

Bioassays zur Untersuchung der biologischen Aktivität
von Flavonoiden

und

Ermittlung eines zellulären Rezeptormoleküls von
foamyviralen Vektoren

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kathrin Plochmann

aus Nürnberg

Würzburg 2011

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„ DIE ENDLOSIGKEIT DES WISSENSCHAFTLICHEN RINGENS SORGT
UNABLÄSSIG DAFÜR, DASS DEM FORSCHENDEN MENSCHEN
SEINE BEIDEN EDELSTEN ANTRIEBE ERHALTEN BLEIBEN UND
IMMER WIEDER VON NEUEM ANGEFACHT WERDEN:

DIE BEGEISTERUNG UND DIE EHRFURCHT.“

MAX PLANCK (*1858, †1947)

FÜR
OMA UND OPA

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinen Mentoren, den Herren Prof. Dr. Peter Schreier und PD Dr. Carsten Scheller für die Möglichkeit der Kooperation der Lebensmittelchemie mit der Virologie und die stets freundliche Unterstützung und Geduld, sowie für die vielen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen, die immer wieder zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Axel Rethwilm für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Virologie und Immunbiologie, sowie für die finanzielle Unterstützung in der Endphase der Studien.

Ich bedanke mich bei den Arbeitsgruppen Scheller, Koutsilieri und Rethwilm für die sehr freundliche und herzliche Aufnahme ins Team, ihre Hilfsbereitschaft und Beharrlichkeit, aus einer Lebensmittelchemikerin so eine Art Biologin zu machen. Für die motivierende Zusammenarbeit und das sehr freundliche, von Humor geprägte Arbeitsklima möchte ich mich bei Andrea, Anita, Bianca, Carmen, Christa, Christoph, Conrad, Eleni, Elisa, Falko, Inge, Ingolf, Kathleen, Katja, Kay, Lena, Nicole, Steffi J, Steffi R, Susann, Tatiana und Uwe sehr herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Klein und seiner Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den histologischen und tierischen Experimenten.

Anett, Claudia, Ebru und Sanja: Danke, dass ihr mich, trotz der räumlichen Entfernung, nicht vergessen und mich auch stets mit Rat und Tat unterstützt habt.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Immunbiologie, sowie allen Mitarbeitern und Kollegen im Arbeitskreis des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie. Vor allem auch den jeweiligen Werkstatt-Teams für „Speis und Trank“ und so manche speziell gebastelte Wunschanfertigung.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mein Studium ermöglicht, mich immer in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert hat. Ich danke auch meinen Freunden, die mir in all den Jahren geholfen und mir so Einiges, wie häufige Abwesenheit, Unpünktlichkeit und Schlafanfänge nachgesehen haben. Danke, dass Ihr für mich da seid.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	VI
Erläuterungen	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XIV
Summary	XVII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Flavonoiden	3
2.2 Metabolismus und Bioverfügbarkeit	5
2.3 Biologische Wirkungen der Flavonoide	7
2.3.1 Cytotoxische Effekte.....	7
2.3.2 Antioxidative Eigenschaften.....	9
2.3.3 Immunmodulatorische Effekte	12
2.4 Einfluss auf Krankheiten	13
2.4.1 Krebs.....	13
2.4.1.1 Mechanismen der Krebsentstehung	13
2.4.1.2 Polyphenole und Krebs	15
2.4.2 Alzheimer Krankheit	16
2.4.2.1 Pathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer	16
2.4.2.2 Genetik und Risikofaktoren	18
2.4.2.3 Das amyloide Vorläuferprotein APP (amyloid precursor protein)	20
2.4.2.4 Prozessierung von APP	21
2.4.2.5 Sekretasen.....	23
2.4.2.6 Therapeutische Interventionsstrategien.....	25
2.4.3 Flavonoide und Alzheimer Krankheit	28
2.5 Foamyviren	31
2.5.1 Aufbau des FV-Partikels.....	33
2.5.2 Genomorganisation	33
2.5.3 Foamyvirale Proteine.....	34
2.5.3.1 Gag (Kapsidprotein)	34
2.5.3.2 Pol (Enzymaktivitäten).....	35
2.5.3.3 Env (Hüllprotein)	35
2.5.3.4 Die akzessorischen Proteine Tas und Bet.....	36

2.5.4	Der foamyvirale Replikationszyklus.....	37
2.5.5	Foamyvirale Vektoren.....	37
2.5.6	Foamyvirale Rezeptor-Studien.....	38
3	Ergebnisse und Diskussion.....	40
3.1	Cytotoxizitätsstudien.....	40
3.1.1	Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Flavonoide.....	41
3.1.2	Bestimmung der Cytotoxizität.....	43
3.2	Flavonoide und Alzheimer Krankheit.....	58
3.2.1	Einfluss von Flavonoiden auf sAPP- und sAPP α -Sekretion.....	58
3.2.2	Knock down der Metalloprotease (ADAM-10).....	63
3.2.2.1	Klonierung der Vektoren.....	64
3.2.2.2	Charakterisierung der shRNA-Aktivität.....	68
3.2.3	Reinigung von AAV.....	74
3.2.4	Vorbereitung von <i>in vivo</i> Studien.....	78
3.2.4.1	Etablierung der stereotaktischen Injektion.....	78
3.2.4.2	Aufbau und Sicherung des transgenen Stamms B6.Cg-Tg(PDGFB- APP _{SwInd}) 20Lms/2J.....	78
3.2.4.3	Histologische Charakterisierung der transgenen A β -Expression.....	80
3.3	Foamyvirale Rezeptor-Studien.....	82
3.3.1	Foamyviren binden an Heparin.....	83
3.3.2	HS/CS-Codefiziente Zellen (pgsA-745) lassen sich nur schlecht mit FV infizieren.....	97
3.3.3	Kompetitive Hemmung mittels löslichem Heparin.....	102
3.3.4	Enzymatische Reduktion von HE/HS von der Zelloberfläche.....	105
3.3.5	Korrelation zwischen Suszeptibilität und Zelloberflächen-HS.....	109
4	Material und Methoden.....	115
4.1	Material.....	115
4.1.1	Geräte.....	115
4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	117
4.1.2.1	Glas.....	117
4.1.2.2	Kunststoff.....	117
4.1.2.3	Sonstiges.....	117
4.1.3	Chemikalien.....	118
4.1.4	Enzyme und Reaktionspuffer.....	118
4.1.5	Kits/Mastermixe.....	119
4.1.6	Größenstandards.....	119
4.1.7	Puffer und Lösungen.....	120

4.1.8	Zellmedien.....	123
4.1.9	Zelllinien	124
4.1.10	Bakterien	126
4.1.11	Plasmidvektoren.....	126
4.1.12	Primer und Oligonukleotide	127
4.1.12.1	Klonierungsprimer	127
4.1.12.2	Sequenzierungsprimer	128
4.1.12.3	Real-Time PCR Primer.....	129
4.1.12.4	Oligonukleotidmatrizen für shRNAs und Kurzzielsequenzen	129
4.1.13	Antikörper.....	130
4.1.14	ELISA/Assay-Kits	130
4.1.15	Mauslinien	131
4.1.15.1	Inzuchtstamm C57BL/6 (WT)	131
4.1.15.2	Transgene Stamm B6.Cg-Tg(PDGFB-APP _{SwInd}) 20Lms/2J	131
4.1.16	Computerprogramme und Internetseiten	131
4.2	Methoden	132
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	132
4.2.1.1	Auftauen eukaryotischer Zellen	132
4.2.1.2	Einfrieren eukaryotischer Zellen	132
4.2.1.3	Passagieren adhärenter Zellen	133
4.2.1.4	Passagieren von Suspensionszellen	133
4.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl.....	133
4.2.1.6	Transfektion mit Polyethylenimin (PEI).....	134
4.2.1.7	Produktion von AAV-Partikeln in eukaryotischen Zellen	135
4.2.1.8	Produktion von FV-Partikeln in eukaryotischen Zellen.....	136
4.2.1.9	Bestimmung des Virustiters.....	137
4.2.1.10	Durchflusszytometrie.....	137
4.2.1.11	Nachweis der GFP/mrfp-Expression	138
4.2.1.12	Lebend-Tod-Färbung mit 7-AAD und Annexin-V-FITC	138
4.2.1.13	Heparin-Färbung auf der Oberfläche von Zellen (extrazellulär)	140
4.2.1.14	Fluoreszenzmikroskopie.....	140
4.2.1.15	Zytotoxizitätstests.....	141
4.2.1.16	Vorbereitung der sAPP-Experimente.....	142
4.2.1.17	Kompetitive Hemmung des replikationsdefizienten foamyviralen Vektors... 143	
4.2.1.18	Entfernung des Heparins auf der Zelloberfläche mittels Heparinasen	144
4.2.2	Mikrobiologische Methoden	144
4.2.2.1	Kultivierung von Bakterien auf festen Nährböden (Agarplatten)	144

4.2.2.2	Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen.....	145
4.2.2.3	Lagerung von Bakterienkulturen	145
4.2.2.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	145
4.2.2.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	146
4.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	146
4.2.3.1	Fällung von Nukleinsäuren	146
4.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	146
4.2.3.3	Sequenzierungen.....	147
4.2.3.4	Präparation von Plasmid-DNA	148
4.2.3.5	Isolation im analytischen Maßstab mit Diatomeen-Erde.....	148
4.2.3.6	Isolation im analytischen Maßstab mit peqLab-Kit	149
4.2.3.7	Isolation im präparativen Maßstab	149
4.2.3.8	Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie.....	150
4.2.3.9	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	150
4.2.3.10	Restriktionsspaltungen.....	151
4.2.3.11	Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	152
4.2.3.12	Reinigung von PCR-Produkten	152
4.2.3.13	Dephosphorylierung geschnittener Vektoren	152
4.2.3.14	Ligationsreaktion.....	153
4.2.3.15	Isolierung der genomischen DNA aus Gewebeprobe.....	153
4.2.3.16	Genotypisierung transgener Mäuse	154
4.2.3.17	Annealing von DNA-Oligonukleotiden	155
4.2.3.18	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	155
4.2.3.19	Primerdesign und Schmelztemperatur	155
4.2.3.20	Standard-PCR	156
4.2.3.21	Gradienten-PCR	157
4.2.3.22	Kolonie-PCR.....	158
4.2.4	Proteinbiochemische Methoden	158
4.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	158
4.2.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	159
4.2.4.3	Westernblot	160
4.2.4.4	Transfer auf Nitrocellulosemembranen	160
4.2.4.5	Ponceau-S-Färbung	161
4.2.4.6	Blocken nichtbesetzter Proteinbindungsstellen	161
4.2.4.7	Immunfärbung und Detektion.....	161
4.2.4.8	Unspezifischer Proteinnachweis	163
4.2.4.9	Luziferase-Assay	164

4.2.4.10	ELISA.....	165
4.2.5	Chromatographische Methoden	167
4.2.6	Ultrazentrifugation der Vektorsuspension	167
4.2.7	Ultrafiltration der Vektorsuspension	168
4.2.8	Tierexperimentelle Methoden	168
4.2.8.1	Tötung und Organentnahme	168
4.2.8.2	Stereotaktische Injektion	169
4.2.8.3	Aufbau und Sicherung des transgen Stammes B6.Cg-Tg (PDGFB-APP _{SwInd}) 20LMs/2J	169
4.2.9	Histologische Methoden	170
4.2.9.1	Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung	170
4.2.9.2	Einfrieren und Herstellung von Gefrierschnitten	170
4.2.9.3	Fixieren und Herstellen von Paraffinschnitten	171
4.2.9.4	Immunohistochemischer Nachweis von A β Plaques	171
4.2.10	Statistik	171
5	Literatur	173

Veröffentlichungen

ORIGINALPUBLIKATIONEN

Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., Scheller, C., Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *460*, 1-9.

POSTERBEITRÄGE

Plochmann, K., Schreier, P., Rethwilm, A., Koutsilieri, E., Scheller, C. (2008)
Cloning of an AAV-shRNA expression vector to investigate the role of ADAM-10 in Alzheimer's Disease. 18th Annual Meeting Society of Virology, Heidelberg

Erläuterungen

Die abgebildeten Spektren und Chromatogramme wurden unter Verwendung der Originaldaten erstellt.

Literaturhinweise sind unter Aufführung von maximal den beiden erstgenannten Autoren und des Erscheinungsjahres in Klammern angegeben und im Literaturverzeichnis vollständig hinterlegt.

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ oder „™“ gekennzeichnet.

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin-D
AAV	adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Krankheit (<i>alzheimer's disease</i>)
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AK	Antikörper
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like complex</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	amyloides Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
aq.	Aqua
AS	Aminosäure
ATV	<i>antibiotic trypsin versen</i>
AU	<i>absorbance Unit</i>
BACE	<i>beta-site APP-cleaving enzyme</i>
BBB	Bluthirnschranke
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kapsidprotein
CAS	cis-aktive Sequenz
cds	<i>coding sequence</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
cPPT	zentraler Polypurintrakt
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
ddNTP	Didesoxynukleotid
dNTP	Desoxynukleotid
dest.	destilliert
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
d.h.	dass heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	Todesrezeptor (<i>death receptor</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
EB	Ethidiumbromid
EC ₅₀	effect concentration ₅₀
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EGFP	<i>enhanced green fluorescing protein</i>
env	Hüllprotein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (et alii)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAD	<i>familiar alzheimer's disease</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FV	Foamyvirus
g	Gramm
gag	Kapsidprotein
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GR-Box	Glycin-Arginin-reiche Box
h	Stunde(n)
hAPP	<i>human amyloid precursor protein</i>
HE	Heparin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure-Natriumsalz
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Heparansulfat
HSV	Herpes-simplex-Virus
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i>
IN	Integrase
IP	interner Promoter

IRES	interne Ribosomenbindungsstelle
IRT	intrazelluläre Retrotransposition
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
LOX	Lipoxygenase
LP	Leaderpeptid
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeats</i>
LV	Lentivirus
M	Molar (mol/L)
mA	Milliamper
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter
MLV	Murines Leukämie Virus
mM	Millimolar (mmol/L)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear-Factor-Kappa-B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
orf	open reading frame (offener Leserahmen)
p. a.	pro analysis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PES	Pol-Enkapsidierungssequenz
PFV	Prototypisches Foamyvirus
pg	Picogramm
P-gp	P-Glycoprotein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PKC	Proteinkinase C
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLA2	Phospholipase A2
pmol	Pikomol
pol	Polymerase
ppm	parts per million
PPP	Proteinprobenpuffer
PR	Protease
PSEN-1, -2	Präsenilin 1, 2
rlu	<i>relative luciferase units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	RibonukleaseH
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RV	Retrovirus
SAD	<i>sporadic alzheimer's disease</i>
sAPP	<i>soluble amyloid precursor protein</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
sec.	Sekunde(n)
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SO	Superoxidanionen
SSC	<i>side scatter</i>
st ADAM10	<i>short a disintegrin and metalloprotease10</i>
SU	Oberflächenuntereinheit
sw	<i>swedish mutation</i>
t	Zeit (<i>time</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
Tas	Transaktivator von Spumaviren
TEMED	N, N-N, N-Tetramethyl-Ethylendiamin

TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TM	Transmembranuntereinheit
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	atomare Masseneinheit (unified mass unit)
U	Unit
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vif	<i>virion infectivity factor</i>
VLP	<i>virus like particle</i>
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B	zum Beispiel
μ	Mikro

Zusammenfassung

Aufgrund ihrer gut dokumentierten, umfangreichen gesundheitsfördernden biologischen Aktivitäten wird den Flavonoiden eine große Bedeutung zugeordnet. Die Ergebnisse von *in vitro*- und Tierstudien deuten zudem darauf hin, dass diese Verbindungen bei der Prävention und Therapie von Erkrankungen wie Krebs oder Alzheimer Krankheit (AD) positive Effekte zeigen. Zur besseren Charakterisierung der Interaktion von Flavonoiden mit Krebszellen wurden von uns die Cytotoxizität verschiedener Flavonoide auf T-Lymphoblastomzellen untersucht und Strukturelemente identifiziert, welche für einen Flavonoid-induzierten Zelltod relevant sind.

Unter den untersuchten 23 Flavonoiden zeigte das Chalcon Xanthohumol mit einem EC_{50} -Wert von 20,5 μM die höchste Cytotoxizität. Bezüglich der Flavonoid-Klassen zeigten die Flavone und Chalone mit EC_{50} -Werten zwischen 20–100 μM (nach 24h) die größten Effekte. Die geringste Cytotoxizität wiesen die Flavanone und Flavanole auf. Für diese wurden nach 24 h EC_{50} -Werte von 200–4000 μM ermittelt. Bei Studien zu Strukturwirkungsbeziehungen wurden folgende cytotoxizitätssteigernde Strukturmerkmale der Flavonoide ermittelt: C_2 - C_3 -Doppelbindung, C_4 -Carbonylgruppe, ortho- im Vergleich zu meta-Hydroxylierung am B-Ring und Methylierung, sowie Glucuronidierung. Zudem ist eine Hydroxygruppe an C_3 -Position des Flavonoid-Moleküls mit einer Reduktion der Cytotoxizität assoziiert.

Unsere weiteren Studien waren der potentiell neuroprotektiven Wirkung von Flavonoiden gewidmet. Amyloide Plaques (als charakteristisches Merkmal der Alzheimer Krankheit, AD) bestehen aus $A\beta$, welches aus der Spaltung des amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch β - und γ -Sekretasen resultiert. Neben diesem amyloidogenen Weg gibt es einen zweiten Prozessierungsweg. Hierbei erfolgt die Spaltung durch die α -Sekretase, wobei kein $A\beta$ entsteht und stattdessen das als neuroprotektiv angesehene, lösliche sAPP α gebildet wird. Die sowohl in neuronalen Zellkulturen als auch in transgenen Alzheimer-Mäusen (TgAPP_{sw}) festgestellte Erhöhung der sAPP α Produktion und Reduktion von $A\beta$ -Bildung wurden mit Aktivitäts- und Expressionssteigerung der α -Sekretase ADAM-10 assoziiert. Um herauszufinden, ob Flavonoide eine neuroprotektive Wirkung zeigen, wurden erste Vorbereitungen für ein Flavonoid-Screening mit einer sowohl hAPP als auch ADAM-10 stabil transfizierten HT1080 Zellen getroffen. Dies beinhaltete die Suche nach einer potenten siRNA/shRNA und einem effektiven Flavonoid.

Für die Bestimmung der Exkretion von sAPP α und sAPP von SH-SY5Y Zellen unter Flavonoideneinfluss wurde ein ELISA-System mit vorhandenen Antikörpern aufgebaut und

die Versuchsbedingungen ermittelt. Sieben Flavonoide wurden getestet. Es zeigte sich, dass Taxifolin, Catechin und Naringenin im Vergleich zur Kontrolle eine bis zu 40 % geringere sAPP-Sekretion zur Folge hatten, während Quercetin und Luteolin eine bis zu 150 % Erhöhung der sAPP-Sekretion bewirkten. Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich auch bei der Betrachtung der sAPP α -Sekretion. Während Zellen, die mit Luteolin, Naringenin und Pelargonidin behandelt wurden, nur noch 10-73 % der sAPP α -Menge im Vergleich zur Kontrolle ins Medium abgaben, hatte die Verwendung von Quercetin und Catechin eine Steigerung von über 100% zur Folge. Durch Einsatz von EGCG ließ sich die sAPP α -Sekretion um 20% steigern. Taxifolin hatte keinen Einfluss auf die gebildete sAPP α -Menge.

Um den Einfluss von Flavonoiden auf ADAM-10 zu verifizieren, beinhaltete diese Arbeit auch die Suche nach einer potenten siRNA/shRNA von ADAM-10. Um die Aktivität der shRNAs auf die Expression von ADAM-10 zu charakterisieren, wurden jeweils geeignete Plasmide, die für die entsprechende Zielsequenz (ADAM-10) bzw. für die shRNAs gegen ADAM-10 kodieren, kloniert. Die Knockdown-Aktivität von vier shRNA-Sequenzen wurde mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay ermittelt, wobei als Zielsequenzen, die entsprechenden Kurzzielsequenzen (KT), ein EST-Clone von ADAM-10 und die vollständige ADAM-10-Sequenz verwendet wurden. Drei der getesteten shRNA-Sequenzen erreichten eine Reduktion der hADAM10-Expression von über 70%.

Die shRNA-Expressionskassetten der effektiven pAAV_shRNA Sequenzen wurden in virale Vektorplasmide inkloniert. Daraus wurden Vektorpartikel verpackt und diese wurden über HPLC mittels einer POROS HE-Säule gereinigt. Um später auch *in vivo*-Experimente durchführen zu können, wurden ferner die stereotaktische Injektion ins murine Gehirn mittels stereotaktischen Rahmens etabliert und ein transgener AD-Mäusestamm (APP_{SwInd}) gezüchtet. Dies beinhaltete die Genotypisierung der Mäuse und histologische Untersuchungen.

Nach ausführlicher Kenntnis der wissenschaftlichen Wettbewerbssituation kamen wir, vor allem aufgrund der schon weit fortgeschrittenen Zeit, zum Entschluss den erarbeiteten Kenntnisstand nicht weiter für eigene Studien zu nutzen. Da sich im Zuge der AAV-HPLC-Analytik Hinweise auf die Natur des bisher unbekanntes und langgesuchten zellulären Rezeptors für Foamyviren ergeben haben, wurde beschlossen, die Studien zum foamyviralen Rezeptor zu vertiefen.

Es wurden deshalb im zweiten Teil der Arbeit Experimente durchgeführt, um die Rolle von Heparansulfat (HS) bei der foamyviralen Anbindung an die Wirtszelle zu untersuchen. Foamyviren (FV) sind Spumaviren und gehören zur Familie der Retroviren. Bei unseren Studien wurde die Bindung von FV an Heparin, die Korrelation der Suszeptibilität verschiedener Zellen mit zellulärem HS und die Reduktion der Infektion durch lösliches Heparin sowie durch enzymatischen HS-Abbau festgestellt. Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass HS in die Bindung der FV an die Zielzelle involviert ist und sie legen nahe, dass HS von FV als zellulärer Rezeptor für den Eintritt genutzt wird. Neben HS scheint es aber noch weitere, bisher nicht identifizierte Rezeptoren zu geben, die ebenfalls einen Eintritt in die Zelle ermöglichen können. Letzteres wird vor allem durch die Beobachtung nahegelegt, dass sich HS-defiziente Zellen wie CRL-2242 ebenfalls - wenn auch deutlich schlechter als alle anderen geprüften Zellen - transduzieren lassen.

Summary

Flavonoids have well-documented, beneficial biological effects. Furthermore different *in vitro*- and *animal*-experiments indicate that these compounds demonstrate positive effects in prevention and therapy of diseases, like cancer or neurodegenerative diseases. In order to characterize the interactions between flavonoids and cancer cells, we examined the cytotoxicity of different flavonoids on a human leukemia cell line and identified structure elements that could be associated to flavonoid-induced cell death. Among the 23 investigated flavonoids the chalcon xanthohumol displayed with an EC₅₀-value of 20,5 µM the highest cytotoxicity. Regarding the different classes of flavonoids, flavones or chalcones demonstrated with EC₅₀-values between 20-100 µM (after 24 h) the most toxic effects. The weakest cytotoxicity showed flavanones and flavanols. For these classes of flavonoids EC₅₀-values between 200-4000 µM (after 24 h) were determined.

Structure-activity relationships for enhanced cytotoxicity were discovered for: C₂-C₃ double bond, C₄-carbonyl-group, ortho- compared to meta-hydroxylation in the B-ring, O-methylation and glucuronidation. Furthermore, the presence of a C₃-hydroxyl-group is connected with reduction of cytotoxicity.

Our further studies were dedicated to the potentially neuroprotective activity of flavonoids. Amyloid plaques (as one hallmark of Alzheimer's disease, AD) consist of Aβ, which are generated by cleavage of APP through β- und γ-secretases. This so-called amyloidogenic pathway can be differentiated from a non-amyloidogenic pathway, by which APP is cleaved by α-secretases to form soluble, nonamyloidogenic sAPPα. It has been described that in neuronal cells as well as in transgenic AD mice EGCG increases levels of sAPPα- and reduces Aβ-production. This influence of EGCG was associated with enhanced activity and expression of the α-secretase, ADAM-10. To find out, if flavonoids showed neuroprotective activity, preliminary work for a later flavonoid screening on hAPP and ADAM-10 with stably-transfected HT1080 cells was done. This includes the determination of flavonoid candidates and research of effective siRNAs towards ADAM-10. In order to investigate the sAPPα- and sAPP-release of SH-SY5Y-cells influenced by flavonoids, an ELISA-system was established. After configuration of the optimal experimental setup, seven flavonoids were analyzed. In comparison with the control it was observed, that taxifolin, catechin and naringenin showed a 40 % reduced sAPP-expression, whereas quercetin and luteolin caused enhanced sAPP-secretion up to 150%.

Relating to sAPP α it was discovered that luteolin, naringenin and perlagonidin reduced the amount of sAPP α to 10-73 % compared to the control. On the other hand quercetin, catechin and EGCG increased the expression of sAPP α . No effect of taxifolin could be detected.

To verify the involvement of flavonoids on ADAM-10 expression, potent siRNA/shRNA towards ADAM-10 were identified and their knockdown-activity was characterized. Different plasmids, encoding for the target gene ADAM-10 or different shRNA towards ADAM-10, were cloned. The knockdown activity of four shRNA sequences, using short-targets-, EST Clone of hADAM-10- and hADAM-10- sequence as target sequences, were analyzed by using a plasmid-based luciferase-reporter assay. Three observed shRNAs showed a knockdown activity on hADAM-10 expression of greater than 70 %.

Furthermore, the shRNA-expression cassettes of the effective pAAV_shRNA sequences were cloned in viral vector plasmids. Afterwards vector particles were packaged and purified by HPLC using a POROS HE column. To do some *in vivo*-experiments in future, also the stereotactical injection system in the mouse brain with stereotactic frame was established and transgenic mice were cultured. This included the genotyping of the mice and histological analyses.

Attributed to a very competitive scientific field in this research area in combination with a time schedule of this work, we decided not to proceed in this area of research. Instead, we got evidence for the nature of the previously unknown cellular receptor for foamy viruses during the experiments on AAV-HPLC analytic. We therefore decided to intensify this research to discover the foamyviral receptor.

We therefore investigated the role of heparansulfat (HS) in attachment of FV to host cell. Foamyviruses (FV) are retroviruses and belong to the subfamily of spumaretroviruses. In our studies we discovered the binding of FV on heparin, the correlation between susceptibility of different cells and cellular HS and the reduction of infectivity through soluble heparin and through enzymatic HS-degradation.

In conclusion the results showed that HS is involved in cellular attachment of FV and they indicate that FV use HS as cellular receptor. Nevertheless, additional cellular receptors for FV entry seem to exist, mainly because of the discovery that HS-deficient cells could be transduced with FV - although at markedly-reduced levels - compared to HS-positive cells.

1 Einleitung und Zielsetzung

Flavonoide sind polyphenolische sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, welche aufgrund ihrer umfangreichen gesundheitsfördernden biologischen Aktivitäten in den letzten Jahren eine große Bedeutung erlangt haben. Unter anderem wurde eine anticancerogene und neuroprotektive Wirkung dieser Verbindungen beobachtet. Die anticancerogenen Effekte beruhen u.a. darauf, dass manche Flavonoide cytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen zeigen. Da unkontrollierte Proliferation mutierter Zellen aufgrund fehlender Apoptosemechanismen in engem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung gesehen wird, ist es ein Ziel der Krebsforschung, kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen herbeizuführen (Hanahan *et al.* 2000). Um herauszufinden, welche Strukturelemente für einen Flavonoid-induzierten Zelltod relevant sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die cytotoxische Aktivität von 23 Flavonoiden an der T-Lymphoblasten Jurkat E61-Zelllinie untersucht.

In den letzten zehn Jahren hat sich die Forschung bezüglich neuroprotektiver Effekte von Polyphenolen in der Nahrung in Verbindung mit der Pathogenese der Alzheimer Krankheit (AD) beträchtlich entwickelt (Ramassamy *et al.* 2006, Singh *et al.* 2008). So hat man gezeigt, dass einzelne Flavonoide oder Pflanzenextrakte in der Lage sind, über Regulation des amyloid-Vorläuferprotein (APP)-Spaltungsprozesses Einfluss auf AD-Pathomechanismen zu nehmen (Kim *et al.* 2010, Ramassamy *et al.* 2006). Der Schwerpunkt der bisher betrachteten Flavonoide liegt bei Epigallocatechingallat (EGCG). Dieses stimuliert den nicht amyloidogenen Weg, so dass die Entstehung von toxischen A β bzw. A β -Plaques verhindert wird. Die sowohl in neuronalen Zellkulturen als auch in transgenen Alzheimer-Mäusen (TgAPP_{sw}) festgestellte Erhöhung der sAPP α -Produktion und Reduktion von A β -Bildung (Rezai-Zadeh *et al.* 2005) wurden von Obregon und Mitarbeitern (2006) mit Aktivitäts- und Expressionssteigerung der α -Sekretase ADAM-10 assoziiert. Da bisher hauptsächlich Studien existieren, welche *in vivo* EGCG in hohen Dosen ip. in transgenen Mäusen verabreichen, war das anfängliche Ziel der Aufbau und die Durchführung einer Fütterungsstudie, in der transgene AD-Mäuse EGCG oral im Trinkwasser niedrig dosiert über einen längeren Zeitraum zu sich nehmen sollten. Um zu ermitteln, ob eine Verzögerung bzw. Verbesserung des Krankheitsverlaufs eintritt, wurde geplant, die murinen Gehirne auf APP-Spaltprodukte, A β -Plaques und ADAM-10 zu untersuchen. Da aber Rezai-Zadeh und Mitarbeiter Anfang 2008 die Resultate einer fast identisch konzipierten Studie veröffentlichten, wurde der Fokus der Arbeiten zunächst auf die Entwicklung eines Flavonoid-Screenings gelegt, mit dem Ziel herauszufinden, ob auch

andere Flavonoide vergleichbare Effekte auf APP und ADAM-10 wie EGCG aufweisen oder ob anhand der Flavonoid-Struktur eine neuroprotektive Wirkung ableitbar ist. Bei Verbindungen, die bei der humanen Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y die sAPP α -Produktion stimulieren, sollte mittels shRNA vermittelten Knockdown über AAV-Vektoren die Rolle von ADAM-10 unter Verwendung von sowohl hAPP als auch ADAM-10 stabil transfizierter HT1080 Zellen identifiziert werden.

Im Sinne unseres oben genannten Ziels galt es dann, Vorbereitungen für diese Experimente (*in vitro* und *in vivo*) zu treffen. Dies beinhaltete die Suche nach einer potenten siRNA/shRNA und einem effektiven Flavonoid. Um später auch *in vivo*-Experimente durchführen zu können, wurden in dieser Arbeit auch erste Vorbereitungen für anstehende Tierversuche getroffen. Dies beinhaltete die AAV-Produktion und Aufreinigung mittels HPLC, die Etablierung der stereotaktischen Injektion und die Aufzucht eines transgenen AD-Mäusestamms (APP_{SwInd}).

Nach ausführlicher Kenntnis der wissenschaftlichen Wettbewerbssituation kamen wir, vor allem aufgrund der schon weit fortgeschrittenen Zeit, zum Entschluss den erarbeiteten Kenntnisstand nicht weiter für eigene Studien zu nutzen. Da sich im Zuge der AAV-HPLC-Analytik Hinweise auf die Natur des bisher unbekanntes und langgesuchten zellulären Rezeptors für Foamyviren ergeben haben, wurde beschlossen, die Studien zum foamyviralen Rezeptor zu vertiefen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden demzufolge Experimente zur Ermittlung eines foamyviralen Rezeptors durchgeführt. Der zelluläre Rezeptor für Foamyviren (FV) ist bisher noch nicht identifiziert worden. Aufgrund des großen Wirtsspektrums und des breiten Zelltropismus der FV geht man davon aus, dass es sich dabei um ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenmolekül handelt (Hill *et al.* 1999; Rethwilm 2007; Picard-Maureau *et al.* 2003). Ein weit verbreitetes Oberflächenmolekül ist das Glucosaminglycan (GAG), Heparansulfat (HS). Für eine Vielzahl von Viren ist dieses Molekül bereits als Corezeptor beschrieben worden, z. B. für das Sindbisvirus (Byrnes und Griffin 1998), das Vaccinia-Virus (Chung *et al.* 1998), das Humane-Herpesvirus 8 (HHV8) (Akula *et al.* 2004) oder das Herpes simplex Virus 1 (O'Donnell und Shukla 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte Heparansulfat als möglicher Rezeptor für FV untersucht werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Flavonoiden

Flavonoide gehören zu der Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Im Gegensatz zu primären (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Vitamine, Mineralstoffe), die am Energiestoffwechsel der Pflanze beteiligt sind, werden die im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildeten, biologisch aktiven Stoffe auch als „nicht-nutritive bioaktive“ Verbindungen bezeichnet (Pechanek 2006). Sie dienen der Pflanze u.a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und aufgrund ihrer Farbe und ihres Duftes als Lockstoffe (Wollersen 2004). Diese auch als Phytochemicals bezeichneten Pflanzeninhaltsstoffe kommen nur in geringen Mengen in der Pflanze vor und weisen zahlreiche unterschiedliche chemische Strukturen auf. Man teilt sie in verschiedene Gruppen ein: Polyphenole, Carotinoide, Phytoöstrogene, Glucosinolate, Sulfide, Monoterpene, Saponine, Protease-Inhibitoren, Phytosterine und Lektine. Zwar stellen nach derzeitigem Kenntnisstand sekundäre Pflanzenstoffe für den Menschen keine essenziellen Nährstoffe dar, jedoch haben sie Einfluss auf viele Stoffwechselprozesse und die zahlreich beschriebenen gesundheitsfördernden Wirkungen erhöhen den Stellenwert für den Menschen (Oberritter 1998, Wollersen 2004, <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=1019>, DGE 2010). Vor allem ist hier die Klasse der Polyphenole von Bedeutung. Für diese sind u.a. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulatorische und entzündungshemmende Eigenschaften beschrieben (Watzl und Leitzmann 1999, Scalbert *et al.* 2005a und b). Die bedeutendsten Vertreter der Polyphenole sind die flavonoiden Inhaltsstoffe (Harborne 1994). Dazu gehört eine Vielzahl von Verbindungen, die alle das Grundgerüst C₆-C₃-C₆ aufweisen. Diese Substanzen werden abhängig von ihrer strukturellen Anordnung in drei Gruppen eingeteilt: die Flavonoide (2-Benzopyrane), die Isoflavone (3-Benzopyrane) und die Neoflavonoide (4-Benzopyrane). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Flavonoide behandelt werden, wird im Folgenden nur auf diese Substanzklasse näher eingegangen.

Die Grundstruktur der Flavonoide ist das 2-Phenylchroman (Flavan). Es besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem heterocyclischen C-Ring (Abb. 2.1).

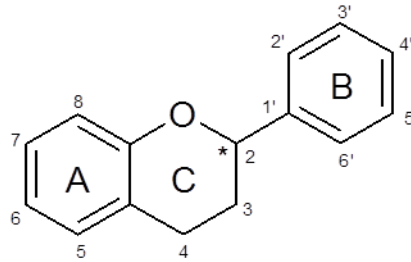


Abb. 2.1: Grundstruktur der Flavonoide (2-Phenylbenzodihydropyran)

Je nach Oxidationszustand oder Sättigungsgrad der Kohlenstoffe im C-Ring erfolgt eine Unterteilung in weitere Untergruppen, wie zum Beispiel Flavone (3-Oxo-flav-2-ene), Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene), Flavanole (3-Hydroxy-flavane), Flavanone (4-Oxo-flavane), Chalcone und Anthocyanidine (Abb. 2.2). Aufgrund eines unterschiedlichen Hydroxylierungsgrades und Methoxylierungsgrades, sowie durch Konjugation mit Zucker-, Sulfat- oder Acetylresten ergibt sich eine große Substanzvielfalt (Harborne und Williams 2000). So sind insgesamt bereits über 9000 Verbindungen bekannt (Williams und Grayer 2004).

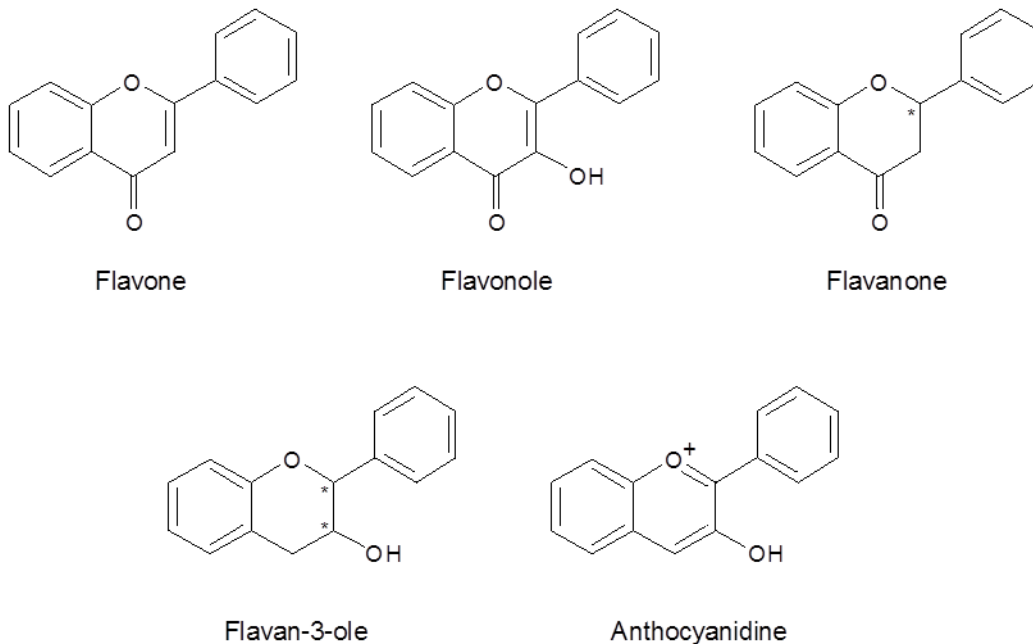


Abb. 2.2: Strukturmerkmale ausgewählter Flavonoid-Unterklassen

Flavonoide sind in vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln enthalten. Sie kommen vor allem in Obst und Gemüse, aber auch in Kräutern, Getreide und Getränken, wie z.B. Rotwein oder Tee, vor (Buschmann 2002). Der Polyphenolgehalt in diesen Nahrungsmitteln variiert allerdings stark und die einzelnen Flavonoide sind sehr unterschiedlich verteilt. So findet

man die Flavanole hauptsächlich in Tee, Rotwein und Obst und die Glycoside der Flavone (Luteolin, Apigenin) z.B. in Sellerie (Scalbert und Williamson 2000; Erlund 2004). Während die Glycoside der Flavonole in mehreren Obstarten und Gemüse vorkommen, sind Anthocyanidine vorwiegend in Beerenobst und Flavanone als Glycoside in Zitrusfrüchten vertreten (Manach *et al.* 2004; Herrmann 1990; Erlund 2004). Flavan-3-ole liegen in der Nahrung, wie z.B. in grünem und schwarzem Tee, als Monomere, Oligomere und Polymere vor. Die Monomere Catechin und Epicatechin können mit Gallussäure verestert auftreten, während glycosidische Verbindungen jedoch nie vorkommen (Gu *et al.* 2003). Hauptsächlich erfolgt die Aufnahme von Flavonoiden u. a. durch Tee, Zwiebeln und Äpfel (Hertog 1993). Eine Angabe zur täglichen Aufnahmemenge von Flavonoiden ist schwierig. Während in einer Studie von 1976 aus den Vereinigten Staaten pro Person eine tägliche Gesamtflavonoidzufuhr (Glycoside) von 1g berechnet wurde, hat man später die tägliche Zufuhr von Flavonolen und Flavonen in Deutschland auf 11,5 mg geschätzt (Böhm *et al.* 1998).

2.2 Metabolismus und Bioverfügbarkeit

Der Begriff der „Bioverfügbarkeit“ beschreibt, mit welcher Geschwindigkeit und in welchem Ausmaß Stoffe nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt (GIT) den Wirkort erreichen. Um die Bioverfügbarkeit der Flavonoide zu bestimmen, sind Informationen über Aufnahme und Metabolisierung der Polyphenole von entscheidender Bedeutung. Die Bioverfügbarkeit ist von verschiedenen Parametern abhängig, wie z. B. Molekülgröße, Lipophilie, Löslichkeit, Passagezeit im GIT, Membranpermeabilität, pH-Wert und *first pass* Metabolismus (Higuchi *et al.* 1981, Stahl *et al.* 2002, Spencer 2003). Ferner wird sie beeinflusst durch Digestion, Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination der Stoffe. Zudem müssen die Dosis, Darreichungsform und eventuell vorhandene individuelle Unterschiede berücksichtigt werden (Erlund *et al.* 2001, Lesse *et al.* 2004).

