



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Testung von Extrakten aus *Salinibacterium amurskyense* auf Histondeacetylase-Inhibierung

verfasst von

Elisabeth Dantler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Lisolette Krenn für die interessante Themenstellung und die herzliche Betreuung während der Diplomarbeit. Durch ihre wertvollen Ratschläge stand sie mir sowohl bei der praktischen Arbeit als auch beim Erstellen der Diplomarbeit hilfreich zur Seite.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Stanimira Krasteva für die Einführung in die praktische Arbeit und Herrn Dr. Martin Zehl für die LC-MS Analyse danken. Frau Dr. Elke Heiß und Corina Vouk danke ich für die Hilfestellung bei Testungen.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich einen besonders großen Dank für die Ermöglichung des Studiums und für ihre Unterstützung aussprechen. Zuletzt möchte ich meinen wertvollen Freunden danken, die mich während meiner gesamten Studienzeit motiviert und auch moralisch den Rücken gestärkt haben.

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Funktion von eukaryotischem Chromatin	1
1.2	Histonacetylierung und –deacetylierung	2
1.3	Suche nach Naturstoffen mit HDAC-inhibierender Wirkung	4
1.4	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	6
2	Zielsetzung der Arbeit	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Verwendetes Material	9
3.1.1	Extrakt von <i>Salinibacterium amurskyense</i>	9
3.1.2	Reinsubstanzen	9
3.2	Chromatographische Methoden	10
3.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	10
3.2.2	Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie	13
3.3	HDAC-Assay	14
3.4	Bradford-Assay	19
3.5	LC-MS	20
4	Ergebnisse und Diskussion	23
4.1	HDAC-Inhibierung durch Acetonextrakte von <i>Salinibacterium amurskyense</i>	23
4.2	Untersuchung des Extraktes mittels HPLC	24

4.3	Auftrennung des Extraktes mittels präparativer HPLC	31
4.4	Testung der Fraktionen auf HDAC-Inhibierung	40
4.5	Strukturaufklärung der Substanzen in Fraktion M5 und M6	42
4.5.1	LC-MS Untersuchungen	42
4.5.2	HPLC-Vergleich mit authentischen Reinsubstanzen	47
4.6	HDAC-Hemmung durch Taurocholsäure und Glycocholsäure	49
4.7	Bestimmung der Proteinmenge im Nuklearextrakt mittels Bradford-Assay	51
4.8	Quantifizierung der Taurocholsäure und Glycocholsäure im Extrakt aus <i>Salinibacterium amurskyense</i>	52
5	Zusammenfassung	56
6	Abstract	57
7	Literaturverzeichnis	58
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	60
8.1	Abbildungsverzeichnis	60
8.2	Tabellenverzeichnis	63
9	Curriculum vitae	64

Abkürzungsverzeichnis

AcCN	Acetonitril
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AS	Aktivator Solution
BSA	Bovines Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
GCA	Glycocholsäure
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HeLa	Zervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks
L	Liter
max.	maximal
MeOH	Methanol
MCA	4-Methyl-coumarin-7-amid
ms	Millisekunde
min	Minute
NAD ⁺	Nicotinadenindinucleotid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
RFU	Relative Fluorescence Units

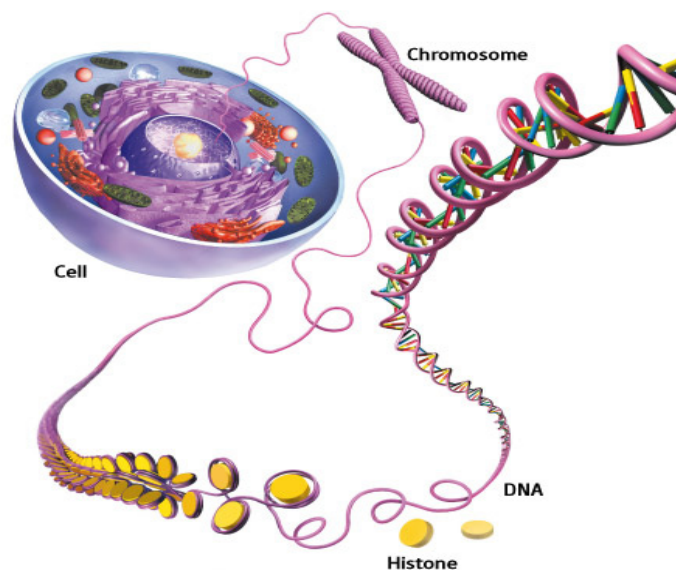
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit
sec	Sekunde
TCA	Taurocholsäure
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan - Hydrochlorid
TSA	Trichostatin A

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion von eukaryotischem Chromatin

Die Hauptfunktion der DNA liegt darin, die Erbinformation eines Lebewesens zu speichern. Die DNA interagiert mit Proteinen, die den DNA-Strang im Nukleus jeder Zelle zu einem kompakten Molekül falten, dem Chromatin. Das eukaryotische Genom, als Chromosom strukturiert, ist ein dynamischer Komplex aus DNA und Proteinen. Unterschiedliche Proteine sind an der Genexpression, der DNA-Replikation sowie an Reparaturen des Chromatins beteiligt. Die Proteine, die an den DNA-Strang binden, um ihn zum Chromosom zu formen, werden in 2 Gruppen geteilt, die chromosomalen Histon-Proteine und die Nicht-Histon-Proteine. Histon-Proteine sind strukturgebend und bilden gemeinsam mit der DNA die erste Verpackungsstufe des Chromatins, das Nukleosom (Müller-Esterl W. et al., 2009).

Abbildung 1: Strukturierung der DNA im Zellkern (H. Koseki. Riken Research, eingesehen Mai 2010)



Enzyme kontrollieren durch Histon-Modifikationen wie Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung die Form des Chromatins und sind dadurch mitverantwortlich für die Transkription von Genen und die Regulation des Zellzyklus (Müller-Esterl W. et al., 2009).

1.2 Histonacetylierung und –deacetylierung

Die Acetylierung von Histonen spielt eine wichtige Rolle in der Transkription von Genen. Die reversible Acetylierung von Histonen wird durch zwei Enzymklassen gesteuert: Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs).

Histondeacetylasen spalten Acetylgruppen vom Lysin am N-terminalen Histon. Dadurch erhält das Lysin eine positive elektrische Ladung und hat nun eine höhere Affinität zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA. Es resultiert eine kompakte DNA-Anordnung als Chromatin. In diesem Zustand haben Transkriptionsfaktoren keinen Zugang zur DNA und somit bleibt die Maschinerie, die für die Genexpression verantwortlich ist, inaktiv. Die Histonacetyltransferasen (HATs) sind für den entgegengesetzten Prozess zuständig. Sie transferieren Acetylgruppen auf das freie Lysin des Histons wodurch die positive Ladung neutralisiert und die Bindung zwischen dem DNA-Strang und den Histon-Proteinen gelockert wird. Dadurch wird ermöglicht, dass Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können und eine Transkription stattfindet (Newkirk T. et al., 2009). Die Acetylierung und Deacetylierung des Chromatins ist somit ein wichtiger, hoch dynamischer Vorgang in einer eukaryotischen Zelle.

Die Gruppe der Histondeacetylasen besteht aus 18 bekannten Enzymen, die in vier Klassen unterteilt werden. Die Klassen I, II und IV, welche als „klassische HDACs“ bezeichnet werden, enthalten ein Zink-Atom im aktiven Zentrum. Die Enzyme der Klasse III, die sogenannten Sirtuine, besitzen einen anderen Wirkungsmechanismus und benötigen NAD^+ als essentiellen Co-Faktor (Witt O. et al., 2008). Zudem

unterscheiden sich die HDAC-Klassen in ihrer Lokalisation. Die HDACs der Klassen I und IV sind ausschließlich im Nukleus der Zelle zu finden. Die Enzyme der Klasse II haben die Fähigkeit, als Antwort auf bestimmte zelluläre Signale zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu wechseln (Zhang L. et al., 2009).

Von großer Bedeutung ist, dass ein Gleichgewicht zwischen Deacetylierung und Acetylierung der Histone besteht, da es sonst zu schwerwiegenden Folgen wie Krebs (Minucci S. et Pelicci P., 2006), viralen Infektionen, neurodegenerativen Erkrankungen, Entzündungen (Zhang L. et al., 2009) sowie Hypertrophie des Herzens (Krasteva S. et al., 2011) kommen kann. Eine Überaktivität der Histondeacetylasen konnte in verschiedenen malignen Geweben nachgewiesen und mit der Entstehung eines Tumors assoziiert werden. Dadurch rückten Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) in den Focus der Krebsforschung. HDACi können den Zellzyklus bzw. das Zellwachstum hemmen oder Zellen in die Apoptose schicken (Frew A. et al., 2009, Minucci S. et Pelicci P., 2006). In diesen Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass bei der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren gesunde Zellen viel resistenter als Tumorzellen sind. Dadurch könnten Tumorzellen selektiver durch HDACi bekämpft werden und gleichzeitig gesunde Zellen von der Therapie weniger angegriffen werden. Ein weiterer Ansatzpunkt der Therapie mit HDAC-Inhibitoren, der intensiv untersucht wird, ist die Kombination von etablierten Cytostatika wie Cisplatin mit HDACi. Es wurde gezeigt, dass HDACi die Wirksamkeit von auf Platin-basierenden Chemotherapeutika erhöhen (Diyabalanage H. et al., 2012).

HDAC-Inhibitoren sind somit vielversprechende therapeutische Ansatzpunkte für die Forschung im Bereich der Krebstherapie.

1.3 Suche nach Naturstoffen mit HDAC-inhibierender Wirkung

Aufgrund des großen Interesses als neue Therapeutika für verschiedene Krankheiten wurden zahlreiche synthetische Komponenten und Naturstoffe auf ihre HDAC-inhibierende Wirkung untersucht und einige davon in klinischen Studien überprüft. Bereits 2006 und 2009 wurden die Substanzen SAHA (Suberoylanilidhydroxamsäure) und der Naturstoff Romidepsin von der FDA als Krebstherapeutika zugelassen (Diyabalanage H. et al., 2012).

Bei der Suche nach neuen aktiven Substanzen bietet die strukturelle Vielfalt der natürlichen Sekundärmetabolite unverzichtbare Ressourcen. Wenige bis jetzt gefundene HDAC-Inhibitoren entstammen dem Pflanzenreich, wie zum Beispiel Flavone und Flavonderivate aus *Feijoa sellowiana* Bert. (Myrtaceae) oder Sesquiterpenoide aus *Zingiber zerumbet* L. (Zingiberaceae) (Krasteva S. et al., 2011).

Der Großteil der bisher untersuchten HDACi sind mikrobielle Metaboliten wie zum Beispiel Trichostatin A und Romidepsin (Krasteva S. et al., 2011). Marine Bakterien erschließen eine neue Quelle für potente Histondeacetylase-Inhibitoren. Da mehr als 70 % der Erde von Ozeanen bedeckt ist, ist es naheliegend im Salzwasser nach HDACi-produzierenden Organismen zu suchen. Analysiert wurden vor allem marine Schwämme, Korallen, Manteltiere, Mollusken und Bakterien (Davidson B., 1995).

Viele dieser marinen Organismen können sich nicht oder nur sehr langsam bewegen und zudem fehlt ihnen oft eine physikalische Abwehrfunktion. Sie schützen sich durch die Produktion von abschreckenden oder toxischen Sekundärmetaboliten, die sie ans Meerwasser abgeben. Diese Substanzen müssen durch die schnelle und starke Verdünnung im Salzwasser in sehr geringer Konzentration eine starke Wirkung entfalten (Ebada S. et al., 2008).

Von besonderem Interesse ist die Ordnung Actinomycetales der Klasse Actinobacteria aufgrund ihrer vielfach nachgewiesenen Fähigkeit Sekundärmetabolite mit verschiedenen biologischen Aktivitäten zu produzieren. Dabei sind besonders die

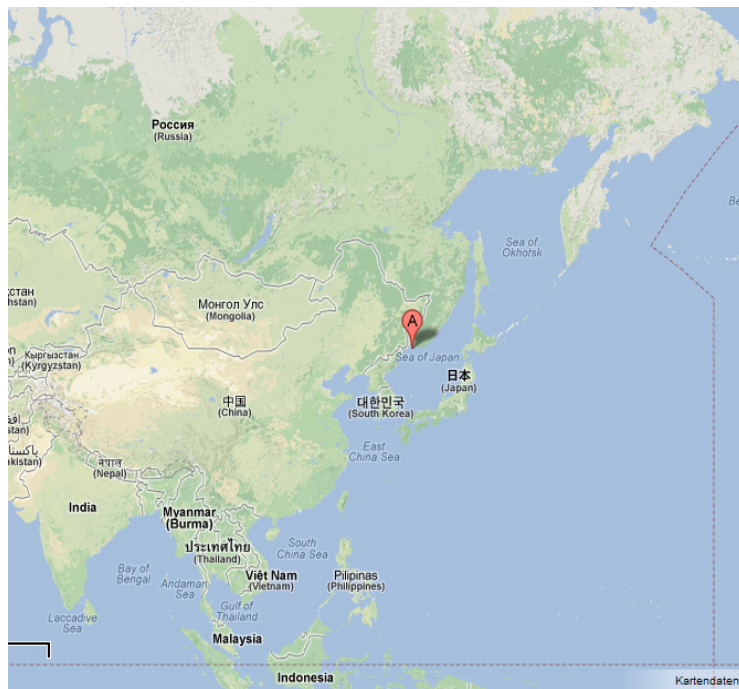
terrestrischen Vertreter der Actinomyceten, wie zum Beispiel Streptomyces-Arten, sehr gut auf ihre sekundären Metabolite untersucht. Zahlreiche Streptomyces-Arten liefern bedeutende Arzneistoffe wie die Antibiotika Erythromycin und Tetracyclin oder die Chemotherapeutika Daunorubicin und Mitomycin (Williams P., 2008, Zotchev S., 2012). In den letzten Jahrzehnten rückten die marinen Vertreter von Actinomycetales aufgrund ihrer bis dato wenig erforschten sekundären Metaboliten in den Focus der Krebsforschung. Es wurden einige vielversprechende Komponenten, wie Salinospramid A, Marinomycin oder Proximicin A isoliert, die zytotoxische Wirkung aufweisen (Williams P., 2008).

Der Ordnung Actinomycetales entstammen viele marine Vertreter. Deshalb ist ein weiteres Screening definierter Bakterien dieser Ordnung, die Metabolite an die Umgebung abgeben, eine aussichtsreiche Methode neue HDAC-inhibierende Sekundärmetabolite zu finden.

1.4 *Salinibacterium amurskyense*

Das Bakterium *Salinibacterium amurskyense* gehört zur Familie der Microbacteriaceae und zählt zur Ordnung Actinomycetales. Es wurde erstmals im Jahr 2000 in der Amurbucht im Golf Peter des Großen isoliert (Han S. et al., 2003).

Abbildung 2: Amurbucht im Golf Peter des Großen



(<http://maps.google.at/> am 06.01.2013)

Anhand morphologischer Merkmale und verschiedener biochemischer Eigenschaften konnte das isolierte Bakterium eindeutig bestimmt werden. *Salinibacterium amurskyense* ist ein gram-positives, nicht bewegliches, aerobes und nicht Sporenbildendes Bakterium. Es wächst in NaCl-saurem Wasser (0-10 %), wobei die Anwesenheit von NaCl für das Wachstum nicht erforderlich ist (Han S. et al., 2003).

Tabelle 1: Taxonomie von *Salinibacterium amurskyense*

Reich	Prokaryoten
Stamm	Actinobacteria
Klasse	Actinobacteria
Ordnung	Actinomycetales
Familie	Microbacteriaceae
Gattung	Salinibacterium
Art	amurskyense

Salinibacterium amurskyense wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt, da es ein eindeutig identifiziertes, kommerziell erhältliches Bakterium ist, dessen Sekundärmetaboliten bis dato noch nicht ausreichend analysiert wurden. Außerdem entstammt *Salinibacterium amurskyense* der Ordnung Actinomycetales, deren Vertreter als vielversprechende Quelle für neue zytotoxische Sekundärmetabolite gelten (Williams P., 2008).

2 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Tatsache, dass Histondeactylase-Inhibitoren neue Ansatzpunkte für die Therapie von Infektionen, COPD, Krebs u.a. bilden könnten, erlangten sie großes Interesse. In klinischen Studien werden die Wirkungen von HDACi gegen verschiedene Tumorarten untersucht.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, ein Extrakt aus *Salinibacterium amurskyense* in vitro auf seine HDAC-inhibierende Wirkung zu untersuchen, wirksame Komponenten zu isolieren und zu identifizieren. Dabei sollte das Extrakt weiter gereinigt und mittels präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie aufgetrennt werden. Die weniger komplex zusammengesetzten Fraktionen sollten anschließend auf ihre HDAC-hemmende Wirkung geprüft werden. Für die Testung der Hemmwirkung der einzelnen Fraktionen sollte ein optimierter fluorometrischer Assay eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendetes Material

3.1.1 Extrakt von *Salinibacterium amurskyense*

Das im Rahmen der Diplomarbeit untersuchte Acetonextrakt enthält sekundäre Metaboliten, die vom Bakterium *Salinibacterium amurskyense* gebildet und an das Nährmedium abgegeben wurden.

In einer vorangegangenen Dissertation am Department für Pharmakognosie, Universität Wien, wurde der Stamm *Salinibacterium amurskyense* vom Leibniz Institut - Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, bezogen und kultiviert. Bei der Ernte wurden die kultivierten Bakterien vom Nährmedium abgetrennt. Folglich konnten die Sekundärmetabolite aus dem Nährmedium durch Adsorption isoliert und weiter mit Aceton extrahiert werden.

Für die Arbeit standen 320 mg lyophilisiertes Acetonextrakt zur Verfügung.

