinidin-3-O-galactosid, Cyanidin-3-O-galactosid, Cyanidin-3-O-glucosid und Cyanidin-3-O-arabinsid (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014). Daher wurde eine Hemmwirkung durch Anthocyane im SFE vermutet. Anthocyane und andere Flavonoide können Phosphodiesterasen kompetitiv

hemmen, wobei vermutet wird, dass der C-Pyranonring der Flavonoide den Pyrimidinring der Nucleosidmonophosphate imitiert (Ferrell *et al.*, 1979). Die Erklärungen, warum der erwartete Effekt nicht eintraf, betreffen zum einen die Stabilität der Anthocyane unter Assay-Bedingungen und zum anderen den Gehalt an Anthocyanen. Die Literaturangaben zu den Gehalten in den Früchten unterliegen starken Schwankungen und reichen von 0,51 mg/100 g Frischgewicht (Pawlowska *et al.*, 2006) über 3,77 mg/100 g Frischgewicht (Pallauf *et al.*, 2008) zu 517,40 mg/100 g Frischgewicht (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014). Der Anthocyangehalt im SFE wurde nicht bestimmt, eine rote Färbung des Extraktes konnte jedoch optisch bestätigt werden. Unabhängig vom Gehalt spielt der pH-Wert des Assays eine entscheidende Rolle. Anthocyane liegen unter einem pH-Wert von 3 als Flavyliumkation vor, welches bei pH-Werten oberhalb von 3 nicht stabil ist. Bei einem pH-Wert im Assay von 7,4 liegen die meisten Anthocyane in Form von Flavenolat anionen vor. Eine Überprüfung der Stabilität unter Assay-Bedingungen hat nicht stattgefunden. Es wurde angenommen, dass beide Faktoren – Stabilität und Gehalt – bei dem Ausbleiben der PDE-Hemmung eine Rolle spielten. Weiterhin kann zur Erklärung die Struktur-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden. Dell’Agli *et al.* (2005) fanden eine negative Korrelation zwischen PDE-Hemmung und zunehmender Glykosylierung während Marko *et al.* (2004) eine positive Korrelation zwischen PDE-Hemmung und zunehmendem Methoxyierungsgrad am B-Ring zeigen konnten. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung könnte auf ein nicht optimales Anthocyanprofil in *Arbutus unedo* mit unmethoxylierten Delphinidin- und Cyanidin-Glykosiden hindeuten.

Die anti-thrombotischen und anti-hypertensiven Effekte der wässrigen *Arbutus unedo*-Zubereitungen deuteten auf eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus hin. Studien zum Wirkmechanismus der anti-hypertensiven Wirkung haben gezeigt, dass die Vasorelaxation Endothel-abhängig ist. Weiterhin konnten *Arbutus*-Extrakte eine Hemmung der Vasorelaxation durch NO-Synthase-Hemmer aufheben (Ziyyat *et al.*, 2002; Afkir *et al.*, 2008). Wie in Kapitel 2.1.5 erläutert, führt endothelial generiertes NO zu einem Anstieg an cGMP und über zahlreiche Mechanismen zur Entspannung des Blutgefäßes. Die beobachteten Effekte von *Arbutus*-Extrakten auf NO-Synthase-Hemmer-behandelte Blutgefäße könnten auf eine Hemmung der PDE im Endothel und den daraus resultierenden Anstieg an cGMP zurückzuführen sein. Die Fraktionierung von methanolischen *Arbutus*-Extrakten zeigte darüber hinaus, dass der anti-hypertensive Effekt in Fraktionen, welche reich an Procyanidinen und Catechinen waren, am stärksten war (Legssyer *et al.*, 2004). Da Catechine auch als PDE-Hemmer in der Literatur beschrieben sind (Beretz *et al.*, 1978; Ruckstuhl *et al.*, 1979), wurde eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus in Betracht gezogen. Laut Literatur sind die in *Arbutus*-Extrakten enthaltenen Procyanidine auch für die anti-thrombotischen Effekte verantwortlich (Mekhfi *et al.*, 2006). Weiterhin konnte als Wirkmechanismus gezeigt werden, dass durch *Arbutus*-Extrakte die Thrombozyten-

Aktivierung durch eine Dämpfung der Ca^{2+} Mobilisation in den Thrombozyten gehemmt wird (El Haouari *et al.*, 2007). Dies ist wie in Kapitel 2.1.4 und Tabelle 2-5 erläutert ein Prozess, der direkt abhängig von den zyklischen Nukleotiden ist und somit durch eine PDE-Hemmung beeinflusst werden kann. Obwohl die physiologischen Effekte von *Arbutus unedo* eine PDE-Hemmung vermuten lassen, konnte sie dennoch mit dem SFE nicht bestätigt werden.

Tabelle 5-7: IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung von Anthocyanen aus der Literatur

Anthocyan	IC_{50} -Wert	PDE-Isoform	Quelle
Malvidin-3-O-glucosid	35,4 μM	5	a
Malvidin-3,5-O-diglucosid	>> 50 μM	5	a
Cyanidin-3,5-O-diglucosid	>> 50 μM	5	a
Malvidin	24,9 μM	5	a
	23 μM	4	b
	7,8 μM	unbekannt	c
	70 μM	unbekannt	d
Pelargonidin	23 μM	unbekannt	d
	~125 μM	4	b
Peonidin	~65 μM	4	b
Cyanidin	~175 μM	4	b
Delphinidin	~250 μM	4	b

a - (Dell'Agli *et al.*, 2005); b - (Marko *et al.*, 2004); c - (Beretz *et al.*, 1978); d - (Ruckstuhl *et al.*, 1979).

Somit kann abschließend ausgesagt werden, dass der Extrakt aus *Arbutus unedo* Früchten (SFE) keine Wirkung auf die PDE gezeigt hat. Zwar wurden die physiologischen Wirkungen, die Hinweise auf eine PDE-Hemmung gaben, durch Extrakte aus Blättern beobachtet, physiologisch wirksame Inhaltsstoffe wie Arbutin und Galloylchinasäure wurden jedoch auch in SFE nachgewiesen, allerdings ergab die Testung im PDE-Assay keine Hinweise darauf, dass diese Bestandteile einen Einfluss auf die PDE ausüben. Aufgrund ihres polyphenolreichen Inhaltsstoffprofils sind Erdbeerbaumfrüchte ernährungsphysiologisch attraktiv und es ist überlegenswert, die Früchte überregional zu nutzen. Hiergegen spricht allerdings, dass das in den Früchten enthaltene Arbutin in Modellversuchen durch Darmmikrobiota deglycosyliert werden konnte und Hydrochinon freigesetzt wurde (Blaut *et al.*, 2006). Das freigesetzte Hydrochinon ist mutagen (Blaut *et al.*, 2006), jedoch von der IARC („International Agency for Research on Cancer“) als nicht kanzerogen eingestuft (Klasse 3). Die Einstufung erfolgte aufgrund fehlender Daten zur Kanzerogenität im Mensch bei vorliegenden Daten zur Kanzerogenität in Tieren. Es besteht hier also Forschungsbedarf bevor die Früchte unbedenklich überregional vertrieben werden sollten.

5.6 Einfluss des Grünteeextraktes (TXE) auf die Phosphodiesterase-Aktivität

Epidemiologische Studien korrelieren den Konsum von Grüntee mit einem verminderten Risiko degenerativer Erkrankungen (Kuriyama *et al.*, 2006). Insbesondere hervorzuheben sind dabei antiinflammatorische, anti-hypertensive und anti-thrombotische Effekte von Inhaltsstoffen des Tees (Lin und Lin, 1997; Yang *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Son *et al.*, 2004; Kürbitz *et al.*, 2011; Ok *et al.*, 2012)³⁷. Diese Effekte stehen in Zusammenhang mit einer möglichen PDE-Hemmung. Zusätzlich enthält Tee neben Catechinen das Alkaloid Koffein, welches bereits als PDE-Hemmstoff bekannt ist. Es sollte daher ein Extrakt aus Tee auf seine PDE-hemmende Wirkung untersucht werden.

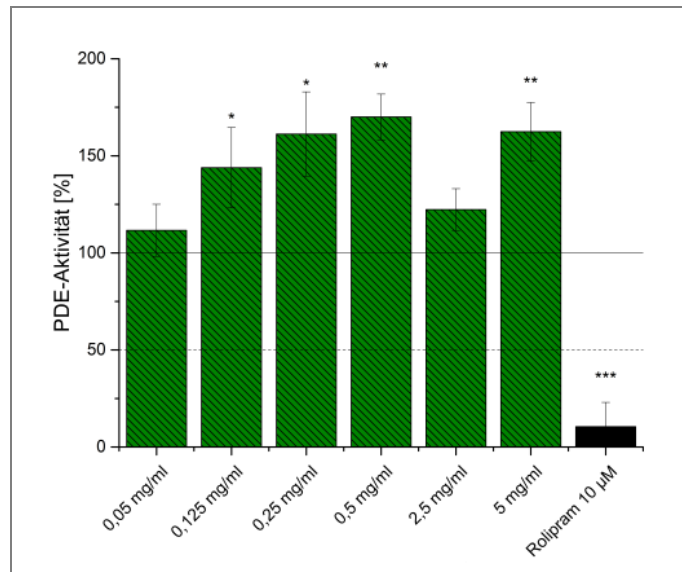


Abbildung 5-23: Einfluss des Grünteeextraktes TXE (0,05 - 5 mg/ml) auf die PDE-Aktivität. PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 μ M). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$.

Camellia sinensis (Theaceae) Blätter wurden über einen lokalen Bio-Supermarkt bezogen. Es handelte sich um in nasser Form zu Kügelchen zusammengerollte und getrocknete Teeblätter, sog. Gunpowder-Tee. Der aus den zerkleinerten Teeblättern gewonnene und mittels XAD aufgereinigte Extrakt TXE wurde im PDE-Assay in den Konzentrationen 0,05 / 0,125 / 0,25 / 0,5 / 2,5 / 5 mg/ml eingesetzt. Dabei zeigte der TXE bei keiner der getesteten Konzentrationen eine PDE-Hemmwirkung (Abbildung 5-23). Allerdings konnte außer bei den Konzentrationen 0,05 und 2,5 mg/ml eine signifikante Zunahme der PDE-Aktivität bis zu einem T/C von 170% beobachtet werden ($p < 0,01$). Die Ergebnisse widersprechen den erwarteten Resultaten. Durch Inhaltsstoffe des Tees wie Coffein und Catechine war eine Inhibition der PDE-Aktivität zu erwarten.

Die Quantifizierung mittels HPLC-UV ergab einen Koffeingehalt im TXE von $131,6 \pm 5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($n=2$). Mit einem IC_{50} von 0,9 mg/ml ist Koffein ein schwacher PDE-Inhibitor (Montoya, 2012). Bei einer TXE Konzentration von 5 mg/ml und einer Koffeinkonzentration von 0,7 mg/ml war in Anbetracht des IC_{50} eine Inhibition zu erwarten. Koffein scheint, wie in Kapitel 5.1.1 (Einfluss des Koffeins auf die Phosphodiesterase-Aktivität *in vitro*) bereits diskutiert, mit

³⁷ Ross, 2007, S. 2

anderen inhibierenden bzw. aktivierenden Agentien zu konkurrieren. Der IC_{50} von Koffein gilt nicht für komplexe Mischungen wie einen Extrakt aus Kaffee oder *Camellia sinensis*.

Die in *Camellia sinensis* enthaltenen Catechine wurden mittels HPLC-MS/MS im TXE identifiziert, jedoch nur prozentual quantifiziert (s. Tabelle 5-8). Die Precursor-Ionen wurden im +Q1-Modus überprüft und die Zuordnung der Catechine erfolgte anhand des MS^2 -Fragmentspektrums und Literaturvergleich (Li *et al.*, 2010). Die HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramme im MS^2 -Modus der Precursor-Ionen mit einem m/z -Verhältnis von 291,1 (Catechin, Epicatechin), 307,1 (Gallocatechin, Epigallocatechin), 443,2 (Catechingallat, Epicatechingallat) und 459,1 (Gallocatechingallat, Epigallocatechingallat) können in Abbildung 5-24 betrachtet werden.

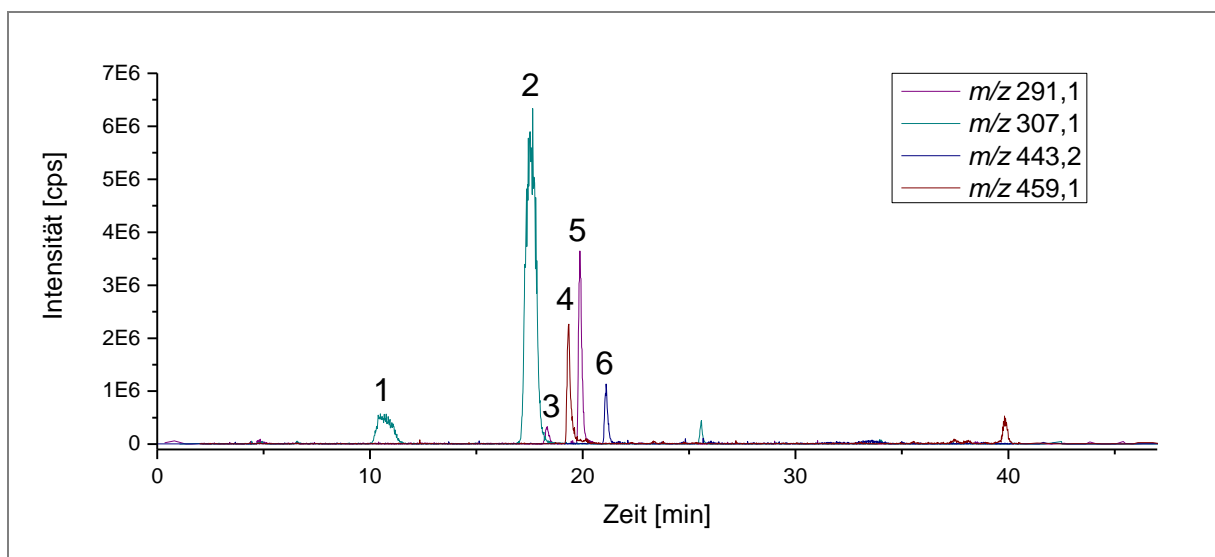


Abbildung 5-24: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramme im MS^2 -Modus (Methode siehe Kap. 4.8.2) der Precursor-Ionen mit einem m/z -Verhältnis von 291,1 (Catechin, Epicatechin), 307,1 (Gallocatechin, Epigallocatechin), 443,2 (Catechingallat, Epicatechingallat) und 459,1 (Gallocatechingallat, Epigallocatechingallat). 1: Gallocatechin bei 10,5 min, 2: Epigallocatechin bei 17,6 min, 3: Catechin bei 18,3 min, 4: Epigallocatechingallat bei 19,3 min, 5: Epicatechin bei 19,9 min, 6: Epicatechingallat bei 21,1 min.

Unabhängig von Gehalt und Identität der Catechine, sind diese schwache PDE-Hemmer mit IC_{50} -Werten im dreistelligen mikromolaren Bereich (Beretz *et al.*, 1978; Ruckstuhl *et al.*, 1979), wie in Tabelle 5-9 erkennbar. In einer weiteren Literaturstelle konnte durch Catechine sogar eine Steigerung der PDE-Aktivität beobachtet werden (Kuppusamy und Das, 1992). Eine Theorie, warum andere Flavonoide verglichen mit Catechinen stärkere PDE-Hemmung bewirken, ist die planare Struktur durch die Doppelbindung in 2-3-Position, die bei Catechinen fehlt. Studien haben gezeigt, dass Flavonoide mit planarer Struktur stärkere PDE-Hemmung aufwiesen. Als Begründung dafür wird die Nachahmung des planaren Pyrimidin-Ringes der zyklischen Nucleosidmonophosphate durch den Pyranon-Ring der Flavonoide gesehen (Ferrell *et al.*, 1979).

Tabelle 5-8: Ergebnisse der qualitativen Catechin-Analytik im TXE mittels HPLC-ESI-MS/MS im MS²-Modus

Peak	Retentionszeit (min)	m/z (amu)	Catechin	Area (%)
1	10,5	307,1	GC	8,5
2	17,6	307,1	EGC	64,0
3	18,3	291,1	C	1,3
4	19,3	459,1	EGCG	8,8
5	19,9	291,1	EC	13,4
6	21,1	443,2	ECG	4,0

Die physiologischen Wirkungen von *Camellia sinensis* umfassen antiinflammatorische, anti-thrombotische und anti-hypertensive Effekte und werden größtenteils auf die enthaltenen Catechine zurückgeführt. So konnte gezeigt werden, dass EGCG *in vitro* die Induktion der NO-Synthase in Makrophagen bei Inflammationsprozessen hemmt (Lin und Lin, 1997). Eine Verminderung der NO-Ausschüttung in Immunzellen wird, wie in Kapitel 2.1.6 erläutert, ebenfalls durch erhöhte cAMP-Spiegel verursacht. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass neben EGCG, die Minorkomponenten ECG und CG die Aktivierung von NF-κB, einem Transkriptionsfaktor der Immunantwort, in unterschiedlichen Zellmodellen hemmt (Lin und Lin, 1997; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Kürbitz *et al.*, 2011). In einem anderen Zellmodell konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF-κB durch hohe cAMP-Spiegel gehemmt werden kann (Chen und Rothenberg, 1994). Diese Zusammenhänge deuten darauf hin, dass eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus der antiinflammatorischen Wirkung der Catechine infrage kommen bzw. zu einer Verstärkung der antiinflammatorischen Wirkmechanismen der Catechine führen kann. Catechine, insbesondere EGCG, zeigen *in vitro* und *in vivo* anti-thrombotische Effekte (Kang *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2004; Ok *et al.*, 2012). Als Wirkmechanismus wurde u.a. die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase in Thrombozyten identifiziert (Ok *et al.*, 2012). Es wäre denkbar, dass eine PDE-Hemmung durch Catechine einen verstärkenden anti-thrombotischen Effekt haben kann. Allerdings konnte eine PDE-Hemmung durch TXE, welcher reich an Catechinen ist, nicht gezeigt werden. Vielmehr konnte eine Aktivierung der PDE gezeigt werden, welche im Widerspruch mit den in der Literatur berichteten physiologischen Effekten steht. Catechine, Koffein und andere aromatische Verbindungen wurden durch eine XAD-Aufreinigung angereichert. Obwohl die Konzentration an Catechinen im TXE nicht bekannt war, wurde eine synergistische PDE-Hemmung durch Catechine und Koffein erwartet, die nicht beobachtet werden konnte. Schließlich lässt sich über den *Camellia sinensis* Extrakt TXE sagen, dass eine PDE-Hemmung wahrscheinlich keinen Wirkmechanismus für die in der Literatur berichteten physiologischen Wirkungen, wie die anti-thrombotische Wirkung, darstellt.