Hauptsächlich findet Absorption und Metabolisierung der Flavonoide im Dün- bzw. Dickdarm statt. Zuvor unterliegen die mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide bzw. Flavonoidglycoside den Bedingungen des Speichels und des Magens. Während hydrolytische Reaktivität gegenüber den glycosidischen Verbindungen der Flavonoide durch Enzyme der bakteriellen Mundflora und die Abspaltung der Gallussäure-Gruppe der Flavan-3-ol-gallatester beschrieben ist (Nakamura und Slots 1983, Walle *et al.* 2005), ist bekannt, dass Flavonoidglycoside im sauren Milieu des Magens stabil sind und keiner Hydrolyse durch Enzyme unterliegen (Vallejo *et al.* 2004, Boyer *et al.* 2005, Bermudez-Soto *et al.* 2007). Im Gegensatz hierzu sind polyphenolische Verbindungen im schwach alkalischen Milieu des Duodenumsekrets teilweise instabil. Neben Abbaureaktionen sind

Isomerisierung und Entstehung von Metaboliten dokumentiert (Bermudez-Soto *et al.* 2007). Die Absorption der Flavonoide ist im Dünndarm u.a. abhängig von Aufnahmekapazität, Konjugation und den oben genannten physikochemischen Faktoren. Im Dickdarm kommt es auf das Metabolisierungspotential der bakteriellen Mikroflora und die Absorption der dabei entstehenden Metabolite an. Zudem spielt die Absorption nach hepatischer Biotransformation bzw. Konjugation eine Rolle (Lin *et al.* 1999b, Carbonaro und Grant 2005). Damit glycosylierte Flavonoide intestinal absorbiert werden können, werden sie entweder im Dünndarm auf enzymatischem Wege oder im Dickdarm auf bakteriellem Weg deglycosyliert. Anschließend erfolgt die Absorption durch die Enterozyten über passive Diffusion der Aglycone (Day *et al.* 2000a, Nemeth *et al.* 2003). Eine untergeordnete Rolle spielt ein aktiver Transport über den Na⁺-abhängigen intestinalen D-Glucosetransporter in den Enterozyten (SGLT-1) und nachfolgende Freisetzung des Aglycons (Walgren *et al.* 2000b, Wolfram *et al.* 2002). Flavan-3-ole, welche nativ keinen Zuckerrest aufweisen und stattdessen häufig mit Gallussäure acyliert sind, können ohne vorherige Dekonjugation oder Hydrolyse durch die Membran passiv diffundieren (Gu *et al.* 2003).

Die Metabolisierungsreaktionen der Flavonoide im GIT (hauptsächlich Dünndarm und Leber) erfolgen enzymatisch. Hauptsächlich sind Glucuronidierung, Sulfatierung oder O-Methylierung dokumentiert (Stahl *et al.* 2002, Scalbert und Williamson 2000). Die Exkretion der konjugierten Flavonoide und Metabolite erfolgt in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse über die Galle (>300 Da) oder über den Urin, wobei der Transport über die Galle den Hauptweg der Ausscheidung darstellt (Griffith 1982). Da die meisten Polyphenole kaum vom Darm absorbiert, mehrfach metabolisiert und rasch ausgeschieden werden, ist zum Einen die Identifizierung der aktiven Form häufig nicht trivial, zum Anderen resultieren sehr niedrige Plasmakonzentrationen, deren biologische Aktivität fraglich ist (Singh *et al.* 2008).

Um eine neuroprotektive Wirkung hervorrufen oder eine antioxidative Wirkung im Gehirn entfalten zu können, bedarf es zusätzlich der Überwindung der Bluthirnschranke, welche aus dem Endothelium des Gehirns gebildet wird. Obwohl viele *in vivo*-Studien eine Flavonoid-vermittelte Neuroprotektion dokumentieren, ist wenig bekannt darüber, wie und in welcher Form und Menge diese Verbindungen die Schranke überwinden (Singh *et al.* 2008). Bisher konnte ein Rezeptor für Epigallocatechingallat (EGCG), der 67kDa Laminin Rezeptor auf vaskulären Zellen, identifiziert werden (Tachibana *et al.* 2004). Derartige Rezeptoren und Transporter sind bisher im Gehirn nicht gefunden worden (Ramassamy *et al.* 2006). Mit Hilfe eines *in vitro*-Modells der Blut-Hirn-Schranke (BBB-model, von *engl.* blood brain barrier) war eine geringe Permeabilität von Naringenin, Hesperetin und ihren glucuronierten Konjugaten, sowie den Anthocyanidinen Cyanidin-3-rutinosid und

Pelargonidin-3-glycosid feststellbar (Youdim 2003). *In vivo*-Studien mit Ratten zeigten, dass bei intravenöser Gabe von Naringenin (20mg/kg), sowohl das Aglycon als auch das Glucuronid im Kortex nachweisbar waren (Peng *et al.* 1998), während bei Gabe von Hesperetin (50mg/kg) nur die Ausgangsverbindung selbst detektiert werden konnte (Tsai und Chen 2000). Eine ähnliche Situation wie bei Naringenin wird bei oraler Gabe von Epicatechin (100mg/kg) beschrieben (Mohsen *et al.* 2002). Anhand Tritium-markierter EGCG-Moleküle wurde festgestellt, dass nach oraler Gabe EGCG ins Gehirn der Maus gelangt (Suganuma *et al.* 1998).

2.3 Biologische Wirkungen der Flavonoide

Aufgrund zahlreicher gesundheitsrelevanter Effekte kommt den Flavonoiden eine große Bedeutung zu. In vielen *in vitro*-bzw. *in vivo*-Studien konnten antioxidative, antimikrobielle (di Carlo *et al.* 1999, Middleton *et al.* 2000), antivirale, antiallergische, antiphlogistische (Brownson *et al.* 2002, Mouria *et al.* 2002) sowie antiproliferative und antikarzinogene Aktivitäten (Birt *et al.* 2001, Le Marchand 2002, Lambert *et al.* 2005) nachgewiesen werden. Zudem hat man in den letzten Jahren immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte beobachtet. Weiterhin haben viele epidemiologische Studien ergeben, dass Flavonoide verschiedene Erkrankungen bzw. das Risiko für deren Entstehung verhindern können (Yochum *et al.* 1999, Hirvonen *et al.* 2001, DGE 2008). Im Folgenden wird auf biologische Eigenschaften der Flavonoide, die das Potenzial zur Prävention und Therapie von Krebs- und neurodegenerativen Erkrankungen haben könnten, näher eingegangen.

2.3.1 Cytotoxische Effekte

Cytotoxizität ist die Fähigkeit einiger chemischer Substanzen, Gewebezellen zu schädigen bzw. Prozesse in Gang zu setzen, welche schließlich zum Untergang der Zelle führen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen von Zelltod: Nekrose und Apoptose. Diese unterscheiden sich in ihren zellbiologischen Vorgängen. Nekrose ist meist ein pathologischer und häufig durch extreme Abweichung von physiologischen Bedingungen ausgelöster Vorgang. Nach Anschwellen der Zelle kommt es schließlich zum Verlust der Zellmembranintegrität. Dadurch werden Enzyme und Zellorganelle freigesetzt, die das umgebende Gewebe schädigen. Lokale Entzündungsprozesse sind die Folge, wobei die nekrotischen Zellen durch Makrophagen beseitigt werden (Golstein *et al.* 1991, Hetts 1998). Die häufigere Form des Zelltodes ist die Apoptose. Da die betroffene Zelle selbst

aktiv Veränderungen der Zelle steuert, die zu einem Absterben der Zelle führen, wird dieser Prozess auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt z.B. durch sogenannte Todesrezeptoren (*engl.* death receptors, DR) (Chen *et al.* 2002), reaktive Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS) oder chemische Agenzien (Hetts, 1998). Nach Schrumpfung der Zelle, kommt es schließlich zur Abschnürung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen, die schließlich von Makrophagen aufgenommen werden (Voll *et al.* 1997, Devitt *et al.* 1998). Da bis zu diesem Zeitpunkt die Cytoplasmamembran intakt bleibt, erfolgt keine Entzündungsreaktion. Es kommt jedoch schon zu Beginn der Apoptose zu einer charakteristischen Umlagerung des Phosphatidylserin-Moleküls von der cytoplasmatischen auf die extrazelluläre Membranseite (Voll *et al.* 1997, Devitt *et al.* 1998, Fadok *et al.* 2000).

Der regulierte Zelltod verläuft über definierte Signaltransduktionswege. Bestimmte Cystein-Proteasen, die Caspasen, sind an der biochemischen Kaskade beteiligt und bedingen schließlich die morphologischen Veränderungen (Chen und Wang 2002). Hierbei werden zwei unterschiedliche Vorgänge beschrieben: Der extrinsische Weg, der über Todesrezeptoren verläuft und der intrinsische, mitochondriale Weg. Die Todesrezeptoren gehören zu der TNF-Rezeptorfamilie. Der extrinsische Weg wird durch Aktivierung der Todesrezeptoren durch ihre natürlichen Liganden, wie z. B. Tumornekrosefaktor (TNF) oder Fas-Ligand initiiert (Chen und Wang 2002, Schulze-Osthoff *et al.* 1998, Smith *et al.* 1994). Dies hat die Aktivierung der Caspase-8 zur Folge. Dadurch kommt es zur Beeinflussung weiterer Caspasen, welche dann als Proteasen agieren. Die Spaltung verschiedener Struktur- und Signalproteine, Kinasen, DNAsen, sowie Proteine des Zellzyklus und der DNA-Reparatur (z.B. PARP = *Poly-ADP-Ribose-Polymerase*) bedingen schließlich den Abbau der Zelle (Chen und Wang 2002, Schulze-Osthoff *et al.* 1998, Arends *et al.* 1999). Initiator des intrinsischen Weges ist eine Schädigung der Mitochondrien z.B. durch Tumorsuppressoren, wie p53. Dieser Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird, stimuliert die Expression proapoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie. Dadurch kommt es zur Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Chen und Wang 2002, Schulze-Osthoff *et al.* 1998). Dies bewirkt die Aktivierung der Caspase-9, die wiederum die Caspasen-Kaskade mit ihren entsprechenden Folgen auslöst (Liu *et al.* 2008, Fadok *et al.* 2000, Fadok *et al.* 2001, Henson *et al.* 2001). Zusätzlich zur Caspase-vermittelten Unterdrückung der DNA-Reparatur kommt es aufgrund aktivierter Nukleasen zur Fragmentierung der DNA (Wajant *et al.* 2003).

Im physiologischen Zustand ist ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung bzw. Wachstum und Zelltod lebenswichtig und wird präzise reguliert. Dabei werden geschädigte oder

überflüssige Zellen durch Apoptose entsorgt. Störungen dieses Gleichgewichts können zu schweren Krankheiten führen. Während zum Beispiel die Apoptose von gewissen Gehirnneuronen in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen (Sathasivam *et al.* 2001, Thompson *et al.* 1995), wird unkontrollierte Proliferation mutierter Zellen aufgrund fehlender Apoptosemechanismen in engem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung gesehen (Hanahan *et al.* 2000). Daher ist es ein Ziel der Krebsforschung, kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen herbeizuführen.

Flavonoide können Apoptose in Krebszellen sowohl über den extrinsischen als auch intrinsischen Weg fördern. Auch eine Aktivität gegenüber gesunden Zellen wird beschrieben (Chang *et al.* 2008). Abhängig von der Flavonoid-Struktur und dem Zelltyp werden unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. So steigert z.B. Luteolin die Expression des Todesrezeptors DR 5 in Cervix- und Prostata-Krebszellen. Luteolin zeigt jedoch gegenüber menschlichen peripheren Blutzellen keine Cytotoxizität und keine Beeinflussung des DR 5-Rezeptors (Horinaka *et al.* 2005). Weiterhin kann Luteolin über Expressionsteigerung des Todesrezeptors Fas (auch CD95 genannt) Zelltod in humanen Hepatomzellen hervorrufen (Selvendiran *et al.* 2006). Aufgrund der Fähigkeit der Flavonoide, DNA-Topoisomerasen zu hemmen, kommt es zur Schädigung der DNA und Aktivierung von p53 und somit zur Beeinflussung der Apoptose über den intrinsischen Weg (Liu *et al.* 2008).

2.3.2 Antioxidative Eigenschaften

Ein weiterer gesundheitsrelevanter Effekt der Flavonoide basiert auf ihrer antioxidativen Wirkung. In einer Vielzahl von Studien konnten antioxidative Effekte flavonoidischer Verbindungen nachgewiesen werden (Rice-Evans *et al.* 1996, Bagchi *et al.* 1997, Plumb *et al.* 1998). Die antioxidative Wirkung beruht auf der Fähigkeit reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS) abzufangen oder deren Entstehung zu verhindern. Diese entstehen im menschlichen Organismus während normaler Zellvorgänge. Ihre Freisetzung erfolgt z.B. bei der Zellatmung in den Mitochondrien, bei der Immunabwehr von Mikroorganismen in den Phagozyten und durch Cytochrom-P450 Enzymaktivität (Gibson 1996). Zusätzlich zu den zelleigenen kommen endogene Faktoren, wie UV-Strahlung oder Chemikalien (Kuhn 2003) hinzu. Es handelt sich bei ROS sowohl um freie Radikale, wie das Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$) oder Superoxidradikalanion (O_2^-), als auch um nichtradikalische Moleküle, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches jedoch unter Einfluss von redoxaktiven Metallionen ($\text{Fe}^{2+/3}$, $\text{Cu}^{2+/3+}$, $\text{Cr}^{2+/3+}$) die Bildung eines Hydroxylradikals zur Folge hat (Eisenbrand und Metzler 2005, Sies 1991, Abb. 2.3).

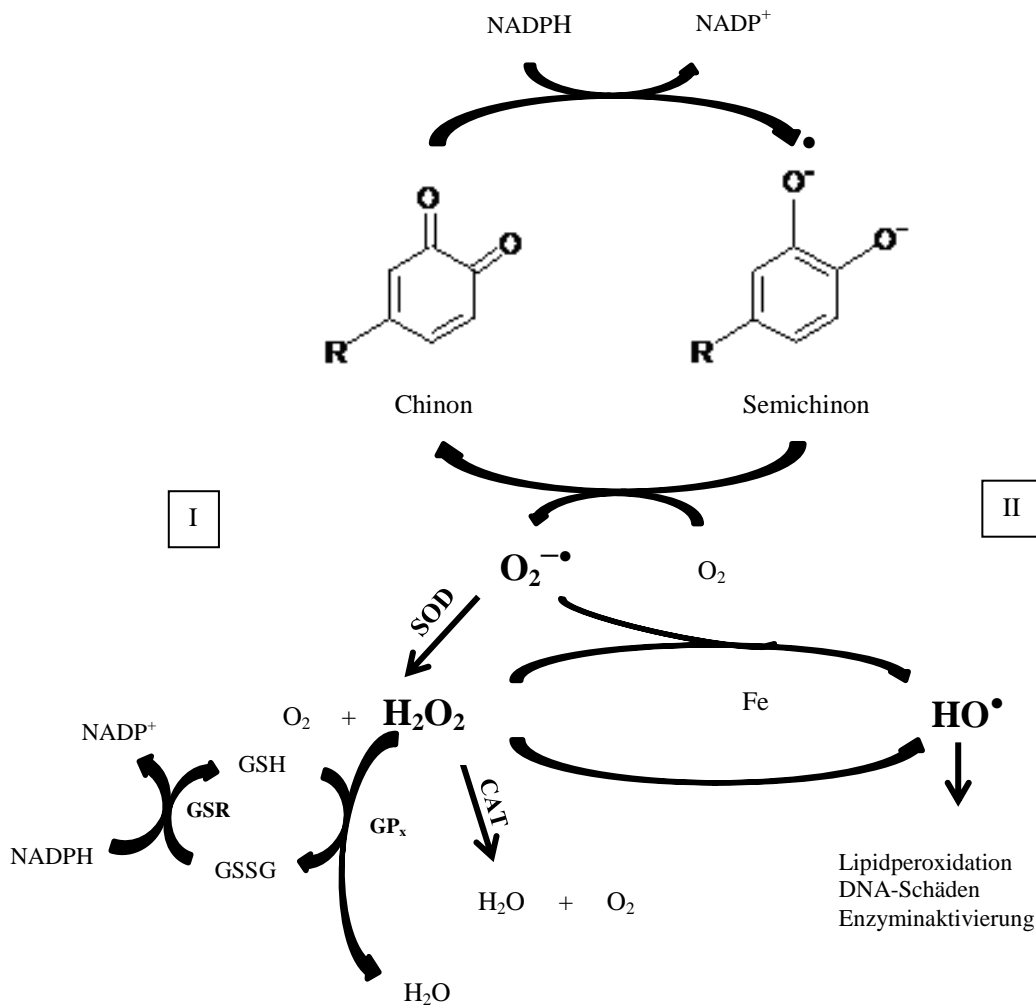


Abb. 2.3: Schematischer Überblick über die Entstehung und zelluläre Deaktivierungsmechanismen von ROS (nach Kelly *et al.* 1998; I Entgiftungsreaktionen, II Hydroxylradikalentstehung).

CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GP_x : Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxiddismutase, CYP: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen

Die Deaktivierung der gebildeten ROS erfolgt durch zelleigene antioxidative Prozesse (Abb. 2.3). Dies geschieht zum einen auf enzymatischem Wege mit Hilfe von Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, zum anderen nichtenzymatisch mit niedermolekularen Substanzen, wie u.a. Ubichinon oder Harnsäure. Auch mit der Nahrung aufgenommene Substanzen sind hier zu nennen. Dazu zählen Tocopherole oder Ascorbinsäure (Chandra *et al.* 2000, Finkel und Holbrook 2000) sowie Polyphenole. Für antioxidative Kapazität sind bestimmte strukturelle Gegebenheiten Voraussetzung (Abb. 2.4) (Cotelle *et al.* 1996, Rice-Evans *et al.* 1996, Sekher Pannala *et al.* 2001): a) vier bis sechs OH-Gruppen, b) freie OH-Gruppe in C_3 -Position (Flavonole, Catechine,

Anthocyanidine), c) benachbarte freie OH-Gruppen in Ring B und d) ungesättigter C-Ring, in Zusammenhang mit der Carbonylgruppe und OH-Gruppen in C₃- und C₅-Position.

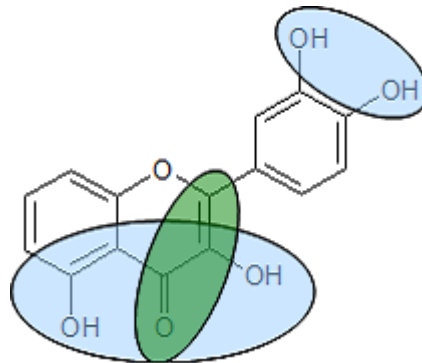


Abb. 2.4: Wesentliche strukturelle Voraussetzungen antioxidativer Kapazität von Flavonoiden

Diese Strukturelemente der Flavonoide ermöglichen es, dass diese Verbindungen in der Lage sind, freie Radikale durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu eliminieren. Dabei gehen diese in eine stabile Chinonstruktur über (Abb. 2.5) (Pietta 2000, Sekher Pannala *et al.* 2001). Auch der durch Flavonoide bewirkte Oxidationsschutz wichtiger Antioxidantien wie Ascorbinsäure ist hier zu nennen (Hirano *et al.* 2001).

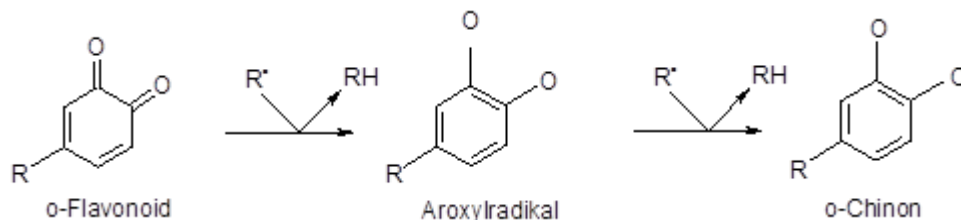


Abb. 2.5: Deaktivierung der Radikale durch Flavonoide (nach Rice-Evans 2001)

Da Polyphenole aufgrund ihrer Struktur Metallionen chelatieren können, wird zudem die Bildung von Hydroxylradikalen unterbunden (Mira *et al.* 2002). Weiterhin hemmen sie Enzyme, welche an der Bildung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind, wie z.B. Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Lipoxygenase und Cyclooxygenase (Kandaswami und Middleton 1994, Cos *et al.* 1998, Pietta 2000).

Überwiegen jedoch die prooxidativen Vorgänge, besteht die Gefahr von oxidativen Schädigungen an DNA, Proteinen und Zellmembranlipiden. Dieser sogenannte oxidative Stress wird in Zusammenhang mit vielen Krankheiten, v.a. den degenerativen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs oder Alzheimer, gesehen (LeWitt

und Taylor 2008). Daher ist hier das antioxidative Potential von Flavonoiden von besonderer Bedeutung.

Aufgrund ihrer reaktiven funktionellen Gruppen zeigen Polyphenole unter bestimmten Bedingungen bzw. in hohen Dosen aber auch pro-oxidative Wirkung (Michels *et al.* 2005, Rucinska *et al.* 2007). Hierbei sind die Strukturmerkmale, die auch für antioxidative Effekte von Bedeutung sind, relevant. Begünstigt wird diese Wirkung durch die Anwesenheit von Metallionen. Aufgrund der Resultate von *in vitro*-Experimenten wird angenommen, dass reaktive Sauerstoffspezies u.a. durch die Reduzierung der Metallionen durch die Flavonoide entstehen (Cao *et al.* 1997). Neben der ROS-Bildung im Zuge des Redox-Cycling (siehe Abbildung 2.3) können zudem Chinone, die elektrophilen Metabolisierungsprodukte der Flavonoide mit Catecholstruktur, weiterreagieren und über eine Methidstruktur Gluthathion-Addukte bilden (Awad *et al.* 2002a und b). Allerdings sind hier nur unphysiologisch hohe Flavonoidkonzentrationen kritisch zu sehen (Skibola und Smith 2000, Divi *et al.* 1996). Aufgrund der geringen Absorptionsrate der Flavonoide und der daraus resultierenden geringen Plasmakonzentration werden *in vivo* cytotoxisch wirkende Konzentrationen nicht erreicht.

2.3.3 Immunmodulatorische Effekte

Die Ergebnisse einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten belegen eine immunmodulierende, meist immunsuppressive Wirkung der Polyphenole (Middleton *et al.* 2000). Die Beeinflussung des Immunsystems hängt mit der Wirkung der Flavonoide, z. B. auf Enzyme der Signaltransduktion, wie Protein- und Proteintyrosinkinase, zusammen. Eine kompetitive Hemmung an der ATP-Bindungsstelle dieser Enzyme wird beschrieben (Manthey 2000). Indem sie die Aktivität von z.B. Proteinkinase C (PKC) (Lin *et al.* 1997), Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) (Agullo *et al.* 1997, Gamet-Payraastre *et al.* 1999) und der Proteintyrosinkinase (Cunningham *et al.* 1992) effektiv inhibieren, greifen Flavonoide in die Kontrolle der Zellproliferation ein. Hierbei erwiesen sich Flavone und Flavonole als wirksamste PKC- sowie PI-3-Kinase –Inhibitoren, wobei besonders das Vorhandensein von OH-Gruppen an den Positionen C_{3'} und C_{4'} des B-Rings und eine Doppelbindung zwischen C₂ und C₃ von Bedeutung waren (Gamet-Payraastre *et al.* 1999). Ein weiterer Angriffspunkt im Immunsystem ist der Arachidonsäurestoffwechsel. Ausgehend von Arachidonsäure, die z.B. durch Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden freigesetzt wird, werden im Zuge des Entzündungsprozesses entweder durch Cyclooxygenasen (COX) Prostaglandine oder durch Lipoxygenasen (LOX) Leukotriene gebildet (Kühn *et al.* 2005). Flavonoide können die Bildung dieser

Entzündungsmediatoren blockieren, indem sie PLA₂, COX und LOX inhibieren (Welton *et al.* 1988, Schewe *et al.* 2002). Zudem sind Flavonoide in der Lage, durch Abschwächung von Cytokin-Transkription regulierender Faktoren wie NF-κB (Nardini *et al.* 2001, Wellmann *et al.* 2001), die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor α und Interleukin-6 zu unterbinden (Pagonis *et al.* 1986).

Insbesondere in Zellen der Immunabwehr wie T- oder B-Lymphozyten und Makrophagen finden immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden statt. Es wurde eine dosisabhängige Hemmung der Lymphozytenproliferation festgestellt (Middleton und Kandaswami 1994). Zudem sind inhibitorische Effekte auf Zytokin- und Immunglobulin-Synthese, Phagozytosevorgänge und die Aktivität natürlicher Killerzellen beschrieben.

2.4 Einfluss auf Krankheiten

Aufgrund dieser vielfältigen biologischen Eigenschaften und ihres breiten Wirkungsspektrums sind Flavonoide sowohl als therapeutische als auch präventive Effektoren gegenüber verschiedenen Erkrankungen in den Fokus der Wissenschaft geraten. Da in der vorliegenden Arbeit die Einflussmöglichkeiten der Flavonoide auf Krebs und Alzheimer-Krankheit thematisiert werden, wird auf diese nachfolgend näher eingegangen.

2.4.1 Krebs

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die jährliche Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland wird auf ca. 400.000 geschätzt (RKI 2006a). Zudem erkrankt statistisch gesehen jeder dritte Europäer an Krebs (Pressemitteilung des Rates der Europäischen Union, 2008).

Die Pathogenese der Krebserkrankung beinhaltet unter anderem eine unkontrollierte Vermehrung des entarteten Gewebes. In der vorliegenden Arbeit wurden Cytotoxizität-Experimente mit entarteten humanen T-Lymphozyten (T-Lymphoblasten, Jurkat E6-1) durchgeführt. T-Lymphozyten reifen im Thymus, zählen zu den weißen Blutzellen und sind Teil der erworbenen Immunabwehr. Entartete T-Zellen sind der Ausgangspunkt bösartiger Erkrankungen des blutbildenden Systems (Leukämien).

2.4.1.1 Mechanismen der Krebsentstehung

Die komplexen Pathomechanismen der Kanzerogenese werden allgemein in drei Phasen eingeteilt: Initiation, Promotion und Progression. In der Initiationsphase wird z.B. durch ein

Kanzerogen in der Zelle eine Mutation auslöst. Liegt die Mutation in einem Gen, das für Zellzyklus- und Zellteilungskontrolle zuständig ist und wird diese mit Hilfe der körpereigenen Reparatur- bzw. Entfernungsmechanismen nicht beseitigt, bleibt das genetische Material irreversibel verändert. Der initiale DNA-Schaden einer einzelnen Zelle wird in diesem Zusammenhang auch Transformation genannt. In der Promotionsphase kommt es durch Inaktivierung von Suppressorgenen oder Apoptosegenen zum Verlust wachstumshemmender Genprodukte, während es durch Aktivierung von Wachstums-onkogenen zu einer Überproduktion wachstumsfördernder Genprodukte kommt. Daraus ergibt sich ein selektiver Wachstums- und Proliferationsvorteil der Krebszelle. Dieser lang andauernde Prozess ist durch gutartiges Wachstum charakterisiert (Lin *et al.* 2008). In der Progressionsphase wird die Basalmembran des Gewebes vom Tumor durchbrochen und es kann so zur Bildung maligner Tumore und zur Metastasierung des Tumorgewebes kommen. Der Prozess, umliegendes und weit entferntes Gewebe zu befallen, wird Metastasenbildung genannt. Durch Ausbildung krebseigener Blutgefäße (Angiogenese) ist eine Invasion in weiter vom Initialort entfernte Körperregionen bzw. Zellen möglich (Calvert und Frucht 2002).

Die Phasenbezeichnungen Promotion und Progression werden zunehmend vom Begriff der Co-Karzinogenese ersetzt.

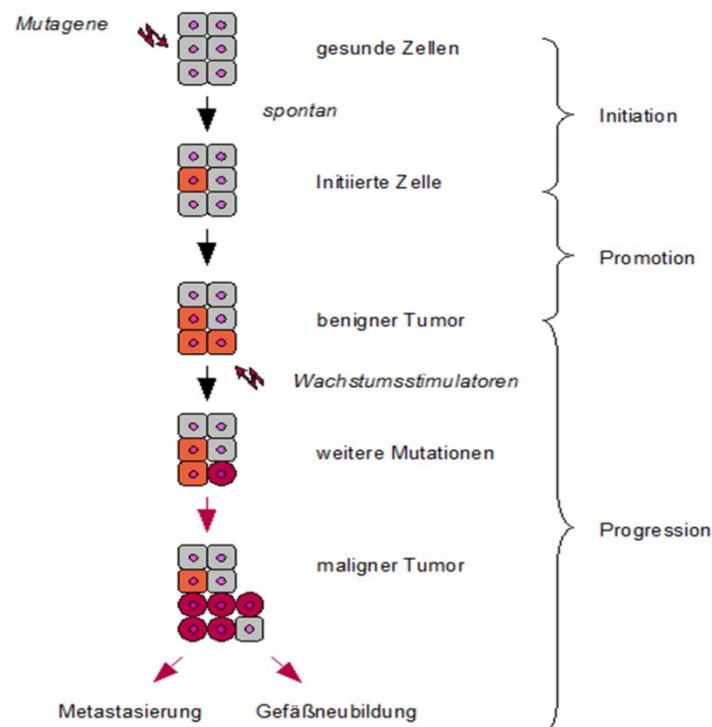


Abb. 2.6: Langzeitprozess der Krebsentstehung (modifiziert nach Marian und Micksche 2006)

2.4.1.2 Polyphenole und Krebs

Eine antikanzerogene Wirkung von Polyphenolen ist sowohl bei Tier- als auch in Zellkulturexperimenten nachgewiesen worden (Jacobasch *et al.* 2000, Parr und Bolwell 2000, Watzl und Rechkemmer, Yang *et al.* 2001). Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivitäten sind die Verbindungen in der Lage, an verschiedenen Stellen des mehrstufigen Langzeitprozesses der Kanzerogenese einzugreifen (Ramos *et al.* 2008 und Lin 2008). Daher ist sowohl ein chemopräventiver als auch ein chemotherapeutischer Einsatz von Polyphenolen denkbar.

Die in der Initialphase beschriebenen genetischen Defekte können durch endogene Faktoren wie Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene (Fearon und Vogelstein 1990) oder exogene Faktoren wie kanzerogene Chemikalien oder physikalische Prozesse (UV-Licht) (Schulte-Hermann *et al.* 2004) hervorgerufen werden. Kanzerogene, die mit der DNA reagieren, entstehen z.B. auch als Zwischenprodukte bei Phase-I-Reaktionen, die durch Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen katalysiert werden (Depeint *et al.* 2002). Aufgrund der Fähigkeit einiger Flavonoide, Enzyme der Cytochrome-P450-Familie zu inhibieren (dazu gehören Quercetin, Luteolin oder Phloretin), kann die P450-abhängige mutagene Aktivierung von Karzinogenen unterdrückt werden (Zessner *et al.* 2008, Pohl *et al.* 2006). Aufgrund des Potenzials der Flavonoide, im Körper toxische Quinone zu bilden, sind diese Verbindungen weiterhin in der Lage, durch Induktion der Phase II-Enzyme, wie Glutathion-S-transferase, UDP-Glucuronyltransferase oder Chinonreduktase, die körpereigene Abwehr zu steigern und so die Tumorumitiation zu inhibieren (Depeint *et al.* 2002, Galati *et al.* 2004). Zudem können sie durch Maskierung von DNA-Bindungsstellen für Kanzerogene die DNA schützen (Duthie *et al.* 1999, Lin *et al.* 2008). Ferner haben sie die Fähigkeit, den weiteren kanzerogenen Verlauf der bereits initiierten Zellen zu hemmen. Indem sie die Zellproliferation bzw. deren Kontrollmechanismen hemmen, werden Vermehrung und Wachstum der defekten Zelle verringert und weitere Zellschäden minimiert. Es ist bekannt, dass Luteolin an die DNA-Topoisomerasen I und II, die essentiell für die Reparatur geschädigter DNA sind, binden und diese hemmen kann (Liu *et al.* 2008, Helton *et al.* 2007). Neben dem direkten Eingriff in den Zellzyklus ist aber auch der Eingriff in den über Wachstumsfaktoren vermittelten Signaltransduktionsweg der Proliferation möglich. Von Luteolin ist eine Inhibierung der Proteinkinasen, die an der proliferativen Signaltransduktion beteiligt sind, beschrieben (Liu *et al.* 2008). Zudem sind Flavonoide in der Lage, den programmierten Zelltod hervorzurufen. Flavonoide induzieren den apoptotischen Zelltod in vielen Krebszelltypen, indem sie die Apoptose-Mechanismen steigern oder Überlebenssignale verringern (Lin *et al.* 2008, Verweis auf cytotoxische Effekte, Kapitel 2.2.1). Aufgrund dieser breiten Funktionalität sind Flavonoide auch fähig,

eine suppressive Wirkung auf Angiogenese und Metastasierung auszuüben. Hierbei wird eine inhibierende Wirkung auf Angiogenesefaktoren wie den vaskulären endothel Wachstumsfaktor (VEGF) und Matrix-Metalloproteasen (MMP) diskutiert (Bagli *et al.* 2004, Ende *et al.* 2004). Luteolin unterdrückt die Produktion und Sekretion von Cytokinen wie TNF α und IL-6, welche Migration und Metastasierung der Krebszellen stimulieren können. Auch eine Blockade von NF- κ B, MAPK/ERK und PI-3-Kinase-Akt-abhängiger Signalkaskaden wird diskutiert (Chen *et al.* 2007, Liu *et al.* 2008, Lee *et al.* 2006).

Aufgrund der Fähigkeiten, die Zelltransformation zu blockieren, das Tumorwachstum zu unterdrücken und Krebszellen zu töten, stellen Flavonoide ein interessantes Forschungsgebiet für Krebsprävention und -therapie dar.

2.4.2 Alzheimer Krankheit

Altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen spielen aufgrund des starken Anstiegs der Lebenserwartung der Menschen seit dem 20. Jahrhundert eine immer größere Rolle (Selkoe 2001). Die häufigste Form der irreversiblen Demenzerkrankungen im Alter ist die Alzheimer Krankheit (AD, *engl.* alzheimer's disease) (Citron 2000), die erstmals 1906 von Alois Alzheimer beschrieben wurde (Selkoe 2001). Weltweit sind schätzungsweise über 29 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen (Cole *et al.* 2008). In den westlichen Industrienationen zählt hierzu durchschnittlich jeder Dritte der über 80-Jährigen (Walsh *et al.* 2004).

Charakteristische Anzeichen der Erkrankung sind Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, Abnahme kognitiver Funktionen, Verhaltensveränderungen einhergehend mit Wahnvorstellungen, sowie Beeinträchtigungen des Sprachvermögens, der motorischen Fähigkeiten und des sozialen Verhaltens (Selkoe 2001, Sleegers *et al.* 2001). Durchschnittlich neun Jahre nach der AD-Diagnose stirbt der Patient (Davis *et al.* 1998).

2.4.2.1 Pathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer

Pathologische Untersuchungen der Gehirne von AD-Patienten zeigten, dass eine signifikante kortikale Atrophie besonders im Bereich des limbischen und assoziativen Kortex zusammen mit vergrößerten lateralen Ventrikeln zu beobachten ist (Abb. 2.7).

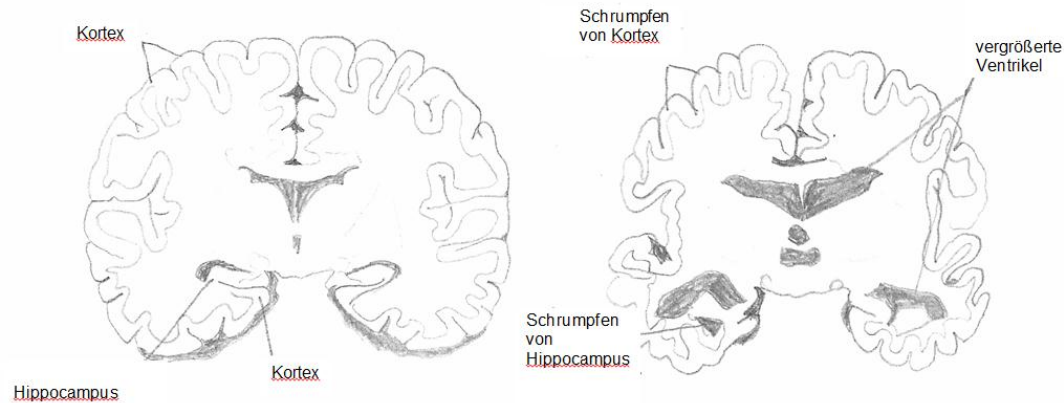


Abb. 2.7: Alzheimer Krankheit führt im menschlichen Gehirn zu kortikaler Atrophie und Ventrikelvergrößerung (modifiziert nach Orlacchio *et al.* 2007). Dargestellt ist der schematische Querschnitt von menschlichen Gehirnen eines gesunden Menschen (links) und eines AD-Patienten (rechts).

Charakteristische neuropathologische Veränderungen in den Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer ist der immense Verlust an Neuronen und Synapsen und das Auftreten von neuritischen (extrazellulären amyloiden) Plaques und intrazellulären Neurofibrillen.

Die neuritischen (senilen) Plaques sind in großer Anzahl in dem limbischen und assoziativen Kortex nachweisbar und werden mit axonalen und dendritischen Verletzungen assoziiert (Dickson 1997). Hauptbestandteil dieser amyloiden Ablagerungen sind A β -Peptide, welche aus der Prozessierung von APP (amyloides Vorläuferprotein, *engl.* amyloid precursor protein) resultieren (siehe Kapitel 2.3.2.4). Sie bestehen aus 39-42 Aminosäuren (AS) mit einer Molekularmasse von 4 kD (Masters *et al.* 1985). Ein erhöhter Anteil an Amyloid- β -Protein mit einer Länge von 42 Aminosäuren wird mit der Krankheit assoziiert (Masters *et al.* 1985). Weiterhin können Proteine wie Apolipoprotein E (ApoE) (Nishiyama *et al.* 1997) und Heparan-Sulfat-Glycoproteine (Snow *et al.* 1996, Castillo *et al.* 1997) Bestandteile dieser Ablagerungen sein. Diese Plaques sind von aktivierten Microglia (Sleegers *et al.* 2001), reaktiven Astrocyten (Dickson *et al.* 1988) und dystrophen Neuriten umgeben. Veränderungen in der Struktur dieser Neuriten wie zum Beispiel vergrößerte Lysosomen oder eine hohe Anzahl von Mitochondrien wurden beobachtet. Der Plaque-Durchmesser variiert von 10 bis 120 μm (Selkoe 2001). Weiterhin wurden auch A β -Protein-Ablagerungen ohne dystrophe Neuriten in ihrer Umgebung gefunden. Vermutlich handelt es sich dabei um restliche Bestandteile von neuritischen Plaques, sogenannte *burned-out*- bzw. *end-stage*-Plaques (Wisniewski *et al.* 1982).

Zwar wurde der molekulare Entstehungsprozess der A β -Plaques detailliert beschrieben (Kapitel 2.3.2.4), die vollständige molekulare Ätiologie von AD ist aber immer noch unklar.

Im Zuge der Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die eine Vielzahl von Wissenschaftlern unterstützen, geht man davon aus, dass die Bildung neuritischer amyloider Plaques zu Schädigung und Verlust von Nervenzellen führt (Selkoe 2001, Hardy und Selkoe 2002). Eine Ursache hierbei könnte das Auslösen von oxidativem Stress durch A β sein (Christen *et al.* 2000, Nunomura *et al.* 2001). Die Hintergründe sind jedoch noch nicht bekannt.

Als zweite pathologische Veränderung treten intraneurale, nicht membrangebundene Aggregationen auf. Dabei handelt es sich um neurofibrilläre Bündel, welche aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen bestehen (Selkoe 2001). Da Tau-Proteine Mikrotubuli stabilisieren, spielen sie eine essentielle Rolle bei der zellulären Struktur und intrazellulären Transportvorgängen. Da eine Hyperphosphorylierung dieses Proteins zur Aggregation führt und dies mit dem Verlust der stabilisierenden Fähigkeit einhergeht, kommt es zu einer Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes innerhalb der Neuronen (Mandelkow *et al.* 2007). Die Folgen sind Fehlfunktionen bei der Reizübertragung und Schädigung der Zelle (Delacourte *et al.* 2000). Zudem treten auch oxidative Schäden, Aktivitätsveränderungen von Kinasen und Phosphatasen sowie die Aktivierung von Mikroglia und Astrocyten auf (Kowalska 2004).