3.1.2 Reinsubstanzen

Taurocholsäure und Glykocholsäure dienten als Referenzsubstanzen für die Strukturaufklärung mittels HPLC/LC-MS und im HDAC-Assay sowie als externer Standard für die Quantifizierung mittels HPLC. Sie wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland, bezogen.

3.2 Chromatographische Methoden

3.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Analyse des Acetonextraktes von *Salinibacterium amurskyense* wurde mit folgendem HPLC-Gerät durchgeführt:

Pumpe	Shimadzu LC-20AD prominence liquid chromatograph
Autosampler	Shimadzu SIL-20AC HAT prominence auto sampler
Controller	Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module
Detektor	Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector
	Shimadzu ELSD-LT low temperature evaporative light scattering detector
Ofen	Shimadzu CTO-20AC prominence column oven

Es kamen für unterschiedliche Fragestellungen folgende Trennbedingungen zum Einsatz:

System 1

Trennsäule	Acclaim [®] 120 RP-18, 150 x 2,1 mm; Dionex, Wien, Partikelgröße 3 µm
Eluenten	A: Ameisensäure 0,064 %, pH 2,5 B: AcCN

Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse 95% A + 5% B

Temperatur	25°C
Durchflussrate	0,5 ml/min

Gradient s. Tab. 2

Tabelle 2: Gradientenprofil der HPLC Analysen

Minute	Eluent B [%]
0 – 10	5
10 – 80	5 – 65
80 – 85	65 – 95
85 – 95	95
95 – 100	95 – 5
100 – 110	5

Injektionsvolumen 10 µl

Detektion 254 nm

System 2

Trennsäule Hypersil BDS C18, 250 x 4 mm; Agilent, Wien, Partikelgröße 5µm

Eluenten A: Ameisensäure 0,064 %, pH 2,5
B: AcCN

Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse 95% A + 5% B

Temperatur 25°C

Durchflussrate 1 ml/min

Gradient s. Tab. 2

Injektionsvolumen 30 µl

Detektion 254 nm

System 3

Trennsäule Hypersil BDS C18, 250 x 4 mm; Agilent, Wien, Partikelgröße
5µm

Eluenten A: H₂O
 B: AcCN

Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse 95% A + 5% B

Temperatur 25°C

Durchflussrate 1 ml/min

Gradient s. Tab. 2, S. 11

Injektionsvolumen 30 µl

Detektion 254 nm

System 4

Trennsäule Hypersil BDS C18, 250 x 4 mm; Agilent, Wien, Partikelgröße
5µm

Eluenten A: H₂O
 B: MeOH

Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse 95% A + 5% B

Temperatur 25°C

Durchflussrate 1 ml/min

Gradient s. Tab. 2, S. 11

Injektionsvolumen	30 µl
Detektion	254 nm

3.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Fraktionierung des Acetonextraktes von *Salinibacterium amurskyense* wurde folgendes System verwendet:

Pumpe	Shimadzu LC 8A preparative liquid chromatograph
Autosampler	Shimadzu SIL-20AP auto sampler
Controller	Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module
Detektor	Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector
Trennsäule	Nucleosil 100 RP-18, 250 x 21 mm; Macherey-Nagel, USA, Partikelgröße 7 µm
Eluenten	A: H ₂ O B: MeOH

Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse 95% A + 5% B

Temperatur	RT
Durchflussrate	14 ml/min
Gradient	s. Tab. 2, S. 11
Injektionsvolumen	500 µl
Detektion	254 nm

3.3 HDAC-Assay

Der HDAC Assay ist ein fluorometrischer Assay (Wegener D. et al., 2003) zur Bestimmung der HDAC-Enzymaktivität nach folgendem Prinzip:

Als Ausgangssubstanz liegt ein Substrat, ein künstliches Peptid mit einem acetylierten Lysin vor, an das das Fluorophor 4-Methyl-coumarin-7-amid (MCA) gebunden ist. Diesem Substrat wird ein Nuklearextrakt, das verschiedene Histondeacetylasen enthält, zugesetzt und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei spalten die Histondeacetylasen die Acetylgruppe vom Substrat ab. Nach 1stündiger Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe einer Aktivator-Solution (AS) gestoppt, die Trichostatin A und eine Endopeptidase enthält. Trichostatin A hemmt die Histondeacetylasen, wodurch eine weitere Abspaltung der Acetylgruppe verhindert wird. Die Endopeptidase spaltet nur vom deacetylierten Substrat den Fluorophor ab. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer halben Stunde wird die Intensität des freien Fluorophors mittels Fluoreszenzmessung erfasst.

Dabei verhält sich der Gehalt des freien Fluorophors direkt proportional zur Aktivität der Histondeacetylasen; je geringer die Aktivität der Enzyme, desto geringer die Fluoreszenz, je höher die Aktivität der Enzyme, desto höher die gemessene Fluoreszenz.

Folglich lässt sich durch die Fluoreszenzintensität die Hemmwirkung eines zugesetzten HDAC-Inhibitors ermitteln.

ϵ -acetylated lysine-based substrate
 C-terminally coupled with MCA

deacetylated lysine-based
 substrate C-terminally coupled
 with MCA

Step I
 HDAC

Step II
 Endopeptidase

7-amino 4-methylcoumarin
 (AMC)

The diagram illustrates the chemical reaction scheme for the assay. It starts with an ϵ -acetylated lysine-based substrate C-terminally coupled with MCA. This substrate is converted to a deacetylated lysine-based substrate C-terminally coupled with MCA in Step I, catalyzed by HDAC. In Step II, catalyzed by Endopeptidase, the deacetylated substrate is cleaved to release 7-amino 4-methylcoumarin (AMC) and a peptide fragment (Tos-Gly-Pro-NH-CH(COO-)-(CH₂)₄-NH₂).

Die Substanzen für den fluorometrischen Assay wie das Substrat, Trichostatin A, der Standard und die Aktivator-Solution wurden aus dem HDAC-Kit der Firma Upstate (Katalog #17-372) bezogen. Weitere Komponenten wie der HDAC-Assay Buffer, das HeLa Nuklearextrakt sowie die zu testenden Fraktionen von *Salinibacterium amurskyense* stammten aus dem Department für Pharmakognosie.

Substrat	7-acetyliertes Peptid mit einem 4-Methyl-coumarin-7-amid- Rest (MCA) am C-Terminus
Trichostatin A (TSA)	bekannter Inhibitor von Histondeacetylasen
Standard	künstliches Peptid mit einem 4-Methyl-coumarin-7-amid-Rest (MCA) am C-Terminus
Aktivator- Solution (AS)	enthält Trichostatin A und eine Endopeptidase
HDAC-Assay Buffer	25 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl ₂
Nuklearextrakt	Nuklearextrakt mit Histondeacetylasen aus HeLa-Krebszellen isoliert

Durchführung des fluorometrischen Assays

Alle Reaktionen wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt. Die Proben wurden zuerst in DMSO gelöst und anschließend mit dem HDAC-Assay Buffer auf eine Konzentration von 0,5 mg/100 µl verdünnt, sodass in den Lösungen der Proben max. 1 % DMSO enthalten war.

Neben der Vermessung der einzelnen Proben wurden folgende Werte im Assay bestimmt:

Blindwert	HDAC-Assay Buffer und Substrat
Negativ-Kontrolle	Bestimmung der 100%igen HDAC-Aktivität ohne Zusatz eines Inhibitors
Positiv-Kontrolle	Bestimmung der HDAC-Aktivität in Anwesenheit von Trichostatin A

Tabelle 3: Pipettierschema des HDAC-Assays

	Blindwert	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle	Probe
HDAC-Assay buffer	20 µl	10 µl	0 µl	0 µl
HDAC-Assay buffer + 4 µM TSA	0 µl	0 µl	10 µl	0 µl
Probenmaterial (0,5 mg/100 µl)	0 µl	0 µl	0 µl	10 µl
HeLa Nuklear Extrakt	0 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Substrat	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
1 h Inkubation unter Lichtausschluss				
Aktivator -Solution	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
30 min Inkubation unter Lichtausschluss				

Das Gesamtvolumen aller Reaktionslösungen in den einzelnen Eppendorf Reaktionsgefäßen betrug 60 µl.

Die Endkonzentration der Proben betrug 13,9 ng/100 µl im Assay.

Alle Messungen wurden in Duplikaten angefertigt. Nach der 30minütigen Inkubationszeit wurde ein Aliquot von 30 µl aus jedem Eppendorf Reaktionsgefäß in eine schwarze 384well-Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des GENios Pro® Multi-Detektionsreader (Fa. Tecan, Schweiz) bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 495 nm. Die gemessene Enzymaktivität wurde in Relative Fluorescence Units (RFU) angegeben. Insgesamt wurde der Assay für jede Probe 3mal wiederholt.

Die ermittelten Werte bildeten die Grundlage zur Berechnung der Inhibierung der Histondeacetylasen durch die getesteten Proben. Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$RFU = \left[\frac{RFU_{\text{enzym}} - RFU_{\text{blank}}}{k * t} \right] * \left[\frac{V_{\text{enzym}} + V_{\text{substrat}}}{V_{\text{enzym}}} \right]$$

RFU	Relative Fluorescence Units
k	Steigung der Standardkurve
t	Reaktionszeit des Assays
V _{enzym}	Volumen des hinzugefügten Enzyms in µl
V _{substrat}	Volumen des hinzugefügten Substrats in µl

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde mit folgendem System durchgeführt:

Geräteparameter

GENios Pro[®] Multi-Detektionsreader der Firma Tecan, Schweiz

Software: Magellan[®] Mess-, Steuerungs- und Datenanalysesoftware

Messparameter

Messungsmodus	Fluorescence Top
Exzitationswellenlänge	340 nm
Emissionswellenlänge	495 nm
Anzahl der Blitze	10
Verzögerungszeit	0 µs

Integrationszeit	40 μ s
Zeit zwischen Bewegung und Blitz	40 ms
Mikrotiterplatte	schwarze 384well-Platte (Fa.Greiner, Frickenhausen Deutschland)

3.4 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay (Bradford M., 1976) ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in einer Lösung. Der Assay basiert auf einer Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue mit Proteinen, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm kommt. Mit Hilfe einer Eichgerade lässt sich die Proteinmenge bestimmen.

Durchführung des Bradford-Assays

Zuerst wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0-500 μ g/ml erstellt. Dabei wurden 10 μ l der jeweiligen Konzentration von BSA und 190 μ l Bradford Lösung (1:5 Verdünnung mit Wasser, Roti®- Quant, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) in eine transparente 96well Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und gemischt. Im gleichen Verhältnis wurde die 20fach verdünnte Lösung des Nuklearextrakts und die Bradford Lösung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einem SUNrise® Mikrotiterplattenreader (Fa. Tecan, Schweiz) vermessen. Mittels der erhaltenen Eichgerade und den gemessenen Werten ließ sich die Konzentration an Histondeacetylasen im Nuklear Extrakt bestimmen.

Alle Messungen wurden in Triplikaten angefertigt.

Geräteparameter

SUNrise[®] Mikrotiterplattenreader der Firma Tecan, Schweiz

Software: Magellan[®] Mess-, Steuerungs- und Datenanalysesoftware

Messparameter

Messungsmodus	Absorption
Messwellenlänge	595 nm
Schwenkzeit	5 sec
Absetzzeit	3 sec
Mikrotiterplatte	transparente 96well-Platte (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

3.5 LC-MS

Die Strukturen von isolierten Substanzen wurden mittels LC-MS aufgeklärt. Durchgeführt wurden die Analysen mit einem UltiMate 3000 Rapid Separation LC System (Fa. Dionex, Germering, Deutschland), gekoppelt an ein Massenspektrometer des Typs HCT (Fa. Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), welches mit einer 3D Qadrupol-Ionenfalle ausgestattet ist. Das Ionisierungsverfahren erfolgte mittels Elektrosprayionisation.

Gerät	UltiMate 3000 Rapid Separation LC System
Controller	Ultimate 3000 Dionex
Autosampler	Ultimate 3000 RS Dionex autosampler

Pumpe	Ultimate 3000 RS Dionex pump
Detektor	Ultimate 3000 RS Dionex diode array detector 190- 400 nm
Ofen	Ultimate 3000 RS Dionex column compartment

Methodenparameter

Ionenmodus	positiv
Ionisation	Elektrospray
Temperatur des Trocknungsgases	340°C
Fluss des Trocknungsgases	9.0 L/min N ₂
Vernebler	26.0 psi N ₂
Kapillarspannung	-3700 V
Messbereich	80 – 550 m/z
Scan Geschwindigkeit	8100 m/z/sec
Kollisionsgas	Helium 5.0
Trennsäule	Acclaim [®] 120 RP-18, 150 x 2,1 mm; Dionex, Wien, Partikelgröße 3 µm
Eluenten	A: Ameisensäure 0,064 %, pH 2,5 B: AcCN
Eluentenzusammensetzung am Beginn der Analyse	95% A + 5% B
Temperatur	25°C

Durchflussrate 0,5 ml/min

Gradient s. Tab. 4

Tabelle 4: Gradientenprofil der LC-MS Analysen

Minute	Eluent B [%]
0 – 10	5
10 - 62.5	5 – 50
62.5 – 63	50 – 95
63 – 73	95
73 -74	95 – 5
74 – 84	5

Injektionsvolumen 1 µl

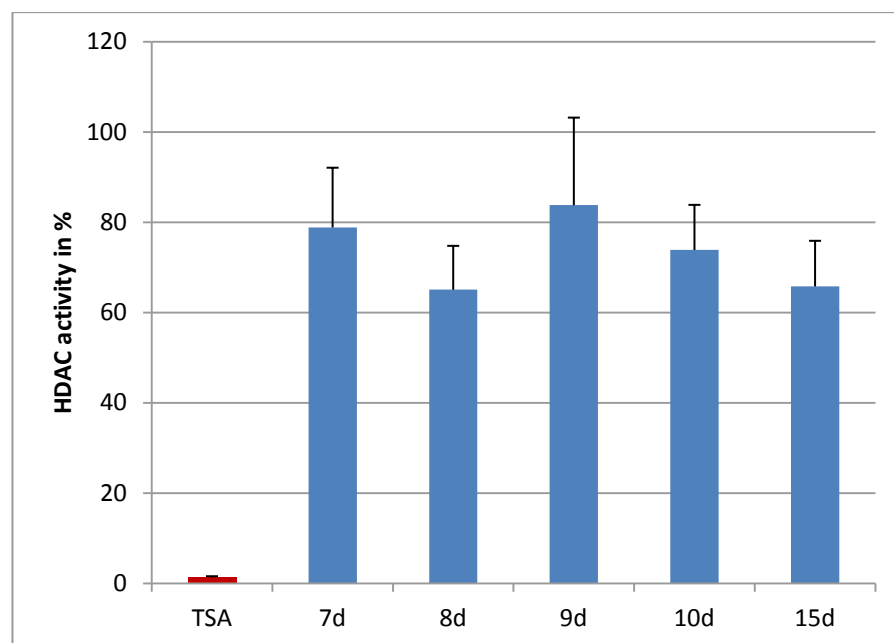
Detektion 254 nm

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 HDAC-Inhibierung durch Acetonextrakte von *Salinibacterium amurskyense*

Bereits im Jahr 2011 waren Acetonextrakte aus dem Nährmediums von *Salinibacterium amurskyense* auf HDAC-Inhibierung getestet worden¹. Diese Testung bildete die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Die Acetonextrakte unterschieden sich durch den Zeitpunkt der Ernte, welche nach 7, 8, 9, 10 und 15 Tagen Inkubation der Mikroorganismen erfolgt war, um das Inhaltsstoffmuster und die Aktivität der sekundären Metabolite abhängig von der Wachstumsphase untersuchen zu können. Laut Literatur erfolgt die höchste Produktion von sekundären Metaboliten am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) bzw. am Anfang der stationären Phase (Subramai R. et Aalbersberg W., 2012).

Abbildung 4: Hemmwirkung der zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Acetonextrakte von *Salinibacterium amurskyense* im HDAC-Assay



¹Die Kultivierung und Testung der Acetonextrakte erfolgte durch Frau Mag. A. Waldmann im Rahmen ihrer Dissertation.

7d	→	Ernte der Mikroorganismen an Tag 7
8d	→	Ernte der Mikroorganismen an Tag 8
9d	→	Ernte der Mikroorganismen an Tag 9
10d	→	Ernte der Mikroorganismen an Tag 10
15d	→	Ernte der Mikroorganismen an Tag 15

Aus dieser Analyse ging hervor, dass die am Tag 8 und am Tag 15 gewonnenen Acetonextrakte die stärkste inhibierende Wirkung im HDAC-Assay aufwiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde das Extrakt 8d, in den folgenden Kapiteln als Extrakt oder Acetonextrakt bezeichnet, weiter aufgetrennt und analysiert.

4.2 Untersuchung des Extraktes mittels HPLC

Da man bei der Testung des Extraktes eine erhebliche Hemmwirkung im HDAC-Assay erkennen konnte (Abbildung 4, S. 23), war es naheliegend, diesen Extrakt mit Hilfe der HPLC genauer auf seine Zusammensetzung zu untersuchen.

Für die Analyse wurden 4 mg Extrakt in 1 ml Methanol gelöst und anschließend 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 10 µl in die HPLC injiziert und untersucht.