Tabelle 5-9: Gehalte und IC₅₀-Werte der PDE-Hemmung ausgewählter Tee-Inhaltsstoffe aus der Literatur

Inhaltsstoff	Gehalt (g/100 g Trockengewicht Blätter)	IC ₅₀ -Wert / EC ₅₀ -Wert
Koffein	2,3 – 3,0 ^a	0,7 mM ^c , 4,8 mM ^d
EGCG	4,7 – 10,4 ^{a,b}	
EGC	0,16 – 3,8 ^{a,b}	
ECG	1,1 – 6,3 ^{a,b}	
EC	0,32 – 1,4 ^{a,b}	500 μM ^e , 136 μM ^f
C	-	500 μM ^e , 640 μM ^g , 170 μM ^g , 240 μM ^f

a - (Zuo *et al.*, 2002), n = 4; b - (Chen *et al.*, 2001), n = 5; c - (Montoya *et al.*, 2014); d - (Montoya, 2012); e - (Beretz *et al.*, 1978); f - (Kuppusamy und Das, 1992); g - (Ruckstuhl *et al.*, 1979)

Aufgrund der zahlreichen physiologischen Wirkungen ist wässriger Grünteeextrakt eines der am häufigsten verwendeten Supplemente weltweit. Generelle Bedenken für den Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln auf Basis von Grünteeextrakt häufen sich in den letzten Jahren vermehrt. Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Supplementierung und Hepatotoxizität (Mazzanti *et al.*, 2009). Man vermutet, dass hohe Mengen an EGCG in der Leber zu oxidativem Stress führten. Ob EGCG aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften hierbei als Prooxidans fungiert ist nicht geklärt. Bei angemessenem Konsum von Grüntee wurde bisher nicht von Hepatotoxizität berichtet.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Weiterleitung von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Targets erfolgt über zahlreiche Mechanismen, beispielsweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gefolgt von sog. *second messengern*. Die *second messenger* cAMP und cGMP vermitteln zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Thrombozytenaktivierung, die Gefäßkontraktion sowie Reaktionen des Metabolismus und Immunsystems (Gresele *et al.*, 2011). Die Regulation der intrazellulären Konzentration dieser zyklischen Nukleotide erfolgt durch Adenylat- bzw. Guanylatzyklasen sowie auf der abbauenden Seite durch Phosphodiesterasen. Bei einer Akkumulation dieser *second messenger* in der Zelle durch eine Hemmung der PDE kommt es zu physiologischen Effekten, u.a. antiinflammatorische, anti-thrombotische oder anti-hypertensive Effekte. Daher werden PDE-Hemmstoffe als Antikoagulantien, Antiphlogistika oder Vasodilatoren für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung eingesetzt (Wood und Hiatt, 2001; Kloner, 2004; Gresele *et al.*, 2011). Aus der Literatur sind neben zahlreichen synthetischen auch eine Reihe natürlicher PDE-Hemmstoffe aus Arzneipflanzen und Lebensmitteln bekannt. So konnten die Lebensmittelinhaltsstoffe Alkylpyrazine, Chlorogensäuren, Methylxanthine und einige Flavonoide als PDE-Hemmstoffe identifiziert werden (Rall und Sutherland, 1958; Beretz *et al.*, 1978; Ferrell *et al.*, 1979; Ruckstuhl *et al.*, 1979; Kuppusamy und Das, 1992; Ko *et al.*, 2004; Marko *et al.*, 2004; Montoya, 2012; Montoya *et al.*, 2014). In zwei Humanstudien konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass der Langzeit-Konsum von Kaffee zu einer Abnahme der PDE-Aktivität in Thrombozyten führte (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Weiterhin wurde regelmäßiger Kaffeekonsum u.a. mit der Verringerung des Risikos von Herz-Kreislauf-Erkrankungen korreliert (Ding *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass der regelmäßige Verzehr von Lebensmitteln mit PDE-hemmenden Inhaltsstoffen zur Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragen könnte. Es besteht daher gesteigertes Interesse, Lebensmittel auf ihre PDE-hemmenden Eigenschaften zu untersuchen und die verantwortlichen Inhaltsstoffe zu identifizieren.

Da die Inhaltsstoffe, die verantwortlich für die starke PDE-Hemmung durch Kaffee sind, bisher nicht identifiziert wurden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen in einem etablierten *in vitro* PDE-Assay getestet. Im Vorfeld der Auswahl eines geeigneten **Kaffeextraktes** (100% ***Coffea arabica***) wurden verschiedene Einflussfaktoren wie Brühmethode, Röstung und Röstgrad sowie Koffeingehalt auf das PDE-hemmende Potential untersucht. Dabei wurde kein Einfluss der Brühmethode, des Röstgrades oder des Koffeins auf die PDE-Aktivität beobachtet. Allerdings zeigte der Vergleich eines Rohkaffees zu dem entsprechenden

Röstkaffee, dass die verantwortlichen Stoffe erst während der Röstung entstehen. Demnach ist die Röstung der entscheidende Verarbeitungsschritt, da der Rohkaffee kein PDE-hemmendes Potential aufwies. Weiterhin konnte im Rahmen der Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung des Kaffees eine Fraktion von wasserlöslichen Melanoidinen mit niedrigerem Molekulargewicht und Polarität identifiziert werden, welche verantwortlich für die *in vitro* beobachteten PDE-hemmenden Effekte des Kaffees war ($IC_{50} = 130 \pm 42 \mu\text{g/ml}$). Die nicht-kompetitive Hemmungskinetik deutet darauf hin, dass die PDE durch eine Abstrahierung von zweiwertigen Kationen durch diese Melanoidine im *in vitro* Assay gehemmt werden könnte. Gegenwärtig kann über die Relevanz für die *in vivo* Situation, bei der eine starke Abnahme der PDE-Aktivität in Thrombozyten nach regelmäßigem Kaffeekonsum festgestellt werden konnte, keine Aussage getroffen werden. Es fehlen Daten zum Charakter der identifizierten, aktiven Melanoidinfraktion und zur Bioverfügbarkeit von Melanoidinen allgemein. Die Heterogenität dieser Stoffklasse macht es schwierig geeignete analytische Endpunkte für die Untersuchung einer Bioverfügbarkeit zu etablieren. Das führt auch dazu, dass keine Referenzsubstanzen für die Überprüfung von Metabolismusstudien wie bspw. einer Enzymhemmung oder -aktivierung zur Verfügung stehen. Ein Ansatzpunkt für zukünftige Forschung, um Eigenschaften von Melanoidinen zu untersuchen, könnte die Verwendung von sog. *Maillard reaction models* sein. Hierbei werden ausgewählte Aminosäuren und Zucker einer schonenden Maillard-Reaktion unterzogen und für *in vitro* Experimente eingesetzt. Ein Nachteil ist aber auch hier der heterogene Charakter der Reaktionsprodukte, wodurch eine Interpretation der Ergebnisse schwierig ist.

Neben der Untersuchung von Kaffee und dessen PDE-Hemmung wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Arzneipflanzen mit kulinarischer Verwendung auf ihre PDE-hemmenden Eigenschaften gescreent. Inhaltsstoffprofile und physiologische Wirkungen, die in direktem Zusammenhang mit PDE-Hemmung stehen, wie antiinflammatorische, anti-hypertensive und anti-aggregative Wirkungen, waren dabei entscheidend bei der Auswahl der Pflanzen. Artischockenextrakte besitzen u.a. anti-hypertensive Effekte (Li *et al.*, 2004) und sind reich an Chlorogensäuren und Flavonen (Schütz *et al.*, 2004; Pandino *et al.*, 2011). Der aus **Artischockenblättern** (*Cynara scolymus*) gewonnene Artischockenextrakt (ALE) zeigte ein PDE-hemmendes Potential, das vergleichbar mit dem von Kaffee war ($IC_{50} = 0,9 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$). Die Wirkung konnte keiner Einzelsubstanz des ALE zugeschrieben werden. Vielmehr zeigten mehrere funktionelle Inhaltsstoffe des ALE eine PDE-hemmende Wirkung. Das Flavon Luteolin zeigte eine starke PDE-Hemmung, die bereits aus der Literatur bekannt war (Amic *et al.*, 1995), kam jedoch nur in Form des Glucosids und Glucuronids im Extrakt vor, welche wiederum keine PDE-hemmenden Eigenschaften besaßen. Zusätzlich zeigte auch eine DicaFFEoylchinasäure einen hemmenden Effekt. Die Hypothese, dass Flavonoide aufgrund ihrer planaren Struktur, die sich in das aktive Zentrum einlagern kann und die

Nucleosidstruktur imitiert (Ferrell *et al.*, 1979), die PDE hemmen können, trifft bei den Chlorogensäuren nur bedingt auf den Hydroxymethylsäurerest zu. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der starke Effekt des ALE vermutlich auf eine Kombination mehrerer PDE-hemmender Inhaltsstoffe zurückzuführen ist. Für zukünftige Forschung bietet sich ähnlich wie beim Kaffee eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung des ALE an, um weitere PDE-hemmende Substanzen zu identifizieren. Von Interesse ist außerdem die Untersuchung des physiologischen Nutzens einer potentiellen PDE-Hemmung *in vivo*, welche im Rahmen einer Humanstudie mit Langzeiteinnahme von Artischockenextrakt zu untersuchen wäre.

Ein altbewährtes Heilmittel der traditionellen Medizin mit breitem Anwendungsspektrum ist **Ingwer (*Zingiber officinale*)**. Seine in der Literatur beschriebenen Wirkungen umfassen u.a. antiinflammatorische und anti-aggregative Wirkungen (Koo *et al.*, 2001). Für den im Rahmen dieser Arbeit aus Ingwerpulver hergestellten Ingwerextrakt GPE konnte im Gegensatz zu Literaturdaten eine PDE-Hemmung gezeigt werden ($IC_{50} = 1,7 \pm 0,2$ mg/ml). Zusätzlich konnte das PDE-hemmende Potential mittels Grobfraktionierung in der lipoiden Fraktion (GLE) bestimmt werden. Die verantwortlichen Substanzen konnten zwar nicht identifiziert werden, es wird aber aufgrund des PDE-hemmenden Potentials der Leitsubstanz [6]-Gingerol davon ausgegangen, dass es sich um Derivate der Gingerole handeln könnte. Möglicherweise ist auch hier die Hypothese des planaren Ringsystems als Imitation des Pyrimidinringes, wie sie für die Flavonoide formuliert wurde (Ferrell *et al.*, 1979), eine Erklärung für die Wirksamkeit des [6]-Gingerols. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus des Ingwers neben Cyclooxygenase-Hemmung (Tjendraputra *et al.*, 2001) und Serotonin-Antagonismus (Abdel-Aziz *et al.*, 2005) in Betracht gezogen werden sollte. Ähnlich wie bei Kaffee und Artischocke bietet sich für die Identifizierung der verantwortlichen Substanzen eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung der lipophilen Fraktion des Ingwers in weiteren Studien an. Da Gingerole sehr gut bioverfügbar sind (Zick *et al.*, 2008), wäre es ebenfalls von großem Interesse, die physiologische Auswirkung einer langzeitigen Supplementierung mit Ingwerextrakt und der Auswirkung auf die PDE-Aktivität *in vivo* in einer Humanstudie zu untersuchen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit ein Extrakt aus Früchten von ***Arbutus unedo* (Erdbeerbaum)** hergestellt und im PDE-Assay getestet. *Arbutus unedo* enthält u.a. Anthocyane (Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008) und zeigte sowohl anti-aggregative als auch anti-hypertensive Wirkungen (Ziyyat *et al.*, 2002; El Haouari *et al.*, 2007; Afkir *et al.*, 2008), wodurch eine PDE-Hemmung im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwartet wurde. Die Testung des hergestellten Erdbeerbaumfruchtextraktes sowie der Leitsubstanz Arbutin hat allerdings keine Hemmung der PDE gezeigt. Dennoch erscheinen Erdbeerbaumfrüchte

ernährungsphysiologisch interessant, da sie ähnlich wie die Wurzeln und Blätter reich an phenolischen Verbindungen sind.

Ebenfalls wurde ein Extrakt aus **Grüntee** (*Camellia sinensis*) hergestellt und auf PDE-hemmender Potential untersucht. Grüntee enthält Koffein und Catechine (Goto *et al.*, 1996; Perva-Uzunalić *et al.*, 2006) und besitzt u.a. antiinflammatorische und anti-aggregative Eigenschaften (Sharangi, 2009), weshalb eine PDE-Hemmung erwartet wurde. Aber auch die Testung des Grünteeextraktes hat entgegen den Erwartungen keinen hemmenden Effekt auf die PDE-Aktivität gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass einige Lebensmittel ein hemmendes Potential auf die PDE besitzen können. Dabei gaben das Inhaltsstoffprofil sowie in der Literatur beschriebene physiologische Wirkungen von pflanz. Extrakten gute Hinweise auf eine mögliche PDE-Hemmung als Wirkmechanismus. Im Falle von Kaffee konnte eine Fraktion von Melanoidinen als die verantwortlichen Inhaltsstoffe identifiziert werden, während bei Artischocke und Ingwer lediglich mehrere Stoffklassen mit PDE-hemmendem Potential identifiziert werden konnten. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass eine PDE-Hemmung als Wirkmechanismus für physiologische Wirkungen dieser „Lebensmittel“ infrage kommt. Für die Abschätzung einer physiologischen Wirkung durch Ingwer- und Artischockenextrakte sind weitere Faktoren zu berücksichtigen, wie das PDE-hemmende Potential, die verzehrte Menge sowie die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus der verantwortlichen Inhaltsstoffe. Nicht von der Hand zu weisen sind die positiven Eigenschaften in Bezug auf die Prävention degenerativer Erkrankungen, die der Verzehr von Lebensmitteln, welche generell reich an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen sind, mit sich bringt.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aziz, H., A. Nahrstedt, F. Petereit, T. Windeck, M. Ploch und E. Verspohl (2005). "5-HT₃ receptor blocking activity of arylalkanes isolated from the rhizome of *Zingiber officinale*." Planta Medica **71**(7): 609-616.
- Abdel-Aziz, H., T. Windeck, M. Ploch und E. J. Verspohl (2006). "Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT₃ receptors: binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum." European Journal of Pharmacology **530**(1): 136-143.
- Aburima, A., K. S. Wraith, Z. Raslan, R. Law, S. Magwenzi und K. M. Naseem (2013). "cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway." Blood **122**(20): 3533-3545.
- Adams, A. und N. De Kimpe (2009). "Formation of pyrazines from ascorbic acid and amino acids under dry-roasting conditions." Food Chemistry **115**(4): 1417-1423.
- Adams, T. B., J. Doull, V. J. Feron, J. I. Goodman, L. J. Marnett, I. C. Munro, P. M. Newberne, P. S. Portoghese, R. L. Smith, W. J. Waddell und B. M. Wagner (2002). "The FEMA GRAS assessment of pyrazine derivatives used as flavor ingredients." Food and Chemical Toxicology **40**(4): 429-451.
- Afkir, S., T. B. Nguenefack, M. Aziz, J. Zoheir, G. Cuisinaud, M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, S. Lahlou und A. Ziyat (2008). "*Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats: Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats." Journal of Ethnopharmacology **116**(2): 288-295.
- Aktories, K., U. Förstermann, F. B. Hofmann und K. Starke (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag.
- Ali, B. H., G. Blunden, M. O. Tanira und A. Nemmar (2008). "Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research." Food and Chemical Toxicology **46**(2): 409-420.
- Alqasoumi, S. I. (2009). "Quantification of 6-gingerol in *Zingiber officinale* extract, ginger-containing dietary supplements, teas and commercial creams by validated HPTLC densitometry." FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences **34**: 33-42.
- Ames, J. M., A. Wynne, A. Hofmann, S. Plos und G. R. Gibson (1999). "The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations *in vitro*." British Journal of Nutrition **82**(06): 489-495.
- Amic, D., D. Davidovic-Amic, A. Juric, B. Lucic und N. Trinajstic (1995). "Structure-activity correlation of flavone derivatives for inhibition of cAMP phosphodiesterase." Journal of Chemical Information and Computer Sciences **35**(6): 1034-1038.

- Andersen, M. R., M. Giese, P. Ronald und J. Nielsen (2012). "Mapping the polysaccharide degradation potential of *Aspergillus niger*." BMC genomics **13**(1): 313.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, C. H. Serezani, M. Luo und M. Peters-Golden (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." The Journal of Immunology **174**(2): 595-599.
- Asami, A., T. Shimada, Y. Mizuhara, T. Asano, S. Takeda, T. Aburada, K.-i. Miyamoto und M. Aburada (2010). "Pharmacokinetics of [6]-shogaol, a pungent ingredient of *Zingiber officinale* Roscoe (Part I)." Journal of Natural Medicines **64**(3): 281-287.
- Ashihara, H., H. Sano und A. Crozier (2008). "Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering." Phytochemistry **69**(4): 841-856.
- Astill, C., M. R. Birch, C. Dacombe, P. G. Humphrey und P. T. Martin (2001). "Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(11): 5340-5347.
- Ayaz, F., M. Kucukislamoglu und M. Reunanen (2000). "Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits." Journal of Food Composition and Analysis **13**(2): 171-177.
- Bailey, R. G., J. M. Ames und S. M. Monti (1996). "An analysis of the non-volatile reaction products of aqueous Maillard model systems at pH 5, using reversed-phase HPLC with diode-array detection." Journal of the Science of Food and Agriculture **72**(1): 97-103.
- Bakuradze, T., R. Lang, T. Hofmann, H. Stiebitz, G. Bytof, I. Lantz, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2010). "Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines." Molecular Nutrition & Food Research **54**(12): 1734-1743.
- Baltes, W. und G. Bochmann (1987). "Model reactions on roast aroma formation. 1. Reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions on coffee roasting and identification of new coffee aroma compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **35**(3): 340-346.
- Barber, R., G. S. Baillie, R. Bergmann, M. C. Shepherd, R. Sepper, M. D. Houslay und G. Van Heeke (2004). "Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology **287**(2): L332-L343.
- Barone, J. und H. Roberts (1996). "Caffeine consumption." Food and Chemical Toxicology **34**(1): 119-129.
- Bartley, J. P. und P. Foley (1994). "Supercritical fluid extraction of australian-grown ginger (*Zingiber officinale*)." Journal of the Science of Food and Agriculture **66**(3): 365-371.

- Begas, E., E. Kouvaras, A. Tsakalof, S. Papakosta und E. K. Asproдини (2007). "In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios." Biomedical Chromatography **21**(2): 190-200.
- Bekedam, E. K., M. P. De Laat, H. A. Schols, M. A. Van Boekel und G. Smit (2007). "Arabinogalactan proteins are incorporated in negatively charged coffee brew melanoidins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(3): 761-768.
- Bekedam, E. K., E. Roos, H. A. Schols, M. A. Van Boekel und G. Smit (2008). "Low molecular weight melanoidins in coffee brew." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(11): 4060-4067.
- Bekedam, E. K., H. A. Schols, M. A. Van Boekel und G. Smit (2006). "High molecular weight melanoidins from coffee brew." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(20): 7658-7666.
- Bekedam, E. K., H. A. Schols, M. A. Van Boekel und G. Smit (2008). "Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(6): 2055-2063.
- Bender, A. T. und J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." Pharmacological Reviews **58**(3): 488-520.
- Beret, A., R. Anton und J. Stoclet (1978). "Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase." Experientia **34**(8): 1054-1055.
- Berger, M., J. A. Gray und B. L. Roth (2009). "The expanded biology of serotonin." Annual review of medicine **60**: 355-366.
- Bermúdez-Soto, M.-J., F.-A. Tomás-Barberán und M.-T. García-Conesa (2007). "Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion." Food Chemistry **102**(3): 865-874.
- Bice, J. S., Y. Keim, J.-P. Stasch und G. F. Baxter (2013). NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size.
- Bingham, J., S. Sudarsanam und S. Srinivasan (2006). "Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms." Biochemical and Biophysical Research Communications **350**(1): 25-32.
- Bjornsson, T. D., J. T. Callaghan, H. J. Einolf, V. Fischer, L. Gan, S. Grimm, J. Kao, S. P. King, G. Miwa und L. Ni (2003). "The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective." Drug Metabolism and Disposition **31**(7): 815-832.
- Blaut, M., A. Braune, S. Wunderlich, P. Sauer, H. Schneider und H. Glatt (2006). "Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria." Food and Chemical Toxicology **44**(11): 1940-1947.

- Bøhn, S. K., R. Blomhoff und I. Paur (2014). "Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms." Molecular Nutrition & Food Research **58**(5): 915-930.
- Bonoli, M., M. Pelillo, T. G. Toschi und G. Lercker (2003). "Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE." Food Chemistry **81**(4): 631-638.
- Borrelli, R. C., A. Visconti, C. Mennella, M. Anese und V. Fogliano (2002). "Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(22): 6527-6533.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- Brandt, W., M. Gürke, F. E. Köhler, G. Pabst, G. Schellenberg und M. Vogtherr (1887). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. Gera-Untermhaus :, Fr. Eugen Köhler.
- Brinen, L. S., W. S. Willett, C. S. Craik und R. J. Fletterick (1996). "X-ray structures of a designed binding site in trypsin show metal-dependent geometry." Biochemistry **35**(19): 5999-6009.
- Brophy, V. H., S. K. Ro, B. K. Rhees, L.-Y. Lui, J. M. Lee, N. Umblas, L. G. Bentley, J. Li, S. Cheng und W. S. Browner (2006). "Association of phosphodiesterase 4D polymorphisms with ischemic stroke in a US population stratified by hypertension status." Stroke **37**(6): 1385-1390.
- Buffo, R. A. und C. Cardelli-Freire (2004). "Coffee flavour: an overview." Flavour and Fragrance Journal **19**(2): 99-104.
- Bulut, V., A. Severn und F. Y. Liew (1993). "Nitric Oxide Production by Murine Macrophages Is Inhibited by Prolonged Elevation of Cyclic AMP." Biochemical and biophysical research communications **195**(2): 1134-1138.
- Bundy, R., A. F. Walker, R. W. Middleton, C. Wallis und H. C. Simpson (2008). "Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial." Phytomedicine **15**(9): 668-675.
- Butcher, R. und E. Sutherland (1962). "Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials." Journal of Biological Chemistry **237**: 1244-1250.
- Buters, J. T., B.-K. Tang, T. Pineau, H. V. Gelboin, S. Kimura und F. J. Gonzalez (1996). "Role of CYP1A2 in caffeine pharmacokinetics and metabolism: studies using mice deficient in CYP1A2." Pharmacogenetics and Genomics **6**(4): 291-296.