In Gehirnen von Alzheimer-Patienten hat man einen Verlust von Synapsen (Terry *et al.* 1991) und Neuronen festgestellt werden (Swerdlow 2007). Da häufig Neuronen im Hippocampus-eine Struktur des Gedächtnisses- in der Amygdala und in dem temporalen und frontalen Assoziationskortex (Schaltstelle für Vernunft, Sprache und Lernen; Selkoe 2001) betroffen sind, ist die Symptomatik der Krankheit durch u.a. Kurzzeitgedächtnisverlust und Beeinträchtigung des Sprachvermögens gekennzeichnet.

2.4.2.2 Genetik und Risikofaktoren

Da die Alzheimer Krankheit nicht nur als altersbedingte, sondern auch als eine genetisch bedingte neurodegenerative Erkrankung vorkommt, werden zwei Formen der Alzheimer Demenz unterschieden (Sleegers *et al.* 2001): Zum einen die nicht erblich bedingte sporadische Form (*engl.* sporadic alzheimer's disease, SAD), welche erst im hohen Alter auftritt und zum anderen die genetisch bedingte familiäre Alzheimer-Erkrankung (*engl.* familiar alzheimer's disease, FAD), welche schon vor dem 60. Lebensjahr (daher auch *engl.* early onset alzheimer's disease, EOAD) genannt) zu Symptomen führt. Die genetisch bedingte Erkrankung, welche auf autosomal-dominante Vererbung von Gendefekten zurückzuführen ist, kommt zwar nur selten vor, jedoch zeigt sie ein drastischeres Krankheitsbild als die altersbedingte Erkrankung. 95% der Fälle stellen jedoch die altersbedingte sporadische Form dar (Chen *et al.* 2009). Beide Formen sind aber durch die gleichen klinischen und neuropathologischen Veränderungen, wie die

Bildung von Neurofibrillen und amyloiden Plaques, das Auftreten einer synaptischen Dysfunktion und eines immensen Neuronenverlustes charakterisiert.

Bislang konnten bei der FAD drei pathogenetische relevante Gene identifiziert werden: Mutationen im APP-Gen, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist, Mutation im Präsenilin-1-Gen (PSEN 1, lokalisiert auf Chromosom 14) und Präsenilin-2-Gen (PSEN 2, lokalisiert auf Chromosom 1). Alle Mutationen haben eine stärkere Ablagerung sowie erhöhte A β -Aggregation zur Folge (siehe A β -Produktion Abbildung 2.8, Tanzi und Bertram 2005). Die weitaus häufigere Ursache für die frühe Entwicklung der Alzheimer Krankheit stellen Mutationen der Präseline dar (Sherrington *et al.* 1995, Rogaev *et al.* 1995), wobei bei genetische Veränderungen in PSEN2 im Vergleich zu Mutationen in APP und PSEN1 die Erkrankung später auftritt (Hardy 1997, Tanzi und Bertram 2001).

Bisher konnten 32 Mutationen im APP-Gen identifiziert werden, die mit einer erhöhten Bildung und Ablagerung des A β -Proteins assoziiert sind (Gandy 2005, www.molgen.ua.ac.be/ADMutations, Stand 2010). Da es sich hierbei um Punktmutationen innerhalb der A β -Region oder in unmittelbarer Umgebung der Schnittstellen der β - und γ -Sekretasen handelt (Irie *et al.* 2005), wird die APP-Prozessierung beeinflusst. Zum Beispiel hat eine Doppelmutation im APP-Gen, die als schwedische Variante bezeichnet wird (APP_{SW} mit Doppelmutation K595N/M596L), welche an der Schnittstelle der β -Sekretase liegt, die Erhöhung der sekretierten A β Gesamtmenge zur Folge. Mutationen am C-terminalen Ende des A β -Bereichs, welche in der Nähe der γ -Sekretasenschnittstellen liegen, führen zur Erhöhung des relativen Anteils an A β ₄₂.

Da zum Beispiel bei Down-Syndrom Patienten das Chromosom 21 als Triplikat existiert (Goate *et al.* 1991), kommt es durch eine lebenslange Überexpression von APP zur Entwicklung einer genetisch bedingten juvenilen Alzheimer-Erkrankung (Brouwers *et al.* 2006, Cole und Vassar 2007).

Apolipoprotein E (ApoE) ist Bestandteil der low-density-Lipoproteine und am Transport von Cholesterin beteiligt. Eine erhöhte A β -Aggregation, bedingt durch Polymorphismus im ApoE, ist mit einem erhöhten Risiko für die sporadische Form von Alzheimer verbunden. Von ApoE sind drei verschiedene Genvarianten bekannt, nämlich ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Im Vergleich zur Normalbevölkerung kommt bei AD-Patienten das ApoE4 Allel gehäuft vor (Corder *et al.* 1993). Zwar tragen 40-80% der Erkrankten diese Allele des Gens (Farrer *et al.* 1997), die Wirkungsweise von ApoE4 in Bezug auf die Pathogenese von Alzheimer ist aber bisher nicht geklärt. Es wird eine Beschleunigung der Bildung und Verhinderung der Beseitigung amyloider Ablagerungen durch ApoE4 in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert (Wisniewski *et al.* 1994). ApoE scheint jedoch

weder für die Erscheinung der Krankheit notwendig, noch ausreichend zu sein (Tanzi und Bertram 2005).

Ein weiteres Gen, das in Verbindung mit AD gebracht wird, ist das, welches für das Insulin-degrading enzyme (IDE) kodiert. Diese Thiol-Zink-Metalloendopeptidase übernimmt eine wichtige Rolle bei der Beseitigung und dem Abbau von A β (Selkoe *et al.* 2001). Mutationen in IDE hatten in einem Rattenmodell eine Reduktion des Insulin- und A β -Abbaus von bis zu 30% zur Folge (Farris *et al.* 2004). Aufgrund der Fähigkeit des Enzyms, Insulin abzubauen, steht es essentiell in Verbindung mit Typ 2-Diabetes und Hyperinsulinämie. Klinische und epidemiologische Studien haben ein erhöhtes AD-Risiko von Typ 2-Diabetes und Hyperinsulinämie-Patienten festgestellt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass hohe Insulinspiegel den IDE-vermittelten Abbau von A β kompetitiv hemmen.

Zusammenfassend konnte bisher folgender Zusammenhang zwischen A β und Alzheimer Demenz festgestellt werden (Selkoe und Schenk 2003, Walsh und Selkoe 2007, Citrion 2010):

Alle Mutationen, welche eine juvenile Form der Alzheimer-Erkrankung verursachen, haben eine Steigerung der A β_{42} -Produktion zur Folge. Zudem steht der genetische Risikofaktor ApoE4 in Zusammenhang mit einer Erhöhung der amyloiden Belastung.

A β -Oligomere zeigen eine akute synapo-toxische Wirkung, während A β -Fibrillen pro-inflammatorische Effekte aufweisen und neurotoxisch wirken.

Amyloide Ablagerungen weisen auf eine beginnende AD hin, und neuritische Plaques stellen ein diagnostisches Schlüsselkriterium dar. Zudem ist bekannt, dass andere amyloide Ablagerungen in der Peripherie auch zu Gewebeschädigung führen.

Man weiß allerdings auch festgestellt, dass amyloide Ablagerungen auch fern von Neuronenverlust auftreten können, dass diffuse Plaques auch in älteren gesunden Personen vorkommen und dass die Anzahl der Plaques mit dem Grad der Demenz nur teilweise korreliert. Viele Wissenschaftler unterstützen dennoch die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, welche die Ablagerungen von A β als Schlüsselereignis und Ursache für die Neurodegeneration bei AD Erkrankung ansieht (Selkoe 2001).

2.4.2.3 Das amyloide Vorläuferprotein APP (amyloid precursor protein)

Das APP gehört zu der Familie konservierter Typ-I-Membranproteine und beschreibt eine heterologe Gruppe von Polypeptiden. Aufgrund von alternativem Splicing und posttranslationalen Modifikationen, wie Glycosilierung, Sulfatierung und Phosphorylierung,

resultieren drei Splicevarianten, bestehend aus 695, 751 bzw. 770 Aminosäuren, mit einer Molekularmasse von 110-140 kD. Während die Isoformen 751 und 770 sowohl in neuronalen als auch in nichtneuronalen Zellen vorkommen, wird die Isoform 695 hauptsächlich von Neuronen exprimiert (LaFerla 2002).

APP besteht aus einer langen N-terminalen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer singulären Transmembranregion und einem kurzen cytoplasmatischen/intrazellulären Bereich (Anliker *et al.* 2006), wobei die A β -Domäne zu einem Teil in der Transmembrandomäne und zum anderen Teil innerhalb der extrazellulären Domäne liegt (Abb. 2.8). Da APP ein Transmembranprotein darstellt, erfolgt die Translation an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums. Nachdem das Protein posttranslational durch N- und O-Glycosylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierungen während des intrazellulären Transports bzw. des Transports über Golgi-Vesikel zur Plasmamembran modifiziert wurde (Thinakaran *et al.* 2008), wird ein kleiner Teil der APP-Moleküle in die Plasmamembran eingebaut.

Bezüglich des APP-Proteins werden u.a. Bindungsmotive für Metalle und extrazelluläre Matrixkomponenten wie beispielsweise Heparin und Kollagen beschrieben (Zheng *et al.* 2006). Aufgrund der Struktur des Proteins wird auch vermutet, dass es die Zelladhäsion fördert (Wang *et al.* 2004, Yamazaki *et al.* 1997) und eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor besitzt (Ho und Sudhof 2004). Aufgrund erhöhter APP-Expression während der neuronalen Reifung und Differenzierung (Hung *et al.* 1992) und sehr hohen Konzentrationen von APP in Bereichen, in denen Synapsen entstehen (Moya *et al.* 1994), wird ihnen eine wichtige Funktion im Neuritenwachstum und während der Synaptogenese zugeschrieben (Small *et al.* 1994).

2.4.2.4 Prozessierung von APP

A β entsteht aus der Prozessierung von APP. Dieser Spaltungsprozess ist ein physiologischer Vorgang und findet auch bei Personen statt, die nicht an AD erkrankt und kognitiv unauffällig sind (Seubert *et al.* 1992 und Shoji *et al.* 1992). Die Grundlage für die Bildung amyloider Plaques ist daher die Regulierung von A β -Produktion und -Beseitigung (Kowalska 2004). Dabei haben eine gesteigerte A β -Produktion und -Aggregation neurodegenerative Schäden zur Folge (Hardy und Selkoe 2002).

Das reife APP wird auf zwei alternativen Wegen, dem nicht-amyloidogenen und dem amyloidogenen Weg proteolytisch gespalten (Abb. 2.8). Hierbei spielen drei verschiedene Proteaseklassen (α -, β - und γ -Sekretasen) eine Rolle (Cole *et al.* 2007), wobei die

Prozessierung von APP durch β - und γ -Sekretasen zur Bildung von A β führt, während die α -Sekretase die A β -Produktion verhindert.

Die β -Sekretase spaltet APP innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A β -Region. Dadurch entsteht analog zur α -Sekretase-Spaltung lösliches sAPP β (*engl.* soluble amyloid precursor protein) sowie ein kürzeres membrangebundenes Stück, genannt C99 (LaFerla 2002).

Durch die anschließende Spaltung von C99 durch die γ -Sekretase kommt es zur Entstehung von Oligomeren, deren Aggregation und schließlich zur Plaque-Bildung. Da die γ -Sekretase auch weitere Schnittstellen im APP erkennt, entstehen unterschiedlich lange A β -Peptide. Es können Peptide mit einer Länge von 39-43 Aminosäuren entstehen, wobei hauptsächlich A β_{40} und A β_{42} gebildet wird (Nunan und Small 2000, Gandhi *et al.* 2004). Da A β_{42} hydrophober ist als A β_{40} , zeigt es eine stärkere Tendenz zur Oligomerisierung und Aggregation. Daher birgt A β_{42} das größte neurotoxische Potential.

Die Spaltung durch die membranständige α -Sekretase erfolgt in der Nähe der Zelloberfläche zwischen Aminosäure 16 und 17 (Esch *et al.* 1990, Kamenetz *et al.* 2003). Hierbei entstehen ein N-terminales, großes, lösliches Ectodomän-Fragment (sAPP α), welches in den extrazellulären Raum freigesetzt wird, und ein C-terminales membrangebundenes C83-Fragment, welches anschließend von der γ -Sekretase in ein p3- und ein p7-Fragment gespalten werden kann (auf der Abbildung 2.8 nicht dargestellt). Das kurze Peptid p3 besteht aus der C-terminalen Region des A β -Peptids (Mok *et al.* 2000, Nunan und Small 2000). Da es nur eine geringe Neigung zur Oligomerbildung aufweist (Dulin *et al.* 2008), handelt es sich um ein nicht-amyloidogenes Peptid. Da die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne angreift, kommt es zu keiner Bildung von A β , und die Plaque-Bildung wird verhindert. Da entstehende Fragmente löslich sind bzw. keine Aggregation erfolgt, wird dieser Spaltungsweg auch als der nicht-amyloidogene Weg bezeichnet. Zudem wird eine neurothrophe und neuroprotektive Wirkung von sAPP α beschrieben (Small *et al.* 1994 und Furukawa *et al.* 1996, Silvestri *et al.* 2009). Weiterhin ist eine Wirkung als Proliferationsfaktor in neuronalen und nichtneuronalen Zellen bekannt (Gralle und Ferreira 2007).

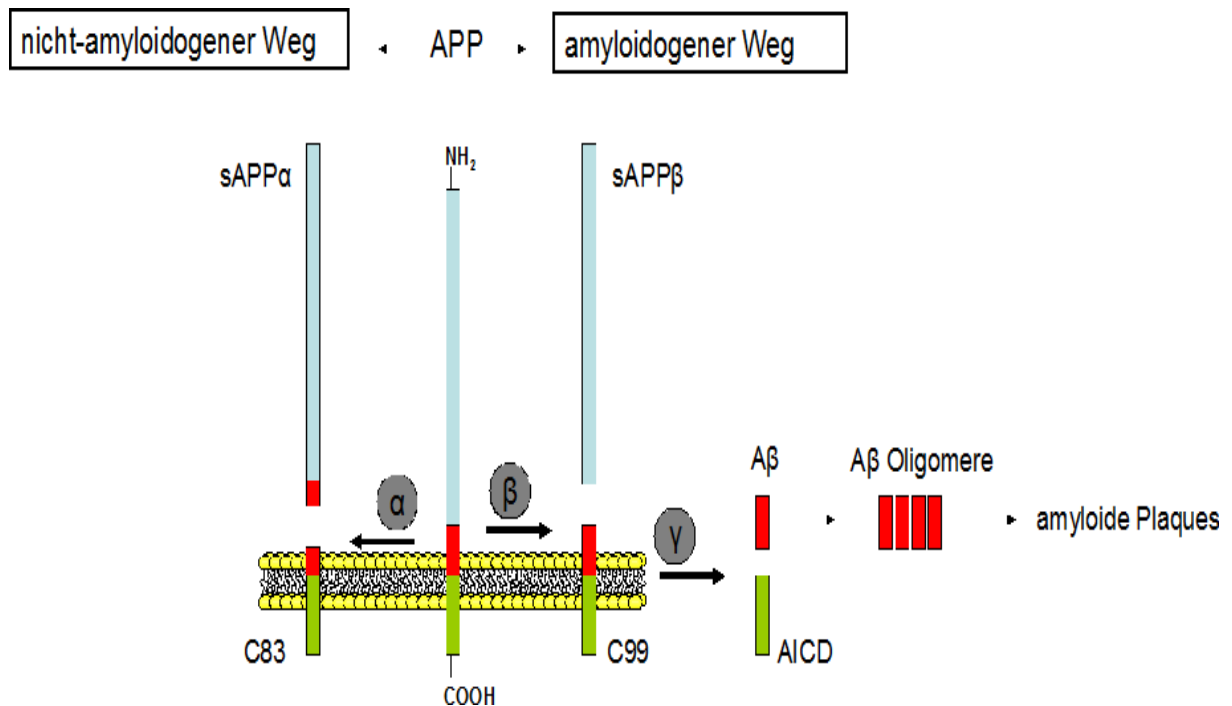


Abb. 2.8: Spaltung von APP durch α -, β - und γ -Sekretasen (modifiziert nach Cole und Vassar 2007).

Es ist bis heute nicht vollständig geklärt, bei welchen physiologischen Prozessen diese Sekretasen noch eine Rolle spielen. Auch ist nicht bekannt, ob nicht noch mehr als die bisher identifizierten Proteine eine α -, β - und γ -Sekretaseaktivität aufweisen. Wissenschaftliche Experimente haben bezüglich der genannten Sekretasen bisher folgendes gezeigt:

2.4.2.5 Sekretasen

Die γ -Sekretase stellt einen Transmembrankomplex, der aus den vier Proteinen, Presenilin (PSEN1), Nicastrin, α -Protein 1A und Presenilin enhancer 2 (PSEN2), besteht, dar. Mutationen in PSEN1 und PSEN2 sind mit erhöhter $A\beta_{42}$ -Freisetzung assoziiert. Bisher wurde weiterhin herausgefunden, dass diese Sekretase nicht nur APP spaltet, sondern auch Notch. Dieses Transmembranprotein mit Signaltransduktionsfunktion ist für die embryonale Entwicklung von essentieller Bedeutung (DeStrooper *et al.* 2003, Citron 2010). In erwachsenen Tieren wurde zudem festgestellt, dass die Inhibierung von Notch1-Spaltung u.a. zur Hemmung der Thymocytdifferenzierung führt und eine intestinale Becherzellen-Metaplasie verursacht (Wong *et al.* 2004 und Milano *et al.* 2004).

Die β -Sekretase ist eine Transmembran-Aspartamprotease, genannt BACE1 (*engl.* β -site APP cleaving enzyme). Im Vergleich zu peripheren Gewebezellen findet in

Gehirnneuronen eine vermehrte Expression statt. Eine gesteigerte Aktivität wurde in Gehirnen von Menschen mit sporadischer AD festgestellt. Bisher wurde über keine Mutationen in BACE1 berichtet, die mit dem Auftreten von AD assoziiert sind. Die schwedische Mutante in APP hat eine höhere Spaltungsrate von BACE1 zur Folge. Neben der APP-Spaltung besitzt BACE1 vermutlich eine regulierende Funktion bei der Myelinisierung im Nervensystem (Citron 2010).

Die α -Sekretasen gehören der ADAM (*engl.* A Disintegrin and Metalloprotease)-Familie an. Bisher wurden ADAM-9, -10 und -17 mit α -Sekretase-Aktivität identifiziert (Lammich *et al.* 1999, Fahrenholz *et al.* 2000, Asai *et al.* 2003), wobei ADAM-10 als die wichtigste angesehen wird (Marshall *et al.* 2006). Bei dieser Enzymklasse handelt es sich um Transmembranproteine mit einer Domänstruktur (Abb. 2.9), welche in vielen physiologischen Vorgängen eine Rolle spielen (Seals *et al.* 2003). Die Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER). Über den Golgi-Apparat findet Reifung, Glycosylierung und Abspaltung der Propeptidomäne und somit die Enzymaktivierung statt. Im zymogenen Zustand wird die katalytisch aktive Stelle der Protease von der Prodomäne geschützt. Ein kleiner Teil der ADAM-Proteine wird in die Plasmamembranen eingebaut (Gutwein *et al.* 2003, Reiss und Saftig 2009). Bisher wurden 21 ADAM-Gene im Menschen identifiziert, wobei nur zwölf für Proteine (darunter auch die erwähnten α -Sekretasen) codieren, die das typische Zinkbindungsmotiv der Metalloprotease besitzen (Reiss und Saftig 2009).

Diese Enzyme besitzen eine katalytische Protease-Domäne HEXGHXXGXXHD, deren drei Histidinreste (H) ein Zinkion komplexieren und damit die Spaltung des Zielproteins ermöglichen (Moss *et al.* 2007). Die anderen Aminosäuren wie Glycin und Methionin sind für die strukturellen Eigenschaften der Bindungsstelle von Bedeutung (Wolfsberg *et al.* 1995, Stocker *et al.* 1995).

Indem die Disintegrindomäne mit Integrinen interagiert, wird eine Zell-Zelladhäsion ermöglicht (Fahrenholz *et al.* 2000, White *et al.* 2003). Für die Spezifität und Aktivität der Metalloproteasen ist die cysteinreiche Domäne von Bedeutung (Smith *et al.* 2002, Janes *et al.* 2005). Neben der Freisetzung von APP sind die Enzyme noch an der derjenigen von löslichen Faktoren von Zelloberflächenmolekülen (Hormonen, Chemokine, Wachstumsfaktoren) beteiligt (Reiss *et al.* 2009, Edwards *et al.* 2008, Le Gall *et al.* 2009). In einer Arbeit von Reiss und Mitarbeiter aus dem Jahr 2009 wurde eine Verbindung zwischen Enzymdefekt und Fehlregulation u.a. mit Entzündungskrankheiten und Krebsentwicklung festgestellt.

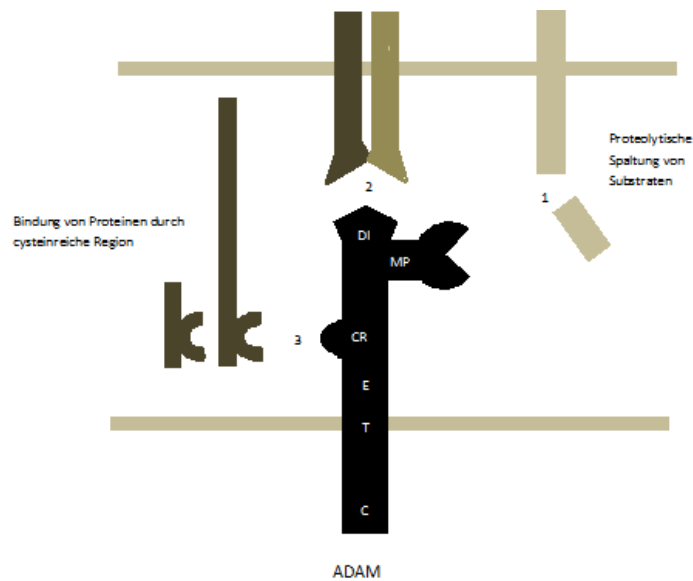


Abb. 2.9: Schematische Domänstruktur von ADAM (modifiziert nach Yang *et al.* 2006). Dargestellt sind verschiedene Domänen und ihre biologische Funktionen: (1) Proteolytische Aktivierung von Substraten durch die Metalloprotease-Domäne MP; (2) Bindung von Integrin-Heterodimerrezeptoren durch die Disintegrindomäne (DI); (3) Bindung an andere Proteine über die cysteinreiche Region (CR); intrazelluläre Signalwirkung durch die cytoplasmatische Region (C); T: Transmembranregion, E: EGF-ähnliche Sequenz.

ADAM-10 wird ubiquitär exprimiert, wobei sich der Großteil als Proenzym im Golgi-Apparat und nur ein geringer Anteil der proteolytisch aktiven Form in der Plasmamembran befindet (Lammich *et al.* 1999, Escrevente *et al.* 2008). Die höchste Promotoraktivität tritt in neuronalen Zellen auf (Howard *et al.* 1996). Da die α -Sekretase APP in der A β -Sequenz schneidet, wird die Produktion und Ablagerung von A β inhibiert und ein neuroproduktives Protein (sAPP α) freigesetzt. Zudem ist bekannt, dass eine Überexpression von ADAM-10 geringere Ablagerungen des amyloiden A β -Peptids zur Folge hat und die kognitiven Defekte reduziert (Postina *et al.* 2004). Eine Stimulation von ADAM und damit eine Bevorzugung des nicht amyloiden Pfades erfolgt zum Beispiel durch Anregung der Proteinkinase C und Senkung des Cholesterolspiegels (Hung *et al.* 1993 und Høglund *et al.* 2005). Auch Flavonoide sind in der Lage, derart auf die Prozessierung einzuwirken.

2.4.2.6 Therapeutische Interventionsstrategien

Da der Zelltod von Neuronen u.a. in Verbindung mit A β -Plaques, Störungen in cholinergen, dopaminergen und glutamatergen Neurotransmittersystemen, genetische Faktoren und erhöhtem oxidativen Stress gebracht wird, gibt es eine Vielzahl therapeutischer Ansätze:

2.4.2.6.1 Behandlungsmöglichkeiten

Bisher beruhen Behandlungsmöglichkeiten lediglich auf Verbesserung der Symptome, wobei die Wirkmechanismen der Antidementiva sehr unterschiedlich sind. Da ein selektiver Verlust von cholinergen Neuronen bei AD-Patienten zu beobachten ist, kommen Acetylcholinesterasehemmer zum Einsatz, um dieses Defizit auszugleichen. Eine Beeinflussung des glutamatergen Neurotransmitter-Systems, dessen Störungen ebenfalls mit AD assoziiert werden, erfolgt über Memantin. Dies ist ein NMDA-Rezeptor-Antagonist (NMDA = N-Methyl-D-Aspartat), der schädliche Glutamat-Wirkung, die vorwiegend über diese Rezeptoren erfolgt, inhibiert. Weiterhin sind sogenannte Nootropika im Handel. Dabei handelt es sich um unterschiedliche Präparate, deren Anti-AD Wirkung wissenschaftlich nicht bewiesen ist.

In den letzten Jahren wurden mehrere Strategien entwickelt und Versuche unternommen, die Progression der Krankheit zu unterbinden oder abzuschwächen. Einige durchlaufen bereits präklinische Studien. Die meisten Ideen bzw. Studien basieren auf der Reduktion der A β -Produktion, der Aggregation und Beseitigung von A β (Citron 2010). Um A β abzubauen, stehen Proteasen wie Nephilysin sowie IDE und Plasmin in der Diskussion. Mit der Entwicklung von z.B. A β -Antikörpern werden auch immunotherapeutische Ansätze verfolgt. Um früher in den Mechanismus einzugreifen, werden auch andere Wege verfolgt: Da dieses Peptid erst durch proteolytische Spaltung mit Hilfe von γ - und β -Sekretasen (siehe Abbildung 2.8) entsteht, stellt die Inhibierung dieser Enzyme eine Möglichkeit dar, einerseits bereits die Bildung von A β zu verhindern, oder andererseits den nicht amyloidogenen Weg durch Stimulierung der α -Sekretase zu stärken. Da es sich bei den Sekretasen nicht nur um ein einzelnes Enzym handelt und die physiologischen Funktionen im Körper nicht vollständig aufgeklärt sind, stellt dieser Ansatz eine besondere Herausforderung dar.

2.4.2.6.2 Genterapeutische Ansätze mittels RNAi-Technologie

Da auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Pathogenese von AD spielen, werden genterapeutische Maßnahmen untersucht. Hier kommt die RNAi-Technologie zum Einsatz, welche einen vielversprechenden Ansatz bietet, in den Krankheitsverlauf einzugreifen bzw. neurodegenerative Erkrankungen zu behandeln (Gonzalez-Alegre 2007, Koutsilieri *et al.* 2007). Diese Methodik basiert darauf, dass gezielt die Entstehung bestimmter Proteine durch Einbringen von Effektoren verhindert wird. Die Effektormoleküle der RNA-Interferenz sind kurze RNA-Stücke (*engl.* small interfering RNAs, siRNAs), welche 21-23 Basen lang sind und eine komplementäre Sequenz zum Zielgen aufweisen. Bei der AD bieten siRNAs die Möglichkeit, mutante Gene wie z.B. die schwedische Mutante von APP selektiv herunterzuregulieren, oder die β -Sekretase, BACE1 selektiv zu inhibieren (Miller *et al.* 2003). Diese kurzen RNA-Sequenzen können

auf unterschiedliche Art und Weise in die Zelle gebracht werden. Es kommen sowohl „nackte“ siRNAs, als auch kurze RNAs mit Haarnadelstruktur (*engl.* short hairpin RNAs, shRNAs) zum Einsatz. Während die erste Methode jedoch nur einen transienten knockdown der Genexpression erzielt, ermöglicht die Verwendung von shRNAs eine langzeitige Suppression der Genexpression (Koutsilieris *et al.* 2007). Es wurden DNA-Plasmide entwickelt, welche die shRNAs unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors exprimieren. In der Zelle werden shRNAs durch die zelluläre Endonuklease Dicer in aktive siRNAs prozessiert (Bernstein *et al.* 2001). Nach Entwindung der Doppelstränge erfolgt durch Inkorporation des antisense-Stranges in einen RNA-Komplex (*engl.* RNA induced silencing Komplex, RISC) die Initiierung der Degradation komplementärer mRNA. Dies führt schließlich zur spezifischen Suppression der Expression sequenzhomologer Gene (Hammond *et al.* 2000, Elbashir *et al.* 2001). Um das therapeutische Potential der siRNA bzw. shRNA *in vivo* zu testen, werden zur Transduktion z. B. von Säugetiergehirnen verschiedene virale Vektoren wie z.B. rekombinante adenoassoziierte Viren (rAAVs) oder Lentiviren (LVs) verwendet (Deglon und Hantraye 2005). Im Gegensatz zu Lentiviren oder Foamyviren (FV), welche in das Wirtsgenom sich teilender Zellen integrieren, liegen die replikationsdefizienten AAVs im lytischen Zyklus meist episomal in sich teilenden oder nicht-teilenden Zellen vor (Samulski *et al.* 1991).

Da es sich bei rAAV um nicht pathogene Vektoren mit lediglich geringer immunogener Aktivität handelt, stellen sie für den gentherapeutischen Ansatz mittels shRNA-Technologie interessante Vektoren dar.

2.4.2.6.3 Antioxidative Ansätze

Aber nicht nur genetische Faktoren, sondern auch oxidativer Stress liefern Hinweise auf eine beginnende AD (Nunomura *et al.* 2001, Butterfield *et al.* 2007). So wurde in den Gehirnen von AD-Patienten oxidative Stressmarker, wie erhöhte Mengen an Lipidperoxidprodukten, oxidierte Proteine und DNA entdeckt und in Zusammenhang mit der Induktion neuronaler Apoptose gebracht (Lovell *et al.* 1995 und Lyras *et al.* 1997). Zwar sind erhöhte Radikalbildung und abgeschwächte Reparaturmechanismen physiologische Vorgänge im Zuge des Alterungsprozesses, jedoch sind sie auch mit einer erhöhten A β -Produktion assoziiert. A β wiederum wird auch in Verbindung mit vermehrter Radikalbildung und Aktivierung der Caspasen-2, -3, -8 und -9 gebracht (Roth *et al.* 2001). In den AD betreffenden Hirnregionen wurde auch Schädigung der DNA der Mitochondrien beobachtet (Hirai *et al.* 2001, Pamplona *et al.* 2005, Aksenov *et al.* 2001). Somit scheinen Substanzen mit antioxidativer Wirkung therapeutisches Potential gegenüber der Pathogenese von AD zu besitzen.

2.4.3 Flavonoide und Alzheimer Krankheit

In den letzten zehn Jahren hat sich die Forschung bezüglich neuroprotektiver Effekte von Polyphenolen in der Nahrung beträchtlich entwickelt. *In vivo*- und *in vitro*-Experimente zeigen, dass diese Verbindungen Neuronen durch verschiedene intrazelluläre Interaktionsmöglichkeiten schützen können (Ramassamy *et al.* 2006, Singh *et al.* 2008). Bisher konnte festgestellt werden, dass der Mechanismus der Wirkungsweise der Polyphenole nicht nur auf ihr antioxidatives Potential zurückzuführen ist, sondern, dass sie auch auf andere Art und Weise Einfluss auf den AD-Mechanismus nehmen (Kim *et al.* 2010).

Um flavonoid-induzierte Neuroprotektivität zu testen, werden häufig humane Neuroblastomzelllinien oder murine neuronale Zelllinien, welche mit der schwedischen Mutante von APP stabil transfiziert wurden, verwendet. Als Tiermodell für die Erforschung der Alzheimer Krankheit werden meistens transgene Mauslinien herangezogen, welche humanes APP und/oder PS-1 bzw. PS-2 überexprimieren (AULD *et al.* 2002). Diese Mäuse weisen charakteristische Merkmale der AD, wie u.a. amyloide Ablagerungen, neuritische Dystrophie (Games *et al.* 1995, Hsiao *et al.* 1996, Holcomb *et al.* 1999) und cognitive Defizite (Hsiao *et al.* 1996, Holcomb *et al.* 1999) auf.

Basierend auf epidemiologischen Studien haben besonders Curcumin, Resveratrol, Pflanzenextrakte und die Catechine des grünen Tees aufgrund ihrer Pathogenesehemmenden Wirkung gegenüber AD Aufmerksamkeit erlangt. Da sich die vorliegende Arbeit speziell mit Flavonoiden beschäftigt, wird auf diese Substanzklasse im Folgenden näher eingegangen.

Extrakte der Blaubeere, dessen Bestandteile u.a. Anthocyanine, Catechin und Epicatechin sind, können aufgrund ihres antioxidativen und anti-apoptischen Potentials, sowie über Regulierung der Zellsignalwege AD beeinflussen. So wurde in Ratten, die Blaubeerextrakt zu sich genommen hatten, im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrige Caspase-3-Aktivität in der ischämischen Hemisphäre (Sweeney *et al.* 2002) und ein niedrigeres Level an NF- κ B festgestellt (Goyarzu *et al.* 2004). Zudem zeigten transgene APP/PS1 Mäuse, deren Nahrung vom vierten bis zum zwölften Monat aus 2% Blaubeerextrakt bestand, im Irrgarten-Test verbesserte cognitive Fähigkeiten (Joseph *et al.* 2003). Aufgrund von Untersuchungen des Gehirns dieser Mäuse konnte kein Einfluss auf A β -Produktion und Plaquebildung festgestellt werden. Aufgrund der erhöhten PKC- α Level im Hippocampus scheint jedoch eine Beeinflussung der neuronalen Signalwege vorzuliegen.

Auch der standardisierte Ginkgo biloba-Extrakt (EGb 761), welcher zu 24 % aus Flavonoiden, (hauptsächlich die Zuckerkonjugate von Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin) besteht, hat aufgrund antioxidativer, anti-apoptotischer und anti-amyloidogener Eigenschaften therapeutisches Potential gegenüber AD (Ramassamy *et al.* 2006). Unter anderem sind hier folgende Effekte zu nennen: a) Schutz vor der A β -Toxizität in primären Hippocampus- und PC12-Zellen (Bastianetto *et al.* 2000), b) Reduktion der ROS in APP_{sw}695-Zellen (Smith und Luo 2003), c) Steigerung der sAPP α Produktion und Reduktion der Caspase-3-Aktivität (Luo *et al.* 2002), d) Reduktion der A β -Fibrillenbildung (Simons *et al.* 1998) *in vitro* und e) verbesserte kognitive Eigenschaften *in vivo* (Oken *et al.* 1998).

Im Zuge von Untersuchungen mit einem Extrakt des grünen Tees und dessen Catechinen, deren wichtigste Vertreter Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechingallat (EGCG) sind, hat sich besonders EGCG als effektive Verbindung herausgestellt. Zellexperimente zeigten, dass die Reinsubstanz wirksamer ist als der grüne Teeextrakt und dass die anti-AD-Wirkung von EGCG durch die Anwesenheit von EGC und EC gehemmt wird (Rezai-Zadeh *et al.* 2005). Die neurotoxische Wirkung von EGCG wird zum Beispiel in Verbindung mit der Expression bestimmter apoptotischer Gene gebracht. So wurde festgestellt, dass EGCG 1 μ M in SH-SY5Y Zellen die Expression von Bax, Bad oder Fas Ligand, jedoch nicht Bcl-2 und Bcl-x reduzierte. *In vivo*-Studien zeigen diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse (Mandel *et al.* 2004, Levites *et al.* 2002).

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien ergaben, dass EGCG den proteolytischen Spaltungsprozess von APP regulieren kann (Ramassamy *et al.* 2006). In neuronalen Zellkulturen konnte EGCG den nicht-amyloidogenen Weg stimulieren. Rezai-Zadeh und Mitarbeiter zeigten 2005, dass EGCG in murinen N2A-Zellen und primären Neuronen von transgenen Alzheimer-Mäusen (TgAPP_{sw}), welche jeweils mit der humanen schwedischen Mutante Form von APP (APP_{sw}N2A) transfiziert waren, die A β -Produktion dosisabhängig (EGCG: 5-20 μ M) bis zu 61% bzw. 38% reduzierte.

Untersuchungen der Gehirne von transgenen Alzheimer-Mäusen (TgAPP_{sw}), welchen im Alter von zwölf Monaten täglich über einen Zeitraum von 60 Tagen ip 20mg/kg EGCG injiziert wurden, zeigten eine Reduktion der A β ₄₀ und A β ₄₂ um 47% und 38 % und eine Erhöhung der α -Sekretaseaktivität um 40% und nicht amyloidogener Fragmente (Ramassamy *et al.* 2006, Rezai-Zadeh *et al.* 2005). Das Resultat einer direkten ventrikulären Injektion von EGCG zeigte zudem, dass die Verbindung EGCG selbst und nicht ein Metabolit die α -Sekretase beeinflusst. Eine ähnliche Reduktion der amyloiden

Ablagerungen war auch nach täglicher, sechs Monate andauernder oraler Gabe von 50mg EGCG/kg TgAPP_{sw} über das Trinkwasser zu beobachten (Rezai-Zadeh *et al.* 2008).

Die Verbindung EGCG konnte in PC12-Zellen und humanen SH-SY5Y-Neuroblastom-Zellen die Spaltung von APP modulieren, indem die α -Sekretase-Aktivität über Aktivierung der anti-apoptotisch wirkender PKC-Isoformen α und ϵ beeinflusst wurde. Eine Erhöhung der sAPP α -Produktion, eine Reduktion von holo APP, A β -Bildung und Zelltod war die Folge. Dabei war ein maximaler Effekt bei einer Konzentration von 10 μ M EGCG zu beobachten, welcher sowohl durch α -Sekretase-Hemmer, als auch durch PKC-Inhibitoren verhindert wurde (Levites *et al.* 2003). Durch Betrachtung von Hippocampus-Gewebe von Mäusen, welche täglich über eine Dauer von zwei Wochen 2mg/kg EGCG erhielten, konnten die *in vitro*-Studien belegt werden (Levites *et al.* 2003)

Erhöhte sAPP α -Produktion und Reduktion von A β wurden von Obregon und Mitarbeitern (2006) mit Aktivitäts- und Expressionssteigerung von ADAM-10 assoziiert (Abb. 2.10). Mit Hilfe von siRNAs gegen die bisher bekannten α -Sekretasen wurde nachgewiesen, dass speziell ADAM-10 bei der EGCG-vermittelten neuroprotektiven Wirkung von Bedeutung ist.

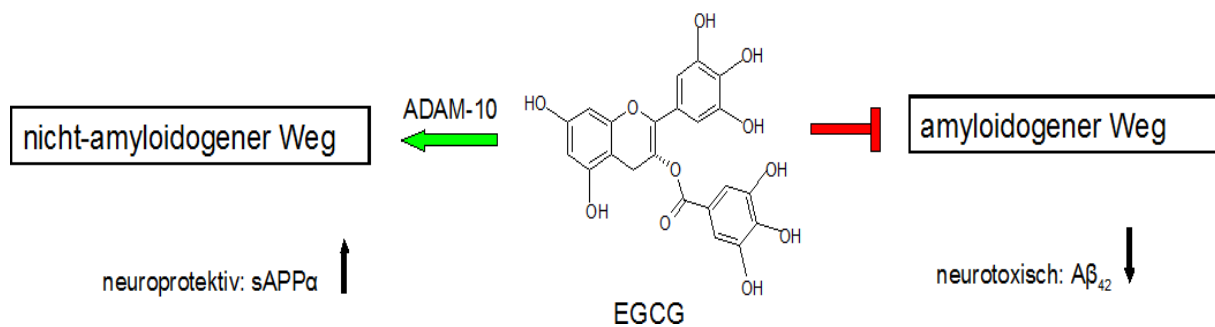


Abb. 2.10: Einfluss von EGCG auf die APP-Prozessierung

Zusammenfassend scheinen Flavonoide aufgrund ihrer anti-amyloidogenen, antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften präventiv gegenüber der AD zu wirken bzw. den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. Um weitere effektive Verbindungen zu finden und einen gezielten Einsatz zu ermöglichen, bedarf es der weiteren Forschung über spezielle Wirkungswege, die der polyphenolischen Neuroprotektion unterliegen.