Der HPLC-Lauf wurde in dem in Kapitel 3.2.1, S. 10 angegebenen System 1 durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Abbildung 5: Chromatorgramm des Extraktes, Analyse in System 1 unter UV- Detektion bei 254nm

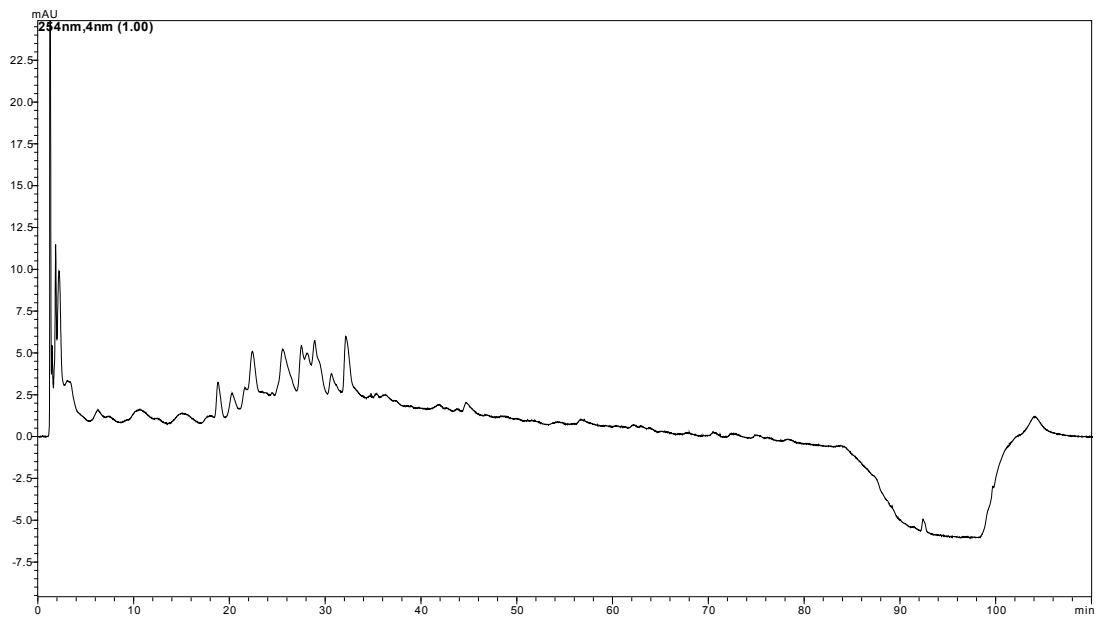
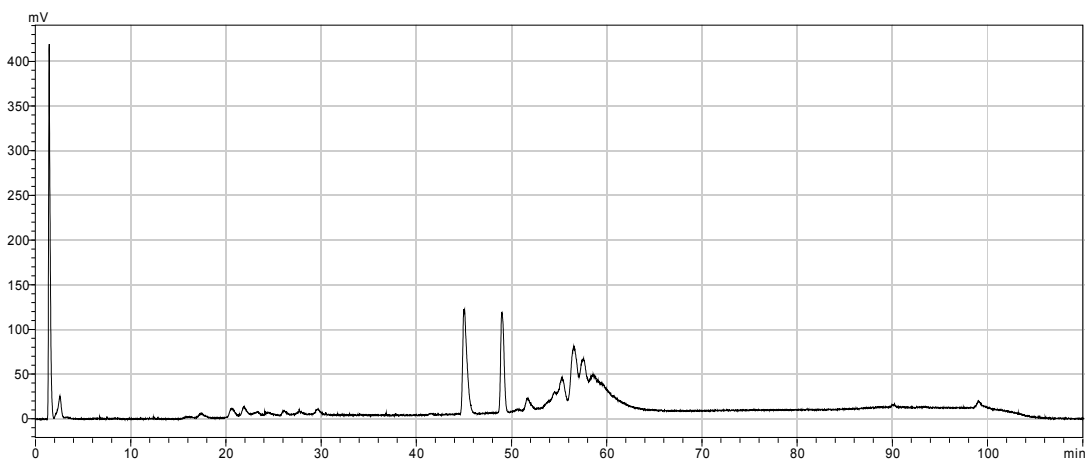


Abbildung 6: Chromatogramm des Extraktes, Analyse in System 1 unter ELSD- Detektion



Im Chromatorgramm (Abbildung 5) wurde eine Gruppe relativ polarer Komponenten detektiert, die zwischen Minute 18 und 33 eluiert wurde. Unter ELSD Detektion (Abbildung 6) waren zwei Hauptkomponenten bei Rt 45 und 49 zu erkennen. Da diese

Peaks im Chromatogramm im UV bei 254 nm nicht sichtbar waren, konnte man auf das Fehlen von Chromophoren in diesen Verbindungen schließen.

Der nächste Schritt war, eine adäquate Menge des Extraktes aufzutrennen, um ausreichend Material für den fluorometrischen Assay zu gewinnen und die HDAC-Inhibierung durch die einzelnen Fraktionen zu überprüfen. Bei der Festlegung der Fraktionierungsschritte wurden sowohl das Chromatogramm unter UV-Detektion als auch das Chromatogramm unter ELSD-Detektion berücksichtigt, sodass man Fraktionen mit möglichst wenigen Komponenten erhielt.

Abbildung 7: Fraktionierungsschritte, UV-Detektion bei 254 nm

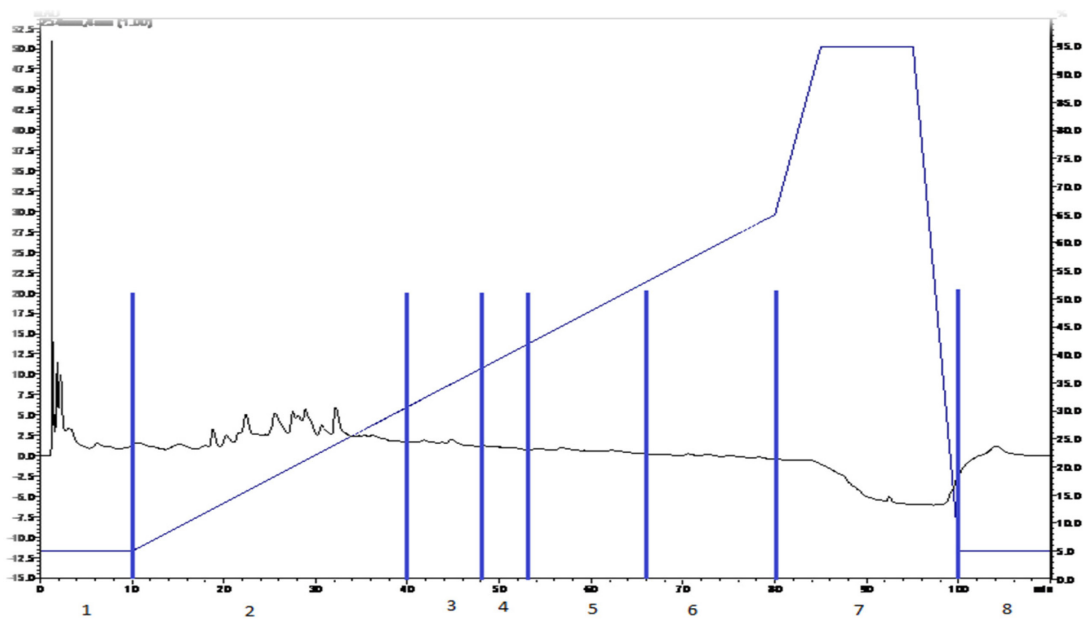
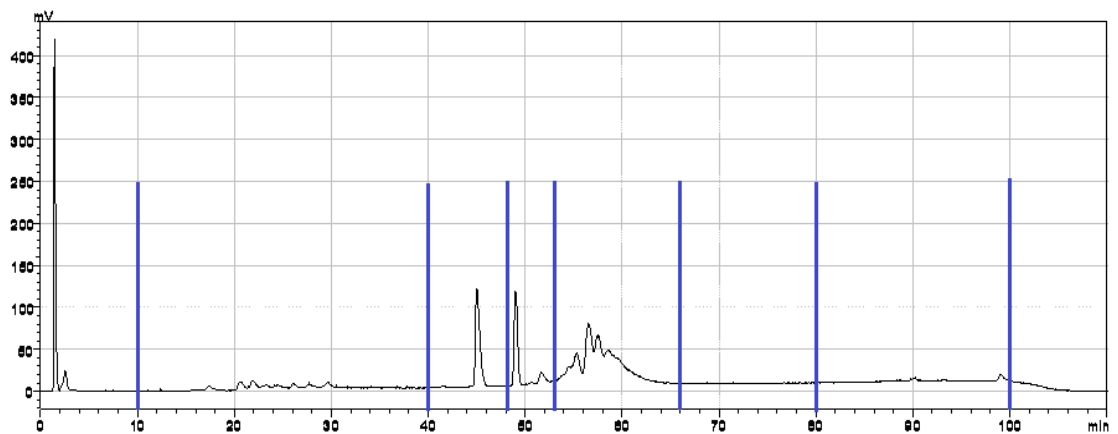
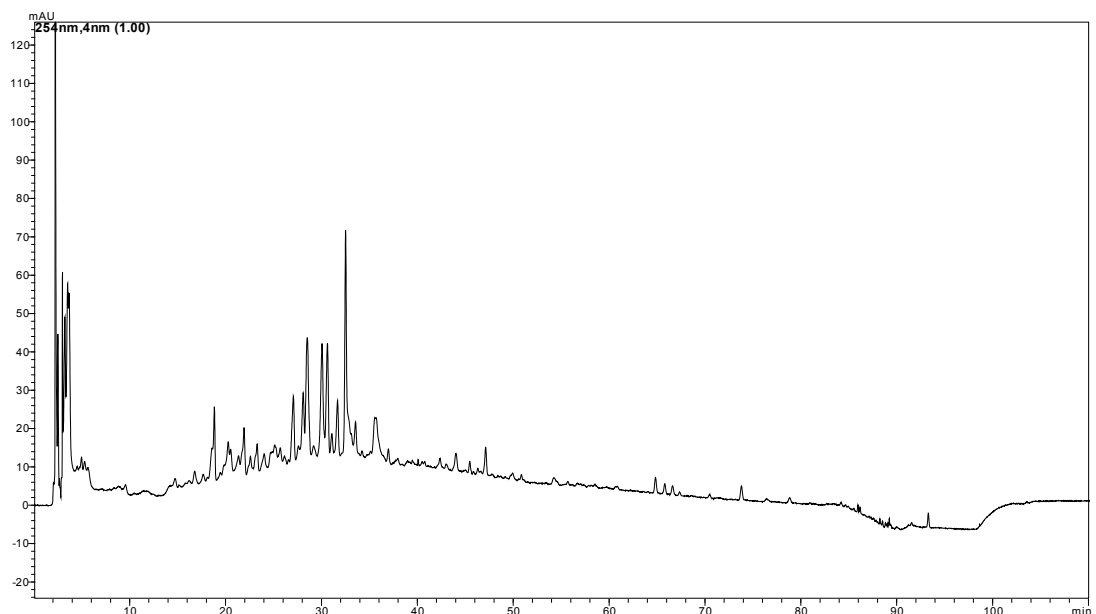


Abbildung 8: Fraktionierungsschritte, ELSD-Detektion



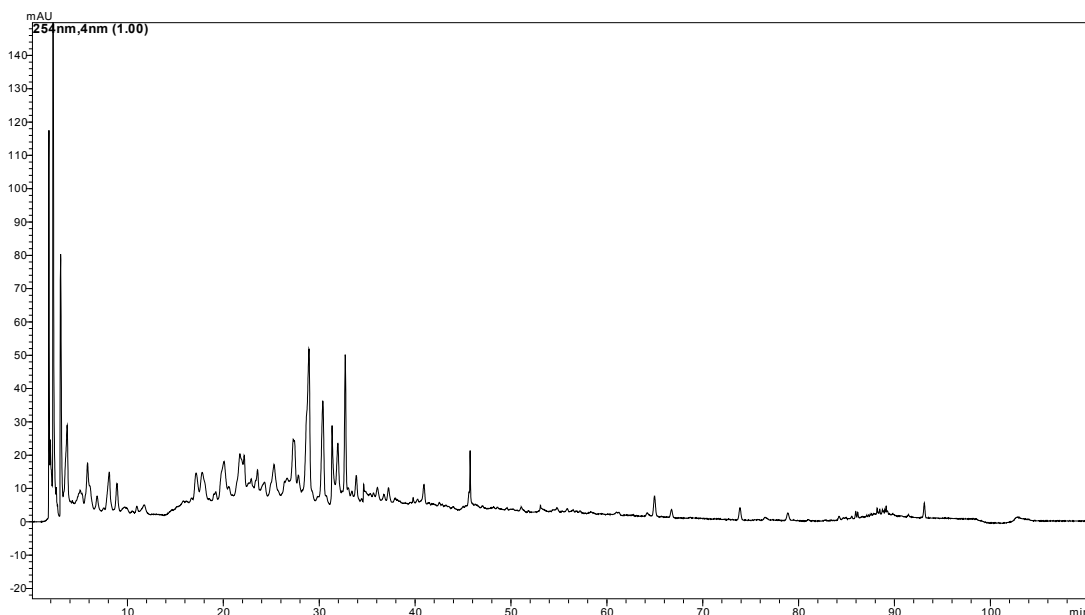
Für die Auftrennung größerer Extraktmengen erfolgte zunächst ein Testlauf in dem in Kapitel 3.2.1, S. 11 angegebenen System 2. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Dabei wurden 14 mg Extrakt in 1 ml Methanol gelöst und anschließend 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 30 µl in die HPLC injiziert.

Abbildung 9: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 2 unter UV-Detektion bei 254 nm



Da es bei der Fraktionierung des Extraktes und beim Eindampfen der Fraktionen schonender ist, Fließmittel ohne Säurezusatz zu verwenden, wurde ein Testlauf in dem in Kapitel 3.2.1, S. 12 beschriebenen System 3 mit Wasser und Acetonitril durchgeführt (Abbildung 10). Es wurde dieselbe Menge und Konzentration des Extraktes wie im HPLC Lauf in System 2 injiziert.

Abbildung 10: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 3 unter UV-Detektion bei 254 nm



In einem HPLC-Lauf in System 4 (Kapitel 3.2.1, S. 12) wurde überprüft, ob sich Methanol als Fließmittel anstelle des giftigeren und weitaus teureren Acetonitrils eignet (Abbildung 11, S. 29 und Abbildung 12, S. 29). Für die Analyse wurde dieselbe Menge und Konzentration des Extraktes wie im Testlauf in System 2 in die HPLC injiziert.

Abbildung 11: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 4 unter UV-Detektion bei 254 nm

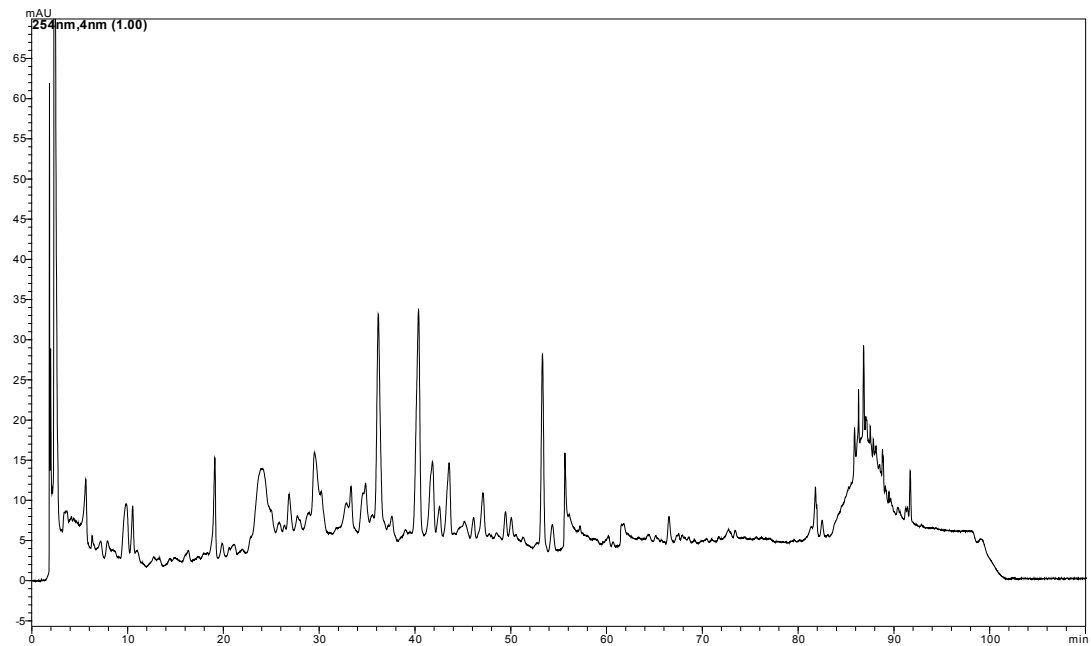
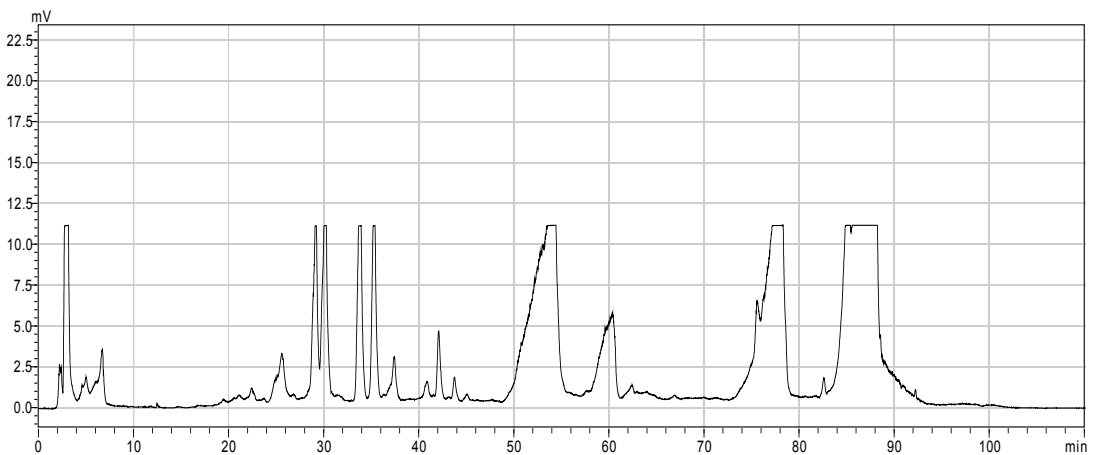


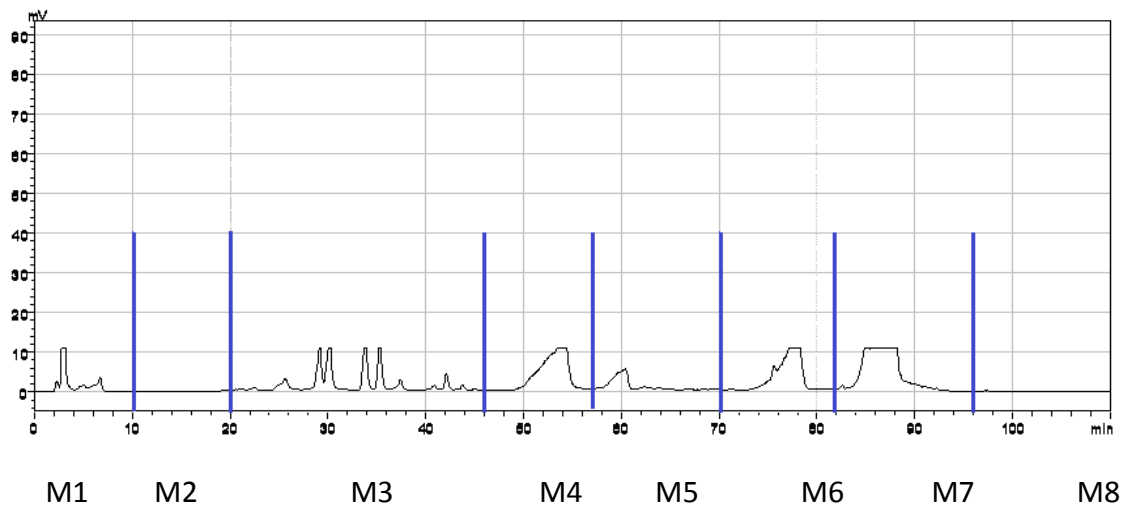
Abbildung 12: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 4 unter ELSD-Detektion



In den Testläufen konnte gezeigt werden, dass sich Wasser und Methanol ebenso als Fließmittel eignen wie angesäuertes Wasser und Acetonitril. Da Methanol ein stärker polares Fließmittel als Acetonitril ist, verschoben sich die Retentionszeiten der eluierten Substanzen etwas nach hinten. Durch das Fehlen der Säure im Fließmittel

und die Substanzüberladung kam es zu einem starken Fronting der Peaks der detektierten Komponenten. Dies beeinträchtigte jedoch die Auftrennung nicht.