- Caccioni, D. R., M. Guizzardi, D. M. Biondi, A. Renda und G. Ruberto (1998). "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*." International Journal of Food Microbiology **43**(1): 73-79.
- Cao, H., M. A. Kelly, F. Kari, H. D. Dawson, J. F. Urban, S. Coves, A. M. Roussel und R. A. Anderson (2007). "Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats." Journal of Inflammation **4**(1): 1.
- Card, G. L., B. P. England, Y. Suzuki, D. Fong, B. Powell, B. Lee, C. Luu, M. Tabrizid, S. Gillette und P. N. Ibrahim (2004). "Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases." Structure **12**(12): 2233-2247.
- Carillo, J. A. und J. Benitez (1996). "CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine." British Journal of Clinical Pharmacology **41**(6): 605.
- Catchpole, O. J., J. B. Grey, N. B. Perry, E. J. Burgess, W. A. Redmond und N. G. Porter (2003). "Extraction of chili, black pepper, and ginger with near-critical CO₂, propane, and dimethyl ether: analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(17): 4853-4860.
- Cavallini, L., M. Coassin, A. Borean und A. Alexandre (1996). "Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation." Journal of Biological Chemistry **271**(10): 5545-5551.
- Chang, T.-T., K.-C. Chen, K.-W. Chang, H.-Y. Chen, F.-J. Tsai, M.-F. Sun und C. Y.-C. Chen (2011). "In silico pharmacology suggests ginger extracts may reduce stroke risks." Molecular BioSystems **7**(9): 2702-2710.
- Chen, C. C. und C. T. Ho (1988). "Gas chromatographic analysis of volatile components of ginger oil (*Zingiber officinale* Roscoe) extracted with liquid carbon dioxide." Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**(2): 322-328.
- Chen, D. und E. V. Rothenberg (1994). "Interleukin 2 transcription factors as molecular targets of cAMP inhibition: delayed inhibition kinetics and combinatorial transcription roles." The Journal of experimental medicine **179**(3): 931-942.
- Chen, H., D. Soroka, Y. Zhu und S. Sang (2013). "Metabolism of ginger component [6]-shogaol in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human." Molecular Nutrition & Food Research **57**(5): 865-876.
- Chen, M. und A. Stracher (1989). "In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain." Journal of Biological Chemistry **264**(24): 14282-14289.
- Chen, W. W., M. Niepel und P. K. Sorger (2010). "Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions." Genes & Development **24**(17): 1861-1875.

- Chen, Z.-Y., Q. Y. Zhu, D. Tsang und Y. Huang (2001). "Degradation of green tea catechins in tea drinks." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(1): 477-482.
- Cheng, Y.-C. und W. H. Prusoff (1973). "Relationship between the inhibition constant K_i and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition I_{50} of an enzymatic reaction." Biochemical Pharmacology **22**(23): 3099-3108.
- Cho, J. Y., K. U. Baik, J. H. Jung und M. H. Park (2000). "*In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*." European Journal of Pharmacology **398**(3): 399-407.
- Chowdhury, A. R., S. Sharma, S. Mandal, A. Goswami, S. Mukhopadhyay und H. K. Majumder (2002). "Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I." Biochemical Journal **366**(2): 653-661.
- Chrubasik, J. E., B. D. Roufogalis und S. Chrubasik (2007). "Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain." Phytotherapy Research **21**(7): 675-683.
- Chu, Y. F. und I. o. F. Technologists (2012). Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, Wiley.
- Clarke, A., R. Anderson und B. Stone (1979). "Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins." Phytochemistry **18**(4): 521-540.
- Clarke, R. und O. Vitzthum (2008). Coffee: recent developments, John Wiley & Sons.
- Clifford, M. N. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden¹." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**: 362-372.
- Clifford, M. N. und S. Knight (2004). "The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans." Food Chemistry **87**(3): 457-463.
- Colman, R. W. (2004). Platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterases: targets for regulating platelet-related thrombosis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- Conti, M., W. Richter, C. Mehats, G. Livera, J. Y. Park und C. Jin (2003). "Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling." Journal of Biological Chemistry **278**(8): 5493.
- Crippa, A., A. Discacciati, S. C. Larsson, A. Wolk und N. Orsini (2014). "Coffee consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a dose-response meta-analysis." American Journal of Epidemiology: kwu194.
- Cui, T., K. Nakamura, L. Ma, J.-Z. Li und H. Kayahara (2005). "Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(10): 3882-3887.

- Czank, C., A. Cassidy, Q. Zhang, D. J. Morrison, T. Preston, P. A. Kroon, N. P. Botting und C. D. Kay (2013). "Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ^{13}C -tracer study." The American Journal of Clinical Nutrition **97**(5): 995-1003.
- Czerny, M., F. Mayer und W. Grosch (1999). "Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(2): 695-699.
- D'Amelio, N., L. Fontanive, F. Uggeri, F. Suggi-Liverani und L. Navarini (2009). "NMR reinvestigation of the caffeine-chlorogenate complex in aqueous solution and in coffee brews." Food Biophysics **4**(4): 321-330.
- Daly, J. W. (2000). "Alkylxanthines as research tools." Journal of the Autonomic Nervous System **81**(1-3): 44-52.
- Daly, J. W., P. Butts-Lamb und W. Padgett (1983). "Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines." Cellular and Molecular Neurobiology **3**(1): 69-80.
- De Marco, L. M., S. Fischer und T. Henle (2011). "High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(21): 11417-11423.
- De Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer und J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-477.
- Deibler, K. D., T. Acree und E. Lavin (1998). "Aroma analysis of coffee brew by gas chromatography-olfactometry." Developments in Food Science **40**: 69-78.
- del Carmen Ramirez-Ahumada, M., B. N. Timmermann und D. R. Gang (2006). "Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases." Phytochemistry **67**(18): 2017-2029.
- Delgado-Andrade, C. und F. J. Morales (2005). "Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(5): 1403-1407.
- Delgado-Andrade, C., J. A. Rufián-Henares und F. J. Morales (2005). "Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(20): 7832-7836.
- Dell'Agli, M., G. V. Galli, U. Vrhovsek, F. Mattivi und E. Bosisio (2005). "*In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(6): 1960-1965.
- Ding, M., S. N. Bhupathiraju, A. Satija, R. M. van Dam und F. B. Hu (2013). "Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: a systematic review and a

- dose-response meta-analysis of prospective cohort studies." Circulation: CIRCULATIONAHA. 113.005925.
- Drexler, H. G. und C. C. Uphoff (2002). "Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention." Cytotechnology **39**(2): 75-90.
- Du Monceau, H. L. D. und B. d. P. d. Arts (1825). Traité des arbres et arbustes, que l'on cultive en pleine terre en France, par Duhamel, Didot aîné.
- El-Daher, S. S., Y. Patel, A. Siddiqua, S. Hassock, S. Edmunds, B. Maddison, G. Patel, D. Goulding, F. Lupu und R. J. Wojcikiewicz (2000). "Distinct localization and function of 1, 4, 5IP3 receptor subtypes and the 1, 3, 4, 5IP4 receptor GAP1IP4BP in highly purified human platelet membranes." Blood **95**(11): 3412-3422.
- El Haouari, M., J. J. López, H. Mekhfi, J. A. Rosado und G. M. Salido (2007). "Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets." Journal of Ethnopharmacology **113**(2): 325-331.
- Englisch, W., C. Beckers, M. Unkauf, M. Ruepp und V. Zinserling (2000). "Efficacy of Artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia." Arzneimittel-Forschung **50**(3): 260-265.
- Fan, L.-H., K.-Z. Wang, B. Cheng, C.-S. Wang und X.-Q. Dang (2006). "Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits." BMC neuroscience **7**(1): 48.
- Farag, M. A., S. H. El-Ahmady, F. S. Elian und L. A. Wessjohann (2013). "Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC–q-TOF-MS and chemometrics." Phytochemistry **95**: 177-187.
- Farah, A., T. de Paulis, D. P. Moreira, L. C. Trugo und P. R. Martin (2006). "Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(2): 374-381.
- Fatemi, S. H., D. P. King, T. J. Reutiman, T. D. Folsom, J. A. Laurence, S. Lee, Y.-T. Fan, S. A. Paciga, M. Conti und F. S. Menniti (2008). "PDE4B polymorphisms and decreased PDE4B expression are associated with schizophrenia." Schizophrenia research **101**(1): 36-49.
- Felquer, M. L. A. und E. R. Soriano (2015). "New treatment paradigms in psoriatic arthritis: an update on new therapeutics approved by the US Food and Drug Administration." Current Opinion in Rheumatology **27**(2): 99-106.
- Ferrell, J. E., P. D. C. Sing, G. Loew, R. King, J. M. Mansour und T. E. Mansour (1979). "Structure/activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices." Molecular Pharmacology **16**(2): 556-568.

- Ferrer, J.-L., M. Austin, C. Stewart und J. Noel (2008). "Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids." Plant Physiology and Biochemistry **46**(3): 356-370.
- Finot, P. und E. Magnenat (1981). "Metabolic transit of early and advanced Maillard products." Progress in Food and Nutrition Science.
- Fischer, M., S. Reimann, V. Trovato und R. J. Redgwell (2001). "Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans." Carbohydrate Research **330**(1): 93-101.
- Flores-Sanchez, I. J. und D. R. Gang (2013). "Inhibition of hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) by lipase inhibitors." Plant Physiology and Biochemistry **72**: 46-53.
- Flynn, D. L., M. F. Rafferty und A. M. Boctor (1986). "Inhibition of human neutrophil 5-lipoxygenase activity by gingerdione, shogaol, capsaicin and related pungent compounds." Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine **24**(2-3): 195-198.
- Fogliano, V. und F. J. Morales (2011). "Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread." Food & Function **2**(2): 117-123.
- Förstermann, U. und W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." European Heart Journal **33**(7): 829-837.
- Francischi, J. N., C. M. Yokoro, S. Poole, W. L. Tafuri, F. Q. Cunha und M. M. Teixeira (2000). "Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis." European journal of pharmacology **399**(2): 243-249.
- Fritsche, J., C. M. Beindorff, M. Dachtler, H. Zhang und J. G. Lammers (2002). "Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds." European Food Research and Technology **215**(2): 149-157.
- Fujioka, K. und T. Shibamoto (2008). "Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees." Food Chemistry **106**(1): 217-221.
- Fulgoni, V. L., D. R. Keast und H. R. Lieberman (2015). "Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001–2010." The American Journal of Clinical Nutrition: ajcn080077.
- Funakoshi-Tago, M., K. Nakamura, K. Tago, T. Mashino und T. Kasahara (2011). "Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin." International Immunopharmacology **11**(9): 1150-1159.
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-1875.
- Gantner, F., H. Tenor, V. Gekeler, C. Schudt, A. Wendel und A. Hatzelmann (1997). "Phosphodiesterase profiles of highly purified human peripheral blood leukocyte

- populations from normal and atopic individuals: a comparative study." Journal of allergy and clinical immunology **100**(4): 527-535.
- Gao, C., X. Liu, W. Liu, H. Shi, Z. Zhao, H. Chen und S. Zhao (2008). "Anti-apoptotic and neuroprotective effects of tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats." Autonomic Neuroscience **141**(1): 22-30.
- García-Osta, A., M. Cuadrado-Tejedor, C. García-Barroso, J. Oyarzábal und R. Franco (2012). "Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease." ACS chemical neuroscience **3**(11): 832-844.
- Gebhardt, R. (1997). "Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes." Toxicology and Applied Pharmacology **144**(2): 279-286.
- Gebhardt, R. (1998). "Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **286**(3): 1122-1128.
- Geetha, T. und P. Varalakshmi (2001). "Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats." Journal of Ethnopharmacology **76**(1): 77-80.
- Ghasemzadeh, A. und N. Ghasemzadeh (2011). "Effects of shading on synthesis and accumulation of polyphenolic compounds in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties." Journal of Medicinal Plants Research **5**(11): 2435-2442.
- Ghayur, M. N., A. H. Gilani, M. B. Afridi und P. J. Houghton (2005). "Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways." Vascular Pharmacology **43**(4): 234-241.
- Giembycz, M. A. (2002). "4D or not 4D—the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered?" Trends in Pharmacological Sciences **23**(12): 548.
- Giembycz, M. A. (2005). "Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors." Current Opinion in Pharmacology **5**(3): 238-244.
- Giembycz, M. A. und S. K. Field (2010). "Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD." Drug Design, Development and Therapy **4**: 147-158.
- Gniechwitz, D., N. Reichardt, M. Blaut, H. Steinhart und M. Bunzel (2007). "Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(17): 6989-6996.
- Gniechwitz, D., N. Reichardt, J. Ralph, M. Blaut, H. Steinhart und M. Bunzel (2008). "Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fraction." Journal of the Science of Food and Agriculture **88**(12): 2153-2160.
- Golebiowski, M., B. Ostrowski, M. Paszkiewicz, M. Czerwicka, J. Kumirska, L. Halinski, E. Malinski und P. Stepnowski (2008). "Chemical composition of commercially available

- essential oils from blackcurrant, ginger, and peppermint." Chemistry of Natural Compounds **44**(6): 794-796.
- Goto, T., Y. Yoshida, M. Kiso und H. Nagashima (1996). "Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea." Journal of Chromatography A **749**(1): 295-299.
- Green, M. M., J. A. Gladner, L. W. Cunningham Jr und H. Neurath (1952). "The effects of divalent cations on the enzymatic activities of trypsin and of α -chymotrypsin¹." Journal of the American Chemical Society **74**(8): 2122-2123.
- Gresele, P., S. Momi und E. Falcinelli (2011). "Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors." British Journal of Clinical Pharmacology **72**(4): 634-646.
- Gretarsdottir, S., G. Thorleifsson, S. T. Reynisdottir, A. Manolescu, S. Jonsdottir, T. Jonsdottir, T. Gudmundsdottir, S. M. Bjarnadottir, O. B. Einarsson und H. M. Gudjonsdottir (2003). "The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke." Nature Genetics **35**(2): 131-138.
- Grosch, W., M. Czerny, R. Wagner und F. Mayer (1996). "Studies on the aroma of roasted coffee." Special Publications of the Royal Society of Chemistry **197**: 200-205.
- Grzanna, R., L. Lindmark und C. G. Frondoza (2005). "Ginger-an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions." Journal of medicinal food **8**(2): 125-132.
- Ham, E. A., D. D. Soderman, M. E. Zanetti, H. W. Dougherty, E. McCauley und F. A. Kuehl (1983). "Inhibition by prostaglandins of leukotriene B₄ release from activated neutrophils." Proceedings of the National Academy of Sciences **80**(14): 4349-4353.
- Hamilton, E. (1852). The flora homoeopathica :or, illustrations and descriptions of the medicinal plants used as homoeopathic remedies /by Edward Hamilton. London :, Leath & Ross.
- Hannon, J. und D. Hoyer (2008). "Molecular biology of 5-HT receptors." Behavioural brain research **195**(1): 198-213.
- Hanske, L., G. Loh, S. Sczesny, M. Blaut und A. Braune (2009). "The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats." The Journal of Nutrition **139**(6): 1095-1102.
- Harbeck, B., S. Hüttelmaier, K. Schlüter, B. M. Jockusch und S. Illenberger (2000). "Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin." Journal of Biological Chemistry **275**(40): 30817-30825.
- Hathaway, D., C. Eaton und R. Adelstein (1981). "Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase." Nature **291**(5812): 252-254.
- Hawksworth, G. und R. R. Scheline (1975). "Metabolism in the rat of some pyrazine derivatives having flavour importance in foods." Xenobiotica **5**(7): 389-399.

- He, X.-G., M. W. Bernart, L.-Z. Lian und L.-Z. Lin (1998). "High-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger." Journal of Chromatography A **796**(2): 327-334.
- Head, K. A. (2008). "Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract." Alternative Medicine Review **13**(3): 227-245.
- Heimes, K., B. Feistel und E. J. Verspohl (2009). "Impact of the 5-HT₃ receptor channel system for insulin secretion and interaction of ginger extracts." European Journal of Pharmacology **624**(1): 58-65.
- Hemmerle, H., H.-J. Burger, P. Below, G. Schubert, R. Rippel, P. W. Schindler, E. Paulus und A. W. Herling (1997). "Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase." Journal of Medicinal Chemistry **40**(2): 137-145.
- Hettasch, J. und J. Sellers (1991). "Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C." Journal of Biological Chemistry **266**(18): 11876-11881.
- Heubl, G., R. Hänsel, S. Greiner, K. Keller, H. Rimpler und G. Schneider (2013). Drogen A-D, Springer Berlin Heidelberg.
- Hill, J. (1762). The Vegetable System: Or, a Series of Experiments, and Observations Tending to Explain the Internal Structure, and the Life of Plants; Their Growth, and Propagation; the Number, Proportion, and Desposition of Their Constituent Parts; with the True Course of Their Juices; the Formation of the Embryo, the Construction of the Seed, and the Encrease from that State to Perfection, Printed at the expence of the author, and sold by R. Baldwin.
- Himejima, M., K. R. Hobson, T. Otsuka, D. L. Wood und I. Kubo (1992). "Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion." Journal of Chemical Ecology **18**(10): 1809-1818.
- Hirano, M., M. Miura und T. Gomyo (1994). "Melanoidin as a novel trypsin inhibitor." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **58**(5): 940-941.
- Hoffmann, J. (2014). The World Atlas of Coffee: From beans to brewing - coffees explored, explained and enjoyed, Octopus.
- Hofmann, T., M. Czerny, S. Calligaris und P. Schieberle (2001). "Model studies on the influence of coffee melanoidins on flavor volatiles of coffee beverages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(5): 2382-2386.
- Homma, S., T. Sakamoto, A. E. Hegab, W. Saitoh, A. Nomura, Y. Ishii, Y. Morishima, T. Iizuka, T. Kiwamoto und Y. Matsuno (2006). "Association of phosphodiesterase 4D gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease: relationship to interleukin 13 gene polymorphism." International journal of molecular medicine **18**(5): 933-940.

- Horman, I. und R. Viani (1972). "The nature and conformation of the caffeine-chlorogenate complex of coffee." Journal of Food Science **37**(6): 925-927.
- Hwang, S. J., Y.-W. Kim, Y. Park, H.-J. Lee und K.-W. Kim (2014). "Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells." Inflammation Research **63**(1): 81-90.
- Jacobson, K. A. (2009). "Introduction to Adenosine Receptors as Therapeutic Targets." Handbook of experimental pharmacology(193): 1-24.
- Jaiswal, R., M. F. Matei, A. Golon, M. Witt und N. Kuhnert (2012). "Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies." Food & function **3**(9): 976-984.
- Jiang, H., A. M. Solyom, B. N. Timmermann und D. R. Gang (2005). "Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(20): 2957-2964.
- Jolad, S. D., R. C. Lantz, G. J. Chen, R. B. Bates und B. N. Timmermann (2005). "Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE 2 production." Phytochemistry **66**(13): 1614-1635.
- Jolad, S. D., R. C. Lantz, A. M. Solyom, G. J. Chen, R. B. Bates und B. N. Timmermann (2004). "Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE 2 production." Phytochemistry **65**(13): 1937-1954.
- Juan, S.-H., C.-H. Chen, Y.-H. Hsu, C.-C. Hou, T.-H. Chen, H. Lin, Y.-L. Chu und Y.-M. Sue (2007). "Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin." Nephrology Dialysis Transplantation **22**(3): 732-739.
- Kang, W.-S., I.-H. Lim, D.-Y. Yuk, K.-H. Chung, J.-B. Park, H.-S. Yoo und Y.-P. Yun (1999). "Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate." Thrombosis Research **96**(3): 229-237.
- Kavanaugh, A., P. J. Mease, J. J. Gomez-Reino, A. O. Adebajo, J. Wollenhaupt, D. D. Gladman, E. Lespessailles, S. Hall, M. Hochfeld und C. Hu (2014). "Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor." Annals of the rheumatic diseases **73**(6): 1020-1026.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman und A. M. Graybiel (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." Science **282**(5397): 2275-2279.
- Kloner, R. A. (2004). "Cardiovascular effects of the 3 phosphodiesterase-5 inhibitors approved for the treatment of erectile dysfunction." Circulation **110**(19): 3149-3155.
- Ko, W.-C., C.-M. Shih, Y.-H. Lai, J.-H. Chen und H.-L. Huang (2004). "Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships." Biochemical Pharmacology **68**(10): 2087-2094.