Um herauszufinden, ob auch andere Flavonoide vergleichbare Effekte auf APP und ADAM-10 aufweisen oder ob anhand der Flavonoidstruktur eine neuroprotektive Wirkung ableitbar ist, bedarf es eines Flavonoid-Screenings. Die ADAM-10-Relevanz von Verbindungen, die sAPP α -Produktion in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y stimulieren, soll mit Hilfe der RNAi Technologie sowohl *in vitro* mittels APP und ADAM-10 stabil transfizierter HT1080 Zelle, als auch *in vivo* mittels transgene AD-Mäuse überprüft werden. *In vivo* ist ein Knockdown mit Hilfe von AAV-Vektoren, welche gezielt ins Gehirn injiziert werden sollten, möglich. Um die Anwendungsmöglichkeit *in vivo*, auch *in vitro* am besten wiederzuspiegeln, wurde geplant, dass über den Einsatz von AAV-Vektoren ein shRNA vermittelte Herunterregulierung von ADAM-10 erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vorbereitungen für dieses Experiment (*in vitro* und *in vivo*) getroffen. Dies beinhaltete die Suche nach einer potenten siRNA/shRNA und einem effektiven Flavonoid. Um später auch *in vivo*-Experimente durchführen zu können, wurden innerhalb dieser Arbeit auch erste Vorbereitungen für anstehende Tierversuche getätigt. Dies beinhaltete die AAV-Produktion und Aufreinigung mittels HPLC, die Etablierung der stererotaktischen Injektion und die Aufzucht des transgenen Mäusestamms.

2.5 Foamyviren

Foamyviren gehören zu den Spumaretrovirinaen, einer Gattung der Retrovirenfamilie. Die vollständige Klassifizierung der Retroviren ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Retroviren haben die besondere Fähigkeit, ihr einzelsträngiges RNA-Genom durch Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in Wirts-DNA-Genom einzubauen (Baltimore 1970, Temin *et al.* 1970). Da dieses DNA-Integrat, welches auch Provirus genannt wird, als Matrize für die virale RNA- und Protein-Synthese dient, ist eine Vermehrung des Virus möglich (Lewinski *et al.* 2005).

Weiterhin werden Retroviren aufgrund ihrer Genomstruktur in einfache und komplexe Retroviren eingeteilt. Während die einfachen Viren nur die vier elementaren Virusbestandteile Gag (Kapsidprotein), Pro (Protease), Pol (Polymerase) und Env (Hüllprotein) kodieren, haben komplexe Retroviren zusätzlich Bereiche, welche für akzessorische, regulatorisch wirkende Proteine kodieren (Cullen *et al.* 1998). Die meisten Retroviren sind pathogen und induzieren in den infizierten Wirten kanzerogene und neurologische Erkrankungen (Jacobson *et al.* 1990, Nagai und Osame 2003).

Tab. 2.1: Klassifizierung der Retroviren (modifiziert nach Wiktorowicz 2009)

Unterfamilie	Gattung	Beispiel
Orthoretrovirinae	Aretroviren	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus (RSV)
	Bretroviren	Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) Mouse mammary tumor virus (MMTV)
	Γretroviren	Murine leukemia virus (MLV) Feline leukemia virus (FeLV)
	Deltaretroviren	Human T-lymphotropic virus (HTLV) 1, 2, 3,4 Simian T-lymphotropic virus (STLV) 1, 2, 3 Bovine leukemia virus (BLV)
	Epsilonretroviren	Walleye dermal sarcoma virus Walleye epidermal hyperplasia virus 1
	Lentiviren	Human immunodeficiency virus (HIV) 1, 2 Simian immunodeficiency virus (SIV) Feline immunodeficiency virus (FIV)
Spumaretrovirinae	Foamyviren/ Spumaviren	Bovine foamy virus (BFV) Feline foamy virus (FFV) Simian foamy virus (SFV) Prototyp foamy virus (PFV)

Foamyviren wurden zum ersten Mal Anfang der 50iger Jahre in Zellkulturen aus Affenrindern beschrieben (Enders *et al.* 1954). Bisher konnte das Virus in den Säugerspezies wie Gorillas, Schimpansen, Makaken, Katzen und Rindern sowie Seelöwen und Schafen nachgewiesen werden (Bieniasz *et al.* 1995, Hooks *et al.* 1972, Rustigian *et al.* 1955, Riggs *et al.* 1969, Malmquist *et al.* 1969, Kennedy-Stoskopf *et al.* 1986, Flanagan 1992).

Da foamyvirale RNA lediglich auf der Mundschleimhaut nachgewiesen wurde, während man die DNA des Foamyvirus in allen Gewebetypen fand (Falcone *et al.* 1999), wird das Virus vermutlich durch den Speichel (durch Bisse oder Lecken) übertragen (Meiering *et al.* 2001, Falcone *et al.* 2003).

In einem humanen Zellisolat eines Krebs-Patienten wurden erstmals 1971 Foamyviren im Menschen (PFV, *engl.* prototyp foamy virus) entdeckt (Herchenroder *et al.* 1994). Da die Sequenz nahezu identisch mit der des Schimpansen war, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Übertragung durch Zoonose handelte (Switzer *et al.* 2004, Wolfe *et al.* 2004). Bisher konnten keine foamyviralen Infektionen, die nicht durch Zoonosen verursacht wurden, im Menschen gefunden werden (Linial 2000, Wolfe *et al.* 2004). Da zudem keine Übertragung von Mensch zu Mensch festgestellt werden konnte, scheint der Mensch der Endwirt des Virus zu sein (Callahan *et al.* 1999 und Heneine *et al.* 2003).

FV weisen einen breiten Zelltropismus auf (Hill *et al.* 1999) und verursachen in vielen Zelllinien *in vitro* einen cytopathischen Effekt, der schließlich die Zerstörung der Zelle einleitet. Da sich dieser Prozess durch Syncytien-Bildung und zellschaumartig erscheinende Zell-Vakuolisierung auszeichnet, werden sie, abgeleitet von dem englischen Wort für schaumig, „foamy“, Foamyviren genannt. Bisher hat man weder in zufälligen, noch in natürlich infizierten Wirten eine Verbindung zu Krankheiten oder Krankheitserscheinungen beobachtet (Linial 2000).

2.5.1 Aufbau des FV-Partikels

Das foamyvirale Partikel besitzt einen Durchmesser von 100 bis 140 nm und ist von einer Lipidmembran umgeben (Delelis *et al.* 2004). Wie bei anderen Retroviren auch, ist das Hüllprotein (Env) als Trimer in dieser Hüllmembran verankert (Wilk *et al.* 2000). Im Gegensatz zu den Orthoretroviren, bei denen das Gag-Vorläuferprotein durch die virale Protease in das Matrix-, Kapsid- und Nucleocapsidprotein gespalten wird, werden bei Foamyviren lediglich die C-terminalen 3kDa abgespalten. Daher beinhaltet das Kapsid, welches aus dem Gag-Protein besteht, nicht nur die unprozessierte (71kDa), sondern auch die prozessierte Variante.

Neben den Strukturproteinen ist im FV-Virion zudem das Pol-Vorläuferprotein vorhanden, aus welchen die für die Replikation notwendigen Enzyme, Integrase, Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität und Protease, hervorgehen (Flugel *et al.* 2003). Auch der foamyvirale Replikationszyklus unterscheidet sich etwas von dem der anderen Retroviren. Bei den FV erfolgt die reverse Transkription der RNA in DNA nicht nach der Infektion, sondern in einer späten Replikationszyklusphase. Zum großen Teil geschieht dies erst vor der Freisetzung der neu produzierten Viruspartikel. Daher ist in extrazellulären foamyviralen Partikeln nicht nur DNA, sondern auch RNA vorhanden (Moebeis *et al.* 1997, Yu *et al.* 1999).

2.5.2 Genomorganisation

Mit einer RNA-Länge von 11,68 kb (PFV) bzw. 13,25 kb (PFV +retrovirale LLTRs am 3' und 5' Ende) ist das FV-Genom innerhalb der Klasse der Retroviren am größten (Schmidt *et al.* 1997). Als komplexe Retroviren besitzen Foamyviren neben dem gag-, pol- und env-Gen weitere offene Leserahmen (ORF, *engl.* open reading frame) am 3' Ende ihres Genoms (Rethwilm *et al.* 1987). Diese kodieren für das Transaktivatorprotein Tas (*engl.* transactivator of spumavirus) bzw. für das Protein Bet (*engl.* between env and tas) (Rethwilm *et al.* 1991). Der hierfür zuständige interne Promotor (IP, *engl.* internal

promotor) am 3'Ende des env-Gens stellt eine weitere Besonderheit des FV dar und ist sehr wichtig für virale Infektionen von Zellkulturen (Lochelt *et al.* 1993). Tas spielt in der Zelle eine wichtige Rolle bei der Expression von viralem Gag, Pol und Env, denn bei einer gewissen Tas-Konzentration wird über eine Bindung an den U3-Promotor die Transkription von mRNA gestartet (Bodem *et al.* 2004, Erlwein und Rethwilm 1993).

Die genomische RNA der Foamyviren besitzt zwei cis-aktive Sequenzen (CAS, *cis acting sequences*), welche für den Transfer foamyviraler Vektoren erforderlich sind (Erlwein *et al.* 1998, Heinkelein *et al.* 1998). Neben der CAS I-Region, welche sich in der 5'UTR befindet und sich bis in das gag-Gen erstreckt, brauchen FV zudem ein CAS II-Sequenz, welche in der 3'-Region des pol-Gens lokalisiert ist (Heinkelein *et al.* 2002a; Trobridge *et al.* 2002a). Innerhalb CAS I und II liegen sogenannte Pol-Enkapsidierungssequenzen (PES I und II), die für die Inkorporation von Pol Protein ins Kapsid erforderlich sind (Peters *et al.* 2005). Im Unterschied zu anderen Orthoretroviren wird das foamyvirale Pol-Protein nicht als Gag-Pol-Fusionsprotein, sondern von einer separat gespleißten mRNA exprimiert. Zusätzlich zu einem Polypurin-Trakt (3'PPT), welcher den Initialort der Positivstrang-Synthese darstellt (Erlwein *et al.* 1998, Heinkelein *et al.* 1998), besitzt das pol-Gen vier weitere purinreiche Sequenzen in der 3'-Region. Da die Sequenz einer dieser internen PPT's identisch ist mit der des 3'PPT, ist diese vermutlich auch für die Initiation der Plusstrangsynthese zuständig (Peters *et al.* 2008).

2.5.3 Foamyvirale Proteine

2.5.3.1 Gag (Kapsidprotein)

Das foamyvirale Gag-Protein ist ein Strukturprotein, welches das virale Kapsid bildet. Wie bereits erwähnt, existieren ein Gag-Vorläuferprotein und eine verkürzte prozessierte Form (Verhältnis 1:4) (Cartellieri *et al.* 2005b). Dieser Verkürzungsprozess ist essentiell für die Virusinfektiosität (Enssle *et al.* 1997). Anders als andere Retroviren besitzen FV keine Cys-His-Boxen im Gag-Protein, welche eine Rolle bei Bindung und Verpackung genomischer RNA haben (Berkowitz *et al.* 1996). Stattdessen weist der 3'-Bereich des Proteins drei Glycin-Arginin-reiche Sequenzen (GR-Boxen I-III) auf. Bisher ist eine Nukleinsäure-Bindedomäne in der GR1-Box und eine Kernlokalisationsdomäne (NLS, *engl.* nuclear localisation signal) in der GR2-Box bekannt. Während der erste Bereich gleichermaßen sowohl RNA als auch DNA bindet, ist die zweite erwähnte Domäne dafür zuständig, dass während des Infektionszyklus das Gag-Protein in den Nukleus transportiert wird (Schliephake und Rethwilm 1994, Yu *et al.* 1996).

Der N-terminale Teil des Proteins spielt eine Rolle bei der Interaktion mit Glycoprotein und Partikelfreisetzung aus der Wirtszelle (Cartellieri *et al.* 2005a). Hier befindet sich eine L-Domäne, welche für das Knospen und den Zusammenbau der viralen Partikel zuständig ist (Stange *et al.* 2005) und das coil-coiled Motiv, welches vermutlich für Gag-Proteine als intrazelluläre Interaktionsstelle für den Kapsidaufbau dient (Tobaly-Tapiero *et al.* 2001). Da bei foamyviralen Partikel ohne Env alle Kapside im Cytoplasma bleiben und eine Knospung von der Zellemembran und Bildung virus-ähnlicher Partikel (VLP, *engl.* virus like particles) nicht möglich ist, ist das Zusammenspiel von Gag, -vermutlich die 300 N-terminalen Basenpaare (Cartellieri *et al.* 2005)- und Env von essentieller Bedeutung bei der Freisetzung des Virus aus der Zelle (Fischer *et al.* 1998, Geiselhart *et al.* 2003).

2.5.3.2 Pol (Enzymaktivitäten)

Das foamyvirale pol-Gen kodiert für die drei retroviralen Enzyme: Protease (PR), die Reverse Transkriptase mit RnaseH-Aktivität (RT) und die Integrase (IN) (Katz und Skalka 1994).

Die Translation erfolgt nicht als Gag-Pol-Fusionsprotein wie bei anderen Orthoretroviren, sondern autonom über eine eigene gespleißte mRNA (Enssle *et al.* 1996, Yu *et al.* 1996a).

Der Aufnahmeprozess von Pol in die foamyviralen Partikel ist bisher noch nicht geklärt (Linial 1999). Hohe Affinität zwischen GAG und Pol sowie spezielle Interaktionen zwischen Pol und viraler RNA stehen in der Diskussion (Wiktorowicz 2009). Bei Orthoretroviren wird das Pol-Vorläuferprotein (127 kDa) in die drei oben genannten Enzyme (P, RT, IN) prozessiert. In FV hingegen wird es in ein P-RT-RNaseH-Protein (85kDa) und Integrase (40 kDa) gespalten (Netzer *et al.* 1993, Flugel und Pfrepper 2003), wobei das Vorläuferprotein verpackt wird und die Spaltung erst im Partikel beginnt (Heinkelein *et al.* 2002, Peters *et al.* 2005).

Ein weiterer Unterschied zu Orthoretroviren stellt die RT dar. Statt einer Mg^{2+} -Abhängigkeit zeigt sie Mn^{2+} -Abhängigkeit auf (Kogel *et al.* 1995).

2.5.3.3 Env (Hüllprotein)

Das Hüllprotein des FV ist 130 kDa groß und besteht aus drei Domänen, dem N-terminalen Leader- bzw. Signalpeptid (LP, 18 kDa), der zentralen Oberflächeneinheit (SU, 80 kDa) und der C-terminalen Transmembranuntereinheit (TM, 48 kDa) (Lindemann *et al.* 2003). Es ist ein Typ III-Membranprotein, wobei die membranspannenden Domänen (MSD) sich im Bereich des LP und TM befinden. Die Synthese des Env-Vorläuferproteins

findet am ER statt (Lindemann *et al.* 2001, Geiselhart *et al.* 2003) und die Spaltung durch zelluläre Proteasen in LP, SU und TM auf dem Weg zur Oberfläche der Zelle. Bei Orthoretroviren entstehen hierbei nur die zwei Untereinheiten SU und TM, da das LP, welches die Translokation des Vorläuferproteins in das ER leitet, kurz nach der Synthese vom restlichen Molekül entfernt wird (Hunter *et al.* 1997). Nach dem Spaltungsprozess, welcher essentiell für die Infektiösität der Viruspartikel ist (Duda *et al.* 2004, Geiselhart *et al.* 2004), liegt der N-Terminus des Leaderpeptids intrazellulär und der der TM auf der extrazellulären Seite vor. Dort ist zudem die SU-Domäne mit TM-Bereichen assoziiert (Lindemann *et al.* 2001, Wilk *et al.* 2001). Die Interaktion zwischen Gag-Protein und Env über einen Leaderprotein-Abschnitt ist essentiell für die Knospung der Viren (Wilk *et al.* 2001, Geiselhart *et al.* 2003). Aufgrund eines ER-Sortierungssignals im C-Terminus der TM erfolgt diese an der ER-Membran (Goepfert *et al.* 1997). Alle drei Untereinheiten werden in die viralen Partikel verpackt, wobei das foamyvirale Env auch autonom aus der Zelle knospen kann, was zur Entstehung von nicht infektiösen subviralen Partikeln (SVP) führt (Shaw *et al.* 2003).

2.5.3.4 Die akzessorischen Proteine Tas und Bet

Als komplexe Retroviren besitzen Foamyviren neben den klassischen retroviralen Proteinen Gag, Pol und Env weitere offene Leserahmen (ORF, open reading frame) am 3'-Ende ihres Genoms (Rethwilm *et al.* 1987). Diese kodieren für das Transaktivatorprotein Tas (ORF1) bzw. für das Protein Bet (ORF1 und ORF2) (Rethwilm *et al.* 1991). Sowohl der interne Promotor als auch der U3-Promotor in der 5'LTR-Region wird von Tas, welches am C-Terminus eine Aktivierungsdomäne und am N-Terminus eine DNA-Bindungsdomäne besitzt, aktiviert (Kang *et al.* 1998, He *et al.* 1996, Bodem *et al.* 2007). Bet entsteht durch die Translation einer gesplittenen mRNA von den Leserahmen 1 und 2 (Muranyi *et al.* 1991) und wird in großen Mengen in infizierten Zellen gebildet und sekretiert. Umgebende Zellen können anschließend Bet aufnehmen. Bisher ist zwar die Funktion von Bet nicht bekannt, jedoch vermutet man, dass es den Einbau von APOBEC in die viralen Partikel verhindert (Russel *et al.* 2005) und somit ähnlich wie Vif von HIV-1 als Antagonist von APOBEC3G fungiert (Russel *et al.* 2005). Als zelluläre Deaminasen deaminieren APOBEC (*engl.* Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic complex)-Proteine in einzelsträngigen Virus-DNA, Cytosin zu Uracil. Während der reversen Transkription führt dies bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges zu G->A-Mutationen (Romani *et al.* 2009). Der exakte Interaktionsmechanismus zwischen Bet und APOBEC ist jedoch unbekannt (Lochelt *et al.* 2005).

2.5.4 Der foamyvirale Replikationszyklus

Der foamyvirale Replikationszyklus unterscheidet sich an mehreren Stellen von dem der Orthoretroviren. Die Ursache dafür, dass das infektiöse FV-Genom aus DNA und das der Orthoretroviren aus RNA besteht, liegt darin, dass die orthoretrovirale reverse Transkription nach Aufnahme in die Zelle erfolgt, während es bei FV erst spät im Replikationszyklus, d.h. vor der Freisetzung des viralen Partikels, dazu kommt (Moebes *et al.* 1997, Yu *et al.* 1999).

Die Aufnahme des FV in die Zelle erfolgt nach Bindung an einen noch unbekanntem Rezeptor und anschließender pH-abhängiger Endocytose (Picard-Maureau *et al.* 2003). Nach Freisetzung der DNA kommt es zur Bildung von einem Präintegrationskomplex (PIC), der entlang der Mikrotubuli zu dem Nukleus befördert wird (Saib *et al.* 1997). Da bei FV der Transport nicht durch die Zellkernmembran erfolgt, gelangen sie erst zu dem Chromosom des Wirts, wenn sich die Membran im Zuge der Mitose auflöst (Lewis *et al.* 1992, Trobridge und Russell 2004). Dadurch ergibt sich, dass FV nur sich teilende Zellen infizieren können. Die für die Replikation notwendige Integration in das Zellgenom beginnt mit der Expression des Tas über den internen Promotor (Enssle *et al.* 1999). Dadurch kommt es zur Transkription der viralen und akzessorischen Proteine (Linial *et al.* 1999). Abschließend wird die virale RNA im Cytoplasma in DNA revers transkribiert. Nach der Bildung des Partikels, in dem sowohl doppelsträngige DNA als auch RNA verpackt werden, erfolgt die Knospung an der ER-Membran (Linial 1999). Somit ist es möglich, dass die virale DNA, statt verpackt zu werden, erneut in die vorliegende Wirts-DNA integriert (intrazelluläre Retrotransposition, IRT) und es zu einer Anhäufung von Provirus in der Wirtszelle kommt (Heinkelein *et al.* 2000).

2.5.5 Foamyvirale Vektoren

Trotz innovativer medizinischer Entwicklungen ist es bisher bei einer Vielzahl an Erbkrankheiten nur möglich, die Symptome zu behandeln. Beruhen die Erkrankungen auf Gendefekten, so besteht die Möglichkeit, mittels Gentherapie diese Gene zu ersetzen oder zu korrigieren (Cotrim und Baum 2008, Mulligan 1993). Für die *in vivo*-Therapie wird der Vektor in den lebenden Organismus eingebracht. Im Zuge der *ex vivo*-Therapie werden dem Patienten Zellen replantiert, welche ihm zuvor entnommen und im Labor gentechnisch modifiziert und vermehrt wurden. Um im Zuge der gentherapeutischen Maßnahmen zum Beispiel ein funktionelles Gen in Körperzellen einführen zu können, wurden verschiedene Vektorsysteme entwickelt. Dabei sind Vektoren mit einem möglichst stabilen Genom, hoher Aufnahmekapazität und geringe Immunogenität ideal. Zur

Gentherapie kommen unterschiedliche Vektorsysteme zum Einsatz. Adenovirale und retrovirale Systeme wurden bereits in dieser Arbeit erwähnt. Unter den Retroviren bieten vor allem Lentiviren und Foamyviren vielversprechende Möglichkeiten.

Foamyvirale Vektoren bieten den Vorteil, stabil mit einem geringen onkogenen Potential ins Genom zu integrieren, zudem haben sie eine große Verpackungskapazität und einen breiten Zelltropismus. Weiterhin zeigen sie keine Pathogenität. Daher bieten Foamyviren in diesem Gebiet einen vielversprechenden Ansatz (Naldini *et al.* 1996) und sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung.

Das foamyvirale System wurde unter anderem zur Steigerung der Expressionseffizienz und Erhöhung der Vektortiter fortlaufend modifiziert. In dieser Arbeit wurde mit einem replikationsdefizienten PFV-basierenden Vektor gearbeitet, dem Genomschnitte die zur Replikation nötig sind, fehlen. Somit ist eine Infektion und DNA-Integration, aber keine Partikelneusynthese möglich. Das derzeitige zur Verfügung stehende System ist ein vier-Plasmidsystem, bestehend aus dem viralen Vektor und den drei Verpackungsplasmiden (gag, pol, env), wobei der virale Vektor nur noch aus RU5-Sequenz, CAS I und II, gefolgt von der Expressionkassette des Reportergens, sowie der deletierten U3-Region besteht (Mergia und Heinkelein 2003).

2.5.6 Foamyvirale Rezeptor-Studien

Die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle wird durch die Bindung der viralen Hüllproteine an Zelloberflächenmoleküle initiiert (Dimitrov 2004). Bisher ist bekannt, dass FV, nachdem sie an den Rezeptor gebunden haben, über eine pH-abhängige Endozytose mit der zellulären Membran fusionieren (Picard-Maureau *et al.* 2003). Bislang konnte auf viraler Seite die Rezeptorbindedomäne auf die Env-SU Region eingeschränkt werden (Berg *et al.* 2003). Um die Env-Rezeptor-Bindung weiter zu charakterisieren, wurden mit Rezeptorbindedomänen-IgG-Bereiche fusionierten Konstrukten gearbeitet (Duda *et al.* 2006). Der zelluläre Rezeptor für FV ist jedoch bisher noch nicht identifiziert worden. Aufgrund eines breiten Zelltropismus der FV (Hill *et al.* 1999)- sogar Reptilien- und Fischzellen konnten ebenfalls infiziert werden (Rethwilm 2010)- geht man davon aus, dass es sich dabei um ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenmolekül handelt.

Ein weit verbreitetes Oberflächenmolekül ist das Heparansulfat (HS). Dabei handelt es sich um ein Glucosaminglycan (GAG), welches aus einer linearen Molekülkette aus repetitiven Disaccharideinheiten besteht (Opie *et al.* 2003). Es zählt neben Heparin und Chondroitinsulfat A (CSA) und C zu den vier meist verbreiteten Membran-verknüpften

GAGs. Heparin (HE) und Heparansulfat besitzen dabei sehr ähnliche Strukturen. Heparin ist ein lineares Polymer bestehend aus sich wiederholenden Einheiten von 1->4 verknüpften Pyranosyluronsäuren und 2-Amino-2-deoxyglucopyranose (Glucosamin) (Capila und Linhardt 2002). Bei den Uronsäuren handelt es sich um L-Iduronsäure (90%) und D-Glucuronsäure (10%). Die Disaccharid-Einheiten sind durchschnittlich mit 2,7 Sulfat-Gruppen modifiziert. Der Aufbau von Heparansulfat ist entsprechend. Vorherrschend ist hier jedoch die Glucuronsäure und die durchschnittliche Modifizierung ist eine Sulfat-Gruppe je Disaccharid-Einheit. Bei beiden Polymeren variiert die strukturelle Variabilität durch Modifikationen. Diese liegen bei physiologischem pH-Wert vollständig ionisiert vor (Opie *et al.* 2003, Lindahl *et al.* 1998). Die GAG-Seitenketten sind posttranslational kovalent an ein Proteingerüst (z.B. Syndecan) gebunden. Diese kommen als HS-Proteoglycane (HSPGs) ubiquitär auf der Oberfläche und in der extrazellulären Matrix der Zelle vor (O'Donnell und Shukla 2008). HS ist an vielen biologischen Vorgängen beteiligt. Da es bei physiologischem pH-Wert negativ geladen ist, interagiert es mit positiv geladenen Aminosäuren vieler verschiedenen Proteinen über elektrostatische Anziehung. Weiterhin kontrolliert es Zellproliferation und Differenzierung, indem es als Corezeptor von Cytokinen und Wachstumsfaktoren dient. Für eine Vielzahl von Viren ist dieses Molekül bereits als Corezeptor beschrieben worden, z. B. für das Sindbisvirus (Byrnes und Griffin 1998), das Vaccinia-Virus (Chung *et al.* 1998), das Humane-Herpesvirus 8 (HHV8) (Akula *et al.* 2004) oder das Herpes simplex Virus 1 (O'Donnell und Shukla 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher Heparansulfat als möglicher Rezeptor für FV untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Cytotoxizitätsstudien

Aufgrund der Eigenschaft, Krebszellen zu schädigen, stellen Flavonoide ein interessantes Gebiet für Krebsprävention und -therapie dar. Viele *in vitro* Studien zeigen, dass Flavonoide auf unterschiedliche Art und Weise den Zelltod induzieren können. Da eine Reihe von Mechanismen für eine Flavonoid-induzierte Cytotoxizität festgestellt wurde, erleichtert die Entwicklung von Strukturwirkungsbeziehungen die Vorhersage eines cytotoxischen bzw. antikanzerogenen Potenzials eines bestimmten Flavonoids. Um die Suche nach effektiven, chemopräventiv wirksamen Kandidaten zu unterstützen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere strukturelle Charakteristika identifiziert, die mit einer Flavonoid-induzierten Cytotoxizität assoziiert sind. Es wurde mit 23 Flavonoiden, welche aus unterschiedlichen Stoffgruppen stammen, aber aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit vergleichbar sind, und der humanen leukämischen T-Zelllinie Jurkat E6-1 gearbeitet (Abb. 3.1).

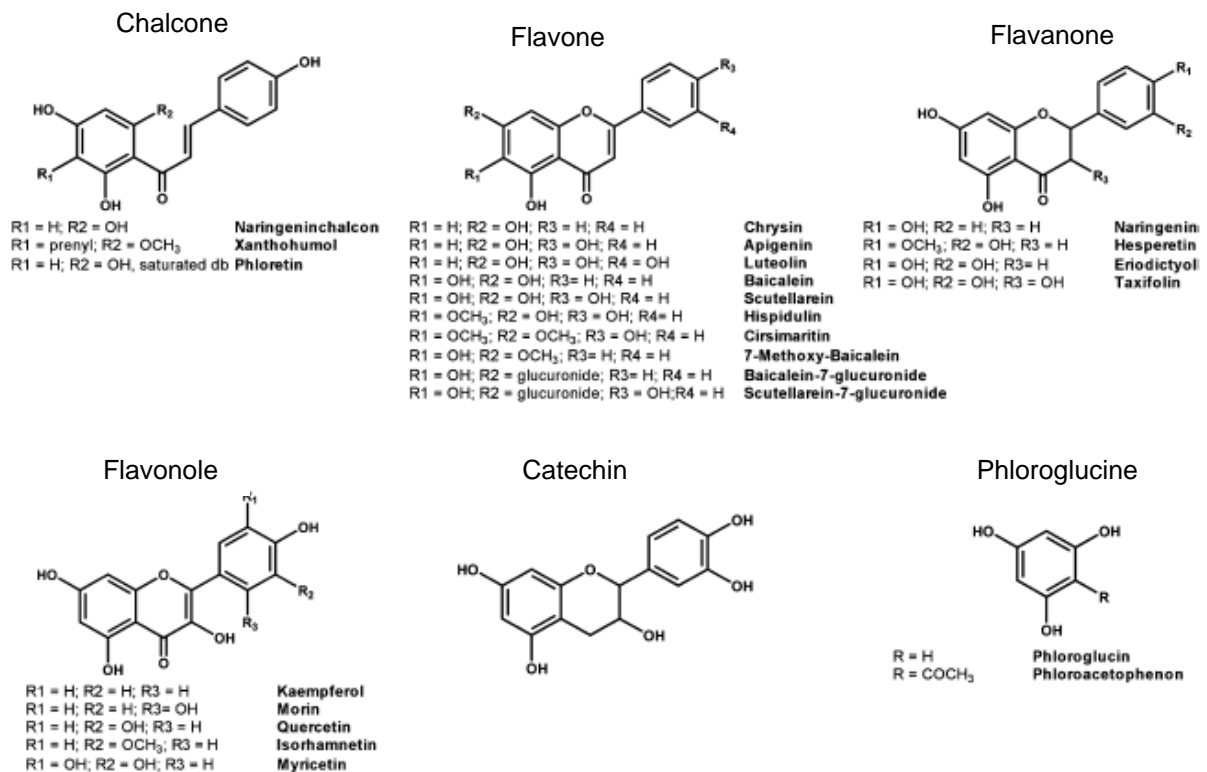


Abb. 3.1: Strukturformeln der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Polyphenole (Plochmann *et al.* 2007)

Die meisten Verbindungen stammten aus der Klasse der Flavone. Hierzu zählen Chrysin, Apigenin, Luteolin, Baicalein, Scutellarein und Hispidulin. Typisch für diese Klasse ist eine C₂-C₃ Doppelbindung und eine 4-Oxogruppe. Da Flavonoide im Zuge des enterohepatischen Kreislaufs unter anderem durch Methoxylierung oder Glucuronidierung metabolisiert werden (Spencer *et al.* 2003), wurde des Weiteren die cytotoxische Wirkung der Derivate Cirsimaritin, 7-Methoxy-Baicalein, Baicalein-7-glucuronid sowie Scutellarein-7-glucuronid untersucht.

Befindet sich im Grundmolekül eine Hydroxygruppe an C₃-Position, führt dies zu der Untergruppe der Flavonole. Hier wurden Kämpferol, Morin, Quercetin, Myricetin und als methoxylierte Verbindung Isorhamnetin eingesetzt.

Naringenin, Hesperitin, Eriodictyol und Taxifolin gehören zu der Gruppe der Flavanone. Diese unterscheiden sich von Flavonen durch eine gesättigte C₂-C₃ Bindung.

Die Flavonolstruktur ohne die Anwesenheit einer Carbonylgruppe an C₄ führt zur der Klasse der Catechine.

Flavonoide, welche keinen geschlossenen C-Ring aufweisen, werden Chalcone genannt. Naringenin-chalcon, Phloretin und Xanthohumol wurden aus dieser Stoffklasse ausgewählt. Besonders von Xanthohumol, welches zusätzlich unter anderem eine Prenylstruktur aufzeigt, wurde über eine cytotoxische Aktivität in verschiedenen Tumorzellen berichtet (Miranda *et al.* 1999).

Zusätzlich zu den erwähnten Flavonoiden wurden auch zwei andere polyphenolische Verbindungen untersucht, d.h. Phloroglucin und Phloroacetophenon, welche als Metabolite von Flavonoiden beschrieben sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jeweils der EC₅₀-Wert der genannten Substanzen ermittelt. Dieser Wert bezeichnet die Konzentration, bei der 50% der Zellen noch leben. Indem die EC₅₀-Werte mehrerer Substanzpaare, die sich nur in einem Strukturelement unterscheiden, miteinander verglichen wurden, wurde die Ermittlung von Strukturwirkungsbeziehungen ermöglicht.

3.1.1 Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Flavonoide

Um bei den Zytotoxizitätstests einen möglichst großen Konzentrationsbereich testen zu können, wurde zunächst die maximale Löslichkeit (S_{max}) der einzelnen Testsubstanzen im Zellkulturmedium semiquantitativ bestimmt. Es wurden zur Bestimmung der S_{max} zunächst Konzentrationsreihen der Substanzen in DMSO erstellt. Anschließend wurden diese in

37°C warmen RPMI Kulturmedium (10% FCS) im Verhältnis 1:200 verdünnt und die Kristallbildung per Mikroskop kontrolliert. Die Flavonoid-Konzentration, die sich unter diesen Bedingungen im Kulturmedium löste, d.h. keine Kristalle mehr unter dem Mikroskop sichtbar waren (bzw. die sich hieraus resultierende Endkonzentration) wurde als S_{\max} identifiziert.

Die maximale Löslichkeit der Flavonoide in RPMI (Tabelle 3.1) lag für die Flavone zwischen 60-300 μM , für Chalcone zwischen 200-500 μM , für Flavonole und Dihydroflavonole lag das Löslichkeitsmaximum in einem Bereich zwischen 250-5000 μM , für Flavanone zwischen 1250-1400 μM .

Tab.3.1: Übersicht über die von mir ermittelte maximale Löslichkeit S_{\max} verschiedener Flavonoide

Substanz	S_{\max} (μM)
7MeO-Baicalein	113
Apigenin	125
Chrysin	125
Cirsimaritin	175
Baicalein	175
Xanthohumol	200
Isorhamnetin	225
Luteolin	250
Kaempferol	250
Hispidulin	300
Scutellarein	300
Phloretin	450
Quercetin	450
Morin	450
Naringenin-chalcon	500
Myricetin	700
Naringenin	1250
Hesperetin	1300
Eriodictyol	1400
Baicalein-glucuronide	1455
Scutellarein-7-glucuronide	2000
Taxifolin	5000
Catechin	5000
Phloroacetophenon	11000
Phloroglucin	25000

3.1.2 Bestimmung der Cytotoxizität

Cytotoxische Effekte der einzelnen Flavonoide auf Jurkat-Zellen wurden bestimmt, indem die Zellen mit logarithmisch angelegten Flavonoidkonzentrationen im Bereich von S_{max} bis 0 für 24 und 48 Stunden inkubiert wurden. Mit Hilfe einer Lebend-Tod-Färbung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) und Annexin-V-FITC sowie anschließender Durchflusszytometrie wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Um die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze direkt vergleichen zu können, erfolgte die Messung mit PE-markierten Beads, auf welche die ermittelte Zellzahl normalisiert werden konnte.

Abbildung 3.2 zeigt repräsentativ die Ergebnisse von Apigenin und Scutellarein. Alle untersuchten Flavonoide zeigten zytotoxische Effekte, und es konnten deutliche Unterschiede in dem Ausmaß der Toxizität beobachtet werden (Tab. 3.2).

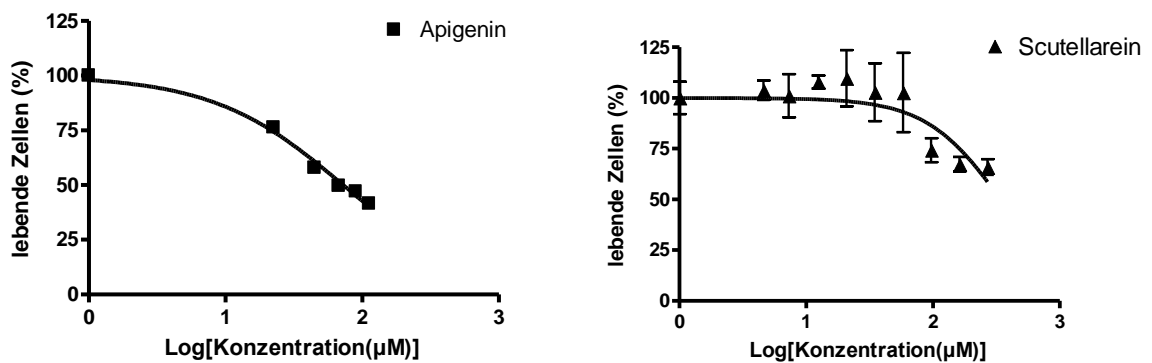


Abb. 3.2: Cytotoxizität exemplarisch ausgewählter Flavonoide auf Jurkat T-Lymphoblasten. Jurkat-T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Flavonoidkonzentrationen für 24 (\blacktriangle) und 48 Stunden (nicht abgebildet) inkubiert ($n=3$). Die Analyse der Zellviabilität erfolgte unter Einsatz von Annexin-V und 7-AAD mittels quantitativer Durchflusszytometrie. Die EC_{50} -Werte wurden mittels nichtlinearer Regressionskurve unter Verwendung eines Algorithmus zur bestmöglichen Anpassung der Kurve an die Versuchsdaten ermittelt. Repräsentativ dargestellt sind die Ergebnisse der 24 h Inkubation mit Apigenin und Scutellarein.

Tabelle 3.2: Übersicht der von uns ermittelten Daten zur Cytotoxizität (EC_{50} -Werte) verschiedener Flavonoide

Substanz	EC_{50} (μM)				Anstieg der Toxizität EC_{24}/EC_{48}
	24h	95% Confid. Interval	48h	95% Confid. Interval	
Xanthohumol	20.5	19.4 - 21.5	11.5	10.9 - 11.9	1.8
Scutellarein-7-glucuronid	43.86	34.25 - 56.16	n.d.	n.d.	n.d.
Cirsimaritin	66.8	43.3 - 102.9	44.4	25.0 - 78.6	1.5
Apigenin	72.7	62.5 - 84.5	27.0	20.2 - 36.2	2.7
Luteolin	78.1	66.0 - 92.5	18.6	11.3 - 30.5	4.2
Chrysin	84.3	76.3 - 93.2	49.1	45.0 - 53.1	1.7
7MeO-Baicalein	91.0	55.22 - 149.9	54.3	30.75 - 96.0	1.7
Isorhamnetin	116.8	55.5 - 245.8	n.d.	n.d.	n.d.
Baicalein-glucuronid	137.0	118.9 - 158.0	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin	140.6	121.6 - 162.7	96.1	78.4 - 117.9	1.5
Hispidulin	153.1	106.5 - 220.1	62.7	54.1 - 72.7	2.4
Kaempferol	163.1	133.6 - 199.1	46.4	36.3 - 59.3	3.5
Naringeninchalcon	166.0	124.0 - 222.2	83.9	57.6 - 122.1	2.0
Baicalein	213.3	114.7 - 396.6	48.2	38.7 - 60.2	4.4
Eriodictyol	226.2	142.6 - 358.9	34.1	23.1 - 50.3	6.6
Myricetin	349.3	291.6 - 418.5	202.0	150.7 - 270.7	1.7
Quercetin	354.7	268.0 - 469.4	83.3	70.6 - 98.4	4.3
Scutellarein	501.9	276.8 - 910.1	176.0	113.1 - 273.8	2.9
Hesperetin	591.6	449.2 - 779.1	274.5	238.2 - 316.4	2.2
Naringenin	617.7	578.3 - 659.9	131.6	103.8 - 166.9	4.7
Morin	680.3	297.7 - 1555	230.2	180.8 - 293.1	3.0
Taxifolin	2247	1584 - 3188	65.9	25.3 - 171.9	34.1
Catechin	4410	2196 - 8855	1834	1093 - 3072	2.4
Phloracetophenon	6297	3111 - 12746	428.2	120.9 - 1517	14.7
Phloroglucin	18676	6125 - 56949	4228	1558 - 11472	4.4

Zur Bestimmung der EC_{50} -Werte der Cytotoxizitätsexperimente ($n=3$) wurde nach logarithmischer Transformation der Daten eine nichtlineare Regressionskurve unter Verwendung eines Algorithmus zur bestmöglichen Anpassung der Kurve an die Versuchsdaten erstellt. Die Tabelle zeigt die Substanzen mit absteigender Cytotoxizität nach 24 h Inkubation.

Aufgrund der breit angelegten Konzentrationsreihe konnte in allen Versuchsansätzen bei 24 Stunden ein EC_{50} -Wert ermittelt werden. Unter allen untersuchten Flavonoiden zeigte das Chalcon Xanthohumol mit einem EC_{50} -Wert von 20,5 μM die höchste Cytotoxizität. Dies entspricht ungefähr einer Konzentration von 17 $\mu\text{g/l}$. Die zwei methoxylierten Flavonoide Cirsimaritin und 7-Methoxy-Baicalein und die drei Flavone Apigenin, Luteolin und Chrysin zeigten ebenfalls einen EC_{50} -Wert unter 100 μM . Die meisten Krebszellen überlebten unter Einsatz von Taxifolin und Catechin. Bei diesen Verbindungen wurde ein EC_{50} -Wert von $> 2\text{mM}$ bzw. $> 4\text{mM}$ ermittelt. Die Strukturen mit nur einem aromatischen Ring (Phloroacetophenon und Phloroglucin) zeigten mit über 6 mM bzw. über 18 mM die geringste Cytotoxizität. Dies entspricht einer Konzentration von über 1g/l.