Abbildung 13: Fraktionierungsschritte, ELSD-Detektion, HPLC Analyse in System 4



Mit dem optimierten System erfolgte die Fraktionierung des Extraktes in 8 Fraktionen (M1-M8), wobei die Sammelzeit pro Fraktion zwischen 10 und 26 Minuten lag (Tabelle 5).

Tabelle 5: Fraktionierung des Extraktes

Fraktion	Sammelzeit in min
M 1	0 – 10
M 2	10 – 20
M 3	20 – 46
M 4	46 – 57
M 5	57 – 70
M 6	70 – 82
M 7	82 – 96
M 8	96 – 110

4.3 Auftrennung des Extraktes mittels präparativer HPLC

Die Auftrennung des Extraktes erfolgte nach den in Kapitel 3.2.2, S. 13 angegebenen Bedingungen.

Für die Fraktionierung wurden 35,1 mg Extrakt in 600 µl Methanol gelöst und anschließend 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 500 µl in die HPLC injiziert. Die Fraktionen M1 – M8 wurden nach dem in Tabelle 5, S. 30 angeführten Schema gesammelt, eingeeengt und lyophilisiert.

Anschließend wurde jede Fraktion mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung überprüft. Jeweils 0,4 mg der lyophilisierten Fraktion wurden in 400 µl Methanol gelöst, 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert und 10 µl der überstehenden Flüssigkeit mittels HPLC analysiert.