- Kobayashi, M., N. Shoji und Y. Ohizumi (1987). "Gingerol, a novel cardiogenic agent, activates the Ca²⁺-pumping ATPase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **903**(1): 96-102.
- Kohlert, C., I. Van Rensen, R. März, G. Schindler, E. Graefe und M. Veit (2000). "Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans." Planta Medica **66**(06): 495-505.
- Kono, Y., S. Kashine, T. Yoneyama, Y. Sakamoto, Y. Matsui und H. Shibata (1998). "Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **62**(1): 22-27.
- Koo, K. L., A. J. Ammit, V. H. Tran, C. C. Duke und B. D. Roufogalis (2001). "Gingerols and related analogues inhibit arachidonic acid-induced human platelet serotonin release and aggregation." Thrombosis Research **103**(5): 387-397.
- Kot, M. und W. A. Daniel (2008). "Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat." Pharmacological Reports **60**(789): 97.
- Kuhlenbäumer, G., K. Berger, A. Hüge, E. Lange, C. Kessler, U. John, H. Funke, D. Nabavi, F. Stögbauer und E. Ringelstein (2006). "Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the phosphodiesterase 4D gene (PDE4D) and their association with ischaemic stroke in a large German cohort." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **77**(4): 521-524.
- Kuhnert, N. (2011). "Analysing complex polyphenols from roasted coffee and black tea by mass spectrometry."
- Kunz, C.-E. (2000). Untersuchungen zur PDE-Ausstattung unterschiedlicher Zelllinien und Xenograft-Tumoren sowie zum Wirkmechanismus substituierter Pteridine, Technische Universität Kaiserslautern. **Dissertation**.
- Kuppusamy, U. und N. Das (1992). "Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes." Biochemical Pharmacology **44**(7): 1307-1315.
- Kürbitz, C., D. Heise, T. Redmer, F. Goumas, A. Arlt, J. Lemke, G. Rimbach, H. Kalthoff und A. Trauzold (2011). "Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells." Cancer Science **102**(4): 728-734.
- Kuriyama, S., T. Shimazu, K. Ohmori, N. Kikuchi, N. Nakaya, Y. Nishino, Y. Tsubono und I. Tsuji (2006). "Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study." JAMA: The Journal of the American Medical Association **296**(10): 1255-1265.
- Lee, J.-H., H. Y. Zhou, S. Y. Cho, Y. S. Kim, Y. S. Lee und C. S. Jeong (2007). "Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules." Archives of Pharmacal Research **30**(10): 1318-1327.

- Leeper, F. J., R. Croteau, E. M. Davis, J. C. Vederas, T. Hartmann, T. Hemscheidt, J. F. Sanz-Cervera, B. Shen, E. M. Stocking und R. M. Williams (2003). Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids, Springer Berlin Heidelberg.
- Legssyer, A., A. Ziyyat, H. Mekhfi, M. Bnouham, C. Herrenknecht, V. Roumy, C. Fourneau, A. Laurens, J. Hoerter und R. Fischmeister (2004). "Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta." Phytotherapy research **18**(11): 889-894.
- Li, D.-Q., Z.-M. Qian und S.-P. Li (2010). "Inhibition of three selected beverage extracts on α -glucosidase and rapid identification of their active compounds using HPLC-DAD-MS/MS and biochemical detection." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(11): 6608-6613.
- Li, H., N. Xia, I. Brausch, Y. Yao und U. Förstermann (2004). "Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **310**(3): 926-932.
- Lin, J.-K., C.-L. Lin, Y.-C. Liang, S.-Y. Lin-Shiau und I.-M. Juan (1998). "Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh, and black teas." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(9): 3635-3642.
- Lin, Y.-L. und J.-K. Lin (1997). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B." Molecular Pharmacology **52**(3): 465-472.
- Lindl, T., Gstraunthaler, G. (2013). Zell- und Gewebekultur. Berlin Heidelberg, Springer.
- Liu, J.-C., F.-L. Hsu, J.-C. Tsai, P. Chan, J. Y.-H. Liu, G. N. Thomas, B. Tomlinson, M.-Y. Lo und J.-Y. Lin (2003). "Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme." Life sciences **73**(12): 1543-1555.
- Lombardo, S., G. Pandino, G. Mauromicale, M. Knödler, R. Carle und A. Schieber (2010). "Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]." Food Chemistry **119**(3): 1175-1181.
- Mahesh, V., R. Million-Rousseau, P. Ullmann, N. Chabrillange, J. Bustamante, L. Mondolot, M. Morant, M. Noirot, S. Hamon und A. de Kochko (2007). "Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis." Plant Molecular Biology **64**(1-2): 145-159.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert und C. Rémésy (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." The American Journal of Clinical Nutrition **81**(1): 230S-242S.

- Manganello, J. M., Y. Djellas, C. Borg, K. Antonakis und G. C. Le Breton (1999). "Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A₂ receptor-associated G α 13." Journal of Biological Chemistry **274**(39): 28003-28010.
- Marko, D. (1994). Zur Bedeutung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen für Tumorwachstum und Therapie. Fachbereich Chemie. Kaiserslautern, Technische Universität Kaiserslautern. **Dissertation**.
- Marko, D., N. Puppel, Z. Tjaden, S. Jakobs und G. Pahlke (2004). "The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation." Molecular nutrition & food research **48**(4): 318-325.
- Marone, G., M. Columbo, M. Triggiani, R. Cirillo, A. Genovese und S. Formisano (1987). "Inhibition of IgE-mediated release of histamine and peptide leukotriene from human basophils and mast cells by forskolin." Biochemical pharmacology **36**(1): 13-20.
- Mattila, P., J. Hellström und R. Törrönen (2006). "Phenolic acids in berries, fruits, and beverages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(19): 7193-7199.
- Mazzanti, G., F. Menniti-Ippolito, P. A. Moro, F. Cassetti, R. Raschetti, C. Santuccio und S. Mastrangelo (2009). "Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases." European Journal of Clinical Pharmacology **65**(4): 331-341.
- Mekhfi, H., M. ElHaouari, M. Bnouham, M. Aziz, A. Ziyat und A. Legssyer (2006). "Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation." Phytotherapy Research **20**(2): 135-139.
- Meyer, H., A. Bolarinwa, G. Wolfram und J. Linseisen (2006). "Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans." Annals of Nutrition and Metabolism **50**(3): 167-172.
- Mizuno, K., M. Kato, F. Irino, N. Yoneyama, T. Fujimura und H. Ashihara (2003). "The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.)1." FEBS Letters **547**(1-3): 56-60.
- Monti, S. M., R. G. Bailey und J. M. Ames (1998). "The influence of pH on the non-volatile reaction products of aqueous Maillard model systems by HPLC with diode array detection." Food Chemistry **62**(3): 369-375.
- Montoya, G. A. (2012). *In vitro* and *in vivo* biofunctional effects of selected coffee compounds, extracts and brews on key elements of adenosine receptor-mediated signaling pathways and on cellular heme oxygenase, Technische Universität Kaiserslautern. **Dissertation**.
- Montoya, G. A., T. Bakuradze, M. Eirich, T. Erk, M. Baum, M. Habermeyer, G. Eisenbrand und E. Richling (2014). "Modulation of 3', 5'-cyclic AMP homeostasis in human platelets by coffee and individual coffee constituents." British Journal of Nutrition **112**(09): 1427-1437.

- Moonen, H., L. Engels, J. Kleinjans und T. de Kok (2005). "The CYP1A2-164A→ C polymorphism (CYP1A2* 1F) is associated with the risk for colorectal adenomas in humans." Cancer Letters **229**(1): 25-31.
- Moore, A. R. und D. A. Willoughby (1995). "The role of cAMP regulation in controlling inflammation." Clinical and Experimental Immunology **101**(3): 387-389.
- Morales, F. J., V. Somoza und V. Fogliano (2012). "Physiological relevance of dietary melanoidins." Amino Acids **42**(4): 1097-1109.
- Morgado, M., E. Cairrão, A. J. Santos-Silva und I. Verde (2012). "Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle." Cellular and Molecular Life Sciences **69**(2): 247-266.
- Müller, R. und S. Rappert (2010). "Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(5): 1315-1320.
- Müller, T., P. Engels und J. R. Fozard (1996). "Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition." Trends in Pharmacological Sciences **17**(8): 294-298.
- Murakami, M., S. Miura, I. Itoh, N. Gotoh und H. Nakamichi (1983). "Effects of nucleotides and nucleosides on the activity of cyclic AMP phosphodiesterase from rat brain." The Tohoku Journal of Experimental Medicine **141**(1): 23-31.
- Murray, A. J. (2008). "Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems." Sci. Signal. **1**(22): re4-re4.
- Nair, K. P. P. (2010). The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World, Elsevier Science.
- Nakazawa, T. und K. Ohsawa (2002). "Metabolism of [6]-gingerol in rats." Life Sciences **70**(18): 2165-2175.
- Nehlig, A. (2004). Coffee, tea, chocolate, and the brain, CRC Press.
- Nievergelt, A., P. Huonker, R. Schoop, K.-H. Altmann und J. Gertsch (2010). "Identification of serotonin 5-HT 1A receptor partial agonists in ginger." Bioorganic & Medicinal Chemistry **18**(9): 3345-3351.
- Niwano, K., M. Arai, K. Tomaru, T. Uchiyama, Y. Ohyama und M. Kurabayashi (2003). "Transcriptional Stimulation of the eNOS Gene by the Stable Prostacyclin Analogue Beraprost Is Mediated Through cAMP-Responsive Element in Vascular Endothelial Cells Close Link Between PGI₂ Signal and NO Pathways." Circulation Research **93**(6): 523-530.
- Noldin, V. F., V. Cechinel Filho, F. D. Monache, J. C. Benassi, I. L. Christmann, R. C. Pedrosa und R. A. Yunes (2003). "Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L.(artichoke) cultivated in Brazil." Quimica Nova **26**(3): 331-334.

- Nunes, F. M., A. Reis, M. R. M. Domingues und M. A. Coimbra (2006). "Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(9): 3428-3439.
- O'Donnell, J. M. und H. T. Zhang (2004). "Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4)." Trends in Pharmacological Sciences **25**(3): 158-163.
- Oberholte, R., J. Ratzliff, P. A. Baecker, D. V. Daniels, P. Zuppan, K. Jarnagin und E. R. Shelton (1997). "Multiple splice variants of phosphodiesterase PDE4C cloned from human lung and testis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1353**(3): 287-297.
- Ok, W.-J., H.-J. Cho, H.-H. Kim, D.-H. Lee, H.-Y. Kang, H.-W. Kwon, M. H. Rhee, M. Kim und H.-J. Park (2012). "Epigallocatechin-3-gallate has an anti-platelet effect in a cyclic AMP-dependent manner." Journal of Atherosclerosis and Thrombosis **19**(4): 337-348.
- Oliveira, I., P. Baptista, R. Malheiro, S. Casal, A. Bento und J. A. Pereira (2011). "Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity." Food Research International **44**(5): 1401-1407.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman, M. N. Buijsman, J. M. van Amelsvoort und M. B. Katan (2003). "Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans." The Journal of Nutrition **133**(6): 1806-1814.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman und M. B. Katan (2001). "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans." The Journal of Nutrition **131**(1): 66-71.
- Omburo, G. A., T. Brickus, F. A. Ghazaleh und R. W. Colman (1995). "Divalent metal cation requirement and possible classification of cGMP-inhibited phosphodiesterase as a metallohydrolase." Archives of Biochemistry and Biophysics **323**(1): 1-5.
- Omori, K. und J. Kotera (2007). "Overview of PDEs and their regulation." Circulation Research **100**(3): 309-327.
- Page, C. P. und D. Spina (2012). "Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases." Current Opinion in Pharmacology **12**(3): 275-286.
- Pallauf, K., J. Rivas-Gonzalo, M. Del Castillo, M. Cano und S. de Pascual-Teresa (2008). "Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits." Journal of Food Composition and Analysis **21**(4): 273-281.
- Pandino, G., S. Lombardo, G. Mauromicale und G. Williamson (2011). "Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm." Journal of Food Composition and Analysis **24**(2): 148-153.
- Patro, B., S. Adhikari, G. Chintalwar, S. Chattopadhyay und T. Mukherjee (2005). "The radioprotection and antioxidant properties of dehydrogingerdione." Research on Chemical Intermediates **31**(7): 667-678.

- Paulmann, N., M. Grohmann, J.-P. Voigt, B. Bert, J. Vowinckel, M. Bader, M. Skelin, M. Jevšek, H. Fink und M. Rupnik (2009). "Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation." *PLOS Biology* **7**(10): e1000229.
- Pavlović, R., B. Lakušić, Z. Došlov-Kokoruš und N. Kovačević (2009). "Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species." *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **64**(10): 656-659.
- Pawlowska, A. M., M. De Leo und A. Braca (2006). "Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(26): 10234-10238.
- Perva-Uzunalić, A., M. Škerget, Ž. Knez, B. Weinreich, F. Otto und S. Grüner (2006). "Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine." *Food Chemistry* **96**(4): 597-605.
- Petrussa, E., E. Braidot, M. Zancani, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui und A. Vianello (2013). "Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses." *International Journal of Molecular Sciences* **14**(7): 14950-14973.
- Pickard, S., I. Becker, K.-H. Merz und E. Richling (2013). "Determination of the Alkylpyrazine Composition of Coffee Using Stable Isotope Dilution–Gas Chromatography–Mass Spectrometry (SIDA-GC-MS)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(26): 6274-6281.
- Pimpão, R. C., T. Dew, P. B. Oliveira, G. Williamson, R. B. Ferreira und C. N. Santos (2013). "Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(17): 4053-4062.
- Pizzorno, J. E. und M. T. Murray (2013). *Textbook of Natural Medicine*, Elsevier/Churchill Livingstone.
- Plavšić, M., B. Čosović und C. Lee (2006). "Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material." *Science of the Total Environment* **366**(1): 310-319.
- Pöch, G. (1971). "Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3', 5'-AMP as substrate." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **268**(3): 272-299.
- Polson, J. B. und S. J. Strada (1996). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **36**(1): 403-427.
- Quintana, J. L. B., M. F. Allam, A. S. Del Castillo und R. F.-C. Navajas (2007). "Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review." *Neurological Research* **29**(1): 91-95.
- Rall, T. und E. W. Sutherland (1958). "Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles." *Journal of Biological Chemistry* **232**(2): 1065-1076.

- Ramos, P. A., A. n. R. Guerra, O. Guerreiro, C. S. Freire, A. M. Silva, M. F. Duarte und A. J. Silvestre (2013). "Lipophilic extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): a source of valuable bioactive terpenic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(35): 8420-8429.
- Ravindran, P. N. und K. N. Babu (2004). Ginger: The Genus Zingiber, CRC Press.
- Reichardt, N., D. Gniechwitz, H. Steinhart, M. Bunzel und M. Blaut (2009). "Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota." Molecular Nutrition & Food Research **53**(2): 287-299.
- Remashree, A., K. Unnikrishnan und P. Ravindran (1999). "Development of oil cells and ducts in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)." Journal of Spices and Aromatic Crops **8**(2): 163-170.
- Rendleman, J. (1987). "Complexation of calcium by melanoidin and its role in determining bioavailability." Journal of Food Science **52**(6): 1699-1705.
- Richter, W. und M. Conti (2004). "The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases." Journal of Biological Chemistry **279**(29): 30338-30348.
- Riedel, A., N. Dieminger, T. Bakuradze, R. Lang, G. A. M. Parra, C. M. Hochkogler, S. Winkler, G. Bytof, I. Lantz und H. Stiebitz (2014). "A 4-week consumption of medium roast and dark roast coffees affects parameters of energy status in healthy subjects." Food Research International **63**: 409-419.
- Robichaud, A., C. Savoie, P. Stamatiou, F. Tattersall und C. Chan (2001). "PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway." Neuropharmacology **40**(2): 262-269.
- Ross, I. A. (2007). Medicinal Plants of the World, Volume 3: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses, Humana Press.
- Ross, S. E., R. O. Williams, L. J. Mason, C. Mauri, L. Marinova-Mutafchieva, A.-M. Malfait, R. N. Maini und M. Feldmann (1997). "Suppression of TNF-alpha expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram." The Journal of Immunology **159**(12): 6253-6259.
- Ruch, R. J., S.-j. Cheng und J. E. Klaunig (1989). "Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea." Carcinogenesis **10**(6): 1003-1008.
- Ruckstuhl, M., A. Beretz, R. Anton und Y. Landry (1979). "Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors." Biochemical Pharmacology **28**(4): 535-538.
- Rufian-Henares, J. A. und S. P. de la Cueva (2009). "Antimicrobial activity of coffee melanoidins - A study of their metal-chelating properties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(2): 432-438.

- Rufián-Henares, J. A. und F. J. Morales (2007). "Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(4): 1480-1485.
- Ruiz-Rodríguez, B.-M., P. Morales, V. Fernández-Ruiz, M.-C. Sánchez-Mata, M. Cámara, C. Díez-Marqués, M. Pardo-de-Santayana, M. Molina und J. Tardío (2011). "Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data." Food Research International **44**(5): 1244-1253.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., C. Sánchez-Moreno, B. d. Ancos, M. Cortes, V. Fernández Ruíz, M. Cámara und J. Tardío (2014). "Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity." Fruits **69**: 435-448.
- Ruiz, A., L. Bustamante, C. Vergara, D. von Baer, I. Hermosín-Gutiérrez, L. Obando und C. Mardones (2015). "Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of South Patagonia." Food Chemistry **167**: 84-90.
- Ryningen, A., B. Olav Jensen und H. Holmsen (1998). "Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism **1394**(2): 235-248.
- Saleem, M. (2009). "Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene." Cancer Letters **285**(2): 109-115.
- Saleheen, D., S. Bukhari, S. R. Haider, A. Nazir, S. Khanum, S. Shafqat, M. K. Anis und P. Frossard (2005). "Association of phosphodiesterase 4D gene with ischemic stroke in a Pakistani population." Stroke **36**(10): 2275-2277.
- Salter, E. A. und A. Wierzbicki (2007). "The mechanism of cyclic nucleotide hydrolysis in the phosphodiesterase catalytic site." The Journal of Physical Chemistry B **111**(17): 4547-4552.
- Sanz, M. J., J. Cortijo und E. J. Morcillo (2005). "PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression." Pharmacology & Therapeutics **106**(3): 269-297.
- Schindler, G., U. Patzak, B. Brinkhaus, A. Nieciecki, J. Wittig, N. Krähmer, I. Glöckl und M. Veit (2002). "Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans." The Journal of Clinical Pharmacology **42**(8): 920-927.
- Schoenknecht, C., G. Andersen, I. Schmidts und P. Schieberle (2016). "Quantitation of Gingerols in Human Plasma by Newly Developed Stable Isotope Dilution Assays and Assessment of Their Immunomodulatory Potential." Journal of agricultural and food chemistry **64**(11): 2269-2279.
- Schütz, K., D. Kammerer, R. Carle und A. Schieber (2004). "Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads,

- juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(13): 4090-4096.
- Schwarz, U. R., U. Walter und M. Eigenthaler (2001). "Taming platelets with cyclic nucleotides." Biochemical Pharmacology **62**(9): 1153-1161.
- Schwertner, H. A. und D. C. Rios (2007). "High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages." Journal of Chromatography B **856**(1): 41-47.
- Seelinger, G., I. Merfort und C. M. Schempp (2008). "Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin." Planta Medica **74**(14): 1667-1677.
- Semmelroch, P., G. Laskawy, I. Blank und W. Grosch (1995). "Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assays." Flavour and Fragrance Journal **10**(1): 1-7.
- Sharangi, A. (2009). "Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)—A review." Food Research International **42**(5): 529-535.
- Shields, B. M., R. M. Freathy, B. A. Knight, A. Hill, M. N. Weedon, T. M. Frayling, A. T. Hattersley und B. Vaidya (2009). "Phosphodiesterase 8B gene polymorphism is associated with subclinical hypothyroidism in pregnancy." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(11): 4608-4612.
- Shimoda, H., K. Ninomiya, N. Nishida, T. Yoshino, T. Morikawa, H. Matsuda und M. Yoshikawa (2003). "Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **13**(2): 223-228.
- Si, H., J. Yu, H. Jiang, H. Lum und D. Liu (2012). "Phytoestrogen genistein up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression via activation of cAMP response element-binding protein in human aortic endothelial cells." Endocrinology **153**(7): 3190-3198.
- Siebler, S. und G. Milligan (2010). G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling, and Physiology, Cambridge University Press.
- Singh, G., I. Kapoor, P. Singh, C. S. de Heluani, M. P. de Lampasona und C. A. Catalan (2008). "Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*." Food and Chemical Toxicology **46**(10): 3295-3302.
- Sivasankar, B. (2002). Food Processing and Preservation, PHI Learning.
- Smolenski, A. (2012). "Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets." Journal of Thrombosis and Haemostasis **10**(2): 167-176.