Nach 48 Stunden war eine Verringerung der EC_{50} -Werte um Faktor 2-4 zu beobachten. Bei Inkubation mit Taxifolin für zwei Tage verringerte sich der EC_{50} -Wert um Faktor 34 auf 66 μM . Somit wies Taxifolin unter den Flavonoiden den deutlichsten Effekt der zeitabhängigen Inkubation auf.

Bezüglich der einzelnen Unterklassen wurde Folgendes festgestellt: Den größten Effekt zeigte die Klasse der Flavone und Chalone mit einem EC_{50} -Wert zwischen 20–100 μM (nach 24h; siehe $EC_{50}/24\text{h}$ in Tabelle 3.2). Nach 48h verringerte sich der EC_{50} -Wert dieser Substanzen auf 10–50 μM (siehe $EC_{50}/48\text{h}$ in Tabelle 3.2). Die geringste Cytotoxizität wiesen die Substanzklassen der Flavanone und Flavanole auf. Hier wurde nach 24 h ein EC_{50} -Wert von 200–4000 μM ermittelt. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Möglichkeit besteht, Strukturwirkungsbeziehungen abzuleiten, durch die es möglich ist, anhand bestimmter Strukturelemente zytotoxische Effekte von Flavonoiden vorherzusagen.

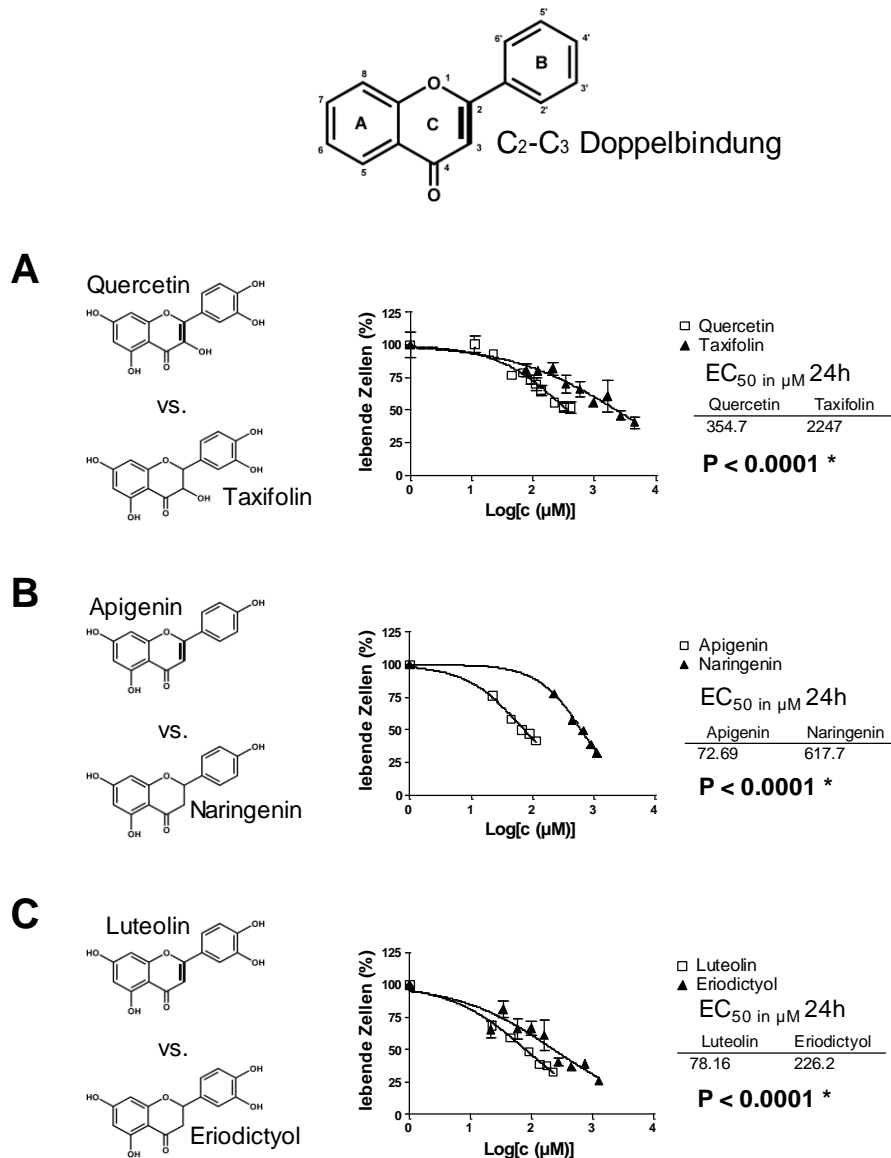


Abb. 3.3: Die C₂-C₃ Doppelbindung bewirkt eine erhöhte Zytotoxizität. A-C: Darstellung der Bedeutung einer C₂-C₃ Doppelbindung für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC₅₀-Werte dreier Molekülpaare. Jurkat-T-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± S.D. . Unterschiede von P < 0.05 (F-Test) gelten als signifikant. A: Quercetin versus Taxifolin. B: Apigenin versus Naringenin. C: Luteolin versus Eriodictyol.

Die Resultate von drei Molekülpaaren (Quercetin und Taxifolin, Apigenin und Naringenin, Luteolin und Eriodictyol), die bis auf Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Doppelbindung zwischen C₂-C₃ identische chemische Strukturen aufweisen, wurden gemäß F-Test miteinander verglichen. Wie die Abbildung 3.3 A-C verdeutlicht, zeigen Strukturen, die eine Doppelbindung an dieser Stelle aufweisen (Quercetin, Apigenin, Luteolin), im Vergleich zu den entsprechenden Molekülen mit einer Einfachbindung (Taxifolin,

Naringenin, Eriodictyol) eine drei- bis zehnfach erhöhte Toxizität. Die Unterschiede der EC_{50} -Werte sind statistisch signifikant für alle Substanzpaare ($P < 0.0001$).

Die Anwesenheit dieser Doppelbindung wurde in Verbindung gebracht mit effizienter Bindung und Hemmung des P-Glycoproteins (P-gp), einem Plasmamembrantransporter, der für den Export der chemotherapeutischen Agenzien verantwortlich ist (Kitagawa *et al.* 2005).

Hemmung dieses wichtigen zellulären Detoxifikationssystems könnte in Zusammenhang mit der Flavonoid-induzierten Cytotoxizität stehen. Zudem stimmen unsere Ergebnisse mit der in der Literatur beschriebenen Korrelation zwischen der Anwesenheit einer C_2-C_3 Doppelbindung und Mitochondrienschäden sowie Zelltod überein (Dorta *et al.* 2005, Kawaii *et al.* 1999, Depeint *et al.* 2002).

Weiterhin wurde die Carbonyl-Gruppe in Position C_4 , welche ausgenommen der Flavane und Flavone in allen Flavonoidklassen vorhanden ist, als cytotoxizitätssteigerndes Strukturelement beobachtet. Da Catechin als einzige der getesteten Substanzen keine C_4 -Carbonylgruppe aufweist, wurden lediglich Taxifolin und Catechin miteinander verglichen. Zwar war die um Faktor zwei erhöhte Toxizität von Taxifolin nach 24h statistisch nicht signifikant ($P=0,5274$, Graph nicht gezeigt), jedoch konnte nach 48h eine fast 30fache signifikante Steigerung im Vergleich zu Catechin festgestellt werden. Die Bedeutung dieser Carbonylgruppe wird durch die Tatsache verstärkt, dass Catechin die geringste Cytotoxizität sowohl nach 24h als auch nach 48h aufwies. Beobachtet hatte man diese geringe Cytotoxizität von Catechin bereits 1997 durch Fotsis und Mitarbeiter. Da über eine Korrelation zwischen der Anwesenheit einer C_4 -Carbonylgruppe und der Hemmung der Fettsäuresynthese berichtet wurde, steht dieser Vorgang in der Diskussion, einen Faktor für die Flavonoid-induzierte Cytotoxizität darzustellen (Brusselmans *et al.* 2005).

Die meisten Autoren, die die antikanzerogenen Fähigkeiten der Flavonoide untersucht haben, postulierten für die cytotoxische Effektivität die Notwendigkeit der Carbonylgruppe in C_4 -Position und der ungesättigten C_2-C_3 Bindung (Kawaii *et al.* 1999, Depeint *et al.* 2002, Agullo *et al.* 1996, Ramanouskaya *et al.* 2009). Weiterhin wurde festgestellt, dass die gleichen Strukturelemente dafür verantwortlich sind, dass die Flavonoidaktivität gegenüber Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase C, Enzyme, die eng mit Zellzyklus-Regulation verknüpft sind, gehemmt wird (Agullo *et al.* 1997).

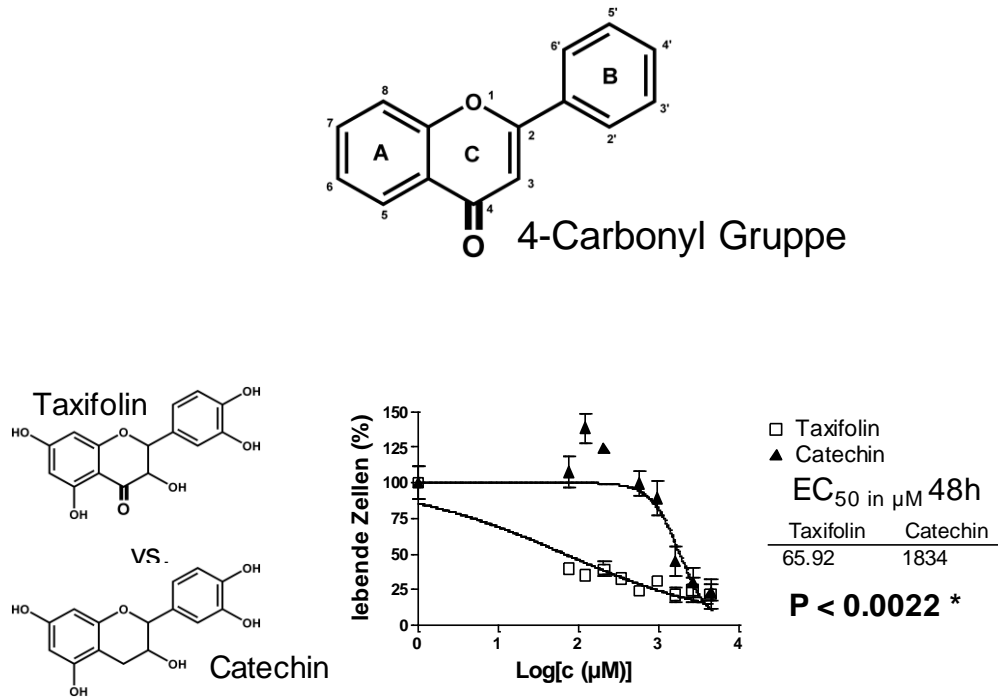


Abb. 3.4: Die C₄-Carbonylgruppe bewirkt eine erhöhte Zytotoxizität. Darstellung der Bedeutung einer C₄-Carbonylgruppe für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC₅₀-Werte eines Molekelpaares (Taxifolin versus Catechin). Jurkat-T-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± S.D.. Unterschiede von P < 0.05 (F-Test) gelten als signifikant.

Einige Flavonoide, d.h. Flavonole und Flavanole, sind an Position C₃ hydroxyliert. Der Vergleich von drei verschiedenen Substanzpaaren (Apigenin und Kämpferol, Luteolin und Quercetin, Eriodictyol und Taxifolin), die sich jeweils nur durch Anwesenheit (Kämpferol, Quercetin, Taxifolin) bzw. Abwesenheit (Apigenin, Luteolin, Eriodictyol) dieser Hydroxygruppe unterscheiden, ergab, dass die C₃-Hydroxylierung assoziiert ist mit einer statistisch signifikanten (P < 0.0001) 2-10fach geringeren Cytotoxizität. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Kawaii *et al.* (1999) überein. Ramanouskaya *et al.* (2009) bestätigten später unsere Befunde.

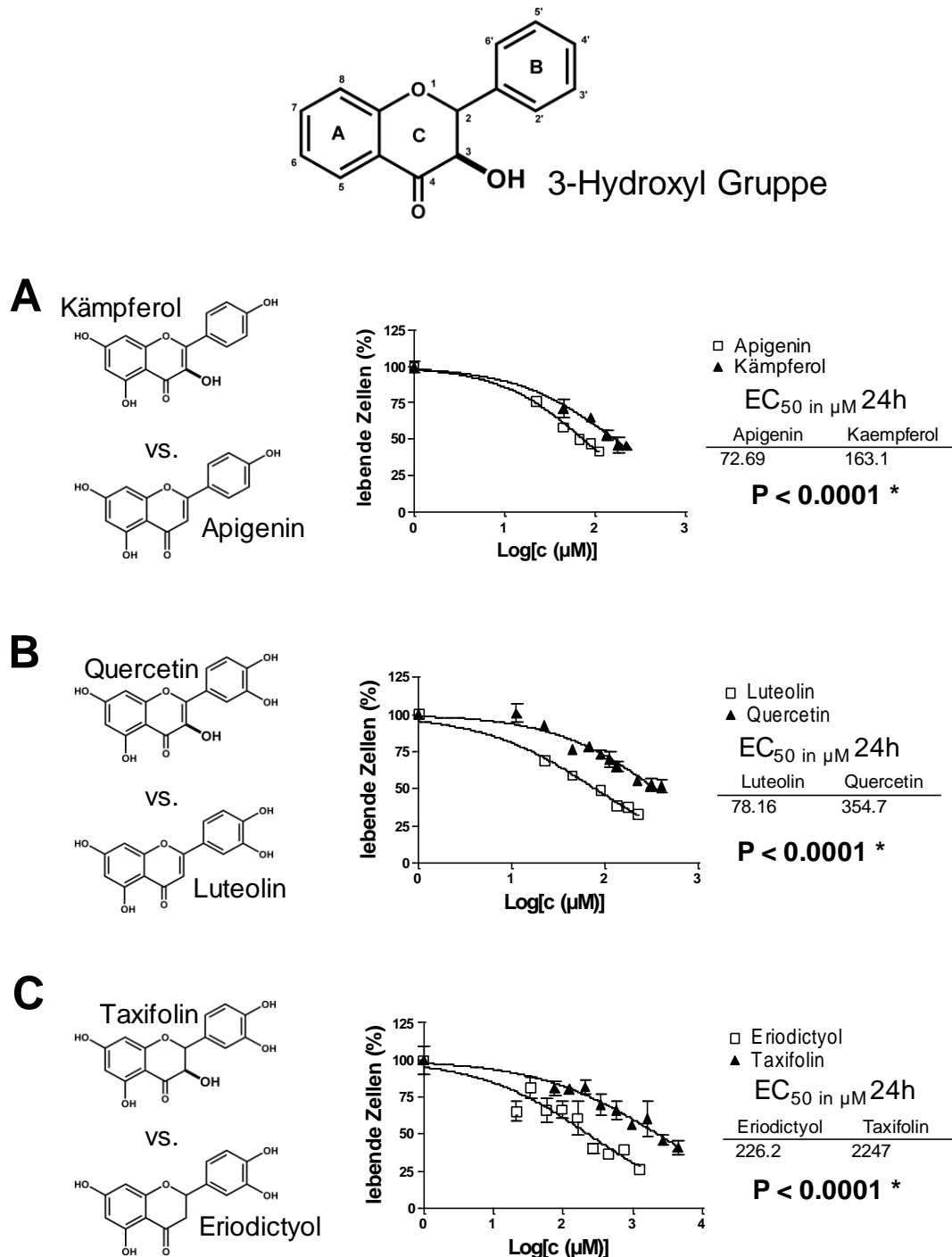


Abb. 3.5: Die C₃-Hydroxygruppe bewirkt eine geringere Zytotoxizität. Darstellung der Bedeutung einer C₃-Hydroxygruppe für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC₅₀-Werte dreier Molekülpaare. Jurkat-T-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.D.. Unterschiede von $P < 0.05$ (F-Test) gelten als signifikant. A: Kämpferol versus Apigenin. B: Quercetin versus Luteolin. C: Taxifolin versus Eriodictyol.

Da die Flavonoide am B-Ring unterschiedliche Hydroxygruppierungen aufweisen, wurde der Einfluss dieser Anordnung der OH-Gruppen auf flavonoid-induzierte Cytotoxizität

untersucht. Der Vergleich von einer C₃- und C₄-Hydroxylierung (Quercetin) mit einer C₂- und C₄-Hydroxylierung (Morin) macht einen signifikanten Unterschied in der Toxizität deutlich: Die ortho-Anordnung der OH-Gruppen im Quercetin-Molekül war dreifach cytotoxischer als die meta-Anordnung im Morin-Molekül. Darauf hatten bereits Kawail *et al.* (1999) aufmerksam gemacht.

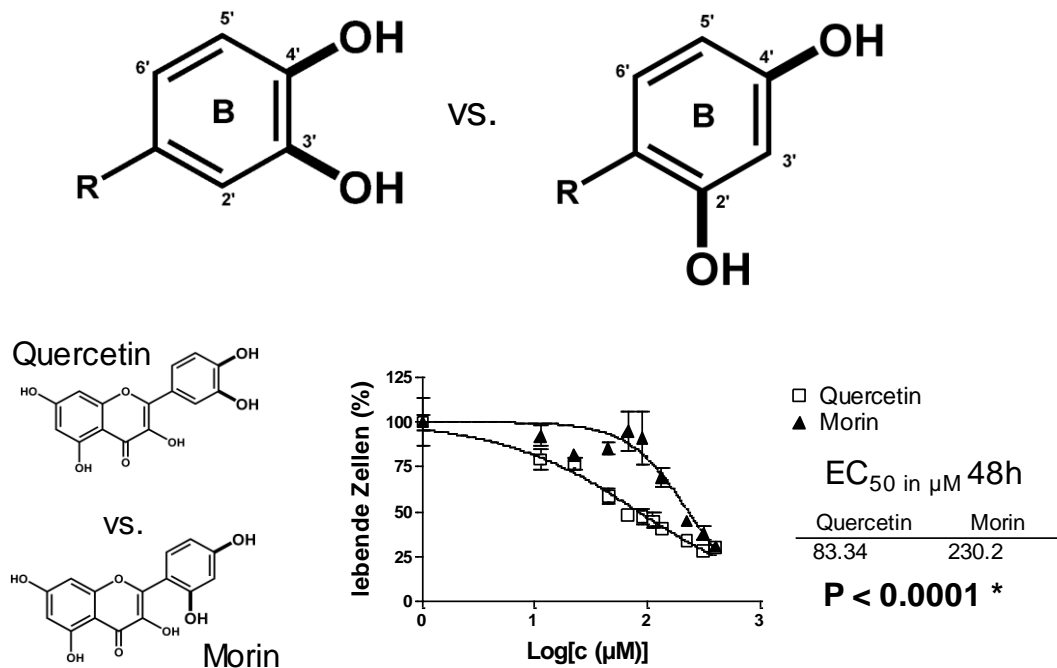


Abb. 3.6: Eine ortho-Anordnung der Hydroxygruppen am B-Ring bewirkt eine erhöhte Zytotoxizität. Darstellung der Bedeutung der Anordnung der Hydroxygruppe am B-Ring für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC₅₀-Werte eines Molekülpaars (Quercetin versus Morin). Jurkat-T-Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± S.D.. Unterschiede von P < 0.05 (F-Test) gelten als signifikant.

Es ist bekannt, dass Flavonoide *in vivo* einer Metabolisierung unterliegen. Da methoxylierte und glucuronidierte Flavonoide als Metabolite beschrieben sind (Spencer *et al.* 2003), wurde auch der Einfluss dieser Modifikationen auf cytotoxische Eigenschaften überprüft. Da der Zelltod bei 7-Methoxy-Baicalein, Cirsimaritin, Hispidulin, Isorhamnetin im Vergleich zu ihren entsprechenden nicht-methoxylierten bzw. geringer methoxylierten Verbindungen (Baicalein, Hispidulin, Scutellarein, Quercetin) signifikant erhöht war, wurde festgestellt, dass die Cytotoxizität mit der Anzahl der am A-Ring lokalisierten Methoxygruppen steigt. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Glucuronidierung. Die Glucuronidierung erhöhte signifikant (P=0,0327 bzw. P<0,0001) die flavonoid-induzierte Cytotoxizität (Abb. 3.7). Dies wurde durch den Vergleich von Baicalein und Scutellarin mit

deren glucuronierten Derivaten deutlich. Somit wurde erstmals gezeigt, dass sowohl Methylierung als auch Glucuronidierung die Cytotoxizität steigern. Dies geht einher mit der Beobachtung eines signifikanten Anstiegs der Toxizität einiger Verbindungen bei Verlängerung der Inkubationszeit (Tab. 3.2). Abhängig von der Verbindung wurde ein unterschiedliches Ausmaß der Verringerung des EC_{50} -Wertes festgestellt. Die meisten untersuchten Flavonoide wiesen eine zweifach höhere Toxizität nach 48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden auf. Allerdings verringert sich nach zweitägiger Inkubation der Zellen mit Taxifolin der EC_{50} -Wert sogar um Faktor 34. Diese unterschiedliche Intensität des Anstiegs ließ sich nicht mit strukturellen Unterschieden korrelieren. Es wurde lediglich festgestellt, dass die Flavonoide, welche das größte cytotoxische Ausmaß bei längerer Inkubationsdauer zeigten (Taxifolin, Eriodictyol, Naringenin), zwischen Position C_2 und C_3 eine gesättigte Bindung aufwiesen. Eine molekulare Ursache für diesen Cytotoxizitätsanstieg ist im Bereich metabolischer Aktivierung der Zelltodinduktion in Verbindung mit unterschiedlichen Kinetiken zu finden.

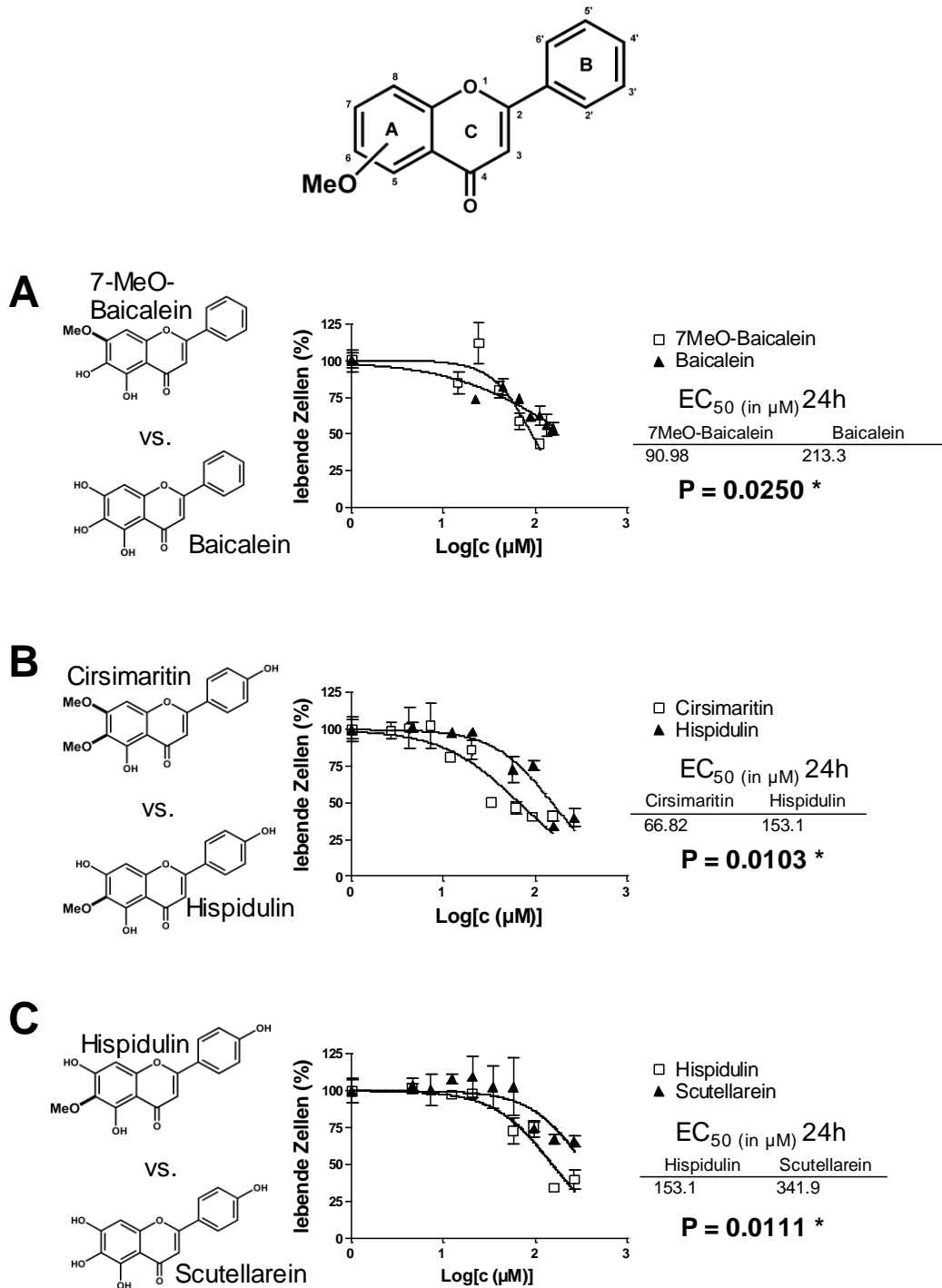


Abb. 3.7: Eine Methoxylierung bewirkt erhöhte Zytotoxizität. Darstellung der Bedeutung einer Methoxygruppe für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC₅₀-Werte dreier Molekülpaare. Jurkat-T-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± S.D.. Unterschiede von P < 0.05 (F-Test) gelten als signifikant. A: 7-Methoxy-Baicalein versus Baicalein. B: Cirsimaritin versus Hispidulin. C: Hispidulin versus Scutellarein.

Weiterhin wurde festgestellt, dass das cytotoxische Potenzial negativ mit der Gesamtzahl an Hydroxygruppen und der Löslichkeit der Flavonoide korreliert. So tendieren Moleküle mit zwei OH-Gruppen (Cirsimaritin, Chysin, 7-Methoxy-Baicalein) dazu, erhöhte Cytotoxizität zu zeigen als Moleküle mit drei (Apigenin, Hispidulin, Baicalein, Isorhamnetin) oder vier OH-Gruppen (Luteolin, Kämpferol, Scutellarein). Substanzen mit fünf Hydroxygruppen (Quercetin, Myricetin, Morin) gehören zu den Stoffen, die in unserer Studie die geringsten cytotoxischen Effekte zeigten. Da, wie erwartet, mehrere Hydroxygruppen auch bessere Löslichkeit bedeuten, korreliert das Löslichkeitsmaximum der Substanzen ebenfalls invers mit der cytotoxischen Aktivität (Abb.3.8). Daher scheinen hydrophobe Eigenschaften eine Rolle bei der flavonoid-induzierten Cytotoxizität zu spielen. Auch die O-methoxylierten Verbindungen passen mit geringerer Löslichkeit und erhöhter Toxizität in dieses Schema. Eine mögliche Erklärung könnten höhere intrazelluläre Konzentrationen lipophiler Verbindungen aufgrund gesteigerter Membranpermeabilität sein. Dies geht einher mit dem Ergebnis, dass Xanthohumol, das die höchste Toxizität zeigte, eine Prenylgruppe an Position C₆ aufweist. Diese ist bekannt dafür, mit Zellmembranen zu interagieren (Gomes *et al.* 2003). Nach uns haben Ramanouskaya und Mitarbeiter (2009) über die Rolle der Lipophilie auf die flavonoid-induzierte Cytotoxizität berichtet. Aufgrund unserer Beobachtung, dass Glucuronidierung, die mit steigender Löslichkeit assoziiert ist, die cytotoxischen Effekte verstärkt (Abb.3.2), liegt die Vermutung nahe, dass eine niedrige S_{max}-obwohl Voraussetzung für effiziente intrazelluläre Akkumulation- nicht direkt im cytotoxischen Mechanismus involviert ist.

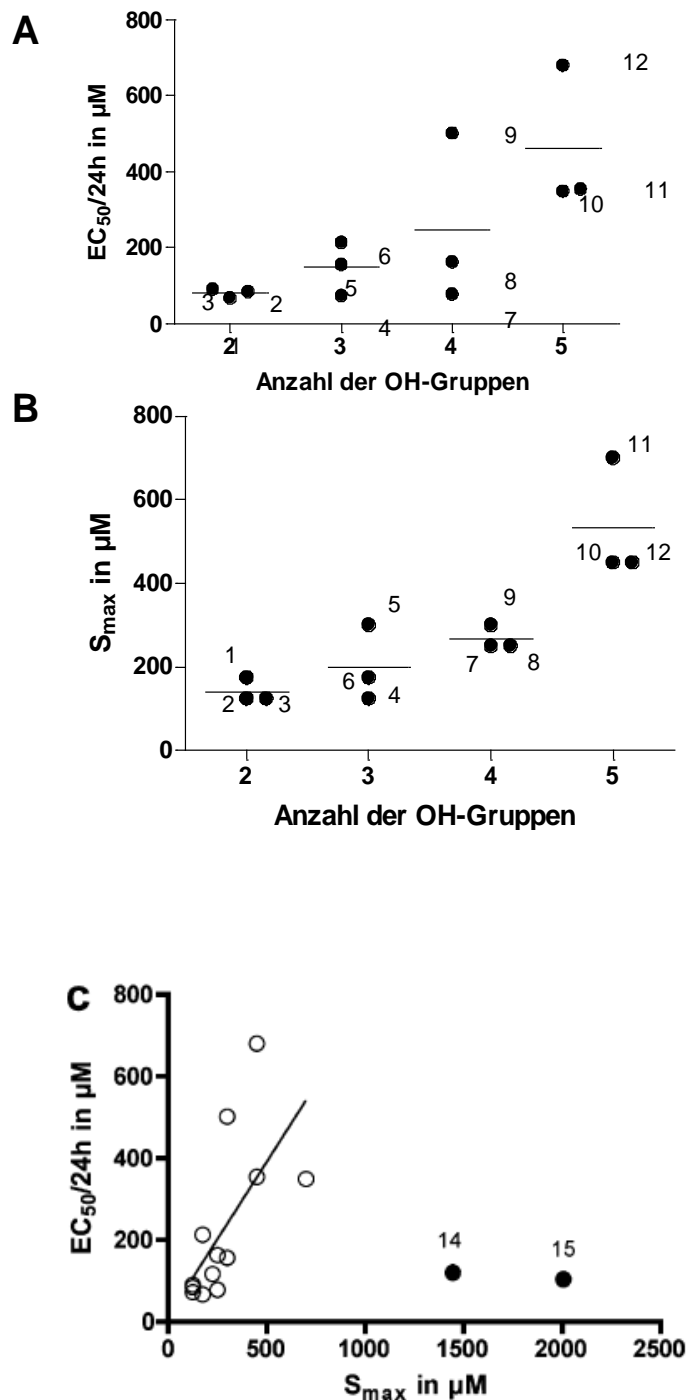


Abb. 3.8: Inverse Korrelation der flavonoid-induzierten Cytotoxizität zur Löslichkeit. Flavone und Flavonole wurden nach Anzahl ihrer Hydroxygruppen gruppiert und mit den entsprechenden EC₅₀/24 h (A) oder S_{max} (B) korreliert: Cirsimaritin (1), Chrysin (2), 7-MeO-Baicalein (3), Apigenin (4), Isorhamnetin (5), Hispidulin (6), Baicalein (7), Luteolin (8), Kaempferol (9), Scutellarein (10), Quercetin (11), Myricetin (12), Morin (13). (C) Korrelation des EC₅₀/24 h mit S_{max} und lineare Regression (berücksichtigt wurden Verbindungen 1-13 (0), die signifikant zwischen zwei Parameter in einem nicht parametrischen Test (two-tailed P mit 95% Konfidenzintervall) korrelieren (P= D 0.0031). Schwarze Punkte repräsentieren Baicalein-glucuronid (14) und Scutellarein-glucuronid (15), welche nicht in die lineare Regression passen.

Um festzustellen, welche Rolle allgemein das Vorhandensein des B-Rings bei der Flavonoid-induzierten Cytotoxizität spielt, wurde das Chalcon Phloretin mit Phloroacetophenon verglichen. Da Phloroacetophenon, das keinen Hydroxybenzyl-Teil aufweist, sich als ca. 50-fach weniger cytotoxisch als Phloretin ($P < 0,0001$) erwies, ist der Einfluss des B-Rings deutlich erkennbar. Eine weitere Reduktion der Grundstruktur (Phloroacetophenon im Vergleich zu Phloroglucin) reduziert den cytotoxischen Effekt zusätzlich um Faktor 10 (Abb.3.9). In diesem Fall wurden die Daten nach 48 Stunden analysiert, da aufgrund der beachtlichen Reduktion der cytotoxischen Aktivität nach 24 Stunden kein verlässlicher EC_{50} -Wert ermittelt werden konnte.

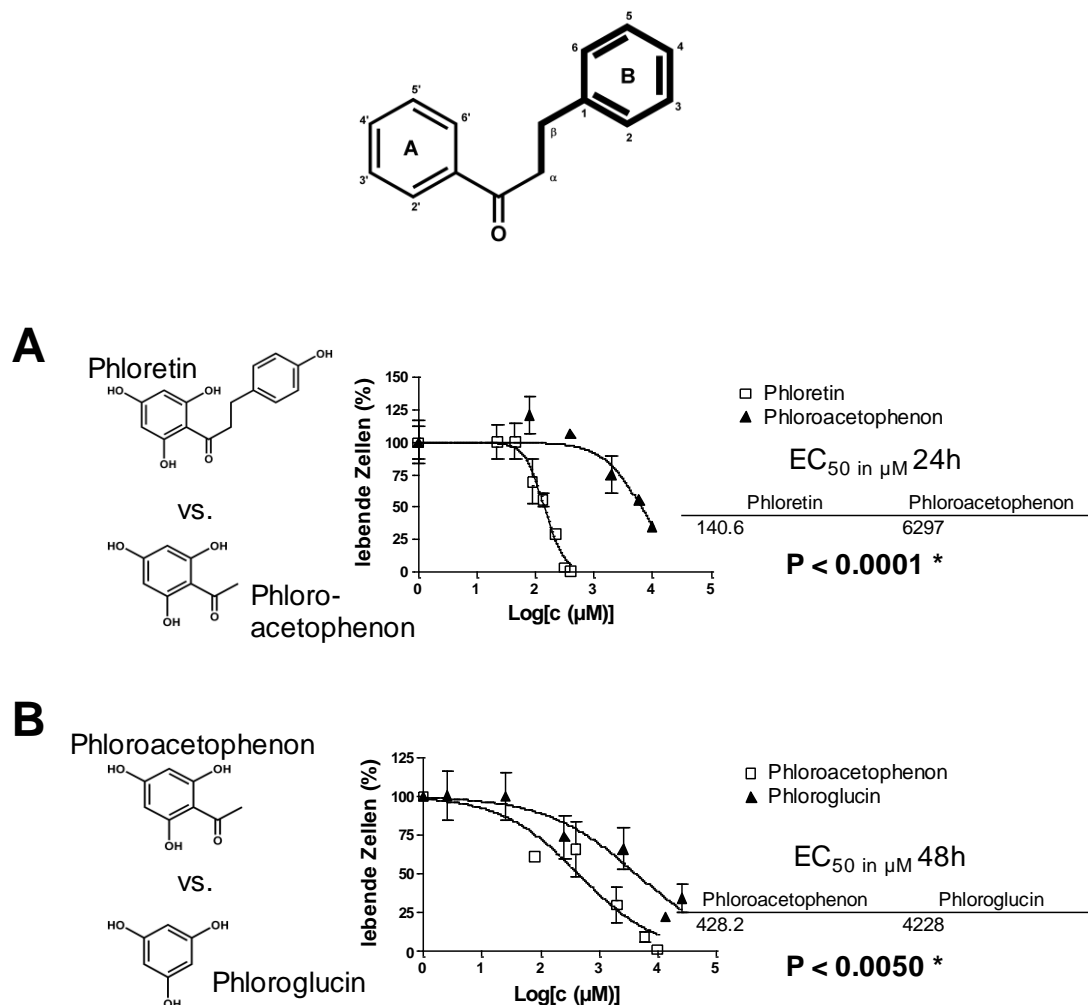


Abb. 3.9: Auflösung der Flavonoid-Grundstruktur bewirkt geringere Zytotoxizität. Darstellung der Bedeutung des Flavonoid-Grundgerüsts für die Zytotoxizität anhand des Vergleiches der EC_{50} -Werte zweier Molekülpaare. Jurkat-T-Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert und die Vitalität der Zellen wurde mittels 7-AAD/Annexin-V-FITC-FACS bestimmt. Werte ausgedrückt als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.D.. Unterschiede von $P < 0.05$ (F-Test) gelten als signifikant. A: Phloretin versus Phloroacetophenon. B: Phloroacetophenon versus Phloroglucin.

Unterschiedliche Ergebnisse wurden bezüglich der Hydroxylierung des B-Rings festgestellt: Während Kämpferol (4'OH am B-Ring) cytotoxischer ist als Quercetin (3',4' OH am B-Ring; siehe Tabelle 3.2; $P=0,0007$), ist Naringenin (4'OH am B-Ring) weniger cytotoxisch als Eriodictyol (3',4' OH am B-Ring; $P=0,0007$).

Ähnlich stellt sich die Analyse des Einflusses der Chalcone gegen das Chroman-Grundgerüst dar. Auch hier erhält man unterschiedliche Ergebnisse. Während Apigenin (geschlossener C-Ring) cytotoxischer ist als Naringenchalcon (offener C-Ring; $P=0,0301$), ist Naringenin (geschlossener C-Ring) weniger toxischer als Phloretin (offener C-Ring; siehe Tabelle 3.2; $P=0,0301$).

Zusammenfassend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende cytotoxizitätssteigernde Strukturmerkmale der Flavonoide ermittelt: a) C_2 - C_3 -Doppelbindung, b) C_4 -Carbonylgruppe, c) ortho- im Vergleich zu meta-Hydroxylierung am B-Ring und d) Methylierung, sowie e) Glucuronidierung. Zudem ist eine Hydroxygruppe an C_3 -Position des Flavonoid-Moleküls mit einer Reduktion der Cytotoxizität assoziiert.

Ein bestimmter Mechanismus, durch welchen Flavonoide Zelltod induzieren, ist nicht bekannt. Bisherige Studien zeigen, dass die antikanzerogene Aktivität auf mehrere Mechanismen zurückzuführen ist. Wie bereits erwähnt, wurden in diesem Zusammenhang z.B. Inhibierung der Proteasome (Chen *et al.* 2005), Hemmung der Fettsäuresynthese (Brusselmans *et al.* 2005) Topoisomerase-Hemmung (Yoon *et al.* 2007), Akkumulation von p53 (Singh und Agarwal 2006) oder Förderung der Expression von c-fos und c-myc (Ganguly *et al.* 2005) diskutiert. Eine weitere Möglichkeit stellt die Bildung cytotoxischer Hydrogenperoxide im Zellmedium während der Autoxidation der Polyphenole dar, wobei diese Reaktion durch die Anwesenheit von Eisenionen im Zellmedium zusätzlich verstärkt wird. Daher erfolgten auch Experimente mit Xanthohumol und Quercetin unter Einsatz von Katalase (10-1000U/ml) bzw. von dem Eisenchelator EDTA (0,1-3mM). Da hier keine Hemmung der Cytotoxizität festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt), liegt die Vermutung nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelten cytotoxischen Resultate nicht ausschließlich auf der oxidierenden Wirkung der Flavonoide beruhen.

Weiterhin wird über die Spezifität dieser cytotoxischen Wirkung auf Krebszellen in der Literatur diskutiert. Gemäß Matsuo *et al.* (2005) rufen höhere Konzentrationen einiger Flavonoide auch in normalen menschlichen Zellen Zelltod hervor. Aber auch in diesem Zusammenhang werden unterschiedliche Mechanismen, zum Teil die genannten, kontrovers diskutiert. Da die Wirkung auch hier je nach Zelltyp und Flavonoid unterschiedlich verläuft und meist der direkte Vergleich zwischen normalen und entarteten

des gleichen Zelltyps fehlen, ist eine Aussage darüber, ob in normalen und entarteten Zelllinien die gleichen Mechanismen ausgelöst werden, unklar. Es gibt auch Hinweise darauf, dass aufgrund der Veränderung der Zelle in mutierten Zellen andere Mechanismen als in gesunden Zellen aktiviert werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass Luteolin u.a. Zelltod in mehreren Krebszellen induziert (Chiang *et al.* 2007, Lee *et al.* 2005) und *in vivo* Tumorwachstum unterdrückt (Selvendiran *et al.* 2006). Eine Langzeit-Behandlung aber wies keine Toxizität in der Ratte (30mg/kg, p.o. für 20 Tage, Samy *et al.* 2006) und in normalen Zellen nur geringe Cytotoxizität auf (Horinaka *et al.* 2005, Chen *et al.* 2007).