HPLC Bedingungen siehe Kapitel 3.2.1., S. 10, System 1

Abbildung 14: Chromatogramm der Fraktion M1 unter UV-Detektion bei 254 nm

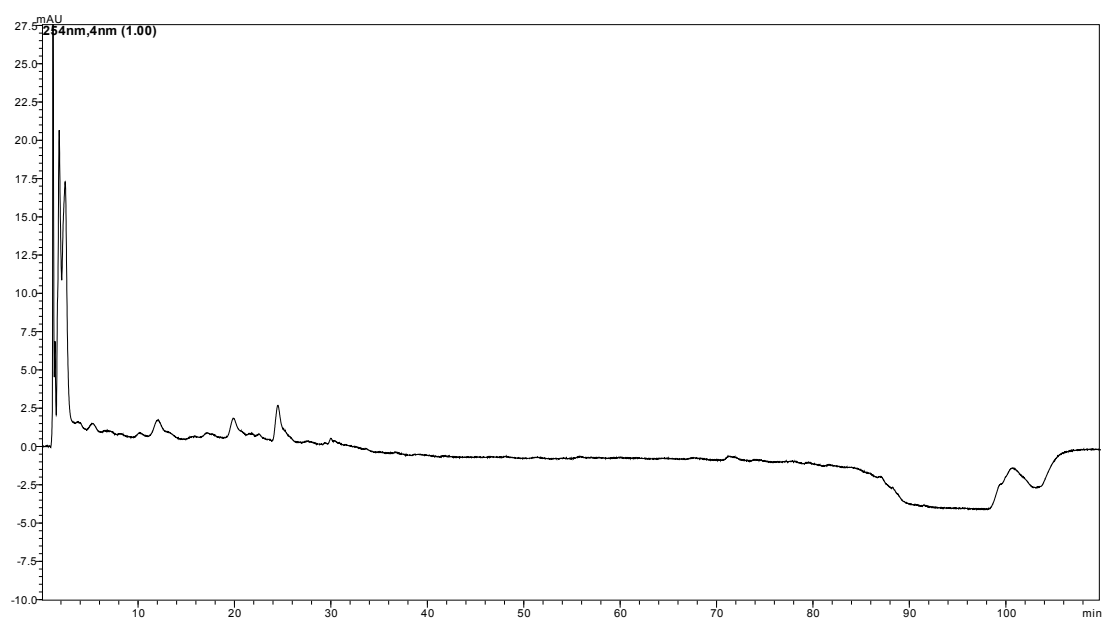


Abbildung 15: Chromatogramm der Fraktion M1 unter ELSD-Detektion

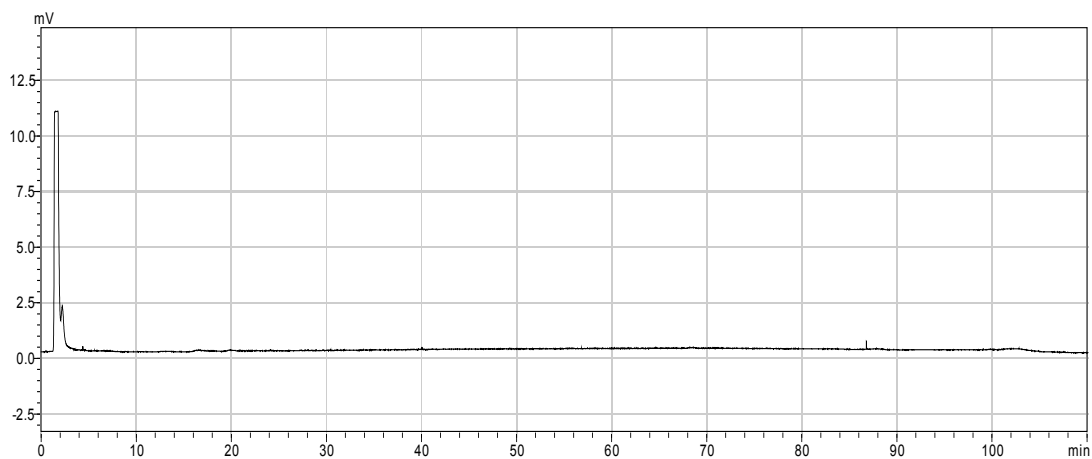


Abbildung 16: Chromatogramm der Fraktion M2 unter UV-Detektion bei 254 nm

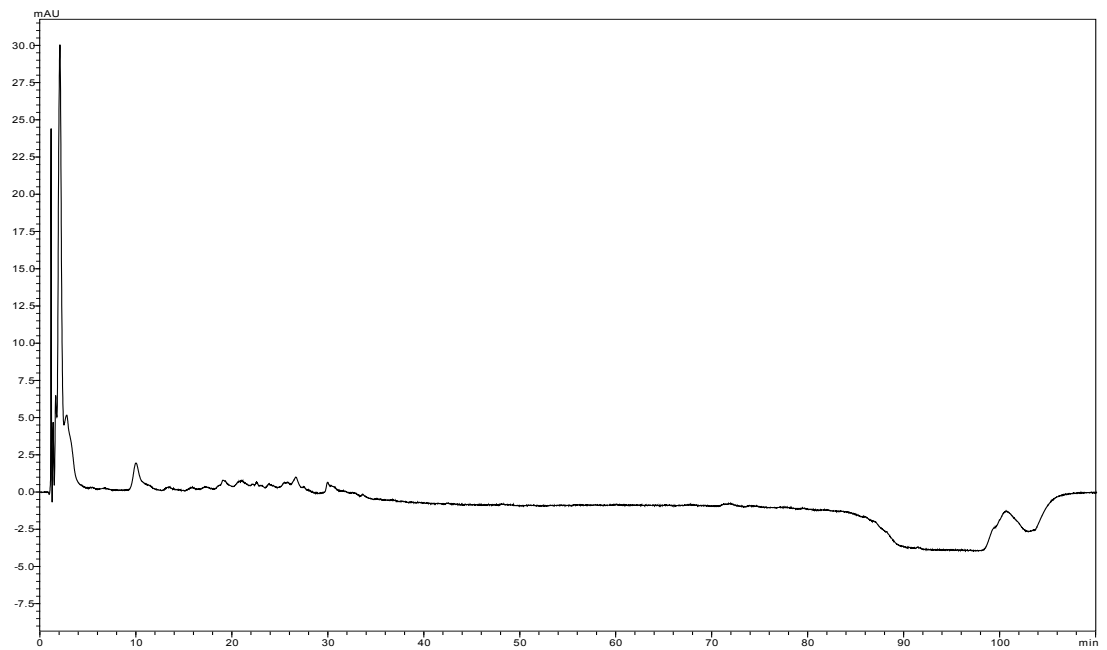


Abbildung 17: Chromatogramm der Fraktion M2 unter ELSD-Detektion

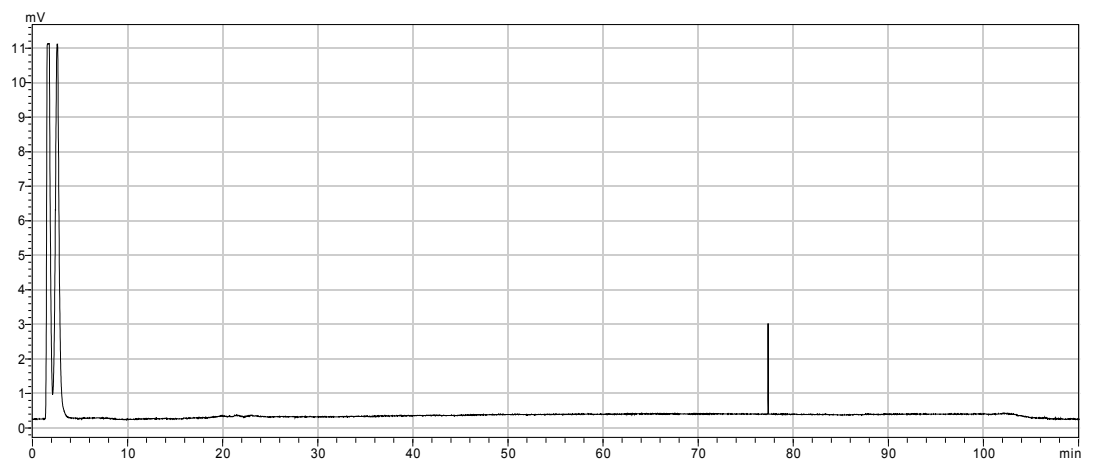


Abbildung 18: Chromatogramm der Fraktion M3 unter UV-Detektion bei 254 nm

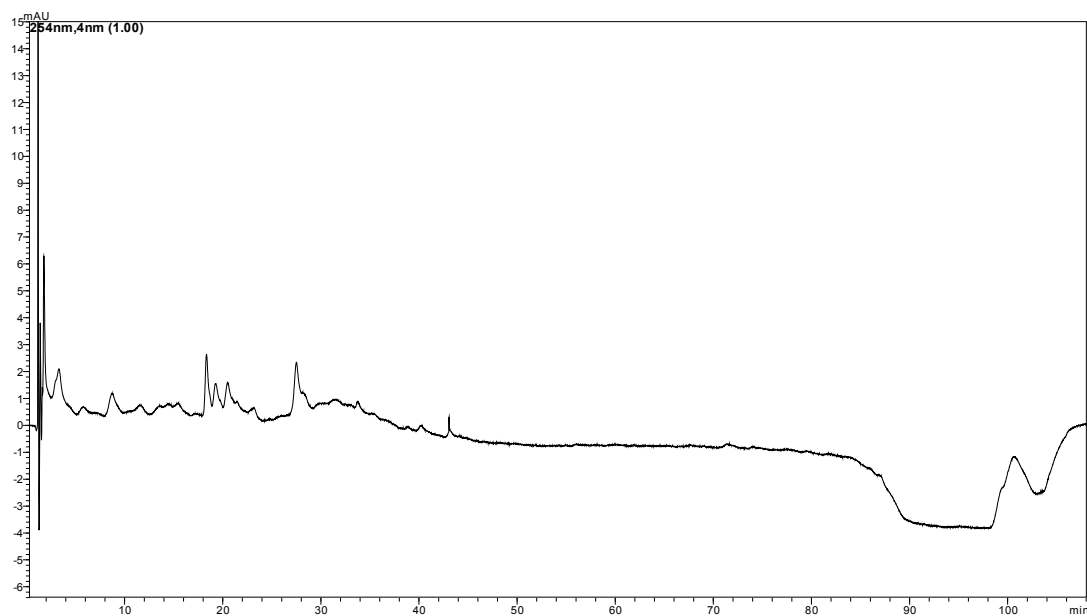


Abbildung 19: Chromatogramm der Fraktion M3 unter ELSD-Detektion

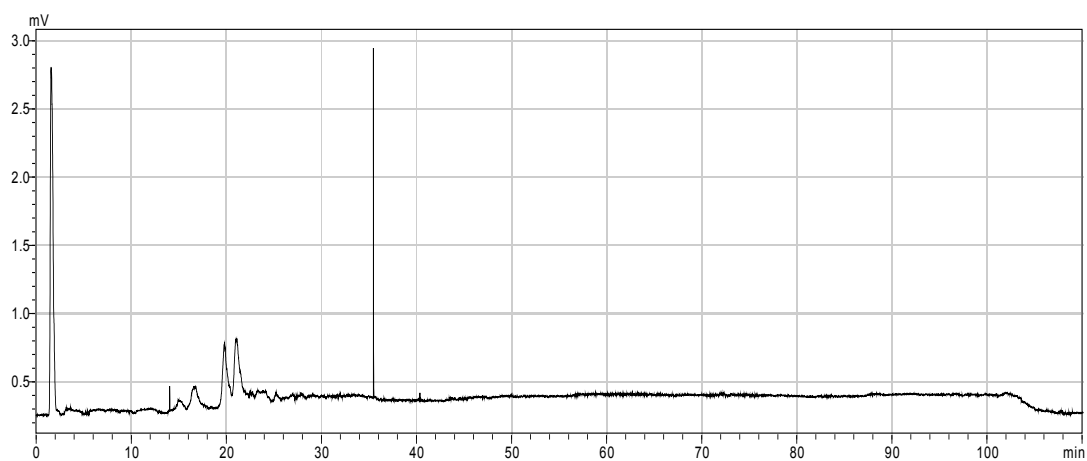


Abbildung 20: Chromatogramm der Fraktion M4 unter UV-Detektion bei 254 nm

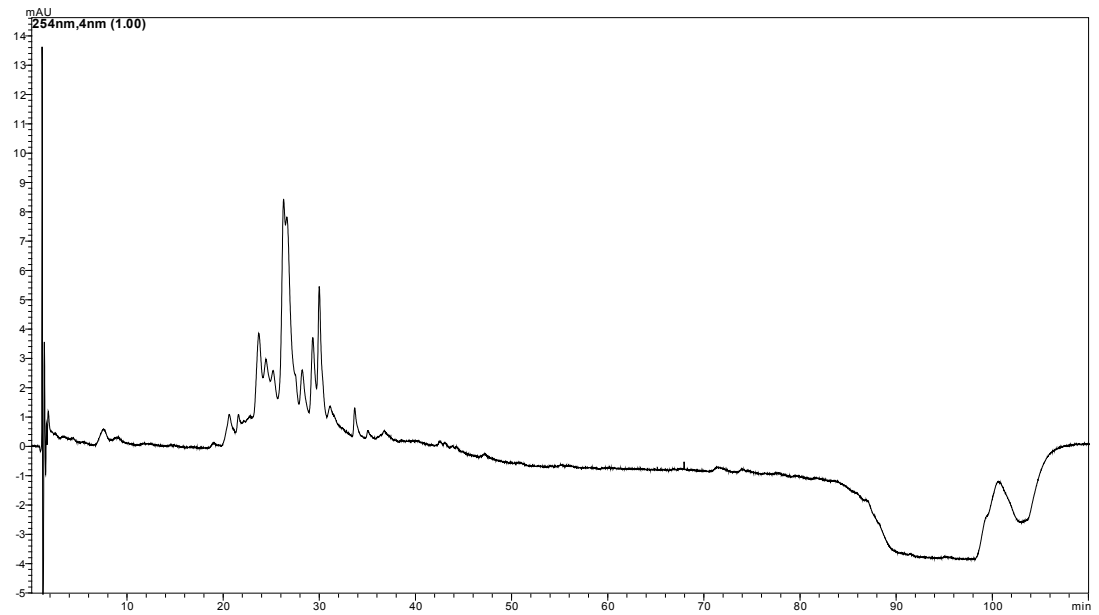


Abbildung 21: Chromatogramm der Fraktion M4 unter ELSD-Detektion

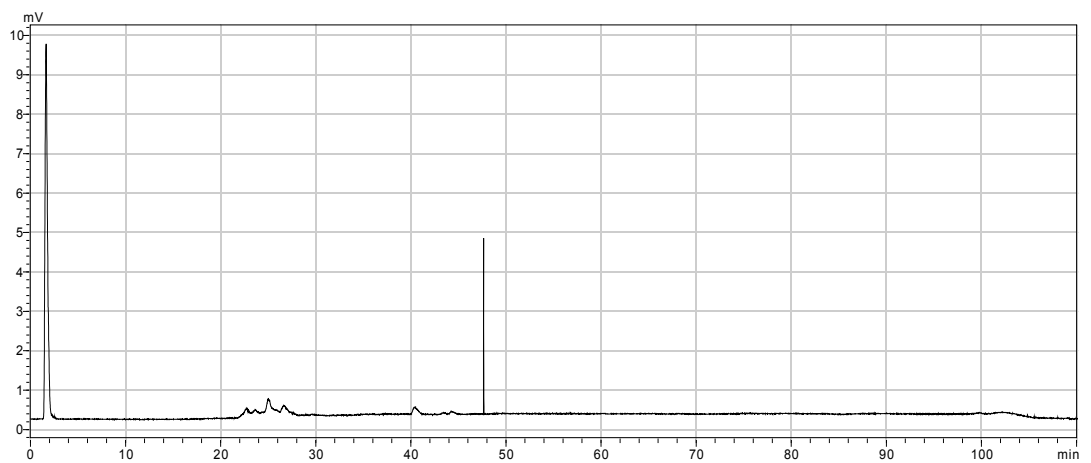


Abbildung 22: Chromatogramm der Fraktion M5 unter UV-Detektion bei 254 nm

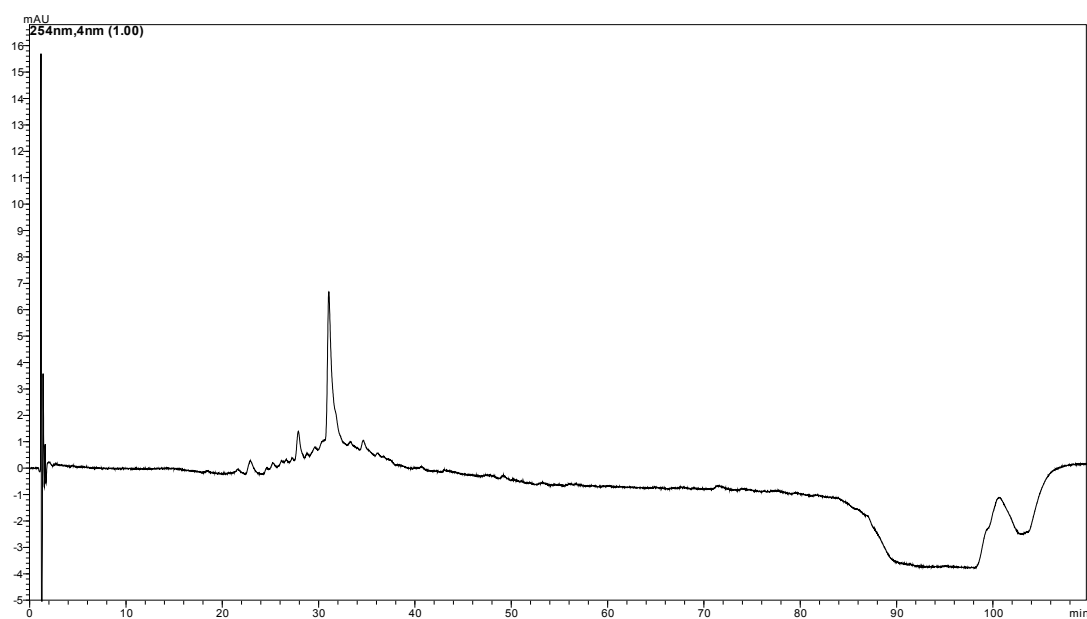


Abbildung 23: Chromatogramm der Fraktion M5 unter ELSD-Detektion

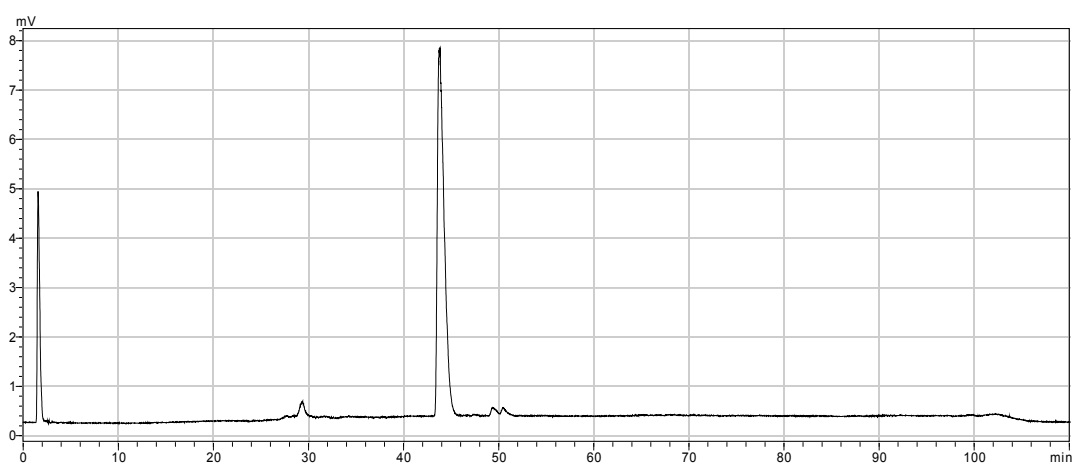


Abbildung 24: Chromatogramm der Fraktion M6 unter UV-Detektion bei 254 nm

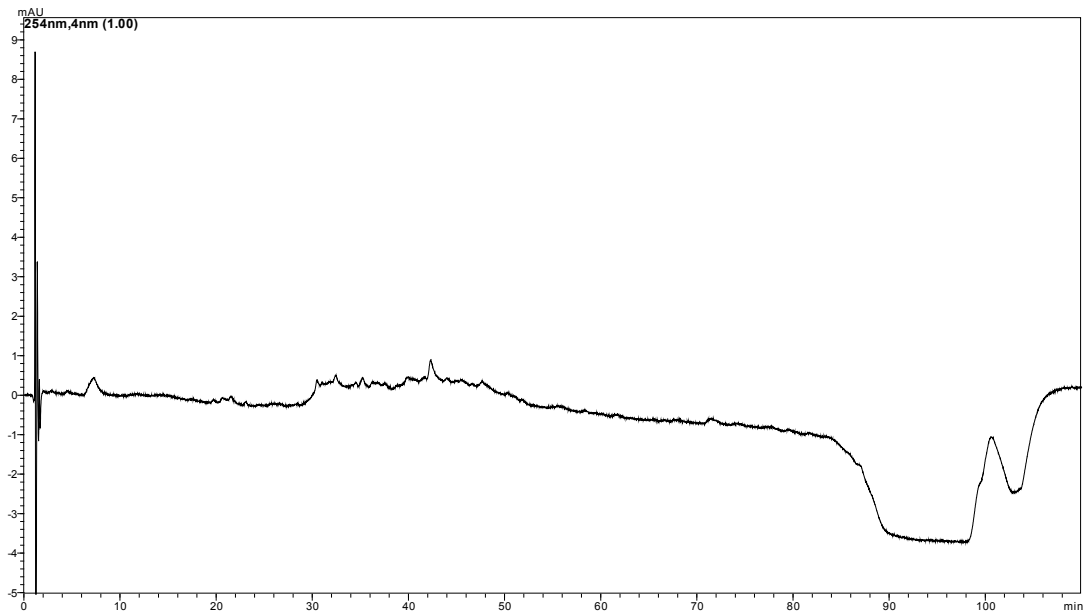


Abbildung 25: Chromatogramm der Fraktion M6 unter ELSD-Detektion

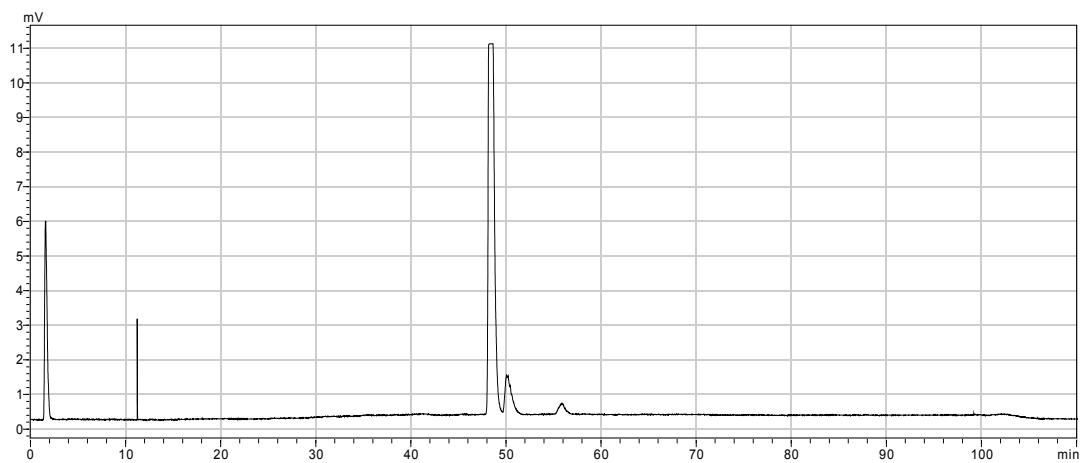


Abbildung 26: Chromatogramm der Fraktion M7 unter UV-Detektion bei 254 nm

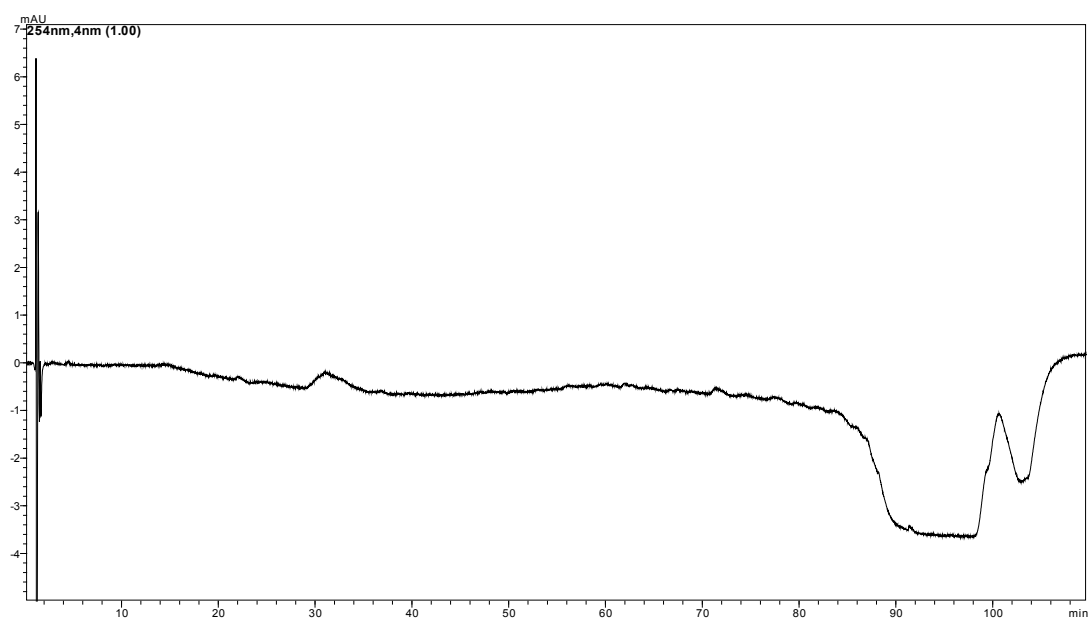


Abbildung 27: Chromatogramm der Fraktion M7 unter ELSD-Detektion

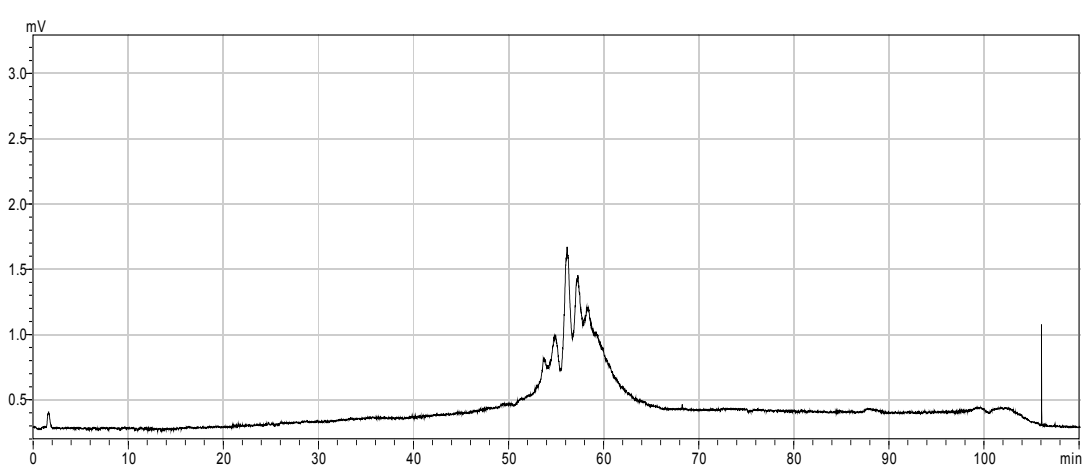


Abbildung 28: Chromatogramm der Fraktion M8 unter UV-Detektion bei 254 nm

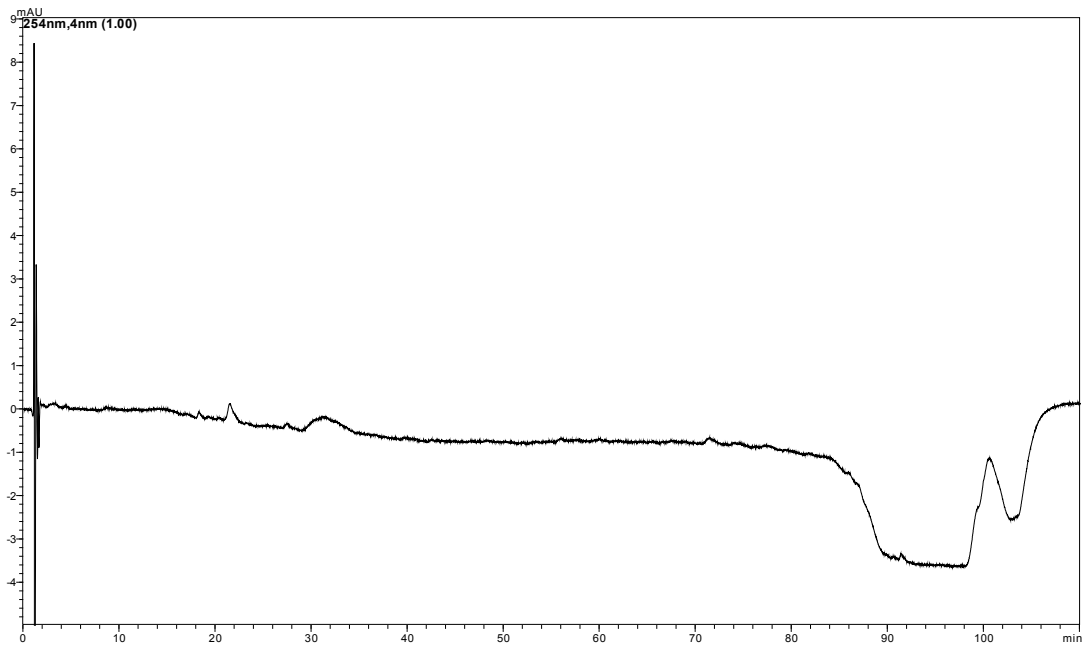
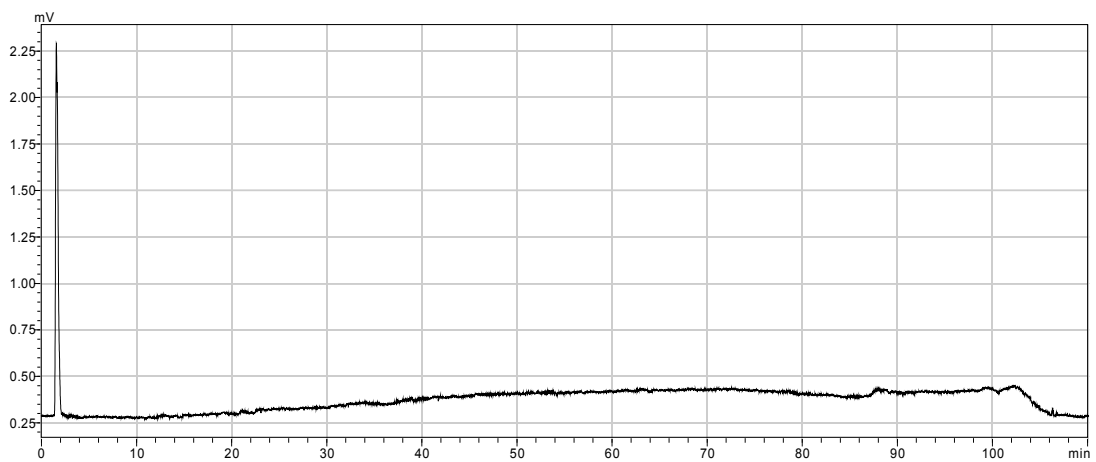


Abbildung 29: Chromatogramm der Fraktion M8 unter ELSD-Detektion



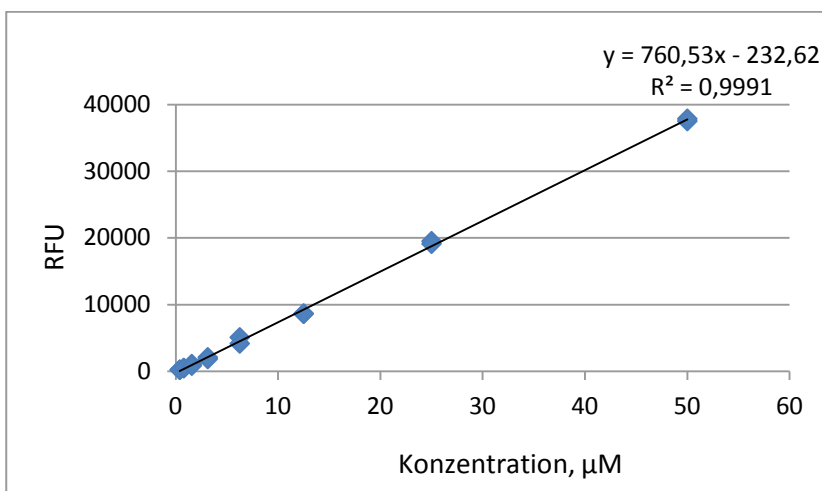
In den Chromatogrammen der Fraktionen M1 bis M4 wurden polare Komponenten fraktioniert. In den Fraktionen M5 und M6 wurde jeweils eine Substanz in chromatographisch nahezu einheitlicher Form angereichert. In der Fraktion M7 wurden zwischen Minute 53 und 62 eluierende Komponenten detektiert.