- Soares, C. M. D., R. C. Alves und M. B. P. P. Oliveira (2015). Chapter 69 - Acrylamide in Coffee: Influence of Processing. Processing and Impact on Active Components in Food. V. Preedy. San Diego, Academic Press: 575-582.
- Somoza, V., E. Wenzel, M. Lindenmeier, D. Grothe, H. F. Erbersdobler und T. Hofmann (2005). "Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters *in vivo*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(21): 8176-8182.
- Somoza, V., E. Wenzel, C. Weiß, I. Clavin-Rädecker, N. Grübel und H. F. Erbersdobler (2006). "Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N (epsilon)-fructoselysine and N (epsilon)-carboxymethyllysine in rats." Molecular Nutrition & Food Research **50**(9): 833-841.
- Son, D.-J., M.-R. Cho, Y.-R. Jin, S.-Y. Kim, Y.-H. Park, S.-H. Lee, S. Akiba, T. Sato und Y.-P. Yun (2004). "Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **71**(1): 25-31.
- Song, Q., J. W. Cole, J. R. O'Connell, O. C. Stine, M. Gallagher, W. H. Giles, B. D. Mitchell, M. A. Wozniak, B. J. Stern und J. D. Sorkin (2006). "Phosphodiesterase 4D polymorphisms and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women Study." Human molecular genetics **15**(16): 2468-2478.
- Souness, J. E., D. Aldous und C. Sargent (2000). "Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors." Immunopharmacology **47**(2-3): 127-162.
- Srivastava, D., D. Fox und R. Hurwitz (1995). "Effects of magnesium on cyclic GMP hydrolysis by the bovine retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase." Biochemical Journal **308**: 653-658.
- Srivastava, K. (1986). "Isolation and effects of some ginger components on platelet aggregation and eicosanoid biosynthesis." Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine **25**(2): 187-198.
- Stalmach, A., W. Mullen, D. Barron, K. Uchida, T. Yokota, C. Cavin, H. Steiling, G. Williamson und A. Crozier (2009). "Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption." Drug Metabolism and Disposition **37**(8): 1749-1758.
- Stalmach, A., H. Steiling, G. Williamson und A. Crozier (2010). "Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy." Archives of Biochemistry and Biophysics **501**(1): 98-105.
- Stark, T. und T. Hofmann (2005). "Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of N-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(13): 5419-5428.

- Stark, T., H. Justus und T. Hofmann (2006). "Quantitative analysis of N-phenylpropenoyl-L-amino acids in roasted coffee and cocoa powder by means of a stable isotope dilution assay." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(8): 2859-2867.
- Stefanovich, V. (1979). "Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP PDE) and cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate phosphodiesterase (cGMP PDE) in microvessels isolated from bovine cortex." Neurochemical Research **4**(6): 681-687.
- Takenaka, M., N. Sato, H. Asakawa, X. Wen, M. Murata und S. Homma (2005). "Characterization of a metal-chelating substance in coffee." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **69**(1): 26-30.
- Tanaka, Y. T., K. Tanaka, H. Kojima, T. Hamada, T. Masutani, M. Tsuboi und Y. Akao (2013). "Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. suppresses photoaging of skin by inhibiting the transcription activity of nuclear factor-kappa B." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **23**(2): 518-523.
- Tao, Y., W. Li, W. Liang und R. B. Van Breemen (2009). "Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High-Performance Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(21): 10014-10021.
- Tasken, K. und E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiological Reviews **84**(1): 137-167.
- Tassaneeyakul, W., D. J. Birkett, M. E. McManus, W. Tassaneeyakul, M. E. Veronese, T. Andersson, R. H. Tukey und J. O. Miners (1994). "Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes p450: Contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms." Biochemical Pharmacology **47**(10): 1767-1776.
- Thein, K., W. Myint, M. M. Myint, S. P. Aung, M. Khin, A. Than und M. Bwin (1995). "Preliminary screening of medicinal plants for biological activity based on inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase." Pharmaceutical Biology **33**(4): 330-333.
- Thorn, C. F., E. Aklillu, E. M. McDonagh, T. E. Klein und R. B. Altman (2012). "PharmGKB summary: caffeine pathway." Pharmacogenetics and Genomics **22**(5): 389.
- Tjendraputra, E., V. H. Tran, D. Liu-Brennan, B. D. Roufogalis und C. C. Duke (2001). "Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells." Bioorganic Chemistry **29**(3): 156-163.
- Tokuhara, D., T. Shimada, A. Asami, A. Takahashi, H. Kobayashi, H. Saimaru und M. Aburada (2013). "Pharmacokinetics of 6-Shogaol, a pungent ingredient of *Zingiberis Rhizoma*, and the anti-inflammatory activity of its metabolite, 6-Paradol." Journal of Traditional Medicines **30**(5): 199-205.
- Van Boekel, M. (2006). "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction." Biotechnology advances **24**(2): 230-233.
- Van Dam, R. M. und E. J. Feskens (2002). "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus." The Lancet **360**(9344): 1477-1478.

- van Dusseldorp, M., M. B. Katan, T. van Vliet, P. Demacker und A. Stalenhoef (1991). "Cholesterol-raising factor from boiled coffee does not pass a paper filter." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **11**(3): 586-593.
- Versteeg, H. H., J. W. Heemskerk, M. Levi und P. H. Reitsma (2013). "New fundamentals in hemostasis." Physiological Reviews **93**(1): 327-358.
- Vigdahl, R. L., J. Mongin und N. R. Marquis (1971). "Platelet aggregation IV. Platelet phosphodiesterase and its inhibition by vasodilators." Biochemical and Biophysical Research Communications **42**(6): 1088-1094.
- Vollert, S., N. Kaessner, A. Heuser, G. Hanauer, A. Dieckmann, D. Knaack, H. Kley, R. Beume und C. Weiss-Haljiti (2012). "The glucose-lowering effects of the PDE4 inhibitors roflumilast and roflumilast-N-oxide in db/db mice." Diabetologia **55**(10): 2779-2788.
- Walle, T., Y. Otake, J. Brubaker, U. Walle und P. Halushka (2001). "Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers." British Journal of Clinical Pharmacology **51**(2): 143-146.
- Wang, H.-Y., H. Qian und W.-R. Yao (2011). "Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity." Food Chemistry **128**(3): 573-584.
- Wang, H., M.-S. Peng, Y. Chen, J. Geng, H. Robinson, M. D. Houslay, J. Cai und H. Ke (2007). "Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors." Biochemical Journal **408**(2): 193-201.
- Wang, H., H. Robinson und H. Ke (2007). "The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10." Journal of Molecular Biology **371**(2): 302-307.
- Wang, M., J. E. Simon, I. F. Aviles, K. He, Q.-Y. Zheng und Y. Tadmor (2003). "Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(3): 601-608.
- Weissmann, G., I. Goldstein, S. Hoffstein und P. K. Tsung (1975). "RECIPROCAL EFFECTS OF cAMP AND cGMP ON MICROTUBULE-DEPENDENT RELEASE OF LYOSOMAL ENZYMES." Annals of the New York Academy of Sciences **253**(1): 750-762.
- Weniger, B., A. Lobstein, B. H. Um, C. Vonthron-Sénéchau, R. Anton, N. J. Usuga, H. Basaran und C. Lugnier (2005). "Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4." Phytotherapy Research **19**(1): 75-77.
- Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." Plant Physiology **126**(2): 485-493.
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress." Current Opinion in Plant Biology **5**(3): 218-223.

- Wittemer, S., M. Ploch, T. Windeck, S. Müller, B. Drewelow, H. Derendorf und M. Veit (2005). "Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans." Phytomedicine **12**(1): 28-38.
- Wohlmuth, H., D. N. Leach, M. K. Smith und S. P. Myers (2005). "Gingerol content of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(14): 5772-5778.
- Wohlmuth, H., M. K. Smith, L. O. Brooks, S. P. Myers und D. N. Leach (2006). "Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(4): 1414-1419.
- Wood, A. J. und W. R. Hiatt (2001). "Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication." New England Journal of Medicine **344**(21): 1608-1621.
- Wu, W., X. Yu, X.-P. Luo, S.-H. Yang und D. Zheng (2013). "Tetramethylpyrazine protects against scopolamine-induced memory impairments in rats by reversing the cAMP/PKA/CREB pathway." Behavioural Brain Research **253**: 212-216.
- Xue, H., H. Wang, X. Song, W. Li, K. Sun, W. Zhang, X. Wang, Y. Wang und R. Hui (2009). "Phosphodiesterase 4D gene polymorphism is associated with ischaemic and haemorrhagic stroke." Clinical science **116**(4): 335-340.
- Yanagimoto, K., K.-G. Lee, H. Ochi und T. Shibamoto (2002). "Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(19): 5480-5484.
- Yang, F., W. J. de Villiers, C. J. McClain und G. W. Varilek (1998). "Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model." The Journal of Nutrition **128**(12): 2334-2340.
- Yang, F., H. S. Oz, S. Barve, W. J. de Villiers, C. J. McClain und G. W. Varilek (2001). "The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6." Molecular Pharmacology **60**(3): 528-533.
- Yang, J., J. Wu, H. Jiang, R. Mortensen, S. Austin, D. R. Manning, D. Woulfe und L. F. Brass (2002). "Signaling through Gi Family Members in Platelets REDUNDANCY AND SPECIFICITY IN THE REGULATION OF ADENYLYL CYCLASE AND OTHER EFFECTORS." Journal of Biological Chemistry **277**(48): 46035-46042.
- Yeh, H.-y., C.-h. Chuang, H.-c. Chen, C.-j. Wan, T.-l. Chen und L.-y. Lin (2014). "Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts." LWT-Food Science and Technology **55**(1): 329-334.
- Yusof, Y., N. Ahmad, S. Das, S. Sulaiman und N. Murad (2009). "Chemopreventive efficacy of ginger (*Zingiber officinale*) in ethionine induced rat hepatocarcinogenesis." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **6**(1): 87-93.

- Zancan, K. C., M. O. Marques, A. J. Petenate und M. A. A. Meireles (2002). "Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts." The Journal of Supercritical Fluids **24**(1): 57-76.
- Zapolska-Downar, D., A. Zapolski-Downar, M. Naruszewicz, A. Siennicka, B. Krasnodębska und B. Kołodziej (2002). "Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes." Life Sciences **71**(24): 2897-2908.
- Zhang, K. Y., G. L. Card, Y. Suzuki, D. R. Artis, D. Fong, S. Gillette, D. Hsieh, J. Neiman, B. L. West und C. Zhang (2004). "A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases." Molecular Cell **15**(2): 279-286.
- Zhang, W. und R. W. Colman (2007). "Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A." Blood **110**(5): 1475-1482.
- Zick, S. M., Z. Djuric, M. T. Ruffin, A. J. Litzinger, D. P. Normolle, S. Alrawi, M. R. Feng und D. E. Brenner (2008). "Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **17**(8): 1930-1936.
- Ziyyat, A., A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni und W. Benjelloun (1997). "Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco." Journal of Ethnopharmacology **58**(1): 45-54.
- Ziyyat, A., H. Mekhfi, M. Bnouham, A. Tahri, A. Legssyer, J. Hoerter und R. Fischmeister (2002). "*Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta." Phytotherapy Research **16**(6): 572-575.
- Zuo, Y., H. Chen und Y. Deng (2002). "Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector." Talanta **57**(2): 307-316.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: PDE-Hemmstoffe mit Arzneimittelzulassung.....	4
Tabelle 2-2: Substratspezifität der PDE-Familien und gewebespezifische Verteilung (Gresele <i>et al.</i> , 2011).	8
Tabelle 2-3: Natürliche Varianten und Isoformen der PDE4 (UniProt-Datenbank)	12
Tabelle 2-4: Michaelis-Menten-Konstanten für die Thrombozyten PDEs (Colman, 2004; Gresele <i>et al.</i> , 2011).	15
Tabelle 2-5: Durch cyclische Nukleotide, PKA und PKG vermutete Hemmung der Thrombozytenaktivierung, z.T. adaptiert nach Schwarz <i>et al.</i> (2001).....	16
Tabelle 2-6: Ausgewählte antiinflammatorische Mechanismen erhöhter cAMP-Level.....	19
Tabelle 2-7: Zusammenfassende Inhaltsstofftabelle für <i>Coffea arabica</i> (Chu und Technologists, 2012 S. 28 + 38).....	22
Tabelle 2-8: Übersicht über das Studiendesign von Kurzzeit- und Langzeitstudie zur Hemmung der Thrombozyten-PDE.....	25
Tabelle 2-9: Dissoziationskonstanten (K_i -Werte) in μM der Methylxanthine für die Bindung der Adenosin-Rezeptoren (Daly <i>et al.</i> , 1983).....	31
Tabelle 2-10: K_i -Werte und IC_{50} -Werte der Methylxanthine für die PDE-Hemmung und -Bindung in mM mit PDE-Ursprungsgewebe.....	31
Tabelle 2-11: Ausgewählte Kaffeearomastoffe mit Geruchseindruck (Deibler <i>et al.</i> , 1998), Geruchsschwellenwert in Wasser sowie Geruchsaktivität (Sammelroch <i>et al.</i> , 1995) und Mechanismus der Entstehung während der Röstung (Buffo und Cardelli-Freire, 2004).	36
Tabelle 2-12: IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung der Alkylpyrazine nach Montoya Parra (2012)	39
Tabelle 2-13: IC_{50} -Werte der PDE-Hemmung durch Flavonoide.	51
Tabelle 4-1: Pipettierschema PDE-Assay	83
Tabelle 4-2: Run III Puffer 2x.....	84
Tabelle 4-3: Run III Puffer 1x.....	84
Tabelle 4-4: cAMP Mix	84
Tabelle 4-5: Zugabe [2,8- ^3H]-cAMP	85
Tabelle 4-6: Eigenschaften verwendeter Kaffees.....	86
Tabelle 4-7: HPLC-Gradientenprofil präparativ CaW/CuW	91
Tabelle 4-8: Profil des Fraktionensammlers für die präparative Aufreinigung von CaW und CuW	91
Tabelle 4-9: HPLC-Gradientenprofil Charakterisierung Kaffee, Kaffeeextrakte und Fraktionen	92

Tabelle 4-10: HPLC-Gradientenprofil der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen	93
Tabelle 4-11: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen im Q1-Scan-Modus	93
Tabelle 4-12: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung der Kaffeeextrakte und Fraktionen im MS ² -Modus	93
Tabelle 4-13: HPLC-Gradientenprofil der Quantifizierung von Luteolin-Glykosiden in Artischockenextrakt mittels HPLC-DAD	95
Tabelle 4-14: HPLC-Gradientenprofil der Identifizierung und Quantifizierung der Gingerole in Ingwerextrakten	97
Tabelle 4-15: MS-Geräteparameter zur Identifizierung der Gingerole in Ingwerextrakten im Q1-Scan-Modus	97
Tabelle 4-16: HPLC-Gradientenprofil der Identifizierung der Hauptkomponente des Erdbeerbaumextrakts und Quantifizierung von Arbutin	100
Tabelle 4-17: MS-Geräteparameter zur Identifizierung der Hauptkomponente des Erdbeerbaumextrakts im MS ² - und Q1-Scan-Modus	100
Tabelle 4-18: HPLC-Gradientenprofil zur Identifizierung der Catechine in Grünteeextrakt mittels HPLC-ESI-MS(/MS)	103
Tabelle 4-19: MS-Geräteparameter der Identifizierung der Catechine in Grünteeextrakt TXE im MS ² - und Q1-Scan-Modus	103
Tabelle 5-1: Eigenschaften der getesteten Kaffees	109
Tabelle 5-2: PDE-Kinetik-Daten der Fraktion 8	113
Tabelle 5-3: MS-Parameter der Identifizierung von CaW und CuW (Methode siehe 4.4.12)	116
Tabelle 5-4: Zusammenfassung der PDE-hemmenden Wirkung und Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen	123
Tabelle 5-5: Gehalte und IC ₅₀ -Werte der PDE-Hemmung der getesteten ALE-Inhaltsstoffe	132
Tabelle 5-6: Gehalte und IC ₅₀ -Werte der PDE-Hemmung der getesteten Ingwerextrakte GPE, GWE, GLE und [6]-Gingerol.	136
Tabelle 5-7: IC ₅₀ -Werte der PDE-Hemmung von Anthocyanen aus der Literatur	144
Tabelle 5-8: Ergebnisse der qualitativen Catechin-Analytik im TXE mittels HPLC-ESI-MS/MS im MS ² -Modus	147
Tabelle 5-9: Gehalte und IC ₅₀ -Werte der PDE-Hemmung ausgewählter Tee-Inhaltsstoffe aus der Literatur	148

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Zyklische Nukleotide.....	4
Abbildung 2-2: Bildung von cAMP aus ATP und Hydrolyse. AC - Adenylatzyklase; PDE - Phosphodiesterase.....	5
Abbildung 2-3: Detaillierte Darstellung der cAMP-Signalkaskade aus Murray (2008). AF6 - Afadin-Protein; AKAP - Proteinkinase A Ankerprotein, AMP - Adenosinmonophosphat; Arap3 - Arf und Rho GAP Adapter Protein 3 ; ATF1 - cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor, <i>activating transcription factor 1</i> ; ATP - Adenosintri-phosphat; B-Raf - Proteinkinase B-Raf; C - katalytische Untereinheit Proteinkinase A; cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat; CNGC - <i>cyclic nucleotide-gated channels</i> ; CREB - <i>cAMP response element-binding protein</i> ; CREM - <i>cAMP response element-modulator</i> ; Epac - <i>exchange protein directly activated by cAMP</i> ; ERK1/2 - <i>extracellular signal-related kinase 1/2</i> ; GAP - GTPase-aktivierende Proteine; G _i - inhibierendes G-Protein; G _s - stimulierendes G-Protein; GTP - Guanosintri-phosphat; JNK - c-Jun N-terminale Kinasen; MAPK - Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK - MAPK/ERK Kinase; PDE - Phosphodiesterase, PKA - cAMP-abhängige Proteinkinase A, R - regulatorische Untereinheit Proteinkinase A; Raf1 - Proteinkinase C-Raf; Rap1 - GTPase, <i>Ras-related protein 1</i> ; Ras - GTPasen-Familie; Rho - GTPase, <i>Ras homologue</i> ;	6
Abbildung 2-4: Spezifität der cAMP-vermittelten Signalkaskade durch Kompartimentalisierung der cAMP-Pools. AKAP - „ <i>A kinase anchoring protein</i> “; C - katalytische Untereinheit der PKA; cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat; PDE - Phosphodiesterase; PKA - Proteinkinase A; aus Tasken und Aandahl (2004).	7
Abbildung 2-5: Das aktive Zentrum der PDE4A aus Wang <i>et al.</i> (2007).	9
Abbildung 2-6: Bindung von cAMP im aktiven Zentrum der PDE. (a) Darstellung der Subdomänen aus Card <i>et al.</i> (2004); (b) Darstellung der Bindungen in PDE4D (lila gebundene Wassermoleküle) aus Wang <i>et al.</i> (2007).	10
Abbildung 2-7: R- und S-Konformer von Rolipram.....	11
Abbildung 2-8: Aktivierungskaskade mit Initiations-, Amplifikations- und Verbreitungsphase aus Versteeg <i>et al.</i> (2013). Initiation (unteres Drittel): Thrombinbildung (IIa) an der Oberfläche subendothelialer Zellen nach Gefäßbeschädigung. Amplifikation (linke Bildhälfte): Thrombin aktiviert erste angehaftete Thrombozyten. Verbreitungsphase (rechte Bildhälfte): Aktivierte Thrombozyten aktivieren massive Mengen an Thrombin, welches weitere Thrombozyten aktiviert und Fibrin zur Vernetzung des Thrombus bildet.....	13
Abbildung 2-9: Regulierung des cAMP Spiegels bei Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin.....	14
Abbildung 2-10: Regulierung der cyclischen Nukleotide bei inaktiven Thrombozyten.	15