Im übrigen dürfen die Nebenwirkungen und Auswirkungen bisheriger Chemotherapeutika auf normale Zellen nicht außer Acht gelassen werden. Daher werden Flavonoide nicht nur als Kandidaten zur Krebstherapie, sondern auch zur Krebsprävention diskutiert. Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass flavonoidreiche Nahrung mit einem reduzierten Krebsrisiko in Verbindung steht. Hierbei werden Mechanismen vermutet, welche in Verbindung stehen mit antiproliferativen und antioxidativen Effekten, Induktion der Entgiftungs-Enzyme, Regulation des eigenen Immunsystems, Veränderung der Zellsignalwege und Induktion der Apoptose (Birt *et al.* 2001). Der Flavonoid-Plasmalevel nach einer flavonoidreichen Nahrungsaufnahme liegt im Bereich von 10-500 nM (50 nM für Quercetin und 325 nM für Hesperetin) (Erlund *et al.* 2002). Dies entspricht einer Konzentration, welche 1000-2000fach niedriger ist als diejenige, die mit akuter Cytotoxizität assoziiert ist (Tabelle 3.2). Somit steht die akute cytotoxische Aktivität der Flavonoide, die bei relativ hohen Konzentrationen beobachtet wurde, den chemopräventiven Effekten dieser Verbindungen, die mit geringeren Mengen erzielt wurden, gegenüber.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine hohe Konzentration der Flavonoide cytotoxisch auf menschliche leukämische Zellen wirkt und dass der Grad der antileukämischen Fähigkeit u.a. von der Molekularstruktur abhängig ist. Es wurden Strukturelemente identifiziert, die die Cytotoxizität in dieser Zelllinie fördern bzw. verstärken. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse können dabei helfen, neue Flavonoid-Derivate zu identifizieren bzw. diese bezüglich ihrer cytotoxischen Aktivität zu optimieren, um die antikanzerogene Fähigkeit zu verstärken.

3.2 Flavonoide und Alzheimer Krankheit

Aufgrund ihrer anti-amyloidogenen, antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften sind Flavonoide auch in der Lage präventiv oder in die Pathogenese der Alzheimer Krankheit einzugreifen. Anhand von Experimenten mit verschiedenen flavonoidhaltigen Pflanzenextrakten konnte bisher festgestellt werden, dass der Mechanismus der Wirkungsweise der Polyphenole nicht nur auf ihr antioxidatives Potential zurückzuführen ist, sondern dass sie auch auf andere Art und Weise Einfluss auf den AD-Mechanismus nehmen (Kim et al. 2010). Besonders die Verbindung EGCG, die im Extrakt des grünen Tee enthalten ist, hat sich als potenter Wirkstoff erwiesen. Es wurde nachgewiesen, dass EGCG die Bildung des toxischen A β reduziert, indem der nicht amyloidogene Weg durch Aktivierung und Expressionssteigerung der α -Sekretase ADAM-10 stimuliert wird (Obregon et al. 2006).

Um weitere effektive Verbindungen zu entdecken und um herauszufinden, ob auch andere Flavonoide vergleichbare Effekte auf APP und ADAM-10 aufweisen und ob anhand der Flavonoid-Struktur eine neuroprotektive Wirkung ableitbar ist, wurde ein Flavonoid-Screening geplant. Die ADAM-10 Relevanz von Verbindungen, die in humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y die sAPP α -Produktion stimulieren, sollte mit Hilfe der RNAi Technologie sowohl *in vitro* mittels APP und ADAM-10 stabil transfizierter HT1080-Zellen, als auch *in vivo* mittels transgener AD-Mäuse, überprüft werden. Um Herunterregulierung von ADAM-10 *in vivo* hervorzurufen, werden AAV-Vektoren, welche für die entsprechende shRNA codieren, gezielt ins Gehirn injiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vorbereitungen für dieses Experiment (*in vitro* und *in vivo*) getroffen. Dies beinhaltete die Suche nach effektiven Flavonoiden und einer potenten siRNA/shRNA gegen ADAM-10. Um später auch *in vivo*-Experimente durchführen zu können, wurden innerhalb dieser Arbeit auch erste Vorbereitungen für anstehende Tierversuche getroffen. Dies beinhaltete die AAV-Produktion und -Reinigung mittels HPLC, die Etablierung der stereotaktischen Injektion und die Aufzucht eines transgenen Mäusestamms.

3.2.1 Einfluss von Flavonoiden auf sAPP- und sAPP α -Sekretion

Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wird häufig für neurologische und neurochemische Versuche, in denen APP eine Rolle spielt, verwendet. Diese exprimiert endogen in signifikanten Mengen APP und sekretiert detektierbar das nicht amyloidogene lösliche sAPP α in das Zellkulturmedium (Nunan 2000). Um den in der Literatur (Levites et

al. 2003) beschriebenen steigenden Effekt von EGCG auf die sAPP α -Produktion unter veränderten Bedingungen nachweisen zu können, wurden $8 \cdot 10^5$ SH-SY5Y Zellen 4 und 24 Stunden mit verschiedenen EGCG-Konzentrationen inkubiert. Der Nachweis von sAPP α im Überstand erfolgte mittels Westernblot (Einsatzvolumen 20 μ l). Zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse wurde der gemessene Wert der Kontrolle (Überstand unbehandelter Zellen) gleich 1 gesetzt (Abb.3.10).

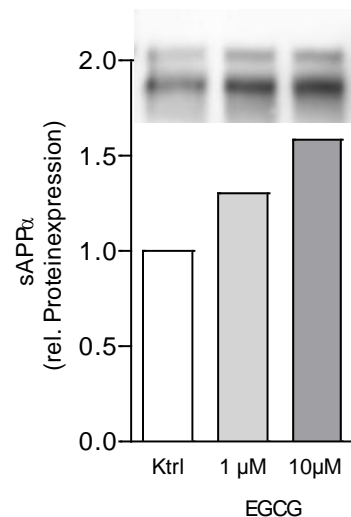


Abb. 3.10: EGCG erhöht die sAPP α -Sekretion von SH-SY5Y Zellen. Dargestellt ist die Graustufenmessung von sAPP α im Überstand der SH-SY5Y Zellen, nachdem sie 24 Stunden mit EGCG inkubiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Banden wurden bei 90 bzw. 100 kDa unter Einsatz des Anti-Human β -Amyloid [1-17] (6E10) mittels Westernblot nachgewiesen.

Nach vierstündiger Inkubationszeit reichte die sAPP α -Produktion nicht aus, um sie mit Hilfe dieser Methode bestimmen zu können. Nachdem die Zellen 24 h unter dem Einfluss von EGCG standen, ist bei einer EGCG-Konzentration von 10 μ M im Vergleich zu der Kontrolle eine Steigerung von 50% beobachtet worden. Weiterhin wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung des sAPP α nachgewiesen. Quantitativ differieren hierzu die Ergebnisse von Levites und Mitarbeiter (2003), welche eine sechsfache sAPP α -Steigerung bei zweistündiger Inkubation mit 10 μ M EGCG ermittelten. Deren Experimente erfolgten jedoch in größeren Ansätzen mit anschließender Lyophilisierung des Überstandes zur Aufkonzentrierung. Da diese Methode für ein Flavonoid-Screening ungeeignet ist, wurde ein anderer Versuchsansatz verfolgt.

Um herauszufinden, ob die Steigerung der sAPP α -Sekretion einhergeht mit einer allgemeinen, gegebenenfalls auch zeitabhängigen Zunahme des löslichen APPs (sAPP α und sAPP β), wurden $8 \cdot 10^5$ SH-SY5Y Zellen mit 10 μ M EGCG inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Konzentration von sAPP wurde anschließend

mittels Human APP ELISA bestimmt. Um festzustellen, ob dabei zytotoxische Effekte eine Rolle spielten, wurde mit den Proben der LDH-Test durchgeführt. Der Mittelwert der ermittelten OD-Werte der Kontrolle (Ktrl) wurde 1 gesetzt; die anderen Werte wurden entsprechend angeglichen (Abb. 3.11 und 3.12).

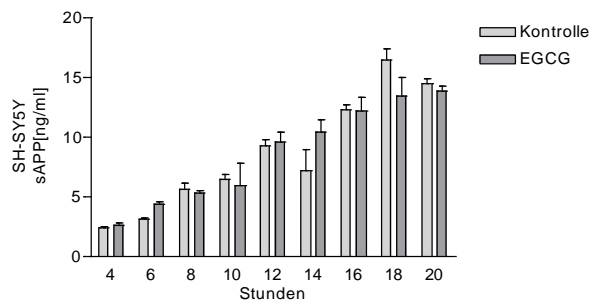


Abb. 3.11: EGCG hat keinen Einfluss auf die sAPP-Sekretion der SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der mittels ELISA ermittelten sAPP-Menge im Überstand von SH-SY5Y-Zellen, die nicht oder mit 10 μ M EGCG für 4-20 Stunden inkubiert wurden.

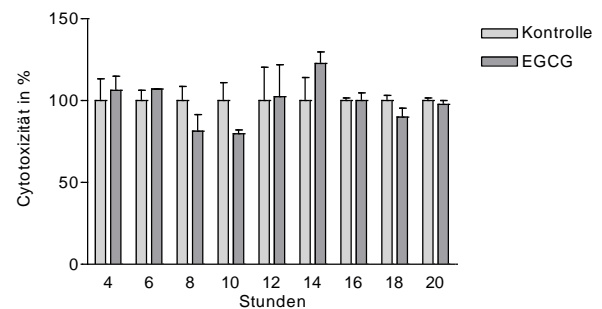


Abb. 3.12: EGCG zeigt keine Cytotoxizität gegenüber SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen cytotoxischen Effekte von 10 μ M EGCG nach der angegebenen Inkubationsdauer (Stunden) \pm SD im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Es wurde festgestellt, dass im Laufe der Zeit die sAPP-Sekretion bei beiden Versuchsansätzen kontinuierlich anstieg, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der sAPP-Menge der mit EGCG behandelten Zellen und der Kontrolle nachweisbar war. Die Abbildung 3.12 zeigt, dass eine Inkubation der Zellen mit einer EGCG-Konzentration von 10 μ M keine zytotoxischen Effekte zur Folge hat. Mit Hilfe eines externen Abgleichs der gemessenen Absorption mit einer bekannten Zellanzahl konnte man anhand der Absorption (OD-Werte) die Anzahl toter Zellen in den Experimenten abschätzen. Danach ergab sich ein maximaler Zelltod von lediglich 4 %.

Im Hinblick auf ein Flavonoid-Screening wurde aus Gründen der Sensitivität und des Zeitaufwandes der Nachweis von sAPP α mittels Human APP ELISA durchgeführt. Um den steigenden Effekt auf sAPP α durch EGCG evtl. noch verstärken zu können, wurde die Zellzahl verringert. Um zu testen, welche Anzahl an Zellen bzw. Inkubationszeit nötig ist, um sAPP im Überstand mittels Human APP ELISA nachweisen zu können, wurde zunächst der Überstand von 3 \cdot 10⁵, 1 \cdot 10⁵, 3 \cdot 10⁴ und 1 \cdot 10⁴ unbehandelten Zellen nach 12 und 24 Stunden für eine Messung herangezogen. Zusätzlich zu der SH-SY5Y Zelllinie wurde hierbei eine weitere Neuroblastomzelllinie (SK-N-SH) getestet. Da bei einer Anzahl

von $1 \cdot 10^4$ beider Zelllinien auch nach 24 Stunden kein sAPP nachweisbar war, wurde diese Zellzahl bei der folgenden Abbildung 3.13 nicht dargestellt.

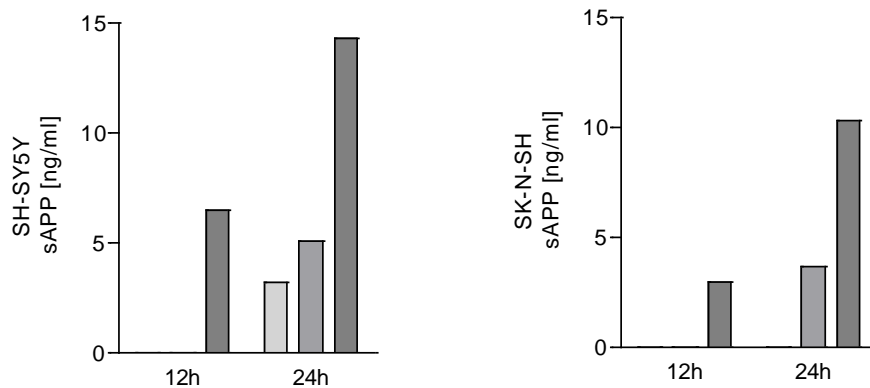


Abb. 3.13: Nachweis von sAPP im Überstand von den Neuroblastomzelllinien, SH-SY5Y und SK-N-SH. Dargestellt ist die mittels human APP Elisa ermittelten sAPP Konzentration im Überstand von $3 \cdot 10^5$ (dunkelgrau), $1 \cdot 10^5$ (grau) und $3 \cdot 10^4$ (hellgrau) Zellen nach 12 und 24 Stunden.

Zusätzlich zu der zeitlichen wurden auch eine von der Zellzahl abhängige kontinuierliche Zunahme der sAPP-Konzentration ermittelt werden. Die höchste Konzentration von sAPP war somit bei einer Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ und einer Inkubationszeit von 24 Stunden messbar. Weiterhin zeigte sich, dass SH-SY5Y Zellen im Vergleich mit SK-N-SH mehr sAPP in den Zellkulturüberstand sekretieren. Dies wurde innerhalb der Arbeitsgruppe auch durch Real-Time-Analysen bestätigt.

Daher wurde für ein Flavonoid-Screening die Zelllinie SH-SY5Y verwendet und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden detektiert. Da die Proben ohne Verdünnung eingesetzt werden sollten, eine Steigerung von sAPP α durch Behandlung mit Flavonoiden zu erwarten war und die ermittelte Menge von 5 ng/ml sAPP in der Mitte der Kalibriergeraden lag, wurde eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ ausgewählt. Unter diesen optimierten Bedingungen wurden von mir zusätzlich zu EGCG sechs weitere Flavonoide getestet. Um evtl. eine strukturabhängige Tendenz erkennen zu können, kamen Verbindungen aus unterschiedlichen Gruppen zum Einsatz. Der Einfluss eines Flavonoids in einer Konzentration von 10 μ M auf sAPP- und sAPP α -Sekretion ist in den folgenden zwei Abbildungen dargestellt. Für die graphische Darstellung wurde der Mittelwert der ermittelten OD-Werte der Kontrolle (Ktrl) 1 gesetzt; die anderen Werte wurden entsprechend angeglichen.

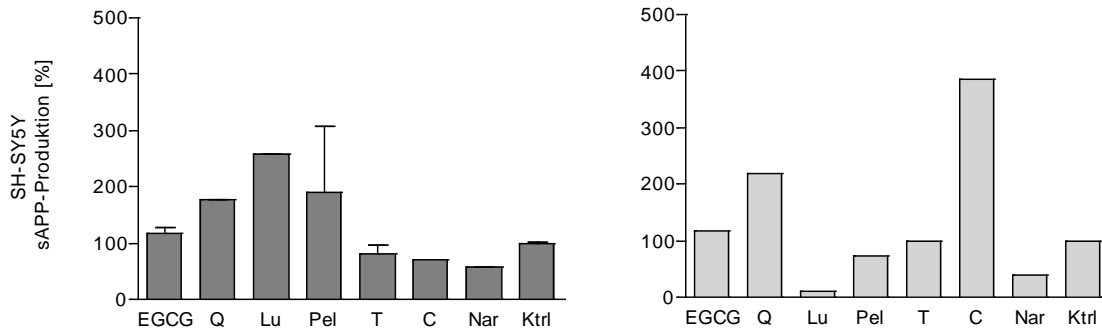


Abb. 3.14: Flavonoide beeinflussen die sAPP- bzw. sAPP α -Sekretion von SH-SY5Y-Zellen. Es ist die relative sAPP- bzw. sAPP α -Menge, die mittels Human APP ELISA im Überstand von SH-SY5Y Zellen, die mit 10 μ M des angegebenen Flavonoids 24 h inkubiert wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Ktrl) dargestellt. links: Hier sind die Mittelwerte (\pm SD) der relativen sAPP-Menge (n=2) abgebildet. rechts: Um sAPP α detektieren zu können, wurde hier der Capture Antikörper des Human APP ELISA durch Anti-Human β -Amyloid [1-17] (6E10) ausgetauscht (n=1). EGCG: Epigallocatechingallat; Q: Quercetin; Lu: Luteolin; Pel: Pelargonidin; T: Taxifolin; C: Catechin; Nar: Naringenin.

Es zeigte sich, dass Taxifolin, Catechin und Naringenin im Vergleich zur Kontrolle eine bis zu 40% geringere, wohingegen Quercetin und Luteolin eine bis zu 150 % stärkere sAPP-Sekretion zur Folge hatten. Wie zuvor schon ermittelt, blieb die sAPP-Konzentration bei mit EGCG behandelten Zellen konstant. Aufgrund der hohen Standardabweichung war bei Pelargonidin keine Aussage möglich. Es ist aber auch zu beachten, dass die Effekte auf die allgemeine sAPP-Sekretion auch mit dem Einfluss auf APP an sich zusammenhängen können.

Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich auch bei der Betrachtung der sAPP α -Sekretion. Während Zellen, die mit Luteolin, Naringenin und Pelargonidin behandelt wurden, nur noch 10-73 % der sAPP α -Menge im Vergleich zur Kontrolle ins Medium abgaben, hatten Quercetin und Catechin eine Steigerung von über 100% zur Folge. Durch Einsatz von EGCG konnte die sAPP α -Sekretion um 20% gesteigert werden, Taxifolin jedoch hatte keinen Einfluss auf die sAPP α -Menge. Eine im Vergleich zu Kontrolle ermittelte reduzierte sAPP α -Sekretion kann mit verringerter sAPP- oder erhöhter sAPP β -Expression assoziiert werden.

Es ist erkennbar, dass Luteolin aufgrund der erhöhten sAPP-Produktion und des zudem sehr geringen sAPP α -Nachweises vermutlich bevorzugt sAPP β bildet im Gegensatz zu Catechin, für das die umgekehrte Situation ermittelt wurde. Ein direkter quantitativer Vergleich der Ergebnisse beider Experimenten ist nicht möglich, da aufgrund des fehlenden sAPP α -Standards keine Quantifizierung des sekretierten Proteins erfolgte und die Resultate unabhängig voneinander auf die Kontrolle bezogen wurde. Zudem muss

berücksichtigt werden, dass es sich hierbei lediglich um Zwei- bzw. Einfachbestimmungen handelt.

Um auch unter diesen veränderten Bedingungen zytotoxische Effekte ausschließen zu können, wurden die Proben wiederum mit dem LDH-Test überprüft. Der Mittelwert der ermittelten OD-Werte der Kontrolle (Ktrl) wurde 1 gesetzt und die anderen Werte entsprechend angeglichen (Abb. 3.15).

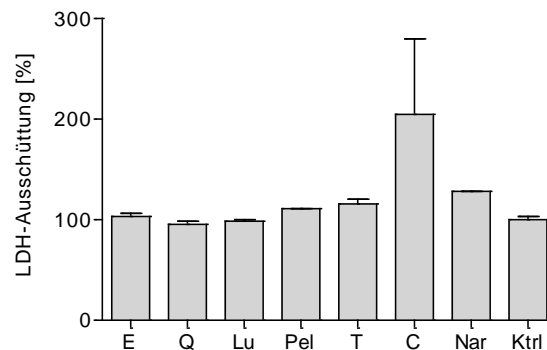


Abb. 3.15: Flavonoide zeigen keine Cytotoxizität gegenüber SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt sind die mittels LDH-Test ermittelten Mittelwerte der relativen zytotoxischen Effekte von 10 μ M der angegebenen Flavonoide nach der einer Inkubationsdauer von 24 Stunden \pm SD im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). E: Epigallocatechingallat; Q: Quercetin; Lu: Luteolin; Pel: Perlargonidin; T: Taxifolin; C: Catechin; Nar: Naringenin.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation der Zelllinie SH-SY5Y mit 10 μ M der hier verwendeten Flavonoide keinen Einfluss auf die Cytotoxizität hatte. Die ermittelte erhöhte LDH-Ausschüttung bei Catechin war statistisch nicht signifikant.

3.2.2 Knock down der Metalloprotease (ADAM-10)

Da ADAM-10 als α -Sekretase bei der Prozessierung von APP beteiligt ist, spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle bei der Alzheimer Krankheit. Die Steigerung der proteolytischen Aktivität dieser Metalloprotease durch EGCG steht in Zusammenhang mit der Reduktion der A β -Ablagerungen. Um die Funktion dieses Enzyms weiter zu analysieren und den Einfluss anderer Flavonoide zu erforschen, bietet sich das Arbeiten mit sogenannten Knock Down Tieren bzw. Knock Down Zelllinien an.

Um diese Systeme zu erzeugen, in denen das Protein nicht komplett ausgeschaltet, sondern herunterreguliert wird, kommt die Methodik der RNA-Interferenz zur Anwendung.

In der vorliegenden Arbeit wurden virale Vektorsysteme entwickelt, die eine shRNA-vermittelte Herunterregulation des humanen ADAM-10 bewirken.

Um die Aktivität der shRNAs zu charakterisieren und eine potentielle shRNA zu finden, mussten zunächst jeweils geeignete Plasmide kloniert werden, die für die entsprechende Zielsequenz (ADAM-10) bzw. für die shRNAs gegen ADAM-10 kodieren. Ziel war es, ein Knockdown auf RNA-Ebene und auf Proteinebene nachzuweisen und anschließend die entsprechenden Vektoren zu produzieren. Da besondere Schwierigkeiten bei der Klonierung von ADAM-10 auftraten, wurden anfängliche Versuche mit einem EST-Clone des ADAM-10, der „st ADAM-10“ genannt wurde, durchgeführt. Die hierbei gemachten Erkenntnisse wurden für den Knockdown des humanen ADAM-10 genutzt.

3.2.2.1 Klonierung der Vektoren

Die Aktivitätstests der shRNAs auf RNA-Ebene erfolgten mit Hilfe eines Reporterassays, dem Luziferaseassay. Hierzu mussten die Zielsequenzen in den Reportervektor psiCheck-2 und die shRNAs in pSilencer bzw. pAAV eingebracht werden. Da mit Hilfe des Vektors eine transkriptionale Fusion der Zielsequenz mit der für die *Renilla*-Luziferase kodierenden Sequenz erfolgt, konnte ein shRNA vermittelter Knockdown durch Abnahme der *Renilla*-Luziferase-Aktivität nachgewiesen werden. Interne Normalisierung der Analysedaten erfolgte über eine zweite Luziferase (*Firefly*-Luziferase).

3.2.2.1.1 Klonierung der Zielsequenzen in psiCheck-2

In diesen Vektor wurden ein EST-Clone der kodierenden Sequenz für hADAM10 (st hADAM10) eingefügt sowie sogenannte Kurzzielsequenzen, die nur einen sehr kleinen Teil (kleiner 100 bp) der kodierenden Sequenz des hADAM10 repräsentieren.

Es wurden insgesamt fünf psiCheck-2-Plasmide hergestellt:

Bezeichnung	Transgen	Länge (bp)	Schnittstellen	Resistenz
KPpsiCheck- st hADAM10	Kodierende Sequenz des EST-Clones von ADAM 10 (EST-Clone: 861 bp)	7111	5'-XhoI/3'-NotI	Ampicillin
KPpsiCheck-KT1 st hADAM10	Sequenzabschnitt 2803 bis 2850 der kodierende hADAM10-Sequenz (entspricht Sequenzabschnitt 298-345 des EST-Clones von hADAM10)	6297	5'-XhoI/3'-NotI	Ampicillin
KPpsiCheck-KT2 st hADAM10	Sequenzabschnitt 2940 bis 2987 der kodierende hADAM10-Sequenz (entspricht Sequenzabschnitt 435-482 des EST-Clones von hADAM10)	6297	5'-XhoI/3'-NotI	Ampicillin
KPpsiCheck-KT3 st hADAM10	Sequenzabschnitt 3090 bis 3137 der kodierende hADAM10-Sequenz (entspricht Sequenzabschnitt 585-632 des EST-Clones von hADAM10)	6297	5'-XhoI/3'-NotI	Ampicillin
KPpsiCheck-KT4 st hADAM10	Sequenzabschnitt 636 bis 683 der kodierende hADAM10-Sequenz (--)	6297	5'-XhoI/3'-NotI	Ampicillin

3.2.2.1.2 Klonierung der shRNA-Sequenzen in pSilencer 2.0-U6

In den pSilencer 2.0-U6-Vektor, der über den zellulären RNA-Polymerase-III-Promotor U6 verfügt, wurden die für die shRNA kodierenden Sequenzen inkloniert. Die ausgewählten siRNA-Sequenzen 1,3 und 4 weisen keine Homologie zu anderen humanen Sequenzen auf. Die siRNA -Sequenz 2 besitzt eine Homologie zu hADAMTS-like 3 von 94 %. Die Position der entsprechenden siRNAs in der hADAM10 Sequenz zeigt die Abbildung 3.16.

Um das standardisierte Protokoll von Promega zu nutzen, wurden die Knockdown-Versuche anfänglich mit dem Expressionsvektor pSilencer 2.0 U6 durchgeführt. Die low copy Eigenschaft dieses Vektors und die fehlende Eignung dieses Vektors für die virale Vektorproduktion, führten im Verlauf der Arbeit zum Einsatz anderer Expressionsplasmide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt vier pSilencer 2.0-U6-Plasmide hergestellt. Das Plasmid pSilencer-neg lag innerhalb der Arbeitsgruppe bereits vor.

Bezeichnung	Transgen	Länge (bp)	Schnittstellen	Resistenz
pSilencer-Neg	Kontroll-shRNA, die gegen keine Homologien zu humanen oder murinen Sequenzen aufwies	3.131	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
KPpSilencer-sh1 st hADAM10	shRNA 1 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	3.131	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
KPpSilencer-sh2 st hADAM10	shRNA 2 gegen hADAM 10 nach Ambion-Algorithmus	3.131	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
KPpSilencer-sh3 st hADAM10	shRNA 3 gegen hADAM 10 nach Ambion-Algorithmus	3.131	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
KPpSilencer-sh4 st hADAM10	shRNA 4 gegen hADAM 10 nach Ambion-Algorithmus (siRNA-Sequenz aus Literatur bekannt)	3.131	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin



Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Position der entsprechenden Zielsequenz in der hADAM10 Sequenz. Dargestellt ist die hADAM10-Sequenz (445-3927bp; hellblau), die EST-Klon hADAM10-Sequenz (grün) und die Position der ausgewählten Zielsequenzen 1-4 (Pfeile) der shRNAs 1-4.

3.2.2.1.3 Klonierung der shRNA-Sequenzen in pAAV-hrGFP

Der Vektor enthält ein CMV-Promotor betriebenes Gen, das für ein grünfluoreszierendes Protein kodiert. Mit Hilfe des pAAV Helper Free Kit (Stratagene) können AAV-basierende virale Vektoren produziert werden. Um diesen Vektor für weiterführende Versuche verwenden zu können, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe zunächst die shRNA-Expressionskassette des Vektors pSilencer in zwei unterschiedliche Richtungen inkloniert. Je nach Orientierung wurden sie pAAV-hrgfp-EcoT7 bzw. pAAV-hrGFP-CpoT7 bezeichnet. Anschließend erfolgte der Einbau der bereits genannten shRNAs 1-4. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs Plasmide kloniert. Die Kontrollplasmide, welche für shRNA-neg codieren, lagen bereits vor.

Bezeichnung	Transgen	Länge (bp)	Schnittstelle n	Resistenz
pAAV-hrGFP-EcoT7-Neg	Expressionskassette shRNA-Neg	5852	5'-Eco911/3'-CpoI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-CpoT7-Neg	Expressionskassette shRNA-Neg	5852	5'-Eco911/3'-CpoI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-EcoT7 sh1hADAM10	shRNA 1 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-EcoT7 sh2_hADAM10	shRNA 2 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-EcoT7 sh3_hADAM10	shRNA 3 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-EcoT7 sh4_hADAM10	shRNA 4 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-CpoT7 sh3_hADAM10	shRNA 3 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin
pAAV-hrGFP-CpoT7 sh4_hADAM10	shRNA 4 gegen hADAM 10 nach Ambion- Algorithmus	5852	5'-HindIII/3'-BamHI	Ampicillin

3.2.2.1.4 Klonierung von hADAM10-Sequenz in pCDNA3.1+

Um den Knockdown der zuvor getesteten shRNA auf Proteinebene zeigen zu können, wurde hADAM10 in den Expressionsvektor pCDNA 3.1+, der sehr effizient Proteine in Säugerzellen exprimiert, kloniert. Aufgrund der Position der shRNA-Sequenzen in der

Zielsequenz hADAM10 wurde nicht nur die kodierende Sequenz (445-2691bp), sondern ein längerer Sequenzabschnitt (445-3927bp) eingebaut.

Bezeichnung	Transgen	Länge (bp)	Schnittstellen	Resistenz
pcDNA3.1+_hADAM10full	Kodierende Sequenz des hADAM10 (445-3927bp)	8920	5'-XhoI/3'-XhoI	Ampicillin

3.2.2.2 Charakterisierung der shRNA-Aktivität

3.2.2.2.1 Luciferase-Assay:

Die Effizienz der shRNA, das Zielgen herunter zu regulieren, und die Spezifität der Wirkung der shRNA wurden mit Hilfe eines Luciferase-basierenden Reporterassays festgestellt. Da in diesem System mit Hilfe des psiCheck-2-Vektors die Fusion der Zielsequenz mit der Sequenz der *Renilla*-Luciferase auf Transkriptionsebene erfolgt, bedeutet die Herunterregulation des Zielgens zugleich die Abnahme des Fusionsproteins. Die Knockdown-Aktivität korreliert daher mit der Abnahme der Luciferase-Aktivität. Die interne Normalisierung durch die *Firefly*-Luciferase ermöglichte den Vergleich der verschiedenen shRNAs 1-4. Als Kontrolle wurde ein Expressionsplasmid eingesetzt, das für eine shRNA kodiert, die keine Sequenzhomologie mit irgendeiner Sequenz im menschlichen, murinen oder rodentischen Genom aufwies.

Zunächst wurden Knockdown-Versuche mit den klonierten Expressionsplasmiden pSilencer-2.0-U6-shRNA 1-4 durchgeführt. Als Zielsequenzträger kamen neben dem EST-Klon des hADAM10 zusätzlich kurze Sequenzabschnitte der hADAM10 Sequenz zum Einsatz. Der Aufbau dieser Kurzzielsequenzen ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

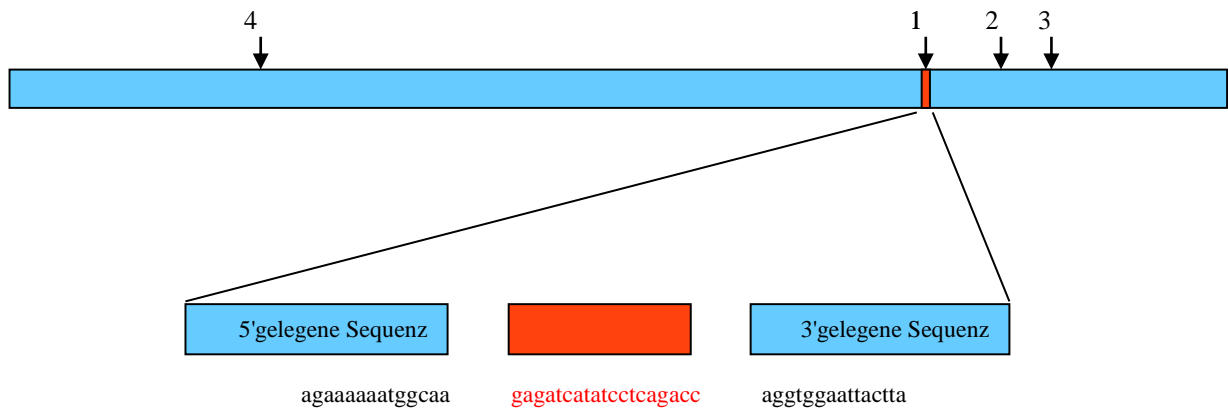


Abb. 3.17: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kurzzielsequenzen. Dargestellt ist die hADAM10 Sequenz (445-3927bp) und die Position der ausgewählten Zielsequenzen 1-4 (Pfeile). Der Aufbau einer Kurzzielsequenz ist am Beispiel der Zielsequenz 1 dargestellt. Die eigentliche Zielsequenz (rot) wird von 5' und 3' gelegenen kurzen Sequenzabschnitten (hellblau) flankiert.

Die Kofransfektion des jeweiligen psiCheck-Konstruktes mit der entsprechenden pSilencer-shRNA in 293T Zellen erfolgte im Massenverhältnis von 1 zu 4. Dies entsprach für den EST-Klon einem Stoffmengenverhältnis von 1 zu 9 und für die Kurzzielsequenzen von 1 zu 8,1. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase gemessen.

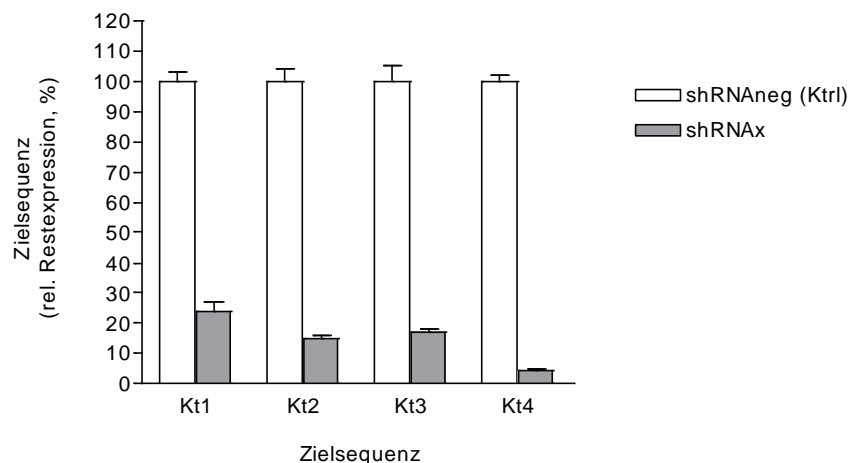


Abb. 3.18: Vergleich der Herunterregulierung der einzelnen Kurzzielsequenzen durch ihre entsprechende shRNA. Die Plasmide der Kurzzielsequenzen (Kt 1-4) wurden mit ihren entsprechenden Plasmiden der shRNAs (1-4) bzw. shRNAneg (Kontrolle) in 293T Zellen cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase mittels Luciferase-Assay. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus Mehrfachmessungen ($n \geq 5$) aus 2 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen. Dargestellt ist die relative Restexpression nach Normalisierung mit Hilfe der *Firefly*-Luciferase. Die relative Expression in den Kontrollen wurde 100 % gesetzt.

Die Abbildung 3.18 zeigt, dass eine Herunterregulierung der Genexpression aller eingesetzten Kurzzielsequenzen erreicht werden konnte. Während durch den Einsatz der shRNA1 lediglich eine Reduktion von ca. 75 % möglich war, konnten die shRNA2 und 3 die Expression ihrer Zielsequenzen um ca. 85% und shRNA 4 sogar um mehr als 95% unterdrücken.

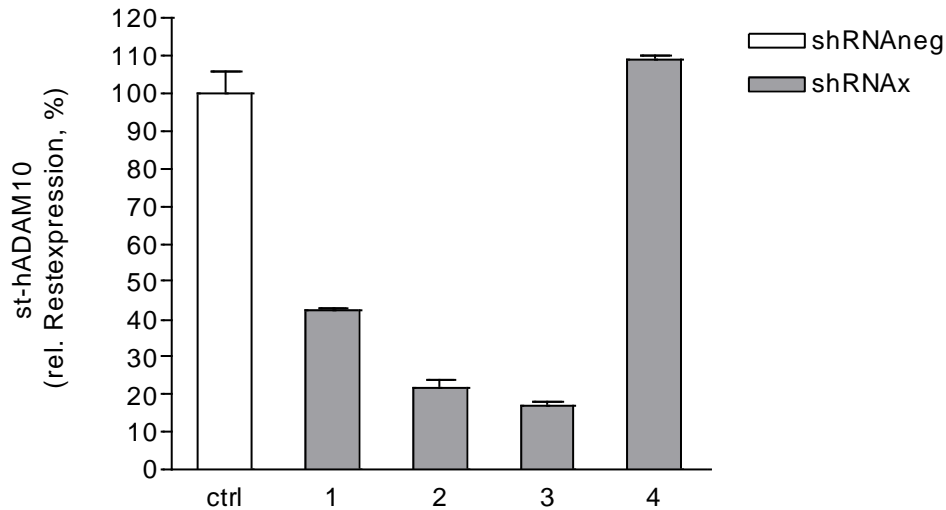


Abb. 3.19: Vergleich der Herunterregulierung des EST-Klons von ADAM10 (st-ADAM10) durch verschiedene shRNAs (1-4). Das Plasmid der st-ADAM10-Sequenz und die Plasmide der shRNAs (1-4), sowie shRNAneg (Kontrolle) wurden in 293T Zellen cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase mittels Luciferase-Assay. Die Balken (Ktrl,1-3) repräsentieren Mittelwerte aus Mehrfachmessungen ($n \geq 5$) aus 2 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen. Der Balken 4 repräsentiert Mittelwerte aus Mehrfachmessungen ($n = 3$) eines anderen Experimentes. Dargestellt ist die relative Restexpression nach Normalisierung mit Hilfe der *Firefly*-Luciferase. Die relative Expression in den Kontrollen wurde 100 % gesetzt.

Die Abbildung 3.19 zeigt, dass eine Herunterregulierung der Genexpression der st-ADAM10-Sequenz erreicht werden konnte. Während durch den Einsatz der shRNA1 lediglich eine Reduktion von ca. 60 % möglich war, konnten die shRNA2 und 3 die Expression ihrer Zielsequenzen um ca. 80% unterdrücken. Diese Tendenz der Aktivität der shRNAs ist vergleichbar mit den Knockdown-Ergebnissen der Kurzzielsequenzen (siehe Abbildung 3.18). Da die Zielsequenz der shRNA4 in der Sequenz von st-ADAM10 nicht vorkommt, zeigte diese shRNA hier keine reduktive Wirkung.

Um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren, wurde in einem parallelen Versuchsansatz ein kleines Plasmid, das für GFP kodiert (p_{\max} -GFP), zusätzlich gleichzeitig cotransfiziert. Es resultierte eine vergleichbare Transfektionsrate ($n=1$) von 86,5 - 96,5 %, wobei das

Plasmid p_{max} die Knockdown-Aktivität der shRNAs nicht statistisch relevant beeinflusste (Daten nicht gezeigt).

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Knockdown-Aktivität zu untersuchen, erfolgte die Transfektion mit unterschiedlichen Plasmidverhältnissen (psiCheck/pSilencer). Während man die Menge an psiCheck-2 konstant hielt, wurde die Menge an pSilencer-Plasmid reduziert, so dass sich - ausgehend von einem Stoffmengenverhältnis (psiCheck /pSilencer) von 0,11:1 - die in der Abbildung 3.20 dargestellten erzielt wurden. Um die unterschiedlichen Plasmidgrößen (psiCheck-Kt 6297bp und psiCheck-st-ADAM10 7111bp) zu berücksichtigen, wurde die Stoffmenge des Plasmids mit der Kurzzielsequenz dem Vektor psiCheck-st-ADAM10 angeglichen.