4.4 Testung der Fraktionen auf HDAC-Inhibierung

Die gewonnenen Fraktionen M1-M8 wurden auf ihr Potential zur HDAC-Inhibierung im fluorometrischen Assay (siehe Kapitel 3.3, S. 14) überprüft, um festzustellen, welche Komponenten des Extraktes für die inhibierende Wirkung verantwortlich sind.

Für die Bestimmung der HDAC-Aktivität und deren Modulation durch die getesteten Fraktionen musste eine Standardkurve generiert werden. Dafür wurde der Standard in verschiedenen Konzentrationen (0 - 50 μM) mit der Aktivator-Solution gemischt und inkubiert. Anschließend wurde die Intensität des freigesetzten Fluorophors (AMC) gemessen. Die Standardkurve muss eine lineare Korrelation zwischen den Konzentrationen des freien Fluorophors und der gemessenen Fluoreszenzintensität ergeben.

Abbildung 30: Standardkurve des freigesetzten AMC aus 0 – 50 μM Standard

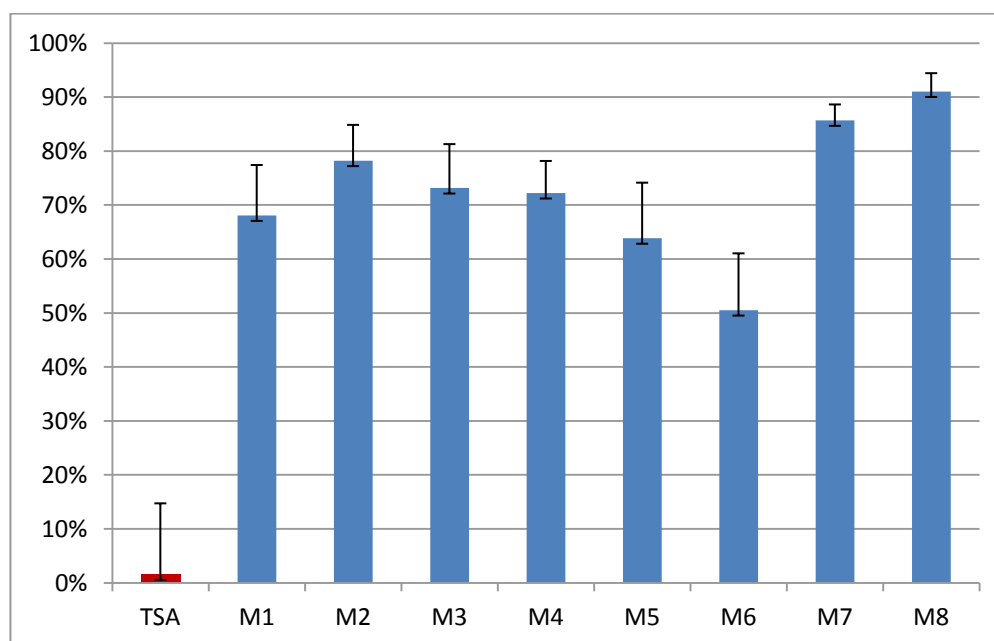


Die Fraktionen M1-M8 setzte man im HDAC-Assay in einer Endkonzentration von 13,9 ng/100 μl ein. Anhand der gemessenen Werte konnte die Aktivität der Histon-deacetylasen nach der in Kapitel 3.3 angegebenen Formel berechnet werden.

Tabelle 6: Einfluss von TSA (667 nM) und den Fraktionen M1-M8 auf die HDAC-Aktivität

	HDAC Aktivität in %	HDAC Inhibierung in %
TSA	1,58	98,42
M1	68,08	31,92
M2	78,23	21,77
M3	73,15	26,85
M4	72,23	27,77
M5	63,85	36,15
M6	50,54	49,46
M7	85,69	14,31
M8	91,04	8,96

Abbildung 31: Einfluss von TSA (667 nM) und den Fraktionen M1-M8 auf die HDAC-Aktivität in %, n=6



Bei der Testung der einzelnen Fraktionen konnte ein eindeutiger Trend zur Aktivitätsminderung der Enzyme festgestellt werden. Trichostatin A, ein charakteristischer HDAC-Inhibitor wurde als Positivkontrolle eingesetzt und zeigte in

einer Konzentration von 667 nM einen inhibierenden Effekt von mehr als 98 %. Durch Fraktion M1 war eine Hemmwirkung auf die HDACs von knapp 32 % zu erkennen. Die Enzymaktivität unter dem Einfluss der Fraktionen M2, M3 und M4 sank lediglich um bis zu 27,7 %.

Für die nahezu rein vorliegenden Komponenten der Fraktionen M5 und M6 wurde die stärkste Aktivitätsminderung der Histondeacetylasen nachgewiesen. Die Fraktion M5 bewirkte eine Hemmwirkung von etwas mehr als 36 % und durch den Einfluss der Fraktion M6 wurde die Enzymaktivität um fast die Hälfte vermindert.

Durch die Fraktionen M7 und M8 ließ sich im Assay nur eine geringe Abnahme der HDAC-Aktivität erkennen.

Die Fraktionen M5 und M6 wurden aufgrund der starken in vitro HDAC-Inhibierung und der Tatsache, dass die Hauptkomponenten der beiden Fraktionen beinahe rein vorlagen, mittels LC-MS analysiert.

4.5 Strukturaufklärung der Substanzen in Fraktion M5 und M6

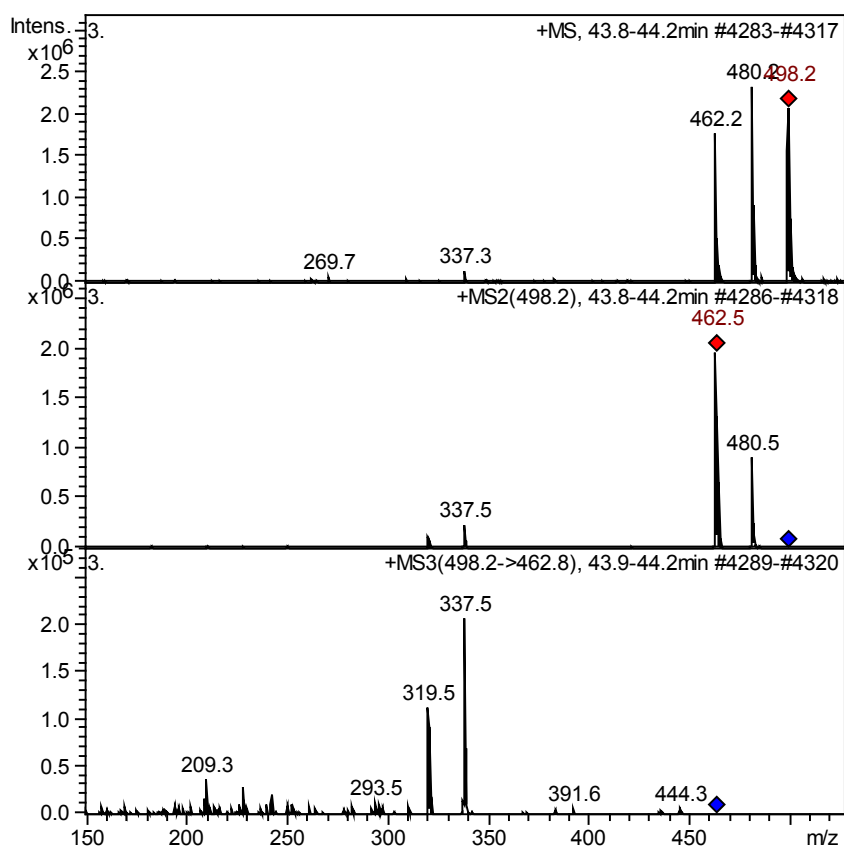
4.5.1 LC-MS Untersuchungen

Die Komponenten der Fraktionen M5 und M6 wiesen die höchste inhibierende Wirkung im HDAC-Assay auf, daher wurde deren Struktur mittels LC-MS untersucht.

Dafür wurden die Fraktionen M5 und M6 in Methanol gelöst und anschließend 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurde 1 µl für die Analyse injiziert.

Die Untersuchung der beiden Fraktionen M5 und M6 erfolgte nach den in Kapitel 3.5, S. 20 angegebenen Bedingungen.

Abbildung 32: MS der Hauptkomponente von Fraktion M5



Das Ergebnis der LC-MS Analyse der Fraktion M5 zeigte, dass die Substanz in der Fraktion M5 einen Hauptpeak von 498.2 m/z im MS¹ Spektrum aufweist, wobei dieses Ion bereits ein Wassermolekül verloren hat und das Molekulargewicht bei 515 mg/mol liegt. Die Fragmente mit dem Molekulargewicht 498.2, 480.5, 462.5 m/z weisen durch die jeweilige Differenz von 18 auf einen sukzessiven Wasserverlust hin (Wu N.W., 2006).

Das Fragmentierungsmuster und das Molekulargewicht deuteten auf das Vorliegen von Taurocholsäure. Zum Nachweis, dass es sich bei der analysierten Komponente um Taurocholsäure handelt, wurde eine Analyse der authentischen Referenz durchgeführt. Durch die idente Fragmentierung des Moleküls im MS² und MS³ Experiment konnte man den Schluss ziehen, dass Fraktion M5 als Hauptkomponente Taurocholsäure enthält.

Abbildung 33: MS-Analyse von Taurocholsäure

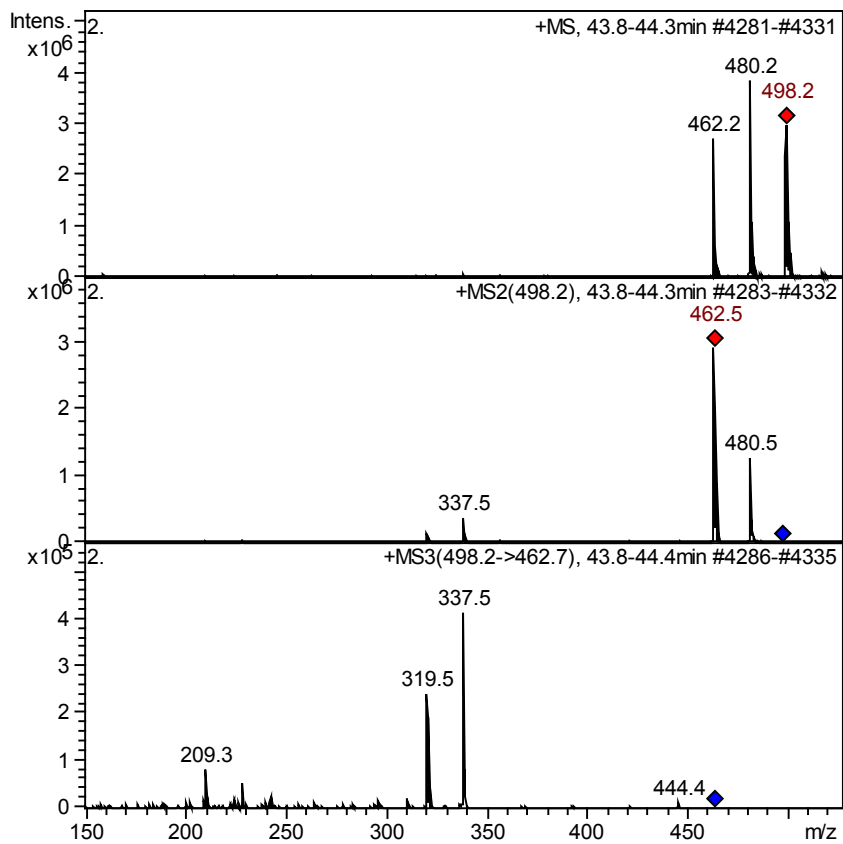
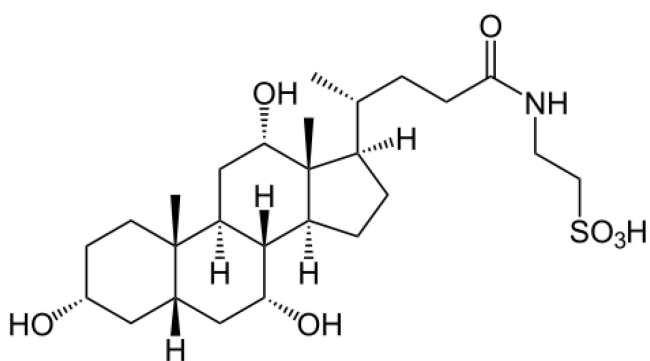


Abbildung 34: Taurocholsäure

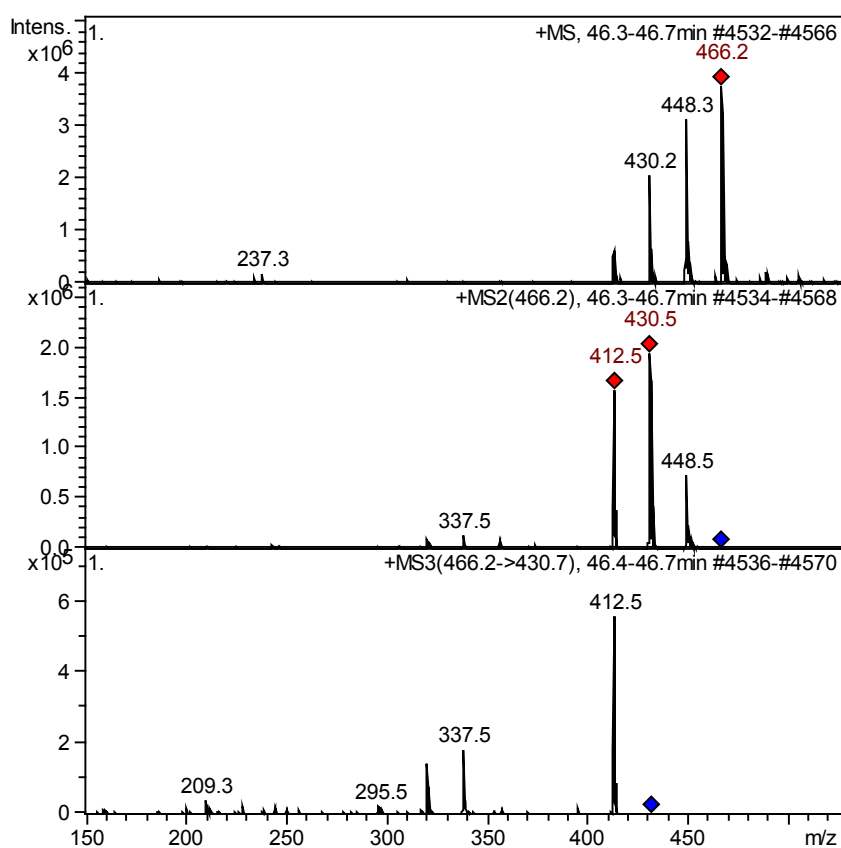


<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Taurochols%C3%A4ure.svg&filetimestamp=200707052>

[31913](#) am 06.04.2013

Die LC-MS Analyse von M6 deutete durch die detektierten Molekülmassen und die Fragmentierung des Moleküls darauf hin, dass es sich bei der Hauptkomponente in Fraktion M6 um Glycocholsäure mit dem Molekulargewicht 465 g/mol handeln könnte (Wu N.W., 2006). Auch in diesem Massenspektrum konnte man durch die detektierten Fragmente mit den Molekulargewichten 466.2, 448.3, 430.2 m/z den sukzessiven Wasserverlust nachweisen.

Abbildung 35: MS der Hauptkomponente von Fraktion M6



Zur Bestätigung des Vorliegens von Glycocholsäure wurde eine LC-MS Analyse der Reinsubstanz durchgeführt und aufgrund der übereinstimmenden Molekülmassen und der gleichen Fragmentierung des Moleküls konnte man Glycocholsäure in der Fraktion M6 eindeutig identifizieren.