Abbildung 2-11: Wege der von zyklischen Nucleotiden abhängigen Vasodilatation aus Morgado <i>et al.</i> (2012).	17
Abbildung 2-12: <i>Coffea arabica</i> , Rubiaceae (Hamilton, 1852)	20
Abbildung 2-13: Arabica Rohkaffeebohnen mit Silberhäutchen (U.S. National Seed Herbarium)	21
Abbildung 2-14: Bildung von Aromaverbindungen in der Maillard-Reaktion aus Van Boekel (2006).	23
Abbildung 2-15: Ergebnisse der PDE-Aktivität in Thrombozyten nach Kaffeekonsum in einer Kurzzeitstudie (n=8) aus Montoya (2012). PDE-Aktivität normalisiert auf den Proteingehalt ist dargestellt im Box-Plot-Diagramm. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test gegen die Wash-out-Phase ermittelt (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Gelb: 2-wöchige Caffé Crema Phase; grün: 2-wöchige Phase koffeinreduziert.	26
Abbildung 2-16: Ergebnisse der PDE-Aktivität in Thrombozyten nach Kaffeekonsum in einer Langzeitstudie (n=84) aus Montoya (2012). PDE-Aktivität normalisiert auf den Proteingehalt ist dargestellt im Box-Plot-Diagramm. Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon Test ermittelt (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). grau: 4-wöchige Phase Referenzkaffee; rot: 4-wöchige Phase Studienkaffee.	27
Abbildung 2-17: Koffein	27
Abbildung 2-18: Vierstufige Biosynthese des Koffeins ausgehend von Xanthosin adaptiert nach (Mizuno <i>et al.</i> , 2003; Ashihara <i>et al.</i> , 2008). SAM, S-Adenosyl-L-methionin; SAH - S-Adenosyl-L-homocystein.	28
Abbildung 2-19: Metabolismus des Koffeins modifiziert nach Tassaneeyakol <i>et al.</i> (1994), Kot und Daniel (2008) und Thorn <i>et al.</i> (2012). CYP – Cytochrom P450 Isozym; NAT2 – N-Acetyltransferase Typ 2; XDH – Xanthindehydrogenase.	29
Abbildung 2-20: Adenosinrezeptoren und ihre G-Protein-vermittelten Signalkaskaden modifiziert nach Jacobsen (Jacobson, 2009)	30
Abbildung 2-21: D-(-)-Chinasäure	32
Abbildung 2-22: Relevante Hydroxyzimtsäuren (oben) und Chlorogensäuren (unten) in Kaffee	33
Abbildung 2-23: Biosynthese der Chlorogensäuren modifiziert nach Mahesh <i>et al.</i> (2007) und Ferrer <i>et al.</i> (2008). PAL - Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H - Zimtsäure-4-Hydroxylase; 4CL - <i>p</i> -Cumaroyl:CoA-Ligase; C3H - <i>p</i> -Cumaroyl-3-Hydroxylase; HCT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Shikimisäure/Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; HQT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; UGCT - UDP-Glucose:Zimtsäure-Glucosyltransferase; HCGQT - Hydroxyzimtsäure-D-glucosid:Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; CCOMT - Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase.	34
Abbildung 2-24: Grundstruktur der Alkylpyrazine	36

Abbildung 2-25: Bildung der Alkylpyrazine bei der Röstung modifiziert nach Baltes und Bochmann (1987) und Adams und De Kimpe (2009). Blau - ausgehend von α -Dicarbonylverbindungen über α -Aminoketone unter Generierung von Strecker Aldehyden. Grün - ausgehend von α -Hydroxylaminosäuren (Serin R=H, Threonin R=CH ₃) über α -Hydroxylamine.....	37
Abbildung 2-26: Metabolisierung der Alkylpyrazine in Mensch und Tier modifiziert nach Müller und Rappert (2010). CYP - Cytochrom P450; GST - Glutathion-S-Transferase; UDP-GT - Uridindiphosphat-Glucuronosyl-Transferase.....	38
Abbildung 2-27: Schematische Darstellung der Bildung von Melanoidinen im Zuge der Maillard-Reaktion modifiziert nach Wang <i>et al.</i> (2011).....	40
Abbildung 2-28: Bildung von Pronyl-Lysin im Zuge der Maillard Reaktion: Reaktion von Acetylformoin mit der freien Aminogruppe des Lysinrestes eines Proteins, modifiziert nach Somoza <i>et al.</i> (2005).	41
Abbildung 2-29: Grundstruktur von Galaktomannanen.	41
Abbildung 2-30: Grundstruktur der Arabinogalaktane des Typs II aus online Zusatzmaterial von Andersen <i>et al.</i> (2012).	42
Abbildung 2-31: RP-HPLC-Chromatogramm eines Maillard-Reaktion-Modells bei 460 nm aus Monti <i>et al.</i> (1998).	44
Abbildung 2-32: Artischocken, Asteraceae (Hill, 1762)	46
Abbildung 2-33: Dicaffeoylchinasäuren der Artischocke	47
Abbildung 2-34: Flavone der Artischocke	48
Abbildung 2-35: Naringenin (R=H), Prunin (R=Glucose), Narirutin (R=Rutinose).	48
Abbildung 2-36: Grundstrukturen der für die Biosynthese relevanten Flavonoide.	48
Abbildung 2-37: Biosynthese der Flavonoide aus Winkel-Shirley (2002). ANS, Anthocyanidin-Synthase; AS, Aureusidin-Synthase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CHI, Chalkon-Isomerase; CHR, Chalkon-Reduktase; DFR, Dihydroflavonol-4-Reduktase; DMID, 7,2'-Dihydroxy-4'-Methoxyisoflavanol-Dehydratase; F3H, Flavanone-3-Hydroxylase; F3'H, Flavonoid-3'-Hydroxylase; F3'5'H, Flavonoid-3'5'-Hydroxylase; FS1/FS2, Flavon-Synthase; I2'H, Isoflavon-2'-Hydroxylase; IFR, Isoflavon-Reduktase; IFS, Isoflavon-Synthase; IOMT, Isoflavon-O-Methyltransferase; LCR, Leucoanthocyanidin-Reduktase; LDOX, Leucoanthocyanidin-Dioxygenase; OMT, O-Methyltransferase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; RT, Rhamnosyl-Transferase; UFGT, Flavonoid-UDP-Glucosyltransferase; VR, Vestiton-Reduktase.	49
Abbildung 2-38: cAMP, cGMP und Flavongrundstruktur. Rot hervorgehoben: Pyrimidin-Ring und Pyranon-Ring.	50
Abbildung 2-39: Sesquiterpen-Laktone in <i>Cynara scolymus</i>	52
Abbildung 2-40: Lupeol.....	52

Abbildung 2-41: <i>Zingiber officinale</i> , Zingiberaceae (Brandt <i>et al.</i> , 1887)	53
Abbildung 2-42: Lysogene Bildung der Ölkanäle. H: Lyse der zentralen Ölzelle (lc). I: Ausgebildeter Ölkanal umgeben von Ölzellen mit Stärkekörnern (S), Nukleus (n) und spärlichem Cytosol aus Remashree <i>et al.</i> (1999)	54
Abbildung 2-43: Die wichtigsten Sesquiterpene in Ingwer.	55
Abbildung 2-44: Die wichtigsten Monoterpene in Ingwer.	55
Abbildung 2-45: Scharfstoffe und Abbauprodukte des Ingwers.....	56
Abbildung 2-46: Biosynthese der Gingerole adaptiert nach del Carmen Ramirez-Ahumada (2006) und Flores-Sanchez und Gang (2013) mit Shikimisäureweg (rot), Gingerol-Synthesepfad (blau) und Curcuminoid-Synthese-Abzweigung (grün). PAL - Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H - Zimtsäure-4-Hydroxylase; 4CL - p-Cumaroyl:CoA-Ligase; C3H - p-Cumaroyl-3-Hydroxylase; HCT - Hydroxyzimtsäure-CoA-Shikimisäure/Chinasäure-Hydroxyzimtsäuretransferase; CCOMT - Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase.....	58
Abbildung 2-47: Demethoxy-[6]-Shogaol	60
Abbildung 2-48: Flavonole des Ingwers.....	60
Abbildung 2-49: <i>Arbutus unedo</i> , Ericaceae (Du Monceau und Arts, 1825).	61
Abbildung 2-50: Erdbeerbaumfrüchte in unterschiedlichen Reifestadien.	62
Abbildung 2-51: Arbutin	63
Abbildung 2-52: Phenolische Verbindungen in <i>Arbutus unedo</i>	63
Abbildung 2-53: <i>Camellia sinensis</i> , Theaceae (Brandt <i>et al.</i> , 1887).....	65
Abbildung 2-54: Catechine des Grüntees	66
Abbildung 2-55: Reaktionsschema einsubstratiger Enzymkatalyse (Cheng und Prusoff, 1973).....	68
Abbildung 2-56: Lineweaver-Burk-Plot	68
Abbildung 2-57: Schematische Darstellung der kompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)	69
Abbildung 2-58: Schematische Darstellung der unkompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)	70
Abbildung 2-59: Schematische Darstellung der nicht-kompetitiven Hemmung und Reaktionsschema (Cheng und Prusoff, 1973)	71
Abbildung 2-60: Lineweaver-Burk-Plot für unterschiedliche Hemmungsmechanismen und Inhibitorkonzentrationen.	72
Abbildung 4-1: Trypanblau	79
Abbildung 4-2: 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).....	80
Abbildung 4-3: Sulforhodamin B	80
Abbildung 4-4: Hydrolyse von [2,8- ³ H]-cAMP zu [2,8- ³ H]-AMP	82

Abbildung 4-5: Syntheseroute für N-Cumaroyltryptophan und N-Caffeoyltryptophan. DMAP: 4-(Dimethylamino)-pyridin, Ac ₂ O: Essigsäureanhydrid, AcOH: Essigsäure.	89
Abbildung 5-1: Einfluss verschiedener Kaffeeextrakte auf die PDE-Aktivität von 0,1 bis 5 bzw. 10 mg/ml: Entkoffeinierter und rekoffeinierter Kaffeeextrakt (a), Kaffeeextrakte K1 – K4 bzw. Abhängigkeit von der Brühmethode (b), Roh- und Röstkaffeeextrakt (c). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle, Proben vs. Proben): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei p < 0,05; hoch signifikant (**) bei p < 0,01; höchst signifikant (***) bei p < 0,001. K1 - handelsüblich, French Press; K2 - handelsüblich, Filtermaschine; K3 - Espresso „Mailänder“, French Press; K4 - Espresso „Mailänder“, Filtermaschine.	106
Abbildung 5-2: Einfluss von Kaffeeextrakt K2* und zwei Fraktionen auf die PDE-Aktivität: Kaffeeextrakt K2* 0,1 - 10 mg/ml - handelsüblich, Filtermaschine (a), unlösliche Fraktion FN 5 - 500 µg/ml (b), lösliche Fraktion FS 0,1 - 10 mg/ml (c). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei p < 0,05; hoch signifikant (**) bei p < 0,01; höchst signifikant (***) bei p < 0,001.	110
Abbildung 5-3: Chromatogramm der präparativen Fraktionierung der löslichen Fraktion FS in neun Fraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.6) bei unterschiedlichen Wellenlängen (270 nm, 325 nm).	111
Abbildung 5-4: Chromatogramm der präparativen Subfraktionierung der Fraktion 4 in zwei Subfraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.6) bei unterschiedlichen Wellenlängen (270 nm, 325 nm).	112
Abbildung 5-5: Lineweaver Burk Plot, Dixon-Plot und Cornish-Bowden-Plot bei unterschiedlichen Substrat-konzentrationen (1, 0,5, 0,25 µM cAMP) und unterschiedlichen F8-Konzentrationen (300, 30, 3, 0 µg/ml).	113
Abbildung 5-6: Einfluss der Kaffeefeinfraktionen auf die PDE-Aktivität: Fraktionen F0 - F8 in untersch. Konzentrationen (a), Fraktion F4b 8 - 800 µg/ml (b), Fraktion F6 5 - 500 µg/ml (c), Fraktion F7 5 - 500 µg/ml (d), Fraktion F8 3 - 300 µg/ml (e). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei p < 0,05; hoch signifikant (**) bei p < 0,01; höchst signifikant (***) bei p < 0,001.	114
Abbildung 5-7: RP-HPLC-UV-Chromatogramme der Fraktionen F6, F7, F8 bei 280 nm (Methode siehe 4.4.11).	115

Abbildung 5-8: HPLC-UV-Chromatogramm von F8 bei 260 nm mit Q1-Spektren von 33,2-33,4 min und von 30,7-31,0 min (a), MS ² -Spektrum von F8 bei <i>m/z</i> 351,5 und 33,3 min, identifiziert als CuW (b), MS ² -Spektrum von F8 bei <i>m/z</i> 367,3 und 30,7 min, identifiziert als CaW (c), Methode siehe Kapitel 4.4.12.	117
Abbildung 5-9: Chromatogramm der präparativen Subfraktionierung der Fraktion F8 in fünf Feinfraktionen mittels präparativer RP-HPLC (Methode siehe 4.4.7) bei 260 nm (a) und Einfluss der Subfraktionen F8.1 – F8.5 auf die PDE-Aktivität (b). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. PDE-Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$	118
Abbildung 5-10: RP-HPLC-UV-Chromatogramm der Subfraktionen F8.1 - F8.5 bei 260 nm (Methode siehe 4.4.11).....	119
Abbildung 5-11: Einfluss der Hydrolysate der Fraktion F8 auf die PDE-Aktivität: Hydrolysat Fraktion F8, Kontrollhydrolysat und Fraktion F8 (150 und 300 µg/ml). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle, Proben vs. Proben): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$	120
Abbildung 5-12: RP-HPLC-UV Chromatogramme von Fraktion F8 (a) und dem Filtrat nach Ultrafiltration mit einer Cut-Off-Größe von 3 kDa (b) bei 260 nm (Methode siehe 4.4.11). ..	121
Abbildung 5-13: Pearson-Korrelation der PDE-Hemmung in Abhängigkeit vom Bräunungsindex BI der getesteten Kaffeeextrakten und Fraktionen.....	122
Abbildung 5-14: HPLC-UV Chromatogramme des ALE. Chromatogramm (a): kurze Methode bei 325 nm (4.4.11), 1: 5-Caffeoylchinasäure, 2: nicht näher bestimmte DicaFFEoylchinasäure. Chromatogramm (b): lange Methode bei 347 nm (4.5.3) 3: Luteolin-7-O-glucosid, 4 - Luteolin-glucuronid.	129
Abbildung 5-15: Einfluss des Artischockenextraktes ALE und verschiedener Inhaltsstoffe der Artischocke auf die PDE-Aktivität: ALE 0,1 - 10 mg/ml (a), 3,4-DiCQA 5 - 500 µg/ml (b), Apigenin 1,25 - 25 µg/ml (c), Luteolin 1,25 - 35 µg/ml (d), Luteolin-glucosid 1,25 - 35 µg/ml (e), Luteolin-glucuronid 1 - 500 µg/ml (f). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$	130

- Abbildung 5-16: Einfluss verschiedener Ingwerextrakte auf die PDE-Aktivität: GPE 0,1 - 10 mg/ml (a), GWE 0,1 - 10 mg/ml (b), GLE 5 - 500 µg/ml (c) und [6]-Gingerol 5 - 500 µg/ml (d). PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$ 135
- Abbildung 5-17: Strukturformeln der Gingerol-Leitsubstanzen aus Ingwer..... 137
- Abbildung 5-18: HPLC-UV-Chromatogramme der Ingwerextrakte GRE, GPE, GLE, GWE bei 230 nm (Methode siehe Kap. 4.6.5). 1: [6]-Gingerol, 2: [8]-Gingerol, 3: [6]-Shogaol, 4: [10]-Gingerol, IS: 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure. GRE: „ginger rhizome extract“ bereitgestellt von Truw Arzneimittel GmbH. Verschiebung der Retentionszeit kommt zustande durch Verwendung von Säulen unterschiedlichen Alters. 139
- Abbildung 5-19: Einfluss des Erdbeerbaumextraktes SFE 0,1 - 10 mg/ml (a) und von Arbutin 5 - 500 µg/ml (b) auf die PDE-Aktivität. PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$ 140
- Abbildung 5-20: HPLC-UV-Chromatogramm des SFE bei 280 nm (Methode siehe Kap. 4.7.3). 1: Arbutin bei 11,0 min, 2: Galloylchinasäure bei 12,7 min, 3: Coffein (IS) bei 21,5 min. 141
- Abbildung 5-21: HPLC-UV-Chromatogramm des SFE bei 280 nm und Q1-Spektrum positiv 12,1-12,5 min (a), +MS²-Spektrum m/z 362,1 von 12,1-12,5 min (b), -MS²-Spektrum m/z 343,0 von 12,1-12,5 min (c), Methode siehe Kapitel 4.7.2. 142
- Abbildung 5-22: Galloylchinasäuren in Erdbeerbaumfrüchten: 3-Galloylchinasäure links, 5-Galloylchinasäure rechts. 142
- Abbildung 5-23: Einfluss des Grünteeextraktes TXE (0,05 - 5 mg/ml) auf die PDE-Aktivität. PDE-Aktivität ist angegeben prozentual zur Lösungsmittelkontrolle. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle Rolipram (10 µM). Signifikanz (Proben vs. Kontrolle): Student's t-Test. Konfidenzintervalle: signifikant (*) bei $p < 0,05$; hoch signifikant (**) bei $p < 0,01$; höchst signifikant (***) bei $p < 0,001$ 145
- Abbildung 5-24: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramme im MS²-Modus (Methode siehe Kap. 4.8.2) der Precursor-Ionen mit einem m/z -Verhältnis von 291,1 (Catechin, Epicatechin), 307,1 (Gallocatechin, Epigallocatechin), 443,2 (Catechingallat, Epicatechingallat) und 459,1 (Gallocatechingallat, Epigallocatechingallat). 1: Gallocatechin bei 10,5 min, 2:

Epigallocatechin bei 17,6 min, 3: Catechin bei 18,3 min, 4: Epigallocatechingallat bei 19,3 min, 5: Epicatechin bei 19,9 min, 6: Epicatechingallat bei 21,1 min.	146
---	-----

10 Anhang

Anhang 1: Kalibrierung Quantifizierung Koffein

Koffein		Koffein (19,4 min, 270 nm)			3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (26,1 min, 325 nm, 10 µg/ml)					
Standard	Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration		
1	66,7	7,6	7,8	506,4	0,13	0,13	0,00	m	0,121	
	68,1	8,0		517,4	0,13			b	0,139	
2	134,8	15,7	15,6	532,8	0,25	0,25	0,00	R	0,9999	
	133,7	15,4		528,8	0,25			R ²	0,9999	
5	333,2	38,5	38,8	530,4	0,63	0,63	0,01	LOD/LOQ		
	333,6	39,0		520,4	0,64			m	6,971	
10	663,4	76,5	76,3	510,7	1,30	1,29	0,02	b	0,000	
	664,8	76,2		522,0	1,27			R		
20	1329,9	156,3	155,4	515,1	2,58	2,56	0,03	R ²	0,9962	
	1322,2	154,6		520,7	2,54			Höhe Rauschen (mAU)	0,1	
50	3343,0	381,1	383,9	523,4	6,39	6,36	0,03	Konzentration Rauschen (µg/ml)	0,01	
	3328,5	386,8		525,0	6,34			LOD (µg/ml) *3	0,04	
100	6588,2	776,2	756,3	531,7	12,39	12,42	0,04	LOQ (µg/ml) *10	0,14	
	6549,9	736,4		526,3	12,45					
200	13083,6	1539,2	1515,1	527,3	24,81	24,78	0,04			
	13105,0	1491,0		529,3	24,76					
400	25161,4	2714,6	2707,7	522,0	48,20	48,43	0,33			
	25530,7	2700,9		524,6	48,66					

Anhang 2: Kalibrierung Quantifizierung [6]-Gingerol

[6]-Gingerol		[6]-Gingerol (23,6 min, 230 nm)			3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (12,1 min, 230 nm, 11,8 µg/ml)					
Standard	Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration		
2,5	46,2	2,6	2,6	1105,1	0,04	0,04	0,00	m	0,018	
	46,8	2,6		1030,3	0,05			b	-0,001	
5	94,2	5,4	5,4	1102,6	0,09	0,09	0,00	R	0,9992	
	94,8	5,5		1025,4	0,09			R ²	0,9985	
10	192,6	11,0	11,0	1088,9	0,18	0,18	0,01	LOD/LOQ		
	191,2	10,9		1038,2	0,18			m	1,268	
50	1024,9	58,3	57,9	1142,4	0,90	0,92	0,03	b	0,000	
	1013,1	57,4		1071,4	0,95			R		
100	1979,1	112,1	113,2	1150,0	1,72	1,79	0,10	R ²	0,9999	
	2008,5	114,3		1081,0	1,86			Höhe Rauschen (mAU)	0,1	
150	2894,1	164,6	165,8	1247,6	2,32	2,49	0,24	Konzentration Rauschen (µg/ml)	0,08	
	2954,4	167,1		1108,3	2,67			LOD (µg/ml) *3	0,24	
300	5945,7	331,8	335,8	1141,0	5,21	5,40	0,27	LOQ (µg/ml) *10	0,79	
	6008,1	339,9		1074,5	5,59					