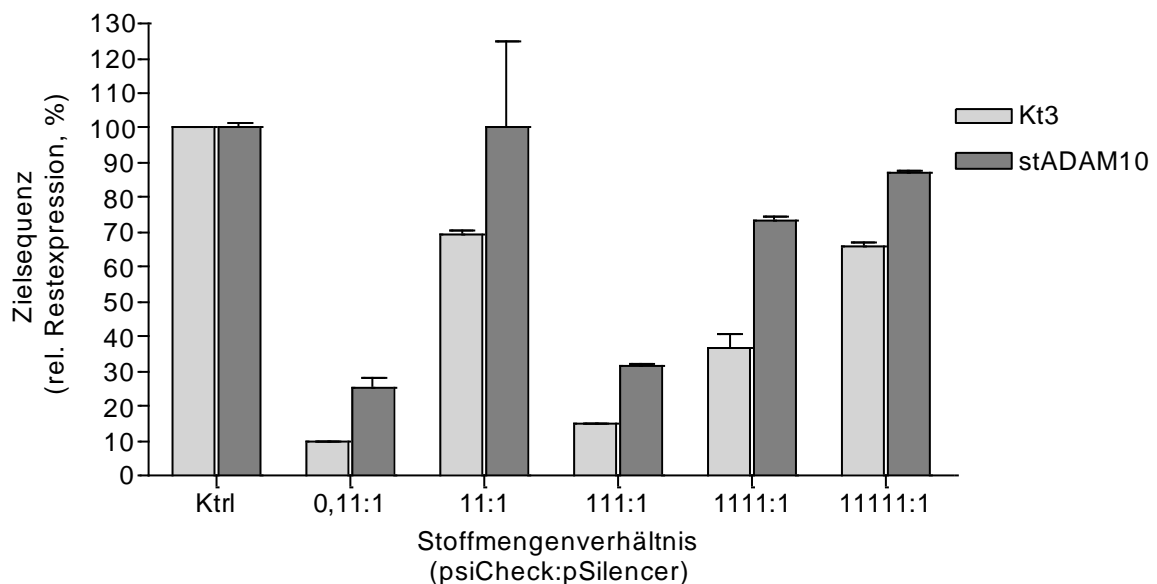


Abb. 3.20: Konzentrationsabhängigkeit der Knockdown-Aktivität und Vergleich der Herunterregulierung zwischen Kurzzielsequenz und des EST-Klons von ADAM10 (st-ADAM10) nach Anpassung der Stoffmenge. Das Plasmid der st-ADAM10-Sequenz bzw. der Kurzzielsequenz 3 und das Plasmid der shRNAs 3(bzw. ihre Verdünnungen), sowie shRNA_{neg} (Kontrolle) wurden in 293T Zellen cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase mittels Luciferase-Assay. Dargestellt ist die relative Restexpression nach Normalisierung mit Hilfe der *Firefly*-Luciferase. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachmessungen. Die relative Expression der Kontrollen wurde 100 % gesetzt.

Die Abbildung 3.20 verdeutlicht, dass eine Abnahme der pSilencer-Konzentration sowohl bei der Kurzzielsequenz als auch bei der st-ADAM10-Sequenz zu einer Abschwächung der Herunterregulierung bis zu einer Restexpression von ca. 90% führte. Bis auf das Knockdown-Ergebnis bei dem Verhältnis 11:1 war die Suppression der Genexpression umso effektiver, je mehr shRNA vorlag. Vergleicht man die Effektivität des Knockdowns zwischen Kurzzielsequenz und st-ADAM10-Sequenz, so stellt man fest, dass die längere

Sequenz doppelt so viel Restexpression aufzeigt. Bei dem Verhältnis von 111:1 war jedoch immer noch ein Knockdown von ca. 69 % messbar.

Nachdem vier shRNAs charakterisiert wurden und nachgewiesen werden konnte, dass alle vier shRNAs für die Herunterregulierung des hADAM10-Sequenz geeignet waren, wurde das Expressionssystem gewechselt. Hierzu wurden die Expressionskassette des pSilencer-Vektors in zwei unterschiedlichen Orientierungen in den Vektor pAAV-hrGFP kloniert. Ob der neue Expressionsvektor oder die Orientierung der Expressionskassette sich auf die Knockdown-Aktivität auswirkt, wurde mittels eines Vergleichsexperiments überprüft. Hierzu wurden nach Anpassung der Stoffmenge der pAAV-Vektoren an die der pSilencer-Vektoren der Knockdown auf die st-ADAM10-Sequenz durch die shRNAs 1-3 getestet. Die Abbildung 3.21 zeigt, dass sich bis auf pAAVEco-shRNA2 keine Differenz in Bezug auf das neue Expressionssystem sowie auf die Orientierung der Expressionskassette ergab. Daher konnten diese pAAV-Plasmide für die Produktion rekombinanter adeno-assoziiierter Vektorpartikel verwendet werden.

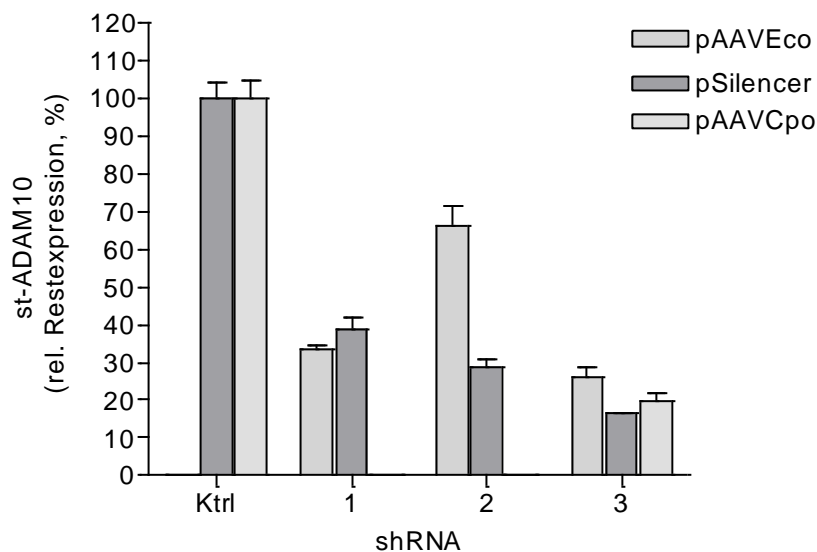


Abb. 3.21: Vergleich der Expressionssysteme pSilencer und pAAV-hrGFP. Das Plasmid der st-ADAM10-Sequenz und die Plasmide der shRNAs (1-3), sowie der shRNAneg (Kontrolle) wurden in 293T Zellen cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase mittels Luciferase-Assay. In parallelen Versuchsansätzen wurde die Aktivität der drei shRNA-Kandidaten in zwei verschiedenen Expressionssystemen miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Orientierung der Expressionskassette im pAAV-Expressionssystem (pAAVCpo gegen pAAVEco) anhand der shRNA 3 überprüft. Dargestellt ist die relative Restexpression nach Normalisierung mit Hilfe der *Firefly*-Luciferase. Die relative Expression der Kontrollen wurde 100 % gesetzt.

3.2.2.2 Knockdown des humanen ADAM10

Wie erwähnt, ist bei der Alzheimer Krankheit die Metalloprotease ADAM-10 von Interesse. Deshalb wurde nach dem erfolgreich etablierten Knockdown der Teilsequenz st-ADAM-10 an der Herunterregulierung der vollständigen Sequenz des Enzyms ADAM-10 gearbeitet. Um die direkte Auswirkung der shRNA-Kandidaten auf die ADAM-10-Expression zu ermitteln, wurde die vollständige Sequenz des Enzyms in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ kloniert; die Expression wurde über einen Western Blot analysiert.

Vor der Vektorproduktion wurde die Knockdown-Aktivität der genannten shRNA auf die hADAM-10-Sequenz mittels Western Blot untersucht. Die pAAV-hrGFP-Eco-shRNA1-4, sowie shRNAneg Vektoren wurden mit pcDNA-hADAM10 in 293 T Zellen cotransfiziert (Transfektionsrate jeweils ca. 70%) und das Zelllysate mit Western Blot und Immunfärbung untersucht.

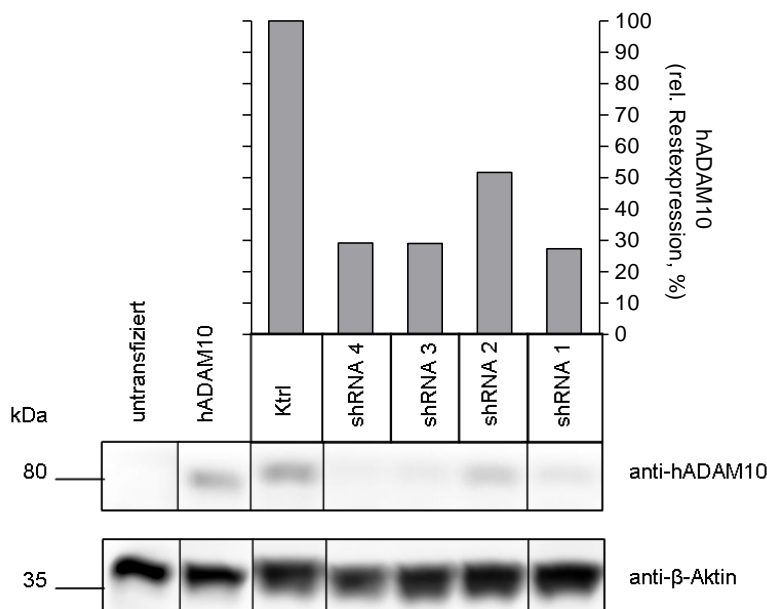


Abb. 3.22: Herunterregulierung von hADAM-10 ist durch shRNAs (1-4) möglich. Die pAAV-hrGFP-Eco-shRNA1-4, sowie shRNAneg Plasmide wurden mit pcDNA-hADAM10 in 293 T Zellen cotransfiziert (identisches Massenverhältnis, Stoffmengenverhältnis von 1:1,5). Die Zellen wurden mit Western Blot nach Bradford-Bestimmung mittels anti-hADAM-10, 11G2 analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Als weitere Kontrollen dienten 293T Zellen, die nicht oder nur mit pcDNA-hADAM10 transfiziert wurden. Die Auswertung der Restexpression erfolgte mit ImageJ. Die Expression der Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Im Balkendiagramm ist die relative Restexpression nach Normalisierung auf β -Aktin zu sehen.

Weitere Versuche zeigten, dass die doppelte Menge an shRNA-Plasmiden keine zusätzliche Reduktion der Restexpression zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 3.22 zeigt, dass die Resultate dem Ergebnis des Luciferase-Assays (Abb.3.21) entsprechen. Die Restexpression von Adam-10 betrug unter Einsatz der

shRNAs1, 3 und 4 nur noch ca. 30%. Die shRNA2 besitzt auch hier das geringste Knockdown-Potential (Restexpression über 50%), während shRNA 1 und 3 ungefähr identische Effektivität zeigen. Weiterhin konnten im Western Blot auch die Konzentrationsabhängigkeit des Knockdown bestätigt werden. So wurde, vergleichbar mit dem Resultat des Luciferase-Assays (Abb.3.20), die Herunterregulierung bei einer 10er Verdünnungsreihe erst ab einer Verdünnung von pcDNA/pAAVshRNA von 1000:1 abgeschwächt (Daten nicht gezeigt).

Mit den effektiven pAAV_shRNA Plasmiden wurden im Rahmen dieser Arbeit Vektoren produziert. Zwar stehen Knockdown-Experimente mit den Vektoren noch aus, jedoch konnte in anderen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Resultate den Plasmidversuchen entsprechen.

Diese Experimente brachten zwei gegenüber ADAM-10 effektive shRNAs hervor. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass vielleicht die Möglichkeit besteht, das Knockdown-Potential der entsprechenden shRNA auf die ganze Zielsequenz (aufgrund der Ergebnisse eines Knockdown-Experimentes mit den Kurzsequenzen als Zielgen) abzuschätzen. Somit könnten Versuche auch ohne Langsequenz, welche oftmals sehr teuer oder überhaupt nicht zugänglich ist, durchgeführt werden.

3.2.3 Reinigung von AAV

Um Vektoren *in vivo* gentherapeutisch einsetzen zu können, bedarf es nach Produktion der Vektoren der Aufreinigung der Vektorsuspension ohne Verlust an Infektiosität. Für AAV, welche ein vielversprechendes Vektorsystem zur Anwendung der Gentherapie darstellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine chromatographische Methode angewendet, welche laut Literatur AAV Vektoren hoher Reinheit und gesteigertem Potential liefern (Gao *et al.* 2000). Die Aufreinigung erfolgte modifiziert nach Gao *et al.* 2000 über HPLC mittels einer Heparin-Säule und Elution mittels erhöhter Salzkonzentration. Es handelt sich hierbei um eine Art Affinitätschromatographie, basierend auf der Tatsache, dass AAV auch an dem Oberflächemolekül dem Heparansulfat-Proteoglycan bindet (Zolotukhin *et al.* 1999). Der Vorteil besteht also darin, dass AAV-Vektoren eine hohe Bindekapazität gegenüber Heparin aufweist und eine hohe Flussrate möglich ist.

Wir arbeiteten mit dem Kationenaustauscher, POROS® 50HE und einem HPLC-UV-pH/C System. Diese Säule beinhaltet Partikel, die mit einem quervernetzten Polyhydroxy-

Polymer, das wiederum mit Heparin-funktionellen Gruppen derivatisiert wurde, gecoated sind. Als Fließmittel wurde 20mM Phosphatpuffer verwendet. Zunächst wurde die Salzkonzentration für den Elutionsschritt über einen Stufengradienten, bestehend aus 100, 200, 300, 400, 500mM NaCl, ermittelt. Die AAV-Vektoren wurden, wie im Methodenteil beschrieben, produziert und geerntet. 1 ml der Vektorssuspension wurde anschließend in das HPLC-System injiziert. Die Fraktionen der einzelnen Stufen (9ml/Stufe) wurden gesammelt und anschließend auf AAV-Partikel mittels ELISA sowie auf Infektiösität mittels Transduktionsversuch und anschließender FACS-Messung untersucht.

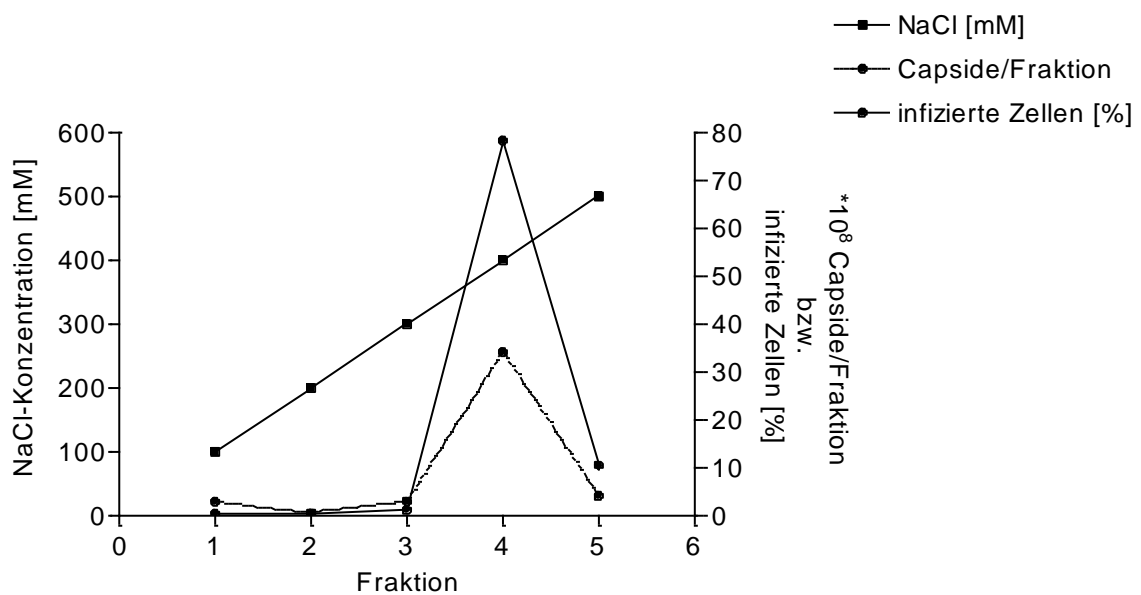


Abb. 3.23: Eine Elutions-Salzkonzentration von 500mM-NaCl werden zur Aufreinigung der AAV- Vektorsuspensionen mittels POROS HE Säulenchromatographie benötigt. AAV-Vektorsuspension (1ml) wurde in das HPLC-System injiziert. Mittels NaCl-Stufengradient (100, 200, 300, 400, 500mM) jeweils mit 5CV erfolgte die Elution der Partikel. Die Waschphasen zwischen den Elutionsstufen erfolgte bei 0mM NaCl, jeweils mit 2CV. Die Fraktionen der einzelnen Elutionsstufen wurden aufgefangen (9ml/Stufe). Anschließend wurden jeweils AAV-Partikel mittels ELISA und Infektiösität der 10^{-1} Verdünnung mittels Transduktionsexperimenten auf HT1080 Zellen mit anschließender FACS-Messung untersucht. Dargestellt ist die Korrelation zwischen AAV-Partikel, Infektiösität und Salzkonzentration.

Die Abbildung 3.23 zeigt, dass bei einer Konzentration von 400mM NaCl, einhergehend mit der Menge der infizierten Zellen, die meisten Partikel eluiert werden konnten. Da sich auch noch ein geringer Teil bei einer NaCl-Konzentration von 500mM von der Säule löste, wurde diese Salzkonzentration für den Elutionsschritt ausgewählt.

In Abbildung 3.24 ist repräsentativ ein Chromatogramm der Aufreinigung von AAV-Partikeln mittels HPLC dargestellt. Es zeigt den FCS-Peak (nicht retardierende

Substanzen) und den Elutionspeak. Mit den einzelnen Fraktionen (Volumen/Fraktion: 1 oder 3ml) wurden Transduktionsexperimente auf HT1080 Zellen durchgeführt. Die Effizienz wurde mittels FACS und Mikroskop getestet. Das Säulendiagramm zeigt im Vergleich zu der Ausgangs-Vektorsuspension keine Reduktion der Transduktionseffizienz. Anzumerken ist aber, dass bei anderen Tests auch Infektionsverluste ermittelt wurden. Dies ist jedoch vermutlich darin begründet, dass sich die Partikel, ionenchromatographisch bedingt, auf ein größeres Volumen verteilen.

Es wurde zwar keine Auswirkung der Salzkonzentration auf die Viruspartikel festgestellt, ein negativer Einfluss auf die Zellen kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden (die physiologische Konzentration beträgt ca. 250mM). Eventuell bedarf es daher nach HPLC-Aufreinigung zur Reduzierung des Salzanteils und weiteren Konzentrierung einer Ultrafiltration (UF) bzw. Dialyse.

Da die AAV-Vektoren fast nicht ins Genom der Zelle integrieren und hauptsächlich episomal in der Zelle vorliegen, geht die Infektiosität mit der Zellteilung verloren. Um schon zu Beginn möglichst viele Zellen infizieren zu können, sind daher besonders hohe Titer von Nöten. Hierzu kann ebenfalls die HPLC-Methode verwendet werden. Ein automatisiertes HPLC-Injektionssystem und eine Art präparatives Säulensystem wären hier von Vorteil, so dass eine große Menge an Vektorsuspension, die in einer geringeren Elutionsmenge resultiert, aufgetragen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher keine Aufkonzentration der AAV-Partikel. Auch eine Reinigung über Cäsiumchlorid-Gradienten Ultrazentrifugation ist bekannt. Diese wird allerdings als zeitaufwendig und ineffizient mit begrenzter Produktionsmenge beschrieben (Gao *et al.* 2000).

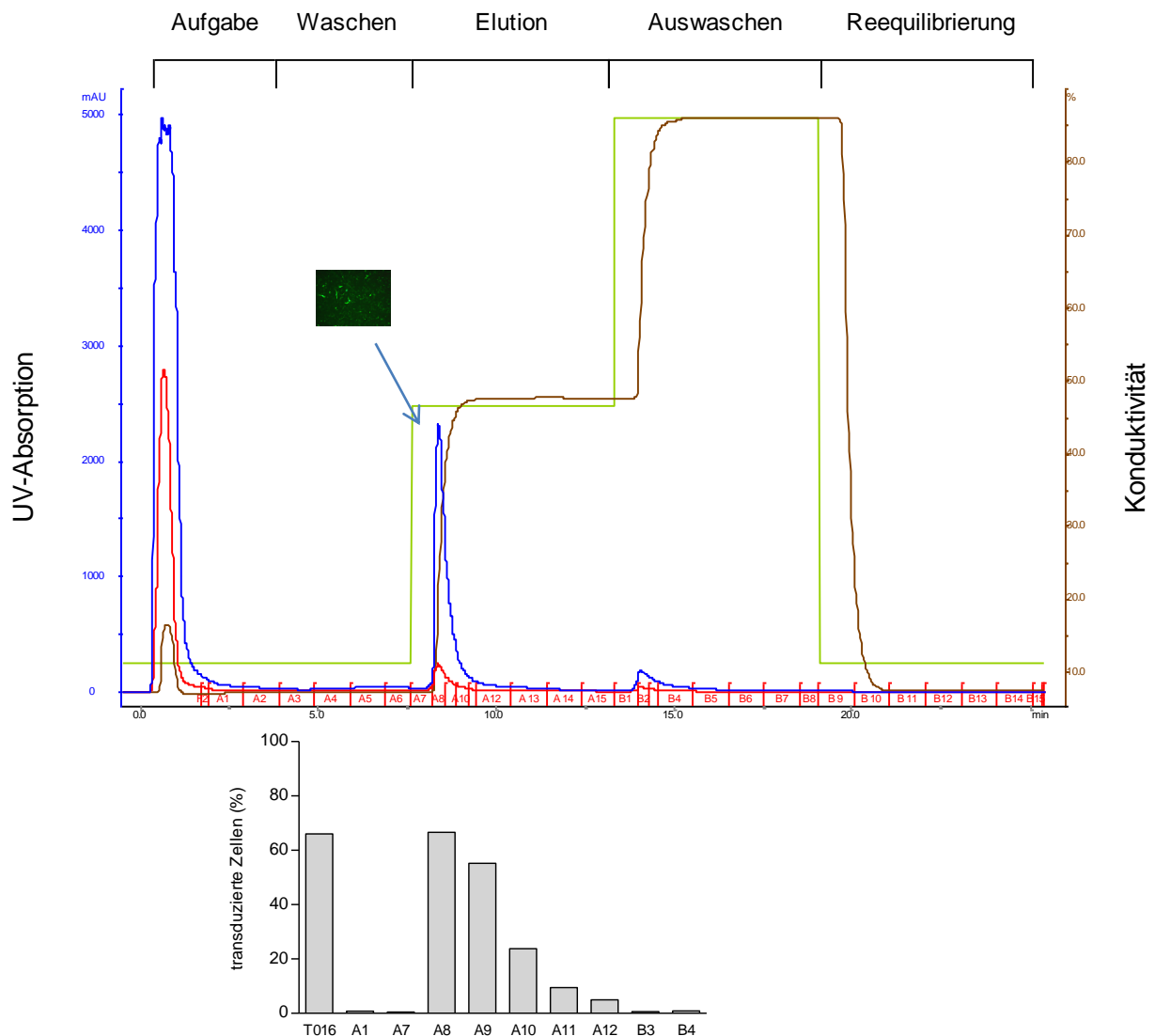


Abb. 3.24: AAV-Vektoren-Reinigung mittels POROS HE Säulenchromatographie. AAV-Vektorsuspension (1ml) wurde in das HPLC-System injiziert. Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Die Fraktionen (1ml oder 3ml) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiösität der 10^{-1} Verdünnung mittels Transduktionsexperimenten auf HT1080 Zellen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Messung untersucht. oben: Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung der Vektoren über HPLC. HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 5% B. Elution: 50% B. Auswaschen: 100% B. Reequilibrierung: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau). 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen A1-B14. Die mikroskopische Aufnahme zeigt repräsentativ den Infektiösitätsnachweis der Hauptpeakfraktion A8. unten: Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der 10^{-1} Verdünnung der Virussuspension vor HPLC-Aufreinigung (T016, Injektionsvolumen: 1ml) und der einzelnen Fraktionen auf HT1080 Zellen.

3.2.4 Vorbereitung von *in vivo* Studien

3.2.4.1 Etablierung der stereotaktischen Injektion

Um Vektoren zur Gentherapie gegen neurodegenerative Erkrankungen *in vivo* testen zu können, ist es nötig, die Vektoren vor allem in die krankheitsspezifisch betroffene Gehirnregionen einzubringen. Hierzu diente die Methode der stereotaktischen Injektion. Um deren Präzision zu bestimmen, wurde nach Festlegung der Hirnregionen, handelsübliche Tinte als Farbstoff unter Einsatz des stereotaktischen Rahmens in Gehirne toter Mäuse injiziert. Als Zielregionen für die Versuche wurden der Hippocampus und Dental Gyrus (betroffene Regionen bei der Alzheimer Krankheit) und Substantia Nigra (betroffene Region bei HIV-Demenz) (nicht dargestellt) ausgewählt. Nach der Injektion wurde das Gehirn präpariert; coronale Gewebeschnitte wurden angefertigt und mittels Mikroskopie anhand der Tinte das getroffene Gewebe lokalisiert.

Die Abbildung 3.25 zeigt die Zielregion, die jeweilige Einstichstelle und den Verlauf der Tinte. Es ist zu sehen, dass die erwünschte Hirnregion getroffen wurde.

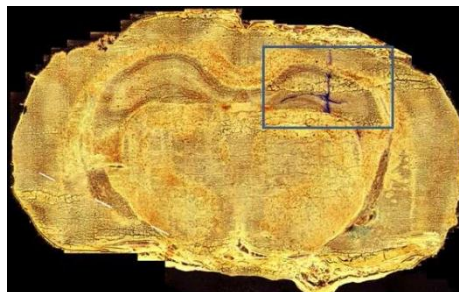


Abb. 3.25: Erfolgreiche stereotaktische Injektion von Tinte in ausgewählte Gehirnregion unter Verwendung des stereotaktischen Rahmens. Dargestellt sind zusammengesetzte Einzelaufnahmen von coronalen Gehirngewebeschnitten, die nach Injektion handelsüblicher Tinte in das Gehirn toter Mäuse erstellt wurden. Die Gehirnregionen wurden mittels Bregmakordinatensystems nach Paxinos und Franklin 2003 bestimmt. Zielregion: Dental Gyrus: Koordinaten: -2,3mm / 1,5mm rechts / 2mm tief; Injektionsvolumen: 10µl

3.2.4.2 Aufbau und Sicherung des transgenen Stamms B6.Cg-Tg(PDGFB-APP_{SwInd})20Lms/2J

Für später geplante Tierversuche wurde der transgene Stamm B6.Cg-Tg(PDGFB-APP_{SwInd})20Lms/2J ausgesucht. Dieser transgene Stamm enthält eine Mutante des APP, die sowohl die schwedische (K670N/M671L) als auch die indische (V717F) Mutation trägt

(APP_{swInd}). Da die transgene Linie den genetischen Hintergrund des C57Bl/6-Stammes besaß, wurden zum Aufbau und Sicherung des heterozygot transgenen Stammes die Foundertiere mit nicht transgenen (Wildtyp) C57Bl/6-Kontrolltieren verpaart. Um die Nachkommen auf Transgenität zu überprüfen, erfolgte eine Genotypisierung mit Hilfe der aus der Schwanzspitze isolierten genomischen DNA und anschließender PCR. Hierzu wurde ein spezifisches Primerpaar verwendet, das ein 360 bp langes Fragment des transgenen mutierten APP-Gens und ein weiteres, das ein 200bp langes Stück des Kontrollgens Tcrd amplifizierten. Die Abbildung 3.26 zeigt die Auftrennung von exemplarisch sieben PCR-Reaktionen mittels Gelelektrophorese. Die Kontrollbande ist in jedem Ansatz zu sehen. Positiv transgene Ansätze weisen eine zusätzliche Bande bei 360bp auf.

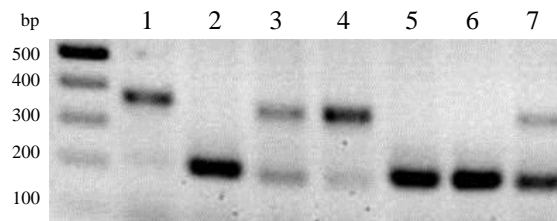


Abb. 3.26: Genotypisierung mittels PCR. Nach Isolierung der genomischen DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse und Amplifikation der PCR Fragmente des Kontrollgens und transgenen Gens, wurden die PCR-Produkte mit Gelelektrophorese aufgetrennt. Fragmentgröße des Kontrollgens ist 200bp, die des transgenes APP-Gens ist 360bp. Dargestellt ist ein Agarosegel der Genotypisierung von sieben Mäusen (1-7). Es zeigt vier positiv transgene Nachkommen (Bahnen 1, 3, 4 und 7) und Wildtyp Nachkommen (Bahnen 2, 5 und 6).

Insgesamt konnten 67 transgene Nachkommen identifiziert werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Übersicht der Zuchtdateien.

Eigenzucht (transgen-)	Eigenzucht (gesamt)	F0-Founder Nachkommen	F1-Founder Nachkommen	Mortalitätsrate (alle < 7 Monate)
positiv	67(35f/32m)	52(27/25m)	15 (8f/7m)	23 (15f/8m)
negativ	78 (39f/39m)	61 (30f/31m)	17 (9f/8m)	2 (1f/1m)

Zwei der drei erworbenen transgenen Mäuse waren fertil und brachten jeweils eine normale Anzahl von Nachkommen hervor. Wie erwartet, erfolgte die Vererbung der Transgene nach den Mendelschen Regeln. Wie in den phenotypischen Merkmalen dieser Linie beschrieben, kommt es v.a. innerhalb der ersten sechs Monate zu einer hohen

Mortalitätsrate von über 15 %. Im Verlauf unserer Arbeiten lag die Mortalitätsrate bei 31%. Diese Daten müssen bei einem späteren Tierversuch mit einkalkuliert werden. Transgene Männchen wurden für die Weiterzucht verwendet. Des Weiteren wurden die Nachkommen zur Charakterisierung der transgenen A β -Expression (Bildung von A β -Plaques) verwendet.

3.2.4.3 Histologische Charakterisierung der transgenen A β -Expression

Laut Beschreibung dieser transgenen Linie kommt es ab dem 5.-7. Monat zur Bildung von diffusen A β -Ablagerungen im Dentatus Gyrus und Neocortex. Das Fortschreiten der amyloiden Ablagerungen führt nach 8-10 Monaten zu Plaques in allen transgenen Mäusen.

Um den Verlauf der Bildung der A β -Plaques zu charakterisieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung (Alter der Tiere: 36W-65W) Gehirne entnommen und entweder ganz in Histofix eingelegt oder sagittal halbiert und die eine Hälfte in Histofix und die andere Hälfte für Erstellung von Homogenaten bei -80°C gelagert.

Für die histologische Analyse dieser Plaques wurden vier Gehirne transgener Mäuse im Alter von 36, 37, 47 und 65 Wochen und ein Gehirn einer Wildtyp C57Bl/6-Maus im Alter von 36 Wochen als Kontrolle in Paraffin eingebettet; mittels Mikrotom wurden Paraffinschnitte erstellt. Nach Färbung und Entwicklung mittels ABC-Kit wurden mikroskopische Aufnahmen erstellt.

Um die Plaque-Situation repräsentativ darzustellen, wurden Regionen der Hippocampus-Formation (CA1) abgebildet (Abb. 3.27). Die dunkelbraunen Spots stellen die Plaques dar. Wie erwartet, stieg mit dem Alter der Mäuse die Anzahl der Plaques; zahlreiche waren ab 47 Wochen detektierbar. Lediglich im Kortex und Dental Gyrus waren auch ab 9 Monaten, jedoch nur sehr vereinzelt, Plaques sichtbar (nicht gezeigt).

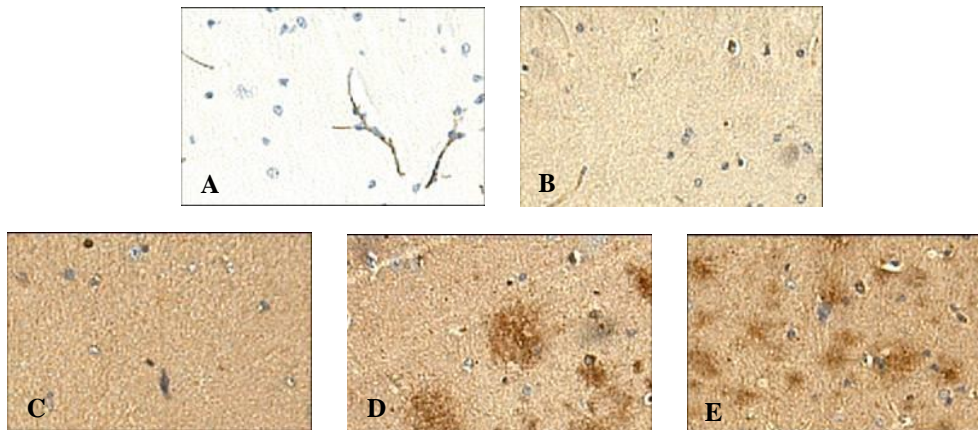


Abb. 3.27: Immunhistologischer Nachweis von A β -Plaques des transgenen Mäusestamms B6.Cg-Tg(APP_{SwInd}). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von Paraffinschnitten der Gehirne angefertigt, die einer immunhistologischen Nachweisreaktion mittels Vectastain ABC Reagenz unterzogen wurden. Dabei wurde als 1.AK der monoklonale Maus Human amyloid β Protein IgG2b und als 2. AK horse anti-mouse IgG (H+L) eingesetzt. Dargestellt ist ein Teil der CA1 Region der Hippocampus-Formation der Gehirne der transgenen Mäuse in verschiedenen Entwicklungsstadien (C) 36 Wochen, (D) 47 Wochen, (E) 65 Wochen. (A) Kontrolle ohne AK. (B) Kontrolle Wildtyp, 36 Wochen.

Nach ausführlicher Kenntnis der wissenschaftlichen Wettbewerbssituation kamen wir, vor allem aufgrund der schon weit fortgeschrittenen Zeit, zum Entschluss den erarbeiteten Kenntnisstand nicht weiter für eigene Studien zu nutzen. Da sich im Zuge der AAV-HPLC-Analytik Hinweise auf die Natur des bisher unbekanntes und langgesuchten zellulären Rezeptors für Foamyviren ergeben haben, wurde beschlossen, die Studien zum foamyviralen Rezeptor zu vertiefen.

3.3 Foamyvirale Rezeptor-Studien

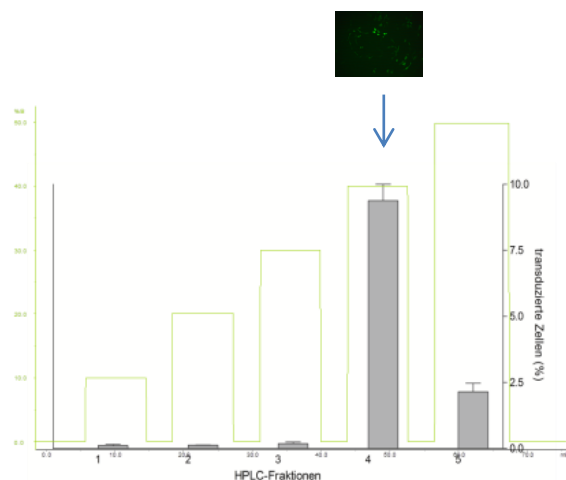
Bisher hat man herausgefunden, dass HS sowohl als primärer viraler Adhäsionsfaktor als auch beim Viruseintritt in die Wirtszelle eine Rolle spielen kann. Die virale Adhäsion zu HS, als erster Schritt des Infektionsprozesses (Spillmann 2001) ist zum Beispiel für einige Herpesviren, wie HSV (Spillmann 2001), Cytomegalovirus (CMV) (Compton *et al.* 1993) oder humane Herpesvirus 7 (HHV) (Secchiero *et al.* 1997) postuliert. Auch Dengue Virus (Chen *et al.* 1997), HIV (Ugolini *et al.* 1999), Adenovirus 2 und 5 (Dechechchi *et al.* 2000), AAV-2 (Summerford und Samulski 1998), Papillomaviren Typ 11,16, 23 (Joyce *et al.* 1999, Giroglou *et al.* 2001), Respiratorische Synzytial Virus (RSV) (Hallak *et al.* 2000) oder auch Maul- und Klauenseuche Virus (FMDV) (Sa-Carvalho *et al.* 1997) wird eine primäre Bindung an HS zugeschrieben. Für die meisten Herpesviren scheinen aber beim Eindringen in die Zelle andere zelluläre Mediatoren eine Rolle zu spielen (Spillmann *et al.* 2001). Jedoch scheint HS z. B. für Dengue Virus (Hung *et al.* 1999) und HIV (Ugolini *et al.* 1999, Saphire *et al.* 1999, Rider 1997) nicht nur als Adhäsionsmolekül zu dienen, sondern auch eine Rolle bei Viruseintritt in die Wirtszelle einzunehmen. Bezüglich HIV ist jedoch ist auch bekannt, dass der Eintritt nicht bei allen Wirtszellen HS abhängig ist (Spillmann 2001). Zudem ist in der Literatur z.B. bei Sindbisvirus (Byrnes und Griffin 1998), Vaccinia-Virus (Chung *et al.* 1998), Humane-Herpesvirus 8 (HHV8) (Akula *et al.* 2004) und Herpes simplex Virus 1 (O'Donnell und Shukla 2008) eine Funktion als Co-Rezeptor beschrieben.

Der zelluläre Rezeptor für Foamyviren (FV) ist bisher noch nicht identifiziert worden. Aufgrund des großen Wirtsspektrums und des breiten Zelltropismus der FV geht man davon aus, dass es sich dabei um ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenmolekül handelt (Hill *et al.* 1999, Mergia *et al.* 1996, Rethwilm 2007, Picard-Maureau *et al.* 2003). Ein weit verbreitetes Oberflächenmolekül ist das Glucosaminglycan (GAG) Heparansulfat (HS). Heparansulfat ist ein lineares Polymer, das sich aus sich wiederholenden Einheiten von 1->4 verknüpften Pyranosyluronsäuren (L-Iduronsäure und D-Glucuronsäure) und 2-Amino-2-deoxyglucopyranose (Glucosamin) (Linhardt und Capila 2002) zusammensetzt und mit Sulfatgruppen modifiziert ist. Bei den Uronsäuren handelt es sich um L-Iduronsäure (90%) und D-Glucuronsäure (10%). Da der Aufbau von Heparansulfat der Grundstruktur des Heparins entspricht, wird auch dieses GAG für Experimente herangezogen. Lediglich der erhöhte Iduronsäure-Anteil und die Anzahl der Sulfatgruppen unterscheiden diese Polymere voneinander. Bei beiden Polymeren wird eine große strukturelle Variabilität durch Modifikationen erzeugt. Für wissenschaftliche Experimente wird daher sehr häufig HE als geeignetes HS-Analogum herangezogen (Prydz und Dalen 2000). Da HS in der extrazellulären Matrix fast aller Zellen vorkommt, während HE nur in Mastzellen exprimiert

wird, kann zudem geschlussfolgert werden, dass FV an der Zelloberfläche an HS bindet und nicht an HE (Prydz und Dalen 2000).

3.3.1 Foamyviren binden an Heparin

Um zu untersuchen, ob foamyvirale Partikel direkt an GAGs binden, wurde das bereits erwähnte HPLC-UV-pH/C System mit POROS® 50HE eingesetzt. Da bekannt ist, dass HS eine wichtige Rolle beim Eintritt der AAV-Partikel in die Zelle spielt, wurde bei den FV-Partikeln entsprechend (siehe 3.2.3) vorgegangen. Die Partikel wurden zunächst im Vierplasmidsystem, wie im Methodenteil beschrieben, produziert. In die HPLC wurde anschließend 1 ml der Vektorsuspension injiziert. Als Fließmittel wurde 20mM Phosphatpuffer bzw. 20mM Phosphatpuffer mit NaCl verwendet. Die Fraktionen des HPLC-Laufs wurden gesammelt, die darin enthaltene Infektiösität mit Hilfe von Transduktionsversuchen auf HT1080-Zellen und anschließender fluoreszenzmikroskopischen Analyse überprüft und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mit Hilfe eines Stufengradienten wurde eine Elutions-Salzkonzentration von 500mM ermittelt (Abb. 3.28).



3.28: Eine Salzkonzentration von 500mM-NaCl wird zur Elution der FV-Partikel von einer POROS HE Säule benötigt. FV-Vektorsuspension (1ml) wurde in das HPLC-System injiziert. Mittels NaCl-Stufengradient (100, 200, 300, 400, 500mM) jeweils mit 5CV erfolgte die Elution der Partikel. Die Waschphasen zwischen den Elutionsstufen erfolgte bei 0mM NaCl, jeweils mit 2CV. Die Fraktionen der einzelnen Elutionsstufen wurden aufgefangen (9ml/Stufe). Anschließend wurde die Infektiösität der 10^{-1} Verdünnung der Stufen mittels Transduktionsexperimenten (n=3) auf HT1080 Zellen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht. Die Abbildung zeigt die fünf Elutionsstufen mit steigender Salzkonzentration (grüne Linien), die Mittelwerte (\pm SD) der jeweilige Transduktionsergebnisse (graue Balken) und eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Transduktionsexperimentes der 400mM NaCl Elutionsfraktion.