4.5.2 HPLC-Vergleich mit authentischen Reinsubstanzen

Aus den LC-MS Analysen konnte abgeleitet werden, dass es sich bei den Hauptkomponenten in den Fraktionen M5 und M6 um Tauro- bzw. Glycocholsäure handelt. Zur weiteren Absicherung wurden beide Fraktionen sowie die Reinsubstanzen Taurocholsäure und Glycocholsäure mittels HPLC untersucht. Die Proben wurden wie in Kapitel 4.2 beschrieben für die Analyse vorbereitet und in System 1 siehe Kapitel 3.2.1, S. 10 analysiert.

Abbildung 38: Chromatogramm der Fraktion M5 (0,5 mg/ml) unter ELSD-Detektion

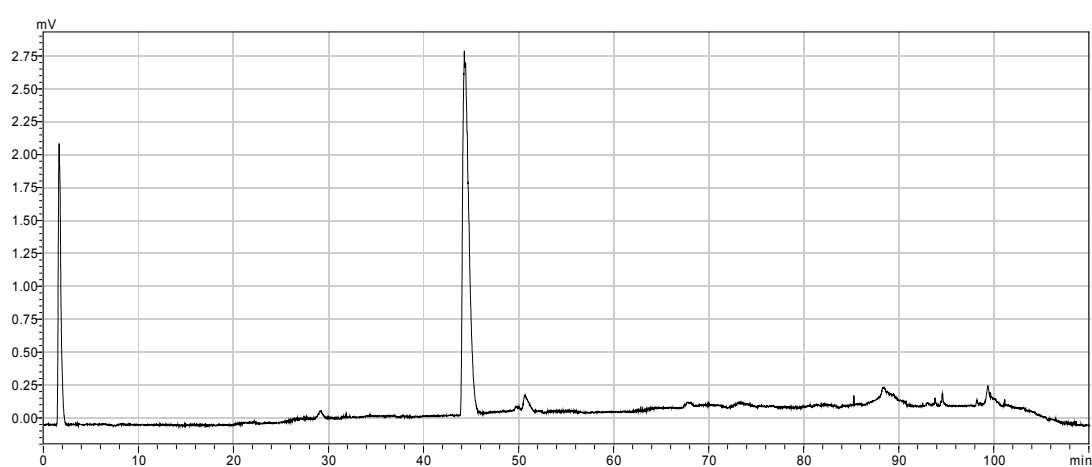


Abbildung 39: Chromatogramm der Taurocholsäure (0,2 mg/ml) unter ELSD-Detektion

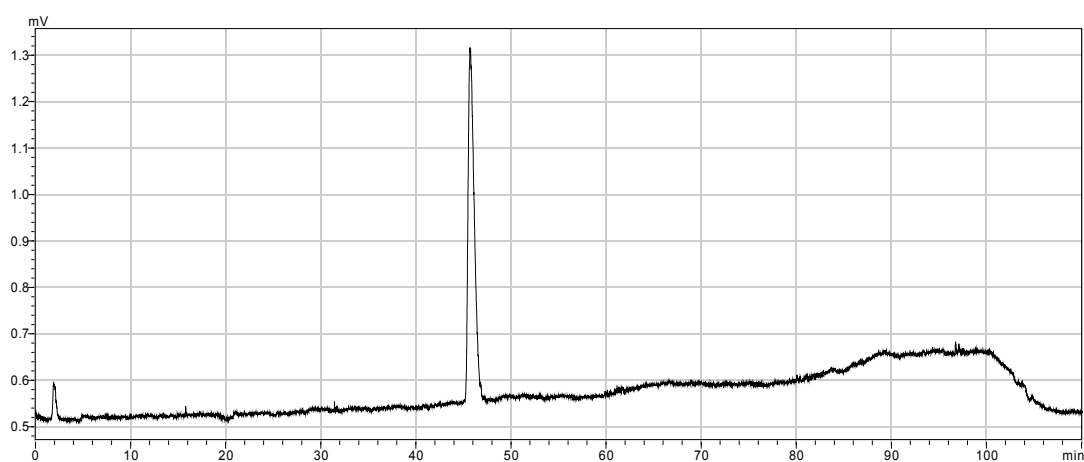


Abbildung 40: Chromatogramm der Fraktion M6 (0,25 mg/ml) unter ELSD-Detektion

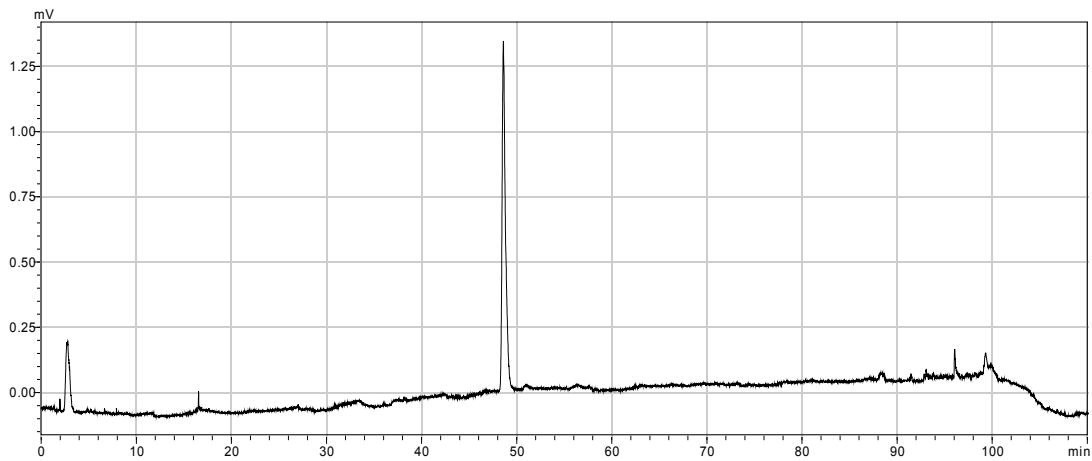
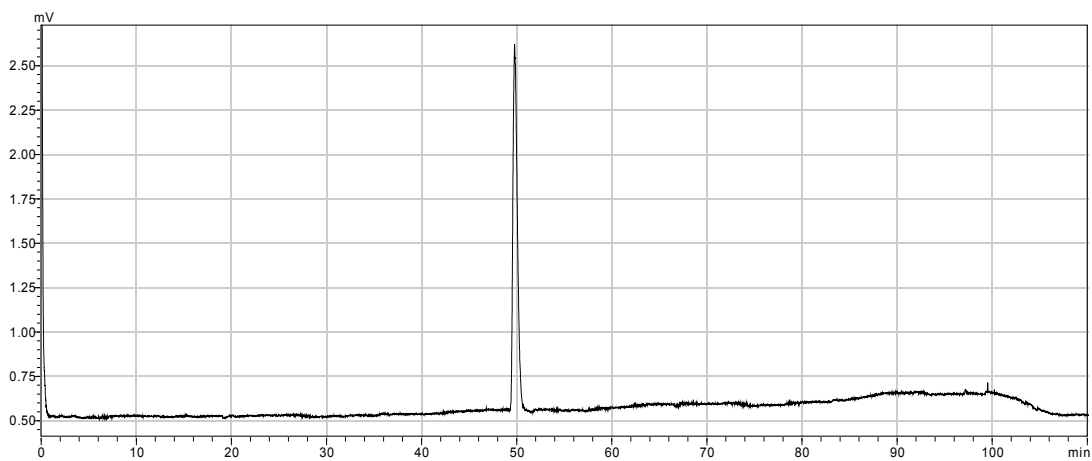


Abbildung 41: Chromatogramm der Glycocholsäure (0,2 mg/ml) unter ELSD-Detektion



Die jeweils gleichen Retentionszeiten der isolierten Substanz im Vergleich zur Reinsubstanz bestätigen auch durch diese Analysenmethode das Vorliegen der Taurocholsäure in Fraktion M5 bzw. der Glycocholsäure in Fraktion M6.

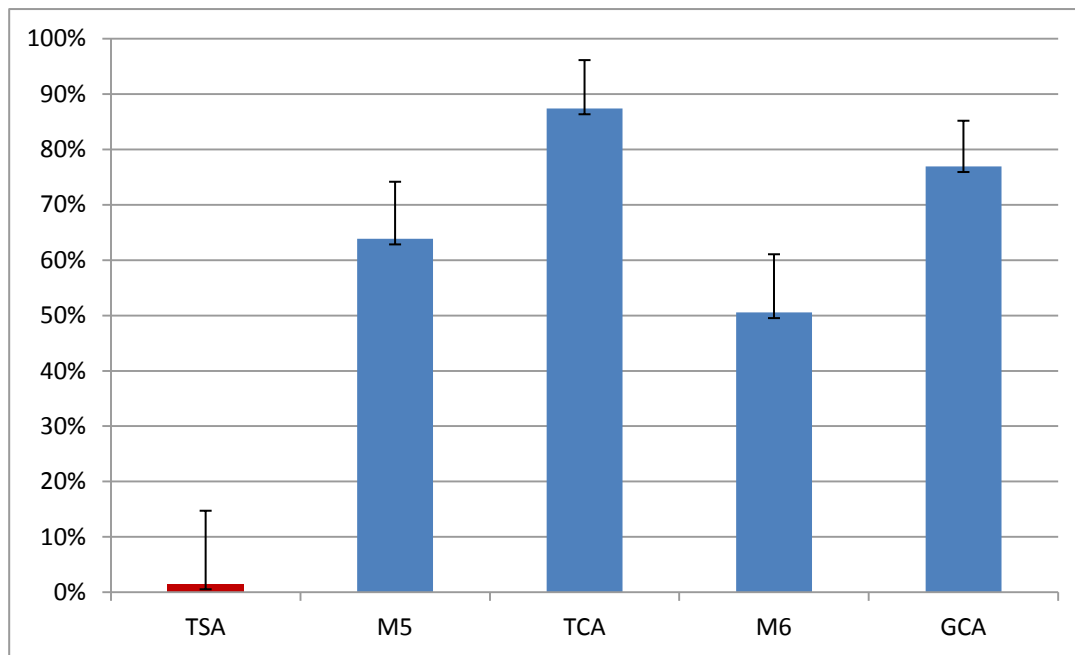
4.6 HDAC-Hemmung durch Taurocholsäure und Glycocholsäure

Um festzustellen, ob die Hemmwirkung von Fraktion M5 und M6 ausschließlich auf diese Komponenten zurückzuführen war, wurden Taurocholsäure (Reinheit 88,9 % nach HPLC-Bestimmung) und Glycocholsäure (Reinheit 100 % nach HPLC-Bestimmung) im HDAC-Assay auf ihre Hemmwirkung überprüft. Beide Substanzen wurden in der gleichen Konzentration (13,9 ng/100 µl) wie die getesteten Fraktionen im Assay eingesetzt.

Tabelle 7: Aktivitätsänderung der HDACs durch die Fraktionen M5 und M6 im Vergleich zu Taurocholsäure (TCA) und Glycocholsäure (GCA)

	HDAC Aktivität in %	HDAC Inhibierung in %
TSA (667 nM)	1,58	98,42
M5	63,85	36,15
TCA	87,35	12,65
M6	50,54	49,46
GCA	76,92	23,08

Abbildung 42: HDAC-Hemmung durch die Fraktionen M5 und M6 im Vergleich zu Taurocholsäure (TCA) und Glycocholsäure (GCA) in %, n=6



Die Aktivitätsminderung der Histondeacetylasen durch Taurocholsäure und Glycocholsäure war geringer als durch die Fraktionen M5 und M6. Die Tendenz, dass M6 die Enzymaktivität stärker hemmt als M5 konnte für die Reinsubstanzen ebenfalls nachgewiesen werden.

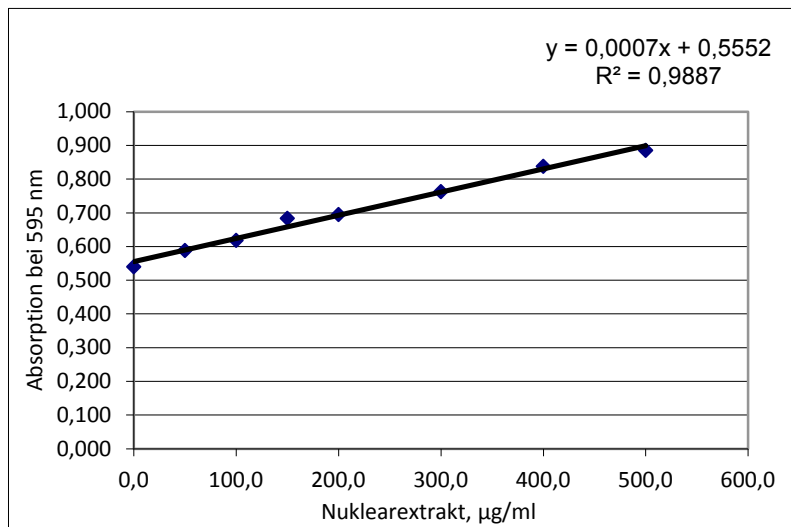
Ursache für die stärkere Hemmwirkung der Fraktionen im Vergleich zu den Reinsubstanzen könnten weitere Komponenten in den Fraktionen sein, die zu einer synergistischen Wirkung führen. In den jeweiligen Chromatogrammen der Fraktionen M5 und M6 (siehe Abbildung 22, S. 36 und Abbildung 24, S. 37) sind weitere Substanzen in minimaler Konzentration zu erkennen. Es könnte sein, dass diese Stoffe zwar in sehr kleiner Menge vorliegen, aber einen sehr starken Effekt auf die Aktivität der Histondeacetylasen haben. Zum anderen könnten auch Substanzen in den Fraktionen vorhanden sein, die nicht mit Hilfe der verwendeten Detektoren erfasst werden, wie zum Beispiel Salze.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Ursache für die unterschiedliche HDAC-Inhibierung der Fraktionen im Vergleich zu den Reinsubstanzen nicht geklärt werden.

4.7 Bestimmung der Proteinmenge im Nuklearextrakt mittels Bradford-Assay

Um die spezifische Aktivität der Histondeacetylasen berechnen zu können, musste der Gehalt an HDACs im Nuklearextrakt bestimmt werden. Dazu wurde der Bradford Assay (siehe Kapitel 3.4, S. 19) herangezogen. Die Enzymaktivität gibt an, wie viel aktives Enzym sich im Nuklearextrakt befindet.

Abbildung 43: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinmenge im Nuklearextrakt



Mit Hilfe der erstellten Eichgerade wurde eine Proteinmenge von 2,64 mg/ml im Nuklearextrakt bestimmt.

Die spezifische Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 Unit 1 µM an deacetyliertem Substrat pro Minute bei RT entspricht. Für die im Nuklearextrakt enthaltenen Histondeacetylasen wurde eine spezifische Aktivität von 0,985 U/mg berechnet.

4.8 Quantifizierung der Taurocholsäure und Glycocholsäure im Extrakt aus *Salinibacterium amurskyense*

Die Quantifizierung der Substanzen in der jeweiligen Fraktion erfolgte mit Hilfe der HPLC.

Dazu wurden 0,3225 mg der Fraktion M5 und 0,325 mg der Fraktion M6 in jeweils 1 ml Methanol vollständig gelöst und für 10 min bei 10 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Davon wurden jeweils 10 µl in die HPLC injiziert und nach den im Kapitel 3.2.1, S. 10 für System 1 angegebenen Bedingungen analysiert. Die erhaltenen Peakflächen der beiden Chromatogramme unter ELSD-Detektion zog man anschließend zur Gehaltsbestimmung der Taurocholsäure bzw. der Glycocholsäure heran.

Abbildung 44: Chromatogramm der Fraktion M5 (0,3225 mg/ml) unter ELSD-Detektion

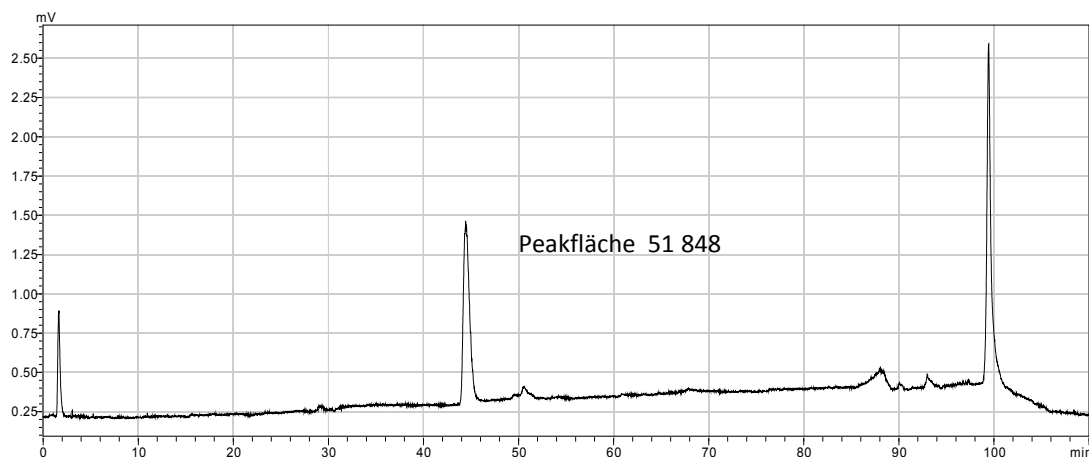
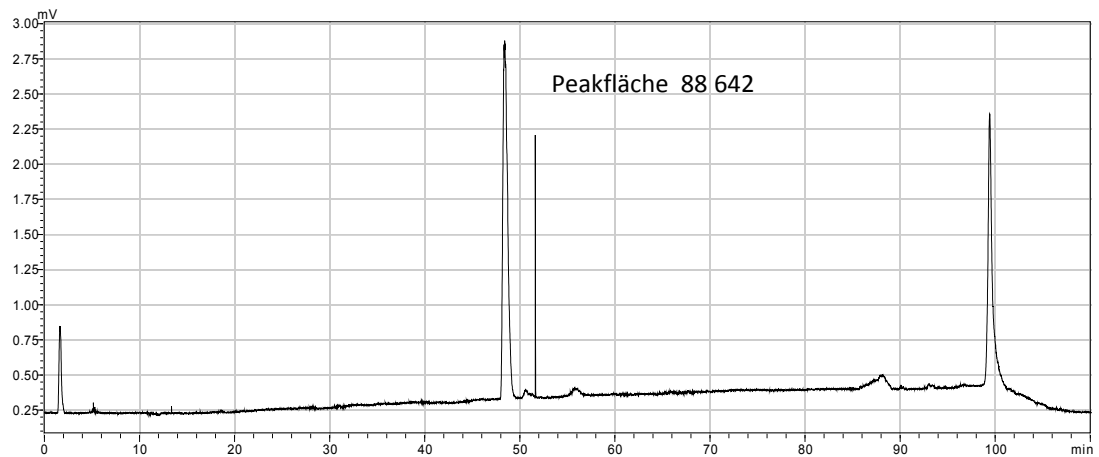


Abbildung 45: Chromatogramm der Fraktion M6 (0,325 mg/ml) unter ELSD-Detektion



Für die Gehaltsbestimmung mittels externen Standards wurden Eichgeraden der beiden Reinsubstanzen erstellt. Das dabei verwendete HPLC-System 1 wird in Kapitel 3.2.1, S. 10 beschrieben.