Anhang 3: Kalibrierung Quantifizierung 5-CQA

5-CQA		5-CQA (15,5 min, 325 nm)			3,4,5- Trimethoxyzimtsäure (26,1 min, 325 nm, 10 µg/ml)					
Standard		Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration	
0,5	µg/ml	25,5	2,6	2,7	522,7	0,05	0,05	0,00	m	0,110
		25,3	2,8		530,5	0,05			b	-0,034
1		52,6	5,8	5,6	512,3	0,10	0,10	0,00	R	0,9999
		52,1	5,4		526,8	0,10			R ²	0,9999
2,5		132,0	14,1	14,2	525,6	0,25	0,25	0,01	LOD/LOQ	
		130,0	14,2		535,0	0,24			m	6,783
5		273,1	30,5	30,5	515,5	0,53	0,52	0,02	b	0,000
		270,1	30,5		532,3	0,51			R	
10		553,1	64,1	64,9	521,2	1,06	1,05	0,02	R ²	0,9998
		546,4	65,6		528,8	1,03			Höhe Rauschen (mAU)	0,1
25	1410,5	165,9	165,2	508,5	2,77	2,72	0,07	Konzentration Rauschen (µg/ml)	0,01	
	1398,2	164,5		523,6	2,67			LOD (µg/ml) *3	0,04	
50	2809,5	325,2	336,6	520,7	5,40	5,38	0,02	LOQ (µg/ml) *10	0,15	
	2800,8	348,1		521,4	5,37					
100	5726,8	668,5	681,2	514,0	11,14	11,02	0,17			
	5655,4	693,9		518,5	10,91					

Anhang 4: Kalibrierung Quantifizierung Arbutin

Arbutin		Arbutin (11,0 min, 280 nm)			Koffein (21,5 min, 280 nm, 10 µg/ml)					
Standard		Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration	
1		12,5	1,9	1,9	430,4	0,03	0,03	0,00	m	0,033
		13,2	1,9		432,3	0,03			b	-0,006
2		28,3	4,2	4,2	513,0	0,06	0,06	0,01	R	0,9999
		28,7	4,1		456,8	0,06			R ²	0,9998
5		72,1	10,9	10,6	494,1	0,15	0,15	0,01	LOD/LOQ	
		73,3	10,3		448,9	0,16			m	2,190
10	µg/ml	147,3	20,5	20,7	451,1	0,33	0,33	0,00	b	0,000
		146,9	20,9		442,1	0,33			R	
25		360,7	52,3	52,0	456,4	0,79	0,80	0,01	R ²	0,9990
		362,3	51,7		447,0	0,81			Höhe Rauschen (mAU)	0,1
50		755,6	112,0	111,2	461,0	1,64	1,64	0,01	Konzentration Rauschen (µg/ml)	
		754,0	110,3		457,9	1,65			LOD (µg/ml) *3	0,14
									LOQ (µg/ml) *10	0,46

Anhang 5: Kalibrierung Quantifizierung 3,4-DiCQA

3,4-DiCQA		3,4-DiCQA (21,9 min, 325 nm)			Koffein (19,2 min, 270 nm, 10 µg/ml)					
Standard		Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration	
1		54,6	5,4	5,4	1759,7	0,03	0,03	0,00	m	0,039
		53,9	5,5		1772,9	0,03			b	-0,033
2,5		147,5	14,4	14,3	1760,7	0,08	0,08	0,00	R	0,9998
		145,0	14,3		1707,6	0,08			R ²	0,9996
5		288,1	28,0	28,6	1795,6	0,16	0,16	0,00	LOD/LOQ	
		293,4	29,2		1818,1	0,16			m	7,399
10	µg/ml	595,2	60,0	59,4	2009,5	0,30	0,29	0,00	b	0,000
		589,3	58,8		2006,1	0,29			R	
50		3421,3	361,7	356,9	1761,7	1,94	1,94	0,01	R ²	0,9988
		3414,0	352,1		1770,0	1,93			Höhe Rauschen (mAU)	0,1
100		6949,4	758,3	748,5	1820,9	3,82	3,85	0,05	Konzentration Rauschen (µg/ml)	
		7018,1	738,6		1807,4	3,88			LOD (µg/ml) *3	0,04
									LOQ (µg/ml) *10	0,14

Anhang 6: Kalibrierung Quantifizierung Luteolin-glucuronid

Luteolin-glucuronid		Lu-Glucur (23,8 min, 347 nm)			Koffein (18,7 min, 270 nm, 10 µg/ml)					
Standard		Area (mAU*s)	Höhe (mAU)	MW Höhe	Area IS (mAU*s)	Verhältnis Standard/IS	MW Verhältnis	Stabw Verhältnis	Konzentration	
0,5	µg/ml	108,7	14,9	14,5	3003,5	0,04	0,04	0,00	m	0,080
		110,6	14,2		2856,4	0,04			b	-0,013
1		220,8	27,4	27,6	2987,7	0,07	0,08	0,00	R	1,0000
		223,7	27,9		2847,4	0,08			R ²	0,9999
5		1120,1	146,2	144,4	2973,6	0,38	0,39	0,01	LOD/LOQ	
		1120,9	142,6		2834,3	0,40			m	29,826
10		2232,6	287,4	290,5	3031,9	0,74	0,76	0,03	b	0,000
		2246,4	293,6		2872,8	0,78			R	
50		11425,2	1464,5	1493,4	2948,3	3,88	3,98	0,14	R ²	0,9999
		11602,2	1522,3		2843,6	4,08			Höhe Rauschen (mAU)	0,785
								Konzentration Rauschen (µg/ml)	0,026	
								LOD (µg/ml) *3	0,08	
								LOQ (µg/ml) *10	0,26	

Anhang 7: Rohdaten PDE-Assay Kaffeeextrakt entkoffeiniert und rekooffeiniert, siehe Abbildung 5-1a.

Entkoffeiniert (Röst)	Lösungsmittel	p76 16.01.2015	p78 30.01.2015	p79 05.02.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	319,7	269,7	262,2	283,9	31,3						
0,1 mg/ml	H ₂ O	288,4	260,4	224,7	257,8	31,9	90,8	11,2	0,980	0,490	0,1849	
0,25 mg/ml	H ₂ O	226,1	214,8	183,0	207,9	22,4	73,2	7,9	0,676	0,338	0,0134	*
0,5 mg/ml	H ₂ O	160,3	185,4	149,3	165,0	18,5	58,1	6,5	0,519	0,259	0,0024	**
1 mg/ml	H ₂ O	174,7	190,5	144,5	169,9	23,4	59,9	8,2	0,717	0,359	0,0036	**
5 mg/ml	H ₂ O	195,3	234,6	168,8	199,6	33,1	70,3	11,7	0,943	0,472	0,0163	*
10 mg/ml	H ₂ O	245,3	280,3	225,3	250,3	27,8	88,2	9,8	0,883	0,442	0,1183	
Rolipram 10 µM	H ₂ O	4,3	47,8	2,4	18,2	25,7	6,4	9,0	0,805	0,403	0,0002	***
Rekoffeiniert (Röst)	Lösungsmittel	p76 16.01.2015	p78 30.01.2015	p79 05.02.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	319,7	269,7	262,2	283,9	31,3						
0,1 mg/ml	H ₂ O	259,6	232,4	223,5	238,5	18,8	84,0	6,6	0,530	0,265	0,0488	*
0,25 mg/ml	H ₂ O	204,5	217,6	171,9	198,0	23,5	69,7	8,3	0,722	0,361	0,0095	*
0,5 mg/ml	H ₂ O	180,5	154,7	152,7	162,6	15,5	57,3	5,4	0,393	0,197	0,0019	**
1 mg/ml	H ₂ O	170,3	183,5	114,2	156,0	36,8	54,9	13,0	0,839	0,419	0,0051	**
5 mg/ml	H ₂ O	182,9	241,3	171,5	198,6	37,5	70,0	13,2	0,821	0,411	0,0194	*
10 mg/ml	H ₂ O	239,8	293,7	214,6	249,4	40,4	87,9	14,2	0,749	0,375	0,1536	
Rolipram 10 µM	H ₂ O	4,3	47,8	2,4	18,2	25,7	6,4	9,0	0,805	0,403	0,0002	***
								Entkoffeiniert vs. Rekoffeiniert	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
								0,1 mg/ml	0,515	0,257	0,2900	
								0,25 mg/ml	0,950	0,475	0,1200	
								0,5 mg/ml	0,823	0,412	0,0515	
								1 mg/ml	0,575	0,288	0,0638	
								5 mg/ml	0,877	0,438	0,2622	
								10 mg/ml	0,643	0,321	0,3583	

Anhang 9: Rohdaten PDE-Assay Kaffeeextrakt Roh- und Röstkaffee, siehe Abbildung 5-1c.

Rohkaffee	Lösungsmittel	p22 28.08.2014	p20 03.09.2014	p21 04.09.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	491,2	497,3	422,3	470,3	41,7						
0,1 mg/ml	H ₂ O	510,0	513,0	471,2	498,1	23,3	105,9	5,0	0,476	0,238	0,1850	
0,25 mg/ml	H ₂ O	501,1	521,0	473,2	498,4	24,0	106,0	5,1	0,499	0,250	0,1839	
0,5 mg/ml	H ₂ O	473,6	493,5	438,5	468,6	27,8	99,6	5,9	0,618	0,309	0,4777	
1 mg/ml	H ₂ O	475,5	468,7	421,4	455,2	29,5	96,8	6,3	0,668	0,334	0,3181	
5 mg/ml	H ₂ O	429,6	376,1	433,5	413,1	32,1	87,8	6,8	0,745	0,372	0,0663	
10 mg/ml	H ₂ O	428,3	384,0	449,3	420,5	33,4	89,4	7,1	0,781	0,391	0,0908	
Rolipram 10 µM	H ₂ O	94,9	108,6	126,4	110,0	15,8	23,4	3,4	0,251	0,125	0,0001	***
Röstkaffee	Lösungsmittel	p22 28.08.2014	p20 03.09.2014	p21 04.09.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	491,2	497,3	422,3	470,3	41,7						
0,1 mg/ml	H ₂ O	500,5	451,4	390,0	447,3	55,4	95,1	11,8	0,723	0,361	0,2982	
0,25 mg/ml	H ₂ O	444,0	391,4	343,1	392,8	50,5	83,5	10,7	0,810	0,405	0,0549	
0,5 mg/ml	H ₂ O	370,2	343,7	308,1	340,7	31,2	72,4	6,6	0,718	0,359	0,0062	**
1 mg/ml	H ₂ O	308,1	271,6	246,7	275,4	30,9	58,6	6,6	0,709	0,355	0,0014	**
5 mg/ml	H ₂ O	257,4	223,0	261,6	247,3	21,2	52,6	4,5	0,410	0,205	0,0006	***
10 mg/ml	H ₂ O	260,9	245,9	245,7	250,8	8,7	53,3	1,9	0,084	0,042	0,0047	**
Rolipram 10 µM	H ₂ O	94,9	108,6	126,4	110,0	15,8	23,4	3,4	0,251	0,125	0,0001	***
								Rohkaffee vs. Röstkaffee	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
								0,1 mg/ml	0,300	0,150	0,1085	
								0,25 mg/ml	0,369	0,185	0,0154	*
								0,5 mg/ml	0,888	0,444	0,0030	**
								1 mg/ml	0,954	0,477	0,0009	***
								5 mg/ml	0,606	0,303	0,0009	***
								10 mg/ml	0,128	0,064	0,0005	***

Anhang 12: Rohdaten PDE-Assay Kaffee-Fraktion FS, siehe Abbildung 5-2c.

FS	Lösungsmittel	p14 06.02.2013	p15 14.02.2013	p17 01.03.2013	p21 27.03.2013	p22 05.04.2013	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	285,1	306,2	383,7	262,0	360,0	319,4	51,1						
0,1 mg/ml	H ₂ O	265,7	357,2	344,9	277,1	336,7	316,3	41,9	562,8	74,5	0,710	0,355	0,4595	
0,25 mg/ml	H ₂ O	281,7		250,3	247,6	288,9	267,1	21,2	475,3	37,7	0,181	0,090	0,0496	*
0,5 mg/ml	H ₂ O	147,4	265,1	201,6	196,0	245,8	211,2	46,1	375,8	82,0	0,847	0,423	0,0039	**
1 mg/ml	H ₂ O	128,8	208,6	114,0	172,0	177,2	160,1	38,4	284,9	68,3	0,594	0,297	0,0003	***
5 mg/ml	H ₂ O	0,0	231,5	65,5	165,4	123,9	117,3	89,2	208,6	158,8	0,305	0,153	0,0011	**
10 mg/ml	H ₂ O	14,3	222,3	111,7	158,1	131,0	127,5	75,8	226,8	134,9	0,463	0,231	0,0008	***
Rolipram 10 µM	1% DMSO	38,5	71,9	23,7	61,2	65,5	52,2	20,3	92,9	36,1	0,101	0,051	0,0000	***
IC₅₀	0,94	±	0,21											

Anhang 13: Rohdaten PDE-Assay Kaffee-Fractionen F0-F8, siehe Abbildung 5-6a.

Fractionen F0-F8	Lösungsmittel	p21 28.03.2013	p22 05.04.2013	p23 10.05.2013	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle (H ₂ O)	H ₂ O	259,6	360,0	435,7	351,7	88,3						
Kontrolle (1% DMSO)	1% DMSO	249,6	340,1	418,1	335,9	84,3						
F0 840 µg/ml	H ₂ O	279,1	433,6	508,1	406,9	116,8	257,2	73,8	0,727	0,364	0,2747	
F1 2400 µg/ml	H ₂ O		421,2	501,9	461,6	57,0	291,7	36,0	0,830	0,415	0,1132	
F2 1700 µg/ml	H ₂ O	262,9	362,8	432,1	352,6	85,1	222,8	53,8	0,962	0,481	0,4954	
F3 700 µg/ml	H ₂ O	287,2	360,3	452,1	366,5	82,7	231,6	52,2	0,934	0,467	0,4213	
F4a 600 µg/ml	H ₂ O	335,6	398,9	517,8	417,4	92,5	263,8	58,5	0,954	0,477	0,2120	
F4b 800 µg/ml	H ₂ O	151,3	193,9	190,0	178,4	23,5	112,7	14,9	0,133	0,066	0,0152	*
F5 700 µg/ml	H ₂ O	271,6	313,2	341,0	308,6	34,9	273,8	31,0	0,270	0,135	0,2378	
F6 500 µg/ml	1% DMSO	194,2	279,6	279,2	251,0	49,2	222,6	43,7	0,508	0,254	0,1031	
F7 500 µg/ml	1% DMSO	171,1	148,3	141,4	153,6	15,6	136,3	13,8	0,066	0,033	0,0300	*
F8 300 µg/ml	1% DMSO	133,3	140,8	110,1	128,1	16,0	113,6	14,2	0,070	0,035	0,0232	*
Rolipram 10 µM	1% DMSO	85,5	65,5	62,3	71,1	12,6	63,1	11,2	0,044	0,022	0,0149	*

Anhang 14: Rohdaten PDE-Assay Kaffee-Fraktion F4b, siehe Abbildung 5-6b.

F4b	Lösungsmittel	pN25 25.04.2013	pN26 02.05.2013	pN27 08.05.2013 Mittelwert	PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	436,4	542,1	523,2	500,6	56,4						
8 µg/ml	H ₂ O	483,8	587,6	558,8	543,4	53,6	108,6	10,7	0,950	0,475	0,1971	
20 µg/ml	H ₂ O	482,7	509,1	517,8	503,2	18,3	100,5	3,7	0,190	0,095	0,4711	
40 µg/ml	H ₂ O	435,5	547,9	524,2	502,5	59,3	100,4	11,8	0,950	0,475	0,4845	
80 µg/ml	H ₂ O	386,9	448,1	462,2	432,4	40,0	86,4	8,0	0,670	0,335	0,0815	
Kontrolle	H ₂ O	414,7	473,7	429,5	439,3	30,7						
400 µg/ml	H ₂ O	230,4	259,4	299,8	263,2	34,9	59,9	7,9	0,873	0,437	0,0014	**
Kontrolle	H ₂ O	259,6	360,0	435,7	351,7	88,3						
800 µg/ml	H ₂ O	151,3	193,9	190,0	178,4	23,5	50,7	6,7	0,133	0,066	0,0152	*
Rolipram 10 µM	1% DMSO	83,0	118,0	277,0	159,4	103,4	31,8	20,7	0,458	0,229	0,0037	**

Anhang 15: Rohdaten PDE-Assay Kaffee-Fraktion F6, siehe Abbildung 5-6c.

F6	Lösungsmittel	p25 25.05.2013	p26 02.05.2013	p27 08.05.2013	Mittelwert PDE- Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	430,3	500,8	476,7	469,3	35,8						
5 µg/ml	1% DMSO	479,9	547,8	583,8	537,2	52,7	114,5	11,2	0,631	0,315	0,0694	
12,5 µg/ml	1% DMSO	465,1	553,8	513,4	510,8	44,4	108,8	9,5	0,788	0,394	0,1380	
25 µg/ml	1% DMSO	450,6	537,2	548,5	512,1	53,6	109,1	11,4	0,617	0,309	0,1569	
50 µg/ml	1% DMSO	415,3	524,4	488,2	476,0	55,5	101,4	11,8	0,587	0,293	0,4345	
Kontrolle	1% DMSO	400,8	452,3	425,7	426,3	25,7						
250 µg/ml	1% DMSO	295,4	321,4	339,5	318,8	22,2	74,8	5,2	0,852	0,426	0,0027	**
Kontrolle	1% DMSO	249,6	340,1	418,1	335,9	84,3						
500 µg/ml	1% DMSO	194,2	279,6	279,2	251,0	49,2	74,7	14,6	0,508	0,254	0,1031	
Rolipram 10 µM	1% DMSO	83,0	118,0	277,0	159,4	103,4	34,0	22,0	0,214	0,107	0,0040	**

Anhang 18: Rohdaten PDE-Assay Kaffee-Fractionen F8.1-F8.5, siehe Abbildung 5-9b.

Subfraktionen F8	Lösungsmittel	p93 13.05.2015	p94 29.05.2015	p95 29.05.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test 2-seitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert T-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle (1% DMSO)	1% DMSO	278,3	338,6	275,8	297,6	35,6						
F 8.1	1% DMSO	281,3	317,2	271,3	289,9	24,1	97,4	8,1	0,630	0,315	0,3865	
F 8.2	1% DMSO	219,8	200,2	204,5	208,2	10,3	70,0	3,5	0,155	0,077	0,0070	**
F 8.3	1% DMSO	146,8	161,8	129,4	146,0	16,2	49,1	5,5	0,345	0,172	0,0013	**
F 8.4	1% DMSO	190,9	184,9	149,8	175,2	22,2	58,9	7,5	0,560	0,280	0,0036	**
F 8.5	1% DMSO	246,9	224,3	219,4	230,2	14,6	77,4	4,9	0,290	0,145	0,0193	*
Rolipram 10 µM	1% DMSO	55,7	73,0	37,0	55,2	18,0	18,6	6,1	0,408	0,204	0,0002	***

Anhang 19: Rohdaten PDE-Assay Hydrolysat Kaffee-Fraktion F8, siehe Abbildung 5-11.

F8 Kontrolle	Lösungsmittel	p15 23.07.2015	p16 23.07.2015	p80 11.02.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	643,8	569,5	312,1	508,5	174,0						
150 µg/ml	1% DMSO	245,3	195,9	101,4	180,9	73,1	35,6	14,4	0,300	0,150	0,0199	*
300 µg/ml	1% DMSO	147,5	193,7	58,5	133,2	68,7	26,2	13,5	0,270	0,135	0,0128	*
Rolipram 10 µM	1% DMSO	161,4	234,9	23,2	139,8	107,4	27,5	21,1	0,552	0,276	0,0177	*
F8 Hydrolysat	Lösungsmittel	p83 5.03.2015	p84 11.03.2015	p85 18.03.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	643,8	569,5	312,1	508,5	174,0						
150 µg/ml	1% DMSO	513,3	478,2	299,6	430,4	114,6	84,6	22,5	0,605	0,302	0,2759	
300 µg/ml	1% DMSO	479,7	443,0	215,7	379,5	143,0	74,6	28,1	0,806	0,403	0,1888	
Rolipram 10 µM	1% DMSO	161,4	234,9	23,2	139,8	107,4	27,5	21,1	0,552	0,276	0,0177	*
Kontrolle Hydrolysat	Lösungsmittel	p83 5.03.2015	p84 11.03.2015	p85 18.03.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	643,8	569,5	312,1	508,5	174,0						
150 µg/ml	1% DMSO	569,2	523,6	338,2	477,0	122,4	93,8	24,1	0,662	0,331	0,4053	
300 µg/ml	1% DMSO	585,2	545,2	291,1	473,8	159,5	93,2	31,4	0,913	0,456	0,4060	
Rolipram 10 µM	1% DMSO	161,4	234,9	23,2	139,8	107,4	27,5	21,1	0,552	0,276	0,0177	*

Anhang 20: Rohdaten PDE-Assay ALE, siehe Abbildung 5-15a.