Dieses Resultat zeigt zum einen, dass foamyvirale Partikel an Heparin binden und zum anderen, dass die Bindungsstärke etwa derjenigen der AAV-Partikel entspricht (siehe Kapitel 3.2.3). Die geringe Transduktionseffizienz von nur 10% (Abb. 3.28) ist auf die erhebliche Verdünnung der Vektorsuspension zurückzuführen (eine Injektionsmenge von nur einem Milliliter resultiert hier schließlich in mindestens 9 ml). Erste chromatographische Versuche wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 3ml/min und mit einer Waschphase von 50mM Salzkonzentration und der ermittelten Elutionskonzentration durchgeführt (Abb. 3.29). Auch die in der Abbildung 3.29 erkennbare geringe Transduktionseffizienz der Hauptfraktion D13/D14 von ca. 30 % ist auf einen 2-3 fachen Verdünnungsschritt zurückzuführen. Zudem wurde hier Virussuspension verwendet, die zuvor bei -80°C gelagert wurde, und es ist bekannt, dass dies bei FV zu Infektiositätsverlust führt. Das Transduktionsexperiment der Fraktionen macht jedoch deutlich, dass die Fraktionen des Elutionspeaks im Gegensatz zu denen des Durchflusses (diese Information ist nicht dargestellt und wurde aus vergleichbaren Experimenten erhalten) und Waschphase sehr viele infektiöse Partikel enthielt.

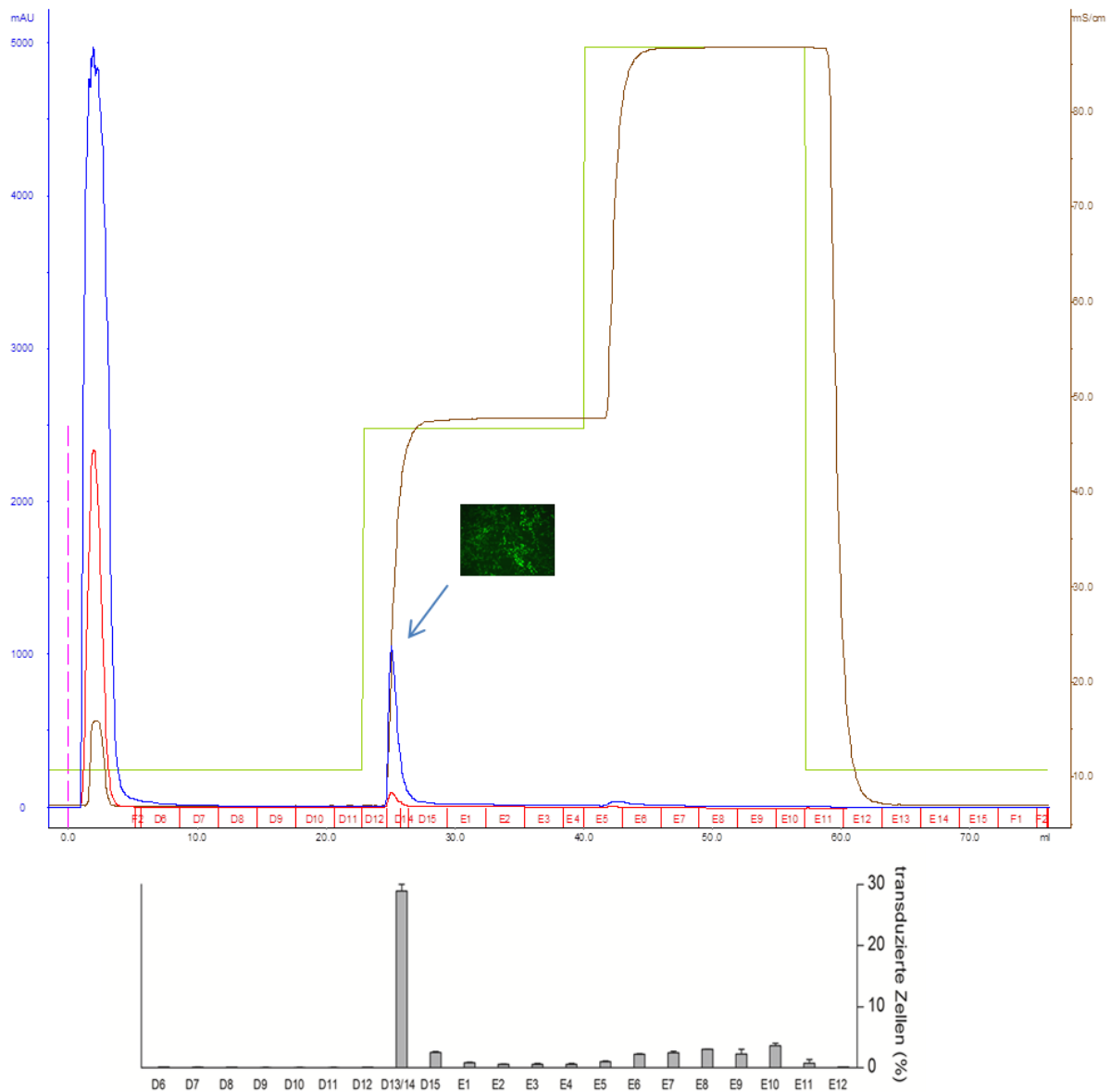


Abb. 3.29: FV-Vektoren binden an POROS HE-Säule. Eine FV-Vektorsuspension (1ml) wurde in das HPLC-System injiziert. Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Die Fraktionen (1ml oder 3ml) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiosität der 10^{-1} Verdünnung mittels Transduktionsexperimenten ($n=2$) auf HT1080 Zellen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht. **oben:** Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung der Vektoren über HPLC. HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 5% B. Elution: 50% B. Auswaschen:100% B. Reequilibrierung: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau). 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen D6-F1. Die mikroskopische Aufnahme zeigt repräsentativ den Infektiositätsnachweis der Hauptpeakfraktion D13/14. **unten:** Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der 10^{-1} Verdünnung der einzelnen Fraktionen (D6-E12).

Um mehr Informationen zu Transduktionsverlust und Reinheit der eluierten FV-Suspension zu erlangen, wurde die Injektionsmenge erhöht. Dies bedeutet eine stärkere Belastung der Säule. Um möglichst viele Störsubstanzen abzutrennen, wurde die Salzkonzentration der Aufgabe- und Waschphase erhöht (50mM versus 300mM), zudem wurde der Einfluss der Flussgeschwindigkeit (1ml/min versus 3ml/min versus 6 ml/min) auf die Transduktionseffizienz überprüft. Um die Auswirkungen des Analysenflusses zu untersuchen, wurde mit 10 ml Vektorsuspension gearbeitet. Repräsentativ ist das Chromatogramm der Analyse mit einem Fluss von 1ml/min in Abbildung 3.30 (oben) dargestellt. Dabei ist der im Vergleich zu Abbildung 3.29 vergrößerter Durchfluss-Peak auf die erhöhte Injektionsmenge zurückzuführen. Für die jeweilige Elutions-Hauptfraktion wurde ein EC_{50} -Wert von $1,93 \cdot 10^{-3}$ (1ml/min), $4,25 \cdot 10^{-3}$ (3ml/min) und $2,88 \cdot 10^{-3}$ (6ml/min) ermittelt. Der Vergleich der EC_{50} -Werte zeigt, dass zwar tendenziell die Fraktion der Analyse mit 1ml/min mehr infektiöse Partikel enthält, ein deutlicher signifikanter Unterschied konnte aber nicht festgestellt werden. Aufgrund der Vermutung, dass diese Tendenz bei weiterer Erhöhung der Vektorsuspensionsmenge deutlicher ausfällt, wurden weitere chromatographische Analysen mit einer Fließgeschwindigkeit von 1ml/min durchgeführt.

Da innerhalb dieses Experiments auch die Infektiösität der injizierten Vektorsuspension bestimmt wurde (EC_{50} -Wert: $2,28 \cdot 10^{-2}$) (Abb. 3.30), konnte zudem festgestellt werden, dass der chromatographische Schritt vermutlich nicht zu einem Verlust von infektiösen Partikel führt. Denn unter der Berücksichtigung, dass bei der Analyse ein Konzentrierungsschritt von max. Faktor 10 vorlag (10ml Injektionsmenge versus 1-4ml Elutionsmenge), sind die EC_{50} -Werte vor und nach der Säulenchromatographie miteinander vergleichbar.

Um die Reinheit der Elutionsfraktion mittels Western Blot überprüfen zu können, wurde bei der Untersuchung des Einflusses der Salzkonzentration während der Aufgabe- und Waschphase mit einer mittels UZ konzentrierter foamyviraler Vektorsuspension gearbeitet. Der EC_{50} -Wert der ursprünglichen foamyviralen Vektorsuspension betrug $1,14 \cdot 10^{-2}$ und der der mittels UZ um ca. Faktor 40 konzentrierten Suspension wurde zu $1,94 \cdot 10^{-3}$ bestimmt (nicht gezeigt). Dieser Konzentrierungsschritt bedeutet somit zu gleich eine Infektiösitätssteigerung um Faktor 10. Ein Milliliter dieser konzentrierten Suspension wurde für die chromatographische Analyse (Abb. 3.31 Chromatogramm A und B) eingesetzt. Die Abbildung 3.31 C zeigt, dass die Erhöhung der Salzkonzentration der Aufgabe- und Waschphase keinen deutlichen Einfluss auf die Infektiösität (EC_{50} -Wert: $3,61 \cdot 10^{-3}$ (A10) versus $2,64 \cdot 10^{-3}$ (A8)) der aufgereinigten FV-Partikel zur Folge hat.

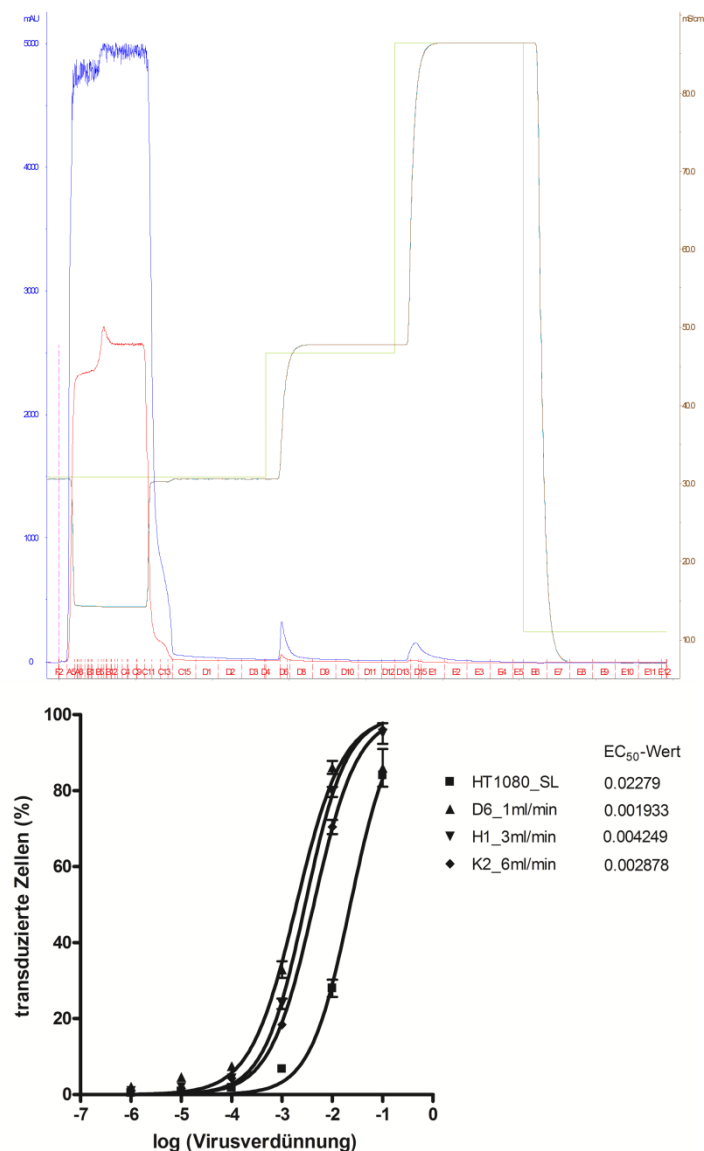


Abb. 3.30: Die Fließgeschwindigkeit der Aufreinigung mittels POROS HE Säulenchromatographie hat keinen Einfluss auf die foamyviralen Transduktions-effizienz. 10ml einer FV-Vektor-suspension wurden in das HPLC-System mit injiziert. Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Der Analysenfluss betrug 1, 3 oder 6 ml/min. Die Fraktionen (1ml oder 3ml) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiösität der jeweiligen Elutionsfraktion (1ml/min: D6, 3ml/min: H1, 6ml/min: K2) mittels Transduktions-experimenten (n=3) auf HT1080 Zellen und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. **oben:** Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung der Vektoren über HPLC (Fluss: 1ml/min). HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 30% B. Elution: 50% B. Auswaschen:100% B. Reequilibrierung: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau). 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen (rot). **unten:** In einer 96 Lochplatte wurden 10³ Zellen pro Vertiefung mit einer logarithmischen Verdünnungs-reihe der foamyviralen Vektor-suspension transduziert (Ansatz in Triplikaten). Nach mehreren Tagen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mittels FACS. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der Hauptfraktionen der chromatographischen Analysen im Vergleich zu der injizierten Vektorsuspension (SL). Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Anhand einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion wurde der EC₅₀-Wert bestimmt.

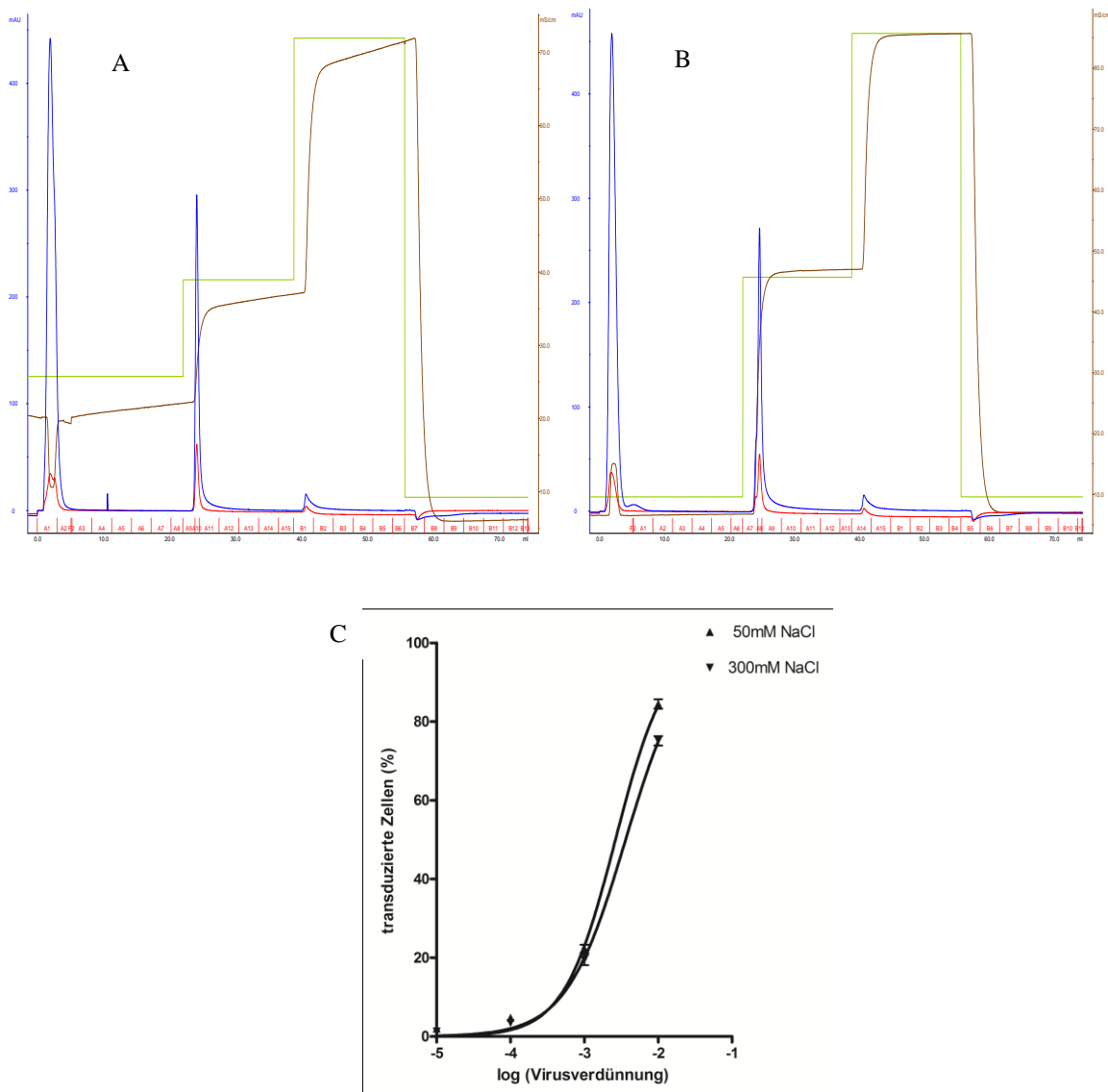


Abb. 3.31: Die Salzkonzentration der Waschphase bei der Aufreinigung mittels POROS HE Säulenchromatographie hat keinen Einfluss auf die foamyviralen Transduktionseffizienz.

1ml einer mittels UZ konzentrierten FV-Vektorsuspension wurde in das HPLC-System injiziert. NaCl-Konzentration der Waschphase: A: 50mM (▲) bzw. B: 300mM (▼). Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Die Fraktionen (3ml, außer A10 und A8 (1ml)) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiosität der Elutionsfraktion A: A10 und B: A8 mittels Transduktionsexperimenten auf HT1080 Zellen und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. **A und B:** Dargestellt sind die Chromatogramme der Aufreinigung der Vektoren über HPLC (Fluss: 1ml/min). HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 30% B (Abb. A) bzw. 5% B (Abb. B). Elution: 50% B. Auswaschen: 100% B. Reequilibrierung: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau). 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen (rot). **C:** In einer 96 Lochplatte wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe der foamyviralen Vektorsuspension transduziert (Ansatz in Triplikaten). Nach mehreren Tagen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der Fraktionen A10 (▼) und A8(▲) der chromatographischen Analyse. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Anhand einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion wurde der EC₅₀-Wert bestimmt.

Anschließend erfolgte der Nachweis der foamyviralen Partikel mittels Western Blot (Abb. 3.32 oben) und die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen mittels Coumassiegel (nicht gezeigt) und Silbergel (Abb. 3.32 unten). Hierzu wurde von beiden chromatographischen Analysen jeweils eine Fraktion des Durchflusses (Abb. 3.31 A: A1 und B: FT), zwei Fraktionen der Waschphase (Abb. 3.31 A: A3 sowie A9 und B: A3 sowie A7), die Haupt-Elutionsfraktion (Abb. 3.31 A: A10 und B: A8) und eine Fraktion der Auswaschphase (Abb. 3.31 A: B1 und B: A14) aufgetragen. Anhand der charakteristischen Gag-Doppelbande (Abb. 3.32 oben) konnten foamyvirale Partikel sowohl in der zur HPLC-Analyse eingesetzten Suspension (UZ) als auch in der jeweiligen Elutionsfraktion (Abb.: 3.31 A: A10 bzw. B: A8) nachgewiesen werden (Abb. 3.32). In den anderen getesteten Fraktionen konnten keine Partikel detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt somit die Transduktionsresultate (Abb. 3.31). Die ursprüngliche Vektorsuspension (SL: ohne UZ und HPLC Behandlung) weist vermutlich aufgrund der geringen Partikelanzahl und Sensivität der Analyse keine Gag-Band auf. Somit gehen diese Ergebnisse einher mit den Transduktionsresultaten (Abb. 3.31 C).

Das Silbergel (Abb. 3.32 unten) weist Proteinbanden in der ursprünglichen Vektorsuspension (SL), in der für die HPLC eingesetzten Suspension (UZ) und in der Durchflussfraktion A1 (Abb. 3.31 A) auf. In den anderen Fraktionen ist kein Protein nachweisbar. Es ist zu erkennen, dass durch die Aufreinigung mittels UZ bereits eine große Proteinmenge abgetrennt wurde. Da auch im Durchfluss der HPLC-Analyse Protein nachgewiesen wurde, ist festzustellen, dass die Suspension durch die chromatographische Analyse weiter aufgereinigt wurde. Aufgrund der schwächeren Proteinbande in der A1-Fraktion scheint nicht alles Protein abgetrennt worden zu sein; allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Fraktion A1 letztlich eine Verdünnung der UZ-Vektorsuspension darstellt, denn der Durchfluss-Peak erstreckt sich über ein Volumen von 3-6 ml.

Da die Durchflussfraktion der Analyse mit einer Waschphase von 50mM (FT) keine Proteinbande aufweist, ist zu anzunehmen, dass diese Salzkonzentration zur Aufreinigung vermutlich nicht ausreicht. Da in der Auswaschphase A14 auch keine Proteinbande nachweisbar war, ist zudem wahrscheinlich, dass proteinogene Verunreinigungen schleichend während der Analyse entfernt bzw. co-eluiert wurden.

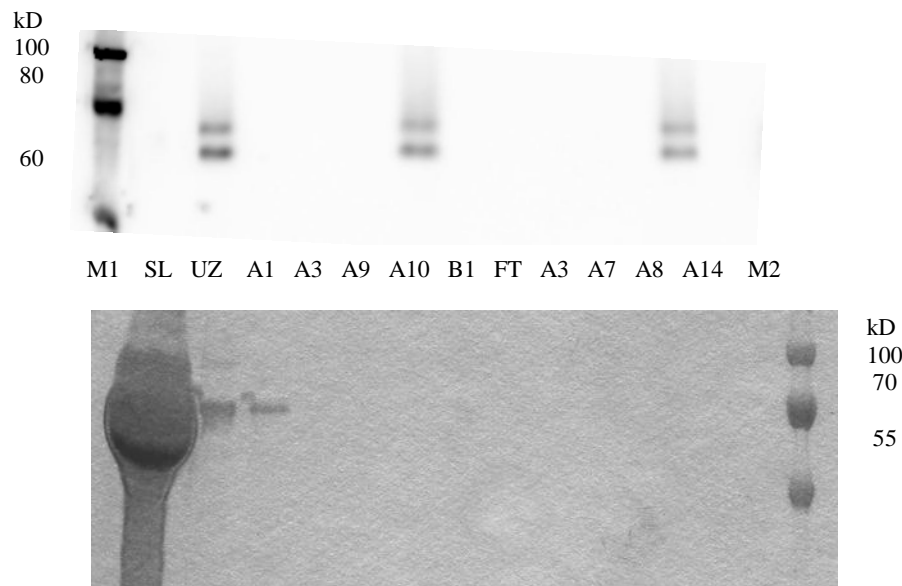


Abb. 3.32: Foamyviren lassen sich durch Heparansulfat-HPLC aufreinigen. Dargestellt sind die zur Aufreinigung eingesetzte Vektorsuspension (UZ: 40-fach konzentrierte SL: Abb. 3.31) und die HPLC-Fractionen nach Bindung der Foamyvektoren an einer POROS HE Säule. A1-B1: Abb.3.31 Chromatogramm A. FT-A14: Abb.3.31 Chromatogramm B. Probenmenge (absolut): 11 μ l pro Bahn.

oben: Western Blot mittels anti-Gag-Antikörper; Belichtungszeit: 420 sec; M1: Biotin-Marker.

unten: Silbergel, M2: Proteinmarker

Um die Infektiösität der Einzelfractionen unter den neu ermittelten chromatographischen Bedingungen (Fluss: 1ml/min, Waschphase: 300mM NaCl) bei größerer Injektionsmenge zu untersuchen, wurde erneut eine chromatographische Analyse durchgeführt (Abb. 3.33). Wie zuvor wurde ein Milliliter einer mittels UZ um Faktor 40 konzentrierten Vektorsuspension auf die Säule gegeben; die Fractionen wurden aufgefangen und die Transduktionseffizienz der 10⁻¹ Verdünnung getestet (Abb. 3.33 unten). Zudem wurde der EC₅₀-Wert der Vektorsuspension vor der UZ, nach der UZ und der Suspension des Elutionsfraction B13 ermittelt (Abb. 3.34). Die Abbildung 3.33 zeigt, dass sowohl in der Durchflussphase, als auch in der Waschphase so gut wie keine infektiösen Partikel nachweisbar waren. Die Einzelfractionen des Elutionspeaks wiesen den erwarteten ionenchromatographischen Verlauf auf. Sowohl die 10⁻¹ Verdünnung der Fraction B13 als auch B14 waren so hochkonzentriert, dass Zelltod hervorgerufen wurde. Da dies bei der Suspension vor der HPLC auch der Fall war, ist ein Einfluss der Salzkonzentration dabei eher unwahrscheinlich. Aus Abbildung 3.34 geht hervor, dass bereits ab der 10⁻² - Verdünnung der Sättigungsbereich eintritt. Daher wurden die Balken der beiden Fractionen in der Abbildung auf 100 % gesetzt, obwohl keine Transduktionseffizienz festgestellt

werden konnte. Zur Verdeutlichung wurden ebenfalls die Fluoreszenzaufnahmen der 10^{-1} Verdünnungen des Transduktionsexperimentes einiger Fraktionen dargestellt. Weiterhin fällt auf, dass die Fraktion B12 auch infektiöse Partikel enthält. Da es sich hierbei eigentlich um die Fraktion direkt vor dem Elutionspeak handelt, dürfte keine Infektiösität zu beobachten sein. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass doch ein kleiner Teil des Elutionspeaks in diese Fraktion gelangt ist. Um dies zu vermeiden, wurden bei den anschließenden Analysen die Einstellungen der automatischen Fraktionssammlung verifiziert, so dass bei Beginn des Peaks eine neue Fraktion beginnt.

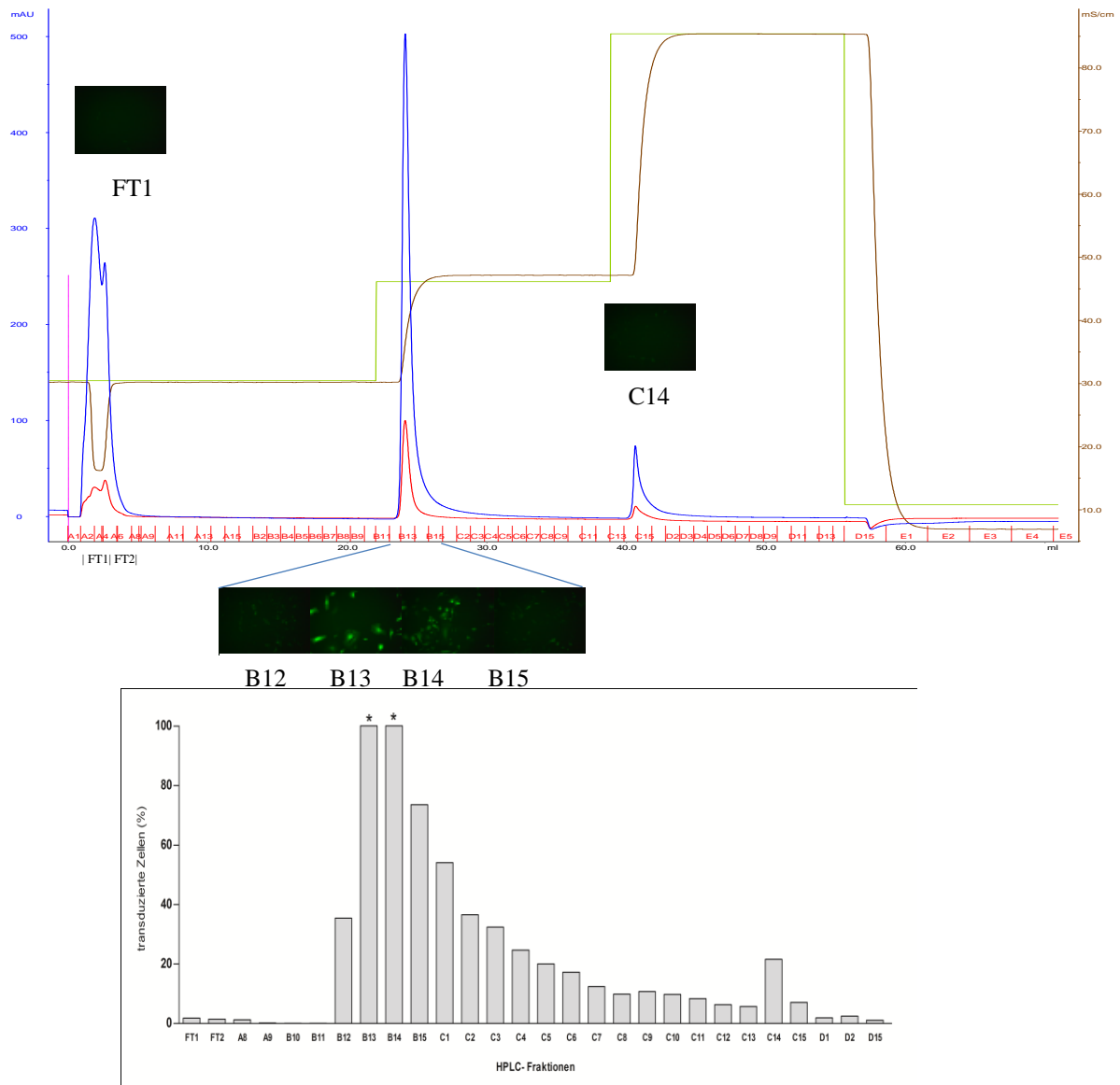


Abb. 3.33: FV-Vektoren binden an POROS HE-Säule. Eine FV-Vektorsuspension (1ml) wurde in das HPLC-System injiziert. Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Die Fraktionen (1ml oder 3ml) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiosität der 10^{-1} Verdünnung mittels Transduktionsexperimenten ($n=1$; 72 h) auf HT1080 Zellen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie (die mikroskopische Aufnahmen zeigen die Infektiosität der Fraktionen FT1, B12-15 und C14) und Durchflusszytometrie untersucht. **oben:** Dargestellt ist das Chromatogramm der Aufreinigung der Vektoren über HPLC. HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 30% B. Elution: 50% B. Auswaschen: 100% B. Reequilibrierung: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau). 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen A1-E4 (1ml), FT1 und FT2 (2,5ml). **unten:** Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der 10^{-1} Verdünnung der einzelnen Fraktionen (FT1, FT2 und A8-D2 und D15). (*) Die 10^{-1} Verdünnung der Fraktionen B13 und B14 war zu hoch konzentriert, so dass Zelltod hervorgerufen wurde. Daher wurde hier ein Transduktionsergebnis von 100 % angegeben.

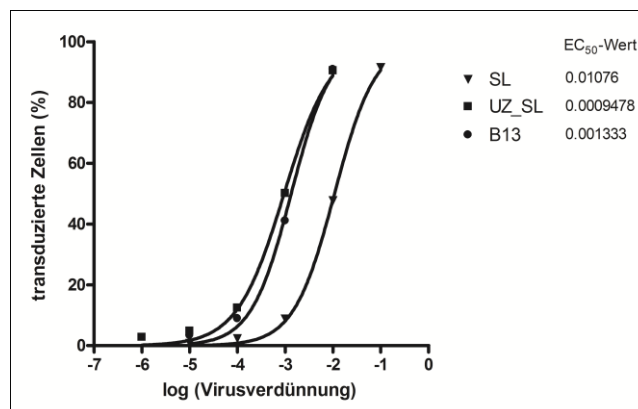


Abb. 3.34: Transduktionseffizienz foamyviraler Vektoren auf HT1080 Zellen. In einer 96 Lochplatte wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe der foamyviralen Vektorsuspension transduziert (Ansatz in Triplikaten). Nach 72 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie. HPLC-Bedingungen: Abb. 3.33. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der zur UZ-Konzentrierung eingesetzten Suspension (SL), die zur HPLC eingesetzten Suspension (UZ) und die Fraktion B13 der chromatographischen Analyse (in Abb. 3.33). Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Anhand einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion wurde der EC₅₀-Wert bestimmt.

Durch Konzentrierung der Vektorsuspension mittels UZ um den Faktor 40 wurde der EC₅₀-Wert um Faktor 10 reduziert (Abbildung 3.33 und 3.34). Der Vergleich der Transduktionseffizienz zwischen der injizierten Virussuspension und der Peak-Fraktion zeigte lediglich einen minimalen Infektionsverlust (Abbildung 3.34). Der EC₅₀-Wert von $9,48 \cdot 10^{-4}$ der injizierten Suspension erhöhte sich geringfügig auf $1,33 \cdot 10^{-3}$. Dieser minimale Verlust der Infektiosität ist vermutlich darin begründet, dass sich die Partikel ionenchromatographisch bedingt auf ein größeres Volumen verteilen: 1ml Injektionsvolumen resultieren in einer Elutionspeak-Fraktion von ca. 4ml. Somit scheint kein wirklicher Verlust an infektiösen Partikeln vorzuliegen. Dieses bedeutet gleichzeitig, dass die Partikel durch 500mM NaCl (Konzentration des Elutionspuffers) nicht geschädigt werden. Somit konnten die unter Abbildung 3.31 dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Zudem ließ sich bei Erhöhung der Salzkonzentration auf 1M NaCl auch trotz erhöhter Injektionsmenge nur eine geringe Infektiosität der entsprechenden Fraktion (C14) feststellen. Auch dies deutet darauf hin, dass die infektiösen Partikel bei der Elution fast vollständig erfasst wurden.

Um herauszufinden, ob diese Methode zur Aufreinigung und Konzentrierung foamyviraler Partikel eine vielversprechende Alternative zur UZ-Reinigung darstellt, wurde zudem ermittelt, ob die Kapazität und Belastbarkeit der Säule ausreicht, um größere Mengen an Vektorsuspension ohne Infektionsverlust zu konzentrieren. Hierzu wurden 200 ml

Vektorsuspension in 10 ml Schritten auf die HE-Säule gegeben. Um möglichst viele Störsubstanzen bereits zu Beginn zu entfernen, wurde unter den zuvor ermittelten Bedingungen gearbeitet. Die Abbildung 3.35 (oben) zeigt einen Ausschnitt des Chromatogramms. Die Transduktionsergebnisse der eingesetzten Vektorsuspension und der Elutionsfraktion L3 sind in Abbildung 3.35 (unten) dargestellt.

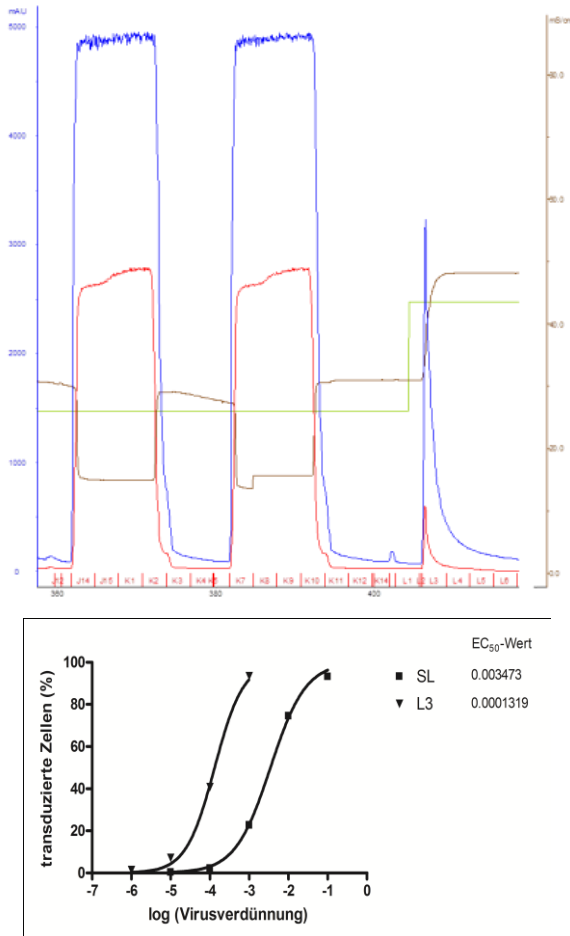


Abb. 3.35: Konzentrierung der foamyviralen Vektorsuspension mittels POROS HE Säulenchromatographie.

200ml einer FV-Vektorsuspension wurden in 10 ml Schritten in das HPLC-System injiziert. Mittels einer NaCl-Konzentration von 500mM erfolgte die Elution der Partikel. Der Analysenfluss betrug 1ml/min. Die Fraktionen (3ml) wurden aufgefangen. Anschließend wurde die Infektiosität der Elutionsfraktion L3 mittels Transduktionsexperiment (n=3) auf HT1080 Zellen und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. **oben:** Dargestellt ist das Chromatogramm der Aufreinigung der Vektoren über HPLC. HPLC-Programm: Puffer A: 20mM Phosphatpuffer. Puffer B: 20mM Phosphatpuffer mit 1mM NaCl. Aufgabe und Waschen: 30% B. Elution: 50% B. Auswaschen: 100% B. Reequilibration: 5% B (grün). Detektor: 220 nm (blau), 280 nm (rot). LF (braun). Fraktionen (rot), **unten:** In einer 96 Lochplatte wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe der foamyviralen Vektorsuspension transduziert (Ansatz in Triplikaten). Nach mehreren Tagen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mittels FACS. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der Hauptfraktionen der chromatographischen Analyse L3 im Vergleich zu der injizierten Vektorsuspension (SL). Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Anhand einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion wurde der EC₅₀-Wert bestimmt.

Da 200 ml Suspension injiziert wurden und das Volumen der Fraktion L3 3ml betrug, ergibt sich rechnerisch ein Konzentrierungsfaktor von 66. Es resultierte für die eingesetzte Vektorsuspension ein EC₅₀-Wert von $3,473 \cdot 10^{-3}$ und für die L3-Fraktion ein EC₅₀-Wert von $1,319 \cdot 10^{-4}$. Der Vergleich der ermittelten EC₅₀-Werte zeigt, dass die Infektiosität um Faktor 26 gesteigert werden konnte. Dies ist in etwa vergleichbar mit den von uns

produzierten UZ-aufgereinigten Suspensionen, wobei eine Aufkonzentrierung um Faktor 40 eine Steigerung der Infektiösität um Faktor 10 mit sich brachte. Bei der chromatographischen Analyse darf nicht außer Acht gelassen werden, dass sich auch in den anderen Peakfraktion des Elutionspeaks infektiöse Partikel befinden. So zeigte z.B. die Fraktion L4 die gleiche Infektiösität wie die eingesetzte Vektorsuspension (Daten nicht gezeigt). Wie in den Experimenten zuvor scheint auch hier kein merklicher Verlust an Partikeln vorzuliegen. Um dies sicher festzustellen, könnten die einzelnen Fraktionen auf Infektiösität getestet werden. Dieses Experiment sowie die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen die aufgeführten Resultaten, dass foamyvirale Partikel an der Heparin-Säule binden und dass es zur Lösung dieser Bindung einer hohen Salzkonzentration bedarf. Diese Konzentration ist vergleichbar bzw. liegt sogar etwas über derjenigen, die auch zur Elution der AAV-Partikel unter ähnlichen Bedingungen nötig ist (Gao *et al.* 2000). Da bekannt ist, dass AAV-Partikel aufgrund ihrer Struktur eine hohe Affinität zu Heparin bzw. HS besitzen und diese Wechselwirkung zudem eine Rolle bei der Infektion der Wirtszelle spielt (Gao *et al.* 2000, Dechechi *et al.* 2001, Kern *et al.* 2003), liegt die Vermutung nahe, dass die Bindungsstärke der foamyviralen Partikel mit der der AAV-Partikel vergleichbar ist und ebenfalls eine Funktion von HE/HS bei der foamyviralen Anbindung und Infektion der Wirtszelle vorliegt.

Die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle wird durch die Bindung der viralen Hüllproteine an Zelloberflächenmoleküle initiiert (Dimitrov 2004). Bisher ist bekannt, dass FV, nachdem sie an den Rezeptor gebunden haben, über eine pH-abhängige Endozytose mit der zellulären Membran fusionieren (Picard-Maureau *et al.* 2003). Bisher konnte auf viraler Seite die Rezeptorbindedomäne auf die Env-SU Region eingeschränkt werden (Berg *et al.* 2003). Die möglichen Env-Binderegionen konnten über eine Rezeptorbindestudie über Immunadhäsion mittels verschiedenen Deletionen des rekombinanten PFV-Env weiter eingeschränkt werden (Duda *et al.* 2006). Eine weitere Möglichkeit, eine strukturelle Basis der HS-Env Interaktion herauszufinden, bietet die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Yu *et al.* 2005, Birkmann *et al.* 2001). Mit Hilfe dieser Methode wurden von Crublet und Mitarbeiter 2008 vier HS-Bindemotive