Abbildung 46: Eichgerade Taurocholsäure

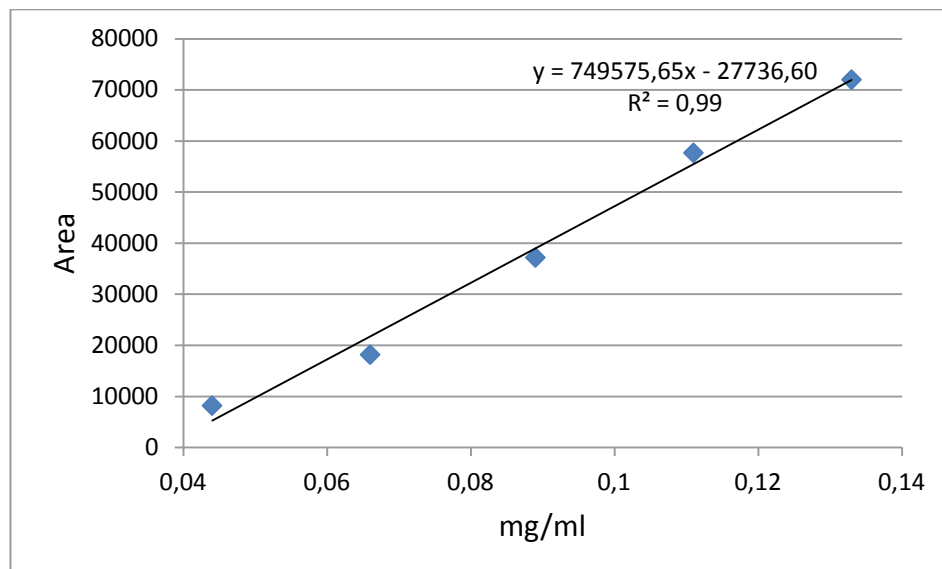
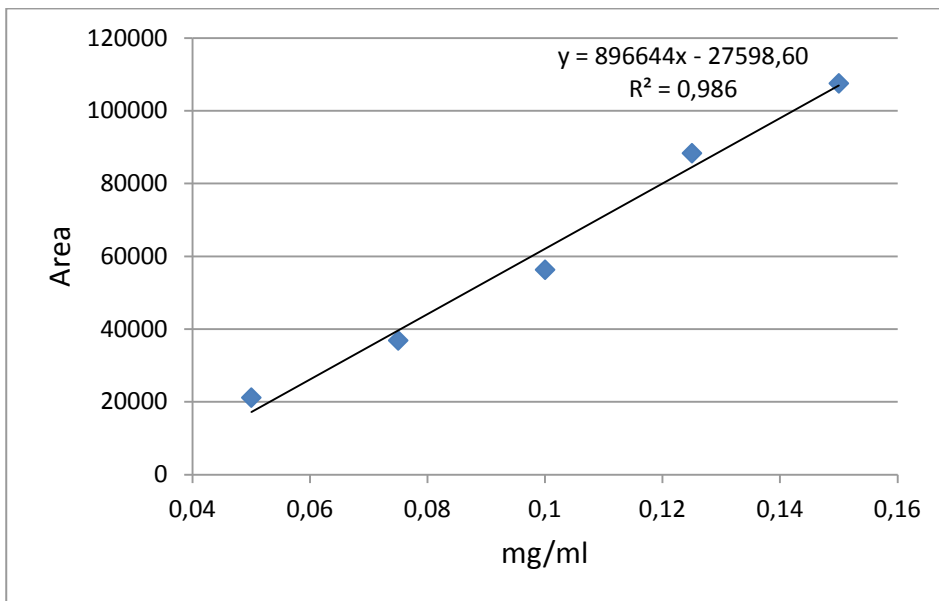


Abbildung 47: Eichgerade Glycocholsäure



Anhand der erstellten Eichgeraden und der erhaltenen Peakflächen aus den Chromatogrammen (Abbildung 44, S. 52 und Abbildung 45, S. 53) konnte der Gehalt der Taurocholsäure und der Glycocholsäure mit folgender Formel bestimmt werden.

$$x = \frac{\text{Area} + d}{k}$$

Area	Peakfläche der Substanz
d	Schnittpunkt auf der y-Achse
k	Steigung der Gerade
x	Gehalt der untersuchten Substanz bezogen auf die injizierte Menge

In Fraktion M5 wurden 32,87 % Taurocholsäure und in Fraktion M6 wurden 40 % Glycocholsäure nachgewiesen. In den Chromatogrammen von M5 und M6 (Abbildung 22 und Abbildung 23, S. 36, Abbildung 24 und Abbildung 25, S. 37) sind allerdings kaum

weitere nennenswerte Peaks zu erkennen, die auf angereicherte Komponenten in den Fraktionen schließen lassen. Es könnte daher möglich sein, dass weitere Substanzen in den Fraktionen weder mit dem ELSD Detektor noch mit dem UV Detektor erfasst werden, wie zum Beispiel Salze. Ein weiteres Indiz für das Vorliegen anderer Substanzen in diesen Fraktionen ist auch die höhere Hemmwirkung der Fraktionen im Vergleich zu den Reinsubstanzen Tauro- und Glycocholsäure im HDAC-Assay. Daraus kann man schließen, dass eine mögliche synergistische Wirkung für die inhibierenden Effekte verantwortlich ist.

Eine Identifizierung von weiteren Substanzen neben Taurocholsäure in der Fraktion M5 und neben Glycocholsäure in der Fraktion M6 war allerdings im Zuge dieser Diplomarbeit nicht möglich.

5 Zusammenfassung

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) erlangten großes Interesse, da sie neue Ansatzpunkte für die Therapie von verschiedenen Erkrankungen wie Entzündungen, COPD, Herzhypertrophie oder Krebs bilden könnten. Bei der Suche nach neuen potenten HDACi könnten marine Bakterien der Ordnung Actinomycetales eine vielversprechende Quelle darstellen. In der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein Extrakt aus *Salinibacterium amurskyense* in vitro auf sein Potential zur HDAC-Inhibierung überprüft. Dabei wurde das aus dem Nährmedium gewonnene Extrakt mit Hilfe der präparativen Hochleistungsflüssigchromatographie in weniger komplex zusammengesetzte Fraktionen aufgetrennt und anschließend wurden diese auf ihre Wirkung auf die HDACs getestet. Für die Bestimmung der Hemmwirkung durch die einzelnen Fraktionen wurde ein optimierter fluorometrischer Assay herangezogen. Zwei Fraktionen, M5 und M6, mit jeweils einer nahezu rein vorliegenden Komponente bewirkten die stärkste Aktivitätsminderung. Diese beiden Fraktionen wurden mittels LC-MS analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei der Substanz in Fraktion M5 um Taurocholsäure und in Fraktion M6 um Glycocholsäure handelte. In Folge wurden Taurocholsäure und Glycocholsäure im in vitro Assay auf HDAC-Inhibierung überprüft, um festzustellen, ob die Hemmwirkung von Fraktion M5 und M6 ausschließlich auf diese Komponenten zurückzuführen ist. Eine Tendenz zur Enzymhemmung durch die Reinsubstanzen war gegeben, allerdings nicht in dem Ausmaß wie durch M5 und M6. Ursache für die stärkere HDAC-Inhibierung der Fraktionen könnten weitere nicht detektierte Substanzen in den Fraktionen sein, die zu einer synergistischen Wirkung führen.

6 Abstract

Histone deacetylase-inhibitors (HDACi) gained a lot of interest as new therapeutics in the treatment of different diseases such as inflammation, COPD, heart hypertrophy or cancer. In the search for new potent HDACi marine bacteria of the order Actinomycetales might provide a promising source. Thus, the main focus of this diploma thesis was the in vitro investigation of an extract from *Salinibacterium amurskyense* for its potential for HDAC inhibition. The extract had been prepared from the culture medium and was fractionated by preparative HPLC. The obtained fractions were tested for their effects on HDAC modulation and their influence on the activity of HDACs was measured by an optimized fluorometric assay. Two fractions, M5 and M6, each containing an almost pure component demonstrated the strongest reduction of enzyme activity. Both fractions were analyzed by LC-MS and it was proven that taurocholic acid was enriched in M5 and glycocholic acid was enriched in M6. Therefore taurocholic and glycocholic acid were tested in vitro for HDAC inhibition, to determine whether the inhibitory effect of fraction M5 and M6 was only due to these substances. Enzyme inhibition by the pure substances was less than by M5 and M6. The reason of the increased HDAC inhibition of the fractions could be components that lead to a synergistic effect but were not detected by the methods used.

7 Literaturverzeichnis

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72, 248-254

Davidson B. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995; 6, 284-291

Diyabalanage H., Granda M., Hooker J. Combination therapy: Histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. *Cancer Letters*. 2013; 329, 1-8

Ebada S., Edrada R., Lin W., Proksch P. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 2008; 3, 1820-1831

Frew A., Johnstone R., Bolden J. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Letters*. 2009; 280, 125-133

Han S., Nedashkovskaya O., Mikhailov V., Kim S., Bae K. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; 53, 2061-2066

Krasteva S., Heiss E., Krenn L. Optimization and application of a fluorimetric assay for the identification of histone deacetylase inhibitors from plant origin. *Pharmaceutical Biology*. 2011; 49, 658-668

Minucci S., Pelicci P. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6, 38-51

Müller-Esterl W., Brandt U., Anderka O., Kieß S., Rindinger K., Plenikowski M. Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009; 207-214

Newkirk T., Bowers A., Williams R. Discovery, biological activity, synthesis and potential therapeutic utility of naturally occurring histone deacetylase inhibitors. Natural Product Reports. 2009; 26, 1293-1320

Subramani R., Aalbersberg W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiological Research. 2012; 167, 571-580

Wegener D., Hildmann C., Riester D., Schwienhorst A. Improved fluorogenic histone deacetylase assay high-throughput screening applications. Analytical Biochemistry 2003; 321, 202-208

Williams P. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. Trends in Biotechnology. 2009; 27, 45-52

Witt O., Deubzer H., Milde T., Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Letters. 2009; 277, 8-21

Wu N.W. Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometric Analysis of Steroid and Conjugated Metabolites. The Chinese Pharmaceutical Journal. 2006; 58, 1-9

Zhang L., Fang H., Xu W. Strategies in Developing Promising Histone Deacetylase Inhibitors. Medicinal Research Reviews. 2010; 30, 585-602

Zotchev S. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. Journal of Biotechnology. 2012; 158, 168-175

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturierung der DNA im Zellkern (H. Koseki. Riken Research, eingesehen Mai 2010)	1
Abbildung 2: Amurbucht im Golf Peter des Großen	6
Abbildung 3: Fluorometrischer Assay (Wegener et al.,2003)	15
Abbildung 4: Hemmwirkung der zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Acetonextrakte von <i>Salinibacterium amurskyense</i> im HDAC-Assay	23
Abbildung 5: Chromatogramm des Extraktes, Analyse in System 1 unter UV- Detektion bei 254nm	25
Abbildung 6: Chromatogramm des Extraktes, Analyse in System 1 unter ELSD-Detektion	25
Abbildung 7: Fraktionierungsschritte, UV-Detektion bei 254 nm	26
Abbildung 8: Fraktionierungsschritte, ELSD-Detektion	27
Abbildung 9: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 2 unter UV-Detektion bei 254 nm	27
Abbildung 10: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 3 unter UV-Detektion bei 254 nm	28
Abbildung 11: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 4 unter UV-Detektion bei 254 nm	29
Abbildung 12: Chromatogramm der HPLC Analyse in System 4 unter ELSD-Detektion	29
Abbildung 13: Fraktionierungsschritte, ELSD-Detektion, HPLC Analyse in System 4	30
Abbildung 14: Chromatogramm der Fraktion M1 unter UV-Detektion bei 254 nm	32
Abbildung 15: Chromatogramm der Fraktion M1 unter ELSD-Detektion	32

Abbildung 16: Chromatogramm der Fraktion M2 unter UV-Detektion bei 254 nm	33
Abbildung 17: Chromatogramm der Fraktion M2 unter ELSD-Detektion	33
Abbildung 18: Chromatogramm der Fraktion M3 unter UV-Detektion bei 254 nm	34
Abbildung 19: Chromatogramm der Fraktion M3 unter ELSD-Detektion	34
Abbildung 20: Chromatogramm der Fraktion M4 unter UV-Detektion bei 254 nm	35
Abbildung 21: Chromatogramm der Fraktion M4 unter ELSD-Detektion	35
Abbildung 22: Chromatogramm der Fraktion M5 unter UV-Detektion bei 254 nm	36
Abbildung 23: Chromatogramm der Fraktion M5 unter ELSD-Detektion	36
Abbildung 24: Chromatogramm der Fraktion M6 unter UV-Detektion bei 254 nm	37
Abbildung 25: Chromatogramm der Fraktion M6 unter ELSD-Detektion	37
Abbildung 26: Chromatogramm der Fraktion M7 unter UV-Detektion bei 254 nm	38
Abbildung 27: Chromatogramm der Fraktion M7 unter ELSD-Detektion	38
Abbildung 28: Chromatogramm der Fraktion M8 unter UV-Detektion bei 254 nm	39
Abbildung 29: Chromatogramm der Fraktion M8 unter ELSD-Detektion	39
Abbildung 30: Standardkurve des freigesetzten AMC aus 0 – 50 µM Standard	40
Abbildung 31: Einfluss von TSA (667 nM) und den Fraktionen M1-M8 auf die HDAC-Aktivität in %, n=6	41
Abbildung 32: MS der Hauptkomponente von Fraktion M5	43
Abbildung 33: MS-Analyse von Taurocholsäure	44
Abbildung 34: Taurocholsäure	44
Abbildung 35: MS der Hauptkomponente von Fraktion M6	45
Abbildung 36: MS-Analyse von Glycocholsäure	46
Abbildung 37: Glycocholsäure	46
Abbildung 38: Chromatogramm der Fraktion M5 (0,5 mg/ml) unter ELSD-Detektion	47

Abbildung 39: Chromatogramm der Taurocholsäure (0,2 mg/ml) unter ELSD-Detektion	47
Abbildung 40: Chromatogramm der Fraktion M6 (0,25 mg/ml) unter ELSD-Detektion	48
Abbildung 41: Chromatogramm der Glycocholsäure (0,2 mg/ml) unter ELSD-Detektion	48
Abbildung 42: HDAC-Hemmung durch die Fraktionen M5 und M6 im Vergleich zu Taurocholsäure (TCA) und Glycocholsäure (GCA) in %, n=6	50
Abbildung 43: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinmenge im Nuklearextrakt	51
Abbildung 44: Chromatogramm der Fraktion M5 (0,3225 mg/ml) unter ELSD-Detektion	52
Abbildung 45: Chromatogramm der Fraktion M6 (0,325 mg/ml) unter ELSD-Detektion	53
Abbildung 46: Eichgerade Taurocholsäure	53
Abbildung 47: Eichgerade Glycocholsäure	54

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie von <i>Salinibacterium amurskyense</i>	7
Tabelle 2: Gradientenprofil der HPLC Analysen	11
Tabelle 3: Pipettierschema des HDAC-Assays	17
Tabelle 4: Gradientenprofil der LC-MS Analysen	22
Tabelle 5: Fraktionierung des Extraktes	30
Tabelle 6: Einfluss von TSA (667 nM) und den Fraktionen M1-M8 auf die HDAC-Aktivität	41
Tabelle 7: Aktivitätsänderung der HDACs durch die Fraktionen M5 und M6 im Vergleich zu Taurocholsäure (TCA) und Glycocholsäure (GCA)	49

9 Curriculum vitae



Name:	Elisabeth Dantler
Adresse:	Rainding 5 4782 St. Florian am Inn
Geburtsdatum:	19.12.1987
Geburtsort:	Schärding
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung

1994 - 1998	Volksschule in St. Florian am Inn
1998 - 2006	Bundesgymnasium in Schärding
08/2006 - 07/2007	Auslandsaufenthalt in Rom
10/2007 - 2013	Diplomstudium der Pharmazie an der Universität Wien
10/2012 - 2013	Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie

Berufserfahrung

WS 2010, 2011, 2012	Tutorin am Department für Pharmakognosie
WS 2011	Tutorin am Department für pharmazeutische Chemie
Juli 2011	Praktikum im Zentrum für Physiologie und Pharmakologie an der Medizinischen Universität Wien
April 2013	Praktikum im Klinikum Wels-Grieskirchen, Oberösterreich