ALE	Lösungsmittel	p12 31.01.2014	p13 07.02.2014	p14 12.02.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	H ₂ O	395,3	356,5	366,4	372,8	20,2						
0,05 mg/ml	H ₂ O	430,8	377,6	382,9	397,1	29,3	106,5	7,9	0,644	0,322	0,1508	
0,1 mg/ml	H ₂ O	370,8	333,6	351,5	352,0	18,6	94,4	5,0	0,918	0,459	0,1299	
0,5 mg/ml	H ₂ O	260,4	233,4	283,5	259,1	25,1	69,5	6,7	0,786	0,393	0,0018	**
1 mg/ml	H ₂ O	181,7	146,3	196,7	174,9	25,9	46,9	6,9	0,755	0,378	0,0002	***
5 mg/ml	H ₂ O	85,6	64,0	90,7	80,1	14,2	21,5	3,8	0,662	0,331	0,0000	***
10 mg/ml	H ₂ O	41,3	42,9	69,3	51,2	15,7	13,7	4,2	0,754	0,377	0,0000	***
Rolipram 10 µM	H ₂ O	78,6	49,5	73,0	67,0	15,4	18,0	4,1	0,739	0,369	0,0000	***
IC₅₀	0,9	±	0,1	mg/ml								

Anhang 21: Rohdaten PDE-Assay 3,4-DiCQA, siehe Abbildung 5-15b.

3,4-DiCQA	Lösungsmittel	p11 22.01.2014	p12 29.01.2014	p13 05.02.2014	Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	432,1	374,4	439,3	415,3	35,6						
1 µg/ml	1% DMSO	469,3	434,6	503,3	469,1	34,4	113,0	8,3	0,965	0,482	0,0663	
5 µg/ml	1% DMSO	441,9	409,3	491,7	447,6	41,5	107,8	10,0	0,847	0,423	0,1819	
10 µg/ml	1% DMSO	437,3	394,1	450,0	427,1	29,3	102,8	7,1	0,808	0,404	0,3398	
50 µg/ml	1% DMSO	334,4	290,2	367,2	330,6	38,7	79,6	9,3	0,917	0,459	0,0246	*
100 µg/ml	1% DMSO	312,0	252,2	342,8	302,3	46,1	72,8	11,1	0,748	0,374	0,0141	*
500 µg/ml	1% DMSO	224,0	184,4	227,9	212,1	24,1	51,1	5,8	0,628	0,314	0,0006	***
Rolipram 10 µM	1% DMSO	59,7	63,4	81,6	68,2	11,7	16,4	2,8	0,196	0,098	0,0000	***

Anhang 22: Rohdaten PDE-Assay Apigenin, siehe Abbildung 5-15c.

Apigenin	Lösungsmittel	p32 07.11.2014	p33 14.11.2014	p37 15.12.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	155,4	200,2	127,5	161,1	36,7						
1,25 µg/ml	10% DMSO	141,8	194,1	126,5	154,1	35,4	95,7	22,0	0,966	0,483	0,4126	
12,5 µg/ml	10% DMSO	126,1	163,6	105,8	131,8	29,4	81,8	18,2	0,781	0,391	0,1709	
25 µg/ml	10% DMSO	132,2	236,8	121,9	163,6	63,6	101,6	39,5	0,499	0,249	0,4773	
ALE 5 mg/ml	10% DMSO	43,9	56,6	53,2	51,3	6,6	31,8	4,1	0,062	0,031	0,0159	*
Rolipram 10 µM	10% DMSO	79,7	118,7	84,3	94,3	21,3	58,5	13,2	0,505	0,252	0,0263	*

Anhang 23: Rohdaten PDE-Assay Luteolin, siehe Abbildung 5-15d.

Luteolin	Lösungsmittel	p35 21.11.2014	p36 04.12.2014	p37 04.12.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	173,9	153,6	189,2	172,2	17,9						
1,25 µg/ml	10% DMSO	132,4	113,4	161,3	135,7	24,1	78,8	14,0	0,709	0,354	0,0516	
12,5 µg/ml	10% DMSO	68,7	58,2	111,1	79,3	28,0	46,1	16,3	0,578	0,289	0,0042	**
25 µg/ml	10% DMSO	64,6	40,7	81,0	62,1	20,3	36,1	11,8	0,875	0,437	0,0011	**
35 µg/ml	10% DMSO	53,8	60,5	83,8	66,1	15,7	38,4	9,1	0,873	0,437	0,0008	***
ALE 5 mg/ml	10% DMSO	81,0	57,1	46,4	61,5	17,7	35,7	10,3	0,989	0,495	0,0008	***
Rolipram 10 µM	10% DMSO	128,7	54,1	63,4	82,1	40,6	47,6	23,6	0,325	0,162	0,0122	*

Anhang 24: Rohdaten PDE-Assay Luteolin-glucosid, siehe Abbildung 5-15e.

Luteolin-7-O-glucosid	Lösungsmittel	p77 06.02.2015	p78 06.02.2015	p79 06.02.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	143,1	151,6	157,2	150,6	7,1						
1,25 µg/ml	10% DMSO	156,9	128,4	165,9	150,4	19,6	99,8	13,0	0,231	0,116	0,4925	
12,5 µg/ml	10% DMSO	143,3	129,9	148,1	140,4	9,4	93,2	6,3	0,721	0,360	0,1039	
25 µg/ml	10% DMSO	142,6	132,2	158,1	144,3	13,0	95,8	8,6	0,458	0,229	0,2496	
35 µg/ml	10% DMSO	128,7	124,1	157,9	136,9	18,3	90,9	12,2	0,260	0,130	0,1460	
ALE 5 mg/ml	10% DMSO	72,5	64,2	62,1	66,3	5,5	44,0	3,6	0,749	0,374	0,0000	***
Rolipram 10 µM	10% DMSO	53,7	29,4	33,3	38,8	13,0	25,8	8,6	0,456	0,228	0,0001	***

Anhang 25: Rohdaten PDE-Assay Luteolin-glucuronid, siehe Abbildung 5-15f.

Luteolin-7-O-glucuronid	Lösungsmittel	p76 15.01.2015	p77 22.01.2015	p78 29.01.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	311,4	255,8	249,1	272,1	34,2						
1 µg/ml	10% DMSO	291,2	271,5	261,2	274,6	15,3	100,9	5,6	0,332	0,166	0,4562	
5 µg/ml	10% DMSO	284,4	242,7	261,3	262,8	20,9	96,6	7,7	0,543	0,272	0,3545	
10 µg/ml	10% DMSO	304,8	201,7	198,5	235,0	60,5	86,4	22,2	0,485	0,242	0,2038	
50 µg/ml	10% DMSO	288,5	193,6	157,2	213,1	67,8	78,3	24,9	0,406	0,203	0,1248	
100 µg/ml	10% DMSO	268,8	189,1	165,3	207,8	54,2	76,3	19,9	0,570	0,285	0,0785	
500 µg/ml	10% DMSO	291,0	215,3	216,1	240,8	43,5	88,5	16,0	0,765	0,382	0,1914	
Rolipram 10 µM	10% DMSO	85,5	35,4	45,8	55,6	26,4	20,4	9,7	0,747	0,373	0,0005	***

Anhang 28: Rohdaten PDE-Assay GLE, siehe Abbildung 5-16c.

GLE	Lösungsmittel	p80 11.02.2015	p81 26.02.2015	p82 26.02.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	160,0	177,7	142,1	160,0	17,8						
5 µg/ml	10% DMSO	158,3	177,6	155,3	163,7	12,1	102,4	7,6	0,632	0,316	0,3876	
12,5 µg/ml	10% DMSO	167,5	172,3	145,1	161,6	14,5	101,0	9,1	0,798	0,399	0,4527	
25 µg/ml	10% DMSO	160,5	170,6	163,5	164,9	5,2	103,1	3,3	0,159	0,079	0,3350	
50 µg/ml	10% DMSO	152,3	151,8	119,5	141,2	18,8	88,3	11,7	0,945	0,473	0,1387	
250 µg/ml	10% DMSO	110,5	107,9	97,5	105,3	6,9	65,8	4,3	0,260	0,130	0,0038	**
500 µg/ml	10% DMSO	79,5	79,4	69,0	76,0	6,1	47,5	3,8	0,208	0,104	0,0007	***
Rolipram 10 µM	10% DMSO		48,1	56,6	52,4	6,0	32,7	3,8	0,299	0,149	0,0139	*
IC₅₀	455	±	19	µg/ml								

Anhang 29: Rohdaten PDE-Assay [6]-Gingerol, siehe Abbildung 5-16d.

[6]-Gingerol	Lösungsmittel	p16 25.10.2013	p17 31.10.2013	p18 07.11.2013	p19 14.11.2013	p20 20.11.2013	p20 25.11.2013	p20 27.11.2013	Mittelwert DL Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	Mittelwert TL Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	366,1	325,5	360,3	239,7	282,3	402,5	396,6	329,4	59,9	334,5	64,7						
1 µg/ml	1% DMSO	442,1	299,3	345,3	257,4	309,9	391,0		340,8	67,0			103,5	20,3	0,811	0,406	0,3809	
5 µg/ml	1% DMSO	345,5	256,5	302,0	259,4	286,1	381,0		305,1	49,4			92,6	15,0	0,684	0,342	0,2302	
10 µg/ml	1% DMSO	387,7	183,0	192,2	199,8	315,3	367,8		274,3	93,7			83,3	28,4	0,348	0,174	0,1264	
50 µg/ml	1% DMSO	240,7	245,0	266,6	154,2	266,3	363,0		256,0	66,9			77,7	20,3	0,813	0,406	0,0365	*
100 µg/ml	1% DMSO		190,4	268,3	207,5	282,1	317,0	344,6	268,3	60,3			80,2	18,0	0,879	0,440	0,0269	*
500 µg/ml	1% DMSO		65,7	196,1	144,1	246,7	296,5	291,2	206,7	90,2			61,8	27,0	0,483	0,241	0,0065	**
Rolipram 10 µM	1% DMSO	53,2	0,0	35,4	116,8	133,3	160,1		83,1	62,7			25,2	19,0	0,922	0,461	0,0000	***

Anhang 30: Rohdaten PDE-Assay SFE, siehe Abbildung 5-19a.

SFE	Lösungsmittel	p83 5.03.2015	p84 11.03.2015	p85 18.03.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	160,7	151,8	196,1	169,5	23,5						
0,1 mg/ml	10% DMSO	167,9	172,8	192,7	177,8	13,1	104,9	7,7	0,476	0,238	0,3114	
0,25 mg/ml	10% DMSO	207,2	179,4	189,3	192,0	14,1	113,2	8,3	0,530	0,265	0,1142	
0,5 mg/ml	10% DMSO	166,2	188,8	178,4	177,8	11,3	104,9	6,7	0,377	0,189	0,3062	
1 mg/ml	10% DMSO	183,2	186,8	193,2	187,7	5,1	110,7	3,0	0,089	0,044	0,1551	
5 mg/ml	10% DMSO	150,7	151,9	168,7	157,1	10,1	92,7	5,9	0,310	0,155	0,2227	
10 mg/ml	10% DMSO	121,4	139,7	128,6	129,9	9,3	76,6	5,5	0,269	0,135	0,0264	*
Rolipram 10 µM	10% DMSO	37,1	42,2	70,8	50,0	18,2	29,5	10,7	0,751	0,376	0,0011	**

Anhang 31: Rohdaten PDE-Assay Arbutin, siehe Abbildung 5-19b.

Arbutin	Lösungsmittel	p83 05.03.2015	p84 11.03.2015	p85 18.03.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	292,2	304,6	370,3	322,4	42,0						
5 µg/ml	1% DMSO	321,6	342,1	391,5	351,7	35,9	109,1	11,1	0,845	0,423	0,2045	
12,5 µg/ml	1% DMSO	316,2	336,2	380,9	344,4	33,2	106,8	10,3	0,768	0,384	0,2573	
25 µg/ml	1% DMSO	335,2	328,1	385,1	349,5	31,1	108,4	9,6	0,707	0,354	0,2096	
50 µg/ml	1% DMSO	273,3	323,0	362,3	319,5	44,6	99,1	13,8	0,940	0,470	0,4697	
250 µg/ml	1% DMSO	278,3	282,5	344,5	301,8	37,0	93,6	11,5	0,875	0,438	0,2793	
500 µg/ml	1% DMSO	271,5	264,1	343,2	293,0	43,7	90,9	13,6	0,960	0,480	0,2240	
Rolipram 10 µM	1% DMSO	32,8	52,0	63,8	49,5	15,7	15,4	4,9	0,244	0,122	0,0002	***

Anhang 32: Rohdaten PDE-Assay TXE, siehe Abbildung 5-23.

TXE	Lösungsmittel	p78 28.1.2015	p77 29.1.2015	p79 4.2.2015	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	10% DMSO	105,7	144,0	160,1	136,6	28,0						
5 mg/ml	10% DMSO	241,4	200,5	223,7	221,9	20,5	162,5	15,0	0,700	0,350	0,0065	**
2,5 mg/ml	10% DMSO	168,4	151,7	181,1	167,0	14,7	122,3	10,8	0,435	0,217	0,0852	
0,5 mg/ml	10% DMSO	221,9	223,9	250,8	232,2	16,1	170,0	11,8	0,499	0,250	0,0034	**
0,25 mg/ml	10% DMSO	204,2	201,9	254,5	220,2	29,7	161,2	21,7	0,940	0,470	0,0119	*
0,125 mg/ml	10% DMSO	179,3	181,2	229,2	196,5	28,3	143,9	20,7	0,988	0,494	0,0297	*
0,05 mg/ml	10% DMSO	135,1	150,7	171,6	152,5	18,4	111,6	13,4	0,602	0,301	0,2285	
Rolipram 10 µM	1% DMSO	-6,8	29,1	51,7	24,6	29,5	10,5	12,5	0,681	0,340	0,0010	***

Anhang 33: Rohdaten PDE-Assay CaW und CuW, siehe Kapitel 5.2.3.

CaW	Lösungsmittel	p13 08.10.2013	p12 30.01.2014	p13 06.02.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	445,2	353,8	427,8	408,9	48,5						
5 µg/ml	1% DMSO	479,6	490,9	432,6	467,7	30,9	114,4	7,6	0,577	0,289	0,0821	
12,5 µg/ml	1% DMSO	481,8	444,5	411,5	446,0	35,2	109,1	8,6	0,689	0,344	0,1749	
25 µg/ml	1% DMSO	470,1	431,8	426,7	442,8	23,7	108,3	5,8	0,385	0,193	0,1792	
50 µg/ml	1% DMSO	437,0	397,8	377,0	403,9	30,5	98,8	7,5	0,565	0,283	0,4447	
250 µg/ml	1% DMSO	450,1	380,2	403,8	411,3	35,6	100,6	8,7	0,699	0,349	0,4738	
500 µg/ml	1% DMSO	509,8	374,5	377,5	420,6	77,3	102,9	18,9	0,566	0,283	0,4184	
Rolipram 10µM	1% DMSO	58,6	119,5	86,4	88,2	30,5	21,6	7,5	0,566	0,283	0,0007	***
CuW	Lösungsmittel	p15 19.02.2014	p16 26.02.2014	p17 05.03.2014	Mittelwert PDE-Aktivität (pmol cAMP / min x mg Protein)	Stabw	T/C (%)	Stabw (%)	p-Wert F-Test zweiseitig	p-Wert F-Test einseitig	p-Wert t-Test einseitig	Kennzeichnung
Kontrolle	1% DMSO	533,2	564,7	402,9	500,3	85,7						
5 µg/ml	1% DMSO	560,6	571,5	524,6	552,2	24,6	110,4	4,9	0,152	0,076	0,1849	
12,5 µg/ml	1% DMSO	555,0	645,3	489,2	563,2	78,4	112,6	15,7	0,911	0,455	0,2007	
25 µg/ml	1% DMSO	595,9	664,6	516,9	592,5	73,9	118,4	14,8	0,852	0,426	0,1155	
50 µg/ml	1% DMSO	488,1	600,2	408,4	498,9	96,3	99,7	19,3	0,884	0,442	0,4932	
250 µg/ml	1% DMSO	499,9	600,6	378,1	492,9	111,4	98,5	22,3	0,744	0,372	0,4659	
500 µg/ml	1% DMSO	517,0	664,6	417,7	533,1	124,2	106,6	24,8	0,646	0,323	0,3627	
Rolipram 10µM	1% DMSO	107,7	631,9	67,3	269,0	315,0	53,8	63,0	0,138	0,069	0,1435	

Dankeschön!

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau **Prof. Richling** für die Betreuung, insbesondere die angeregten Gespräche und Diskussionen sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Ich bedanke mich bei **Melanie Esselen** für die Übernahme der Zweitkorrektur und die Hilfe bei Problemen im Labor.

Weiterhin bedanke ich mich bei der **TU Kaiserslautern** für das Promotionsstipendium.

Meinen Kolleginnen **Tamara, Denise, Meike, Dolores, Steffi** und **Katharina** - Danke für die schönen Jahre, die gute Zusammenarbeit und die verrückten Momente! Den „Nerds“ aus der OC ein Danke für die gemeinsame Freizeitgestaltung.

Großer Dank geht an meine Diplomanden **David, Svenja, Olga**, meine Masterandin **Silvia**, meine Forschungspraktikantinnen **Johanna** und beide **Katharinas**.

Liebe **Sylvia**, Danke für die Unterstützung im Labor sowie die angeregten Unterhaltungen.

Liebe **Ingrid**, ich bedanke mich an dieser Stelle nicht nur für die administrative Unterstützung während meiner Promotion sondern auch nachträglich während meiner Diplomarbeit.

Ich danke den Mitarbeitern des **AK Schrenk** für die Unterstützung durch die Jahre insbesondere **Simone** für die gemeinsamen Reparaturen sowie **Alex** für die anregenden Diskussionen.

Vielen Dank an den **AK Neuhaus** für die Erlaubnis, den Szintillationszähler zu benutzen.

Liebe **Anke**, danke für die lange Freundschaft seit dem Mathevorkurs und natürlich für das Ausleihen des einen oder anderen Werkzeugs.

Judith - Lebenssituationen ändern sich, aber du bist immer geblieben. Danke für die lange Freundschaft!

Jörn, danke dafür, dass wir diese Hürde gemeinsam nehmen! Auf dass uns noch viele gemeinsame Hürden bevorstehen <3

Elisa, du warst schon immer und wirst auch immer ein Vorbild für mich sein. Dankeschön für's Dasein in allen Lebenslagen, Schwesterherz!

Zum Schluss bedanke ich mich bei **Mama** und **Papa** für die Unterstützung meines Lebensweges.

Ich danke außerdem allen weiteren Freunden und Familienmitgliedern, die mich auf meinem Weg unterstützt haben.

Lebenslauf

Ausbildung

- 04/2012 - 01/2017 Dissertation, TU Kaiserslautern, Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
- 10/2007 - 03/2012 Studium der Lebensmittelchemie, TU Kaiserslautern, Abschluss: 1. Staatsexamen und Diplom
- 02/2011 - 05/2011 Forschungspraktikum, Universidad de Murcia, „Post-translational Mechanisms of Metabolic Regulation in Escherichia coli“
- 10/2011 - 03/2010 Wiss. Abschlussarbeit, TU Kaiserslautern, „Studien zum Einfluss von Koffeinhaltstoffen auf die Phosphodiesterase-Aktivität in der humanen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L“

Schulbildung

- 1998 - 2007 Gymnasium Birkenfeld, Abschluss: Abitur
- 1994 - 1998 Grundschule Niederbrombach

Veröffentlichungen

Posterbeiträge

Röhrig T., Richling E.; Phosphodiesterase Inhibition durch Kaffee – eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung. *42. deutscher Lebensmittelchemikertag* in Braunschweig, 15. – 18.09.2013.

Röhrig T., Montoya G.A., Richling E.; Phosphodiesterase Inhibition by Coffee - an Activity Guided Fractionation. *2nd international Conference on Cocoa, Coffee & Tea (CoCoTea)* in Neapel, 9. – 11.10.2013.

Röhrig T., Hernández S., Pacjuk O., Richling E.; Phosphodiesterase-Inhibition durch Ingwer (*Zingiber officinale*) und Artischocke (*Cynara cardunculus* L.). *43. deutscher Lebensmittelchemikertag* in Gießen, 22. - 24.09.2014

Diskussionsvorträge

Röhrig T., Richling E.; Eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung zur Identifizierung der Phosphodiesterase hemmenden Strukturen in Kaffee. *Regionalverbandstagung Südwest* in Geisenheim, 12.3.2015.

Publikationen

Peixoto, H., Roxo, M., Krstin, S., **Röhrig, T.**, Richling, E., & Wink, M. (2016). An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(6), 1283-1290.

Castaño-Cerezo, S., Bernal, V., **Röhrig, T.**, Termeer, S., & Cánovas, M. (2015). Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N ϵ -lysine acetylation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(8), 3533-3545.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die für die Arbeit genutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Kaiserslautern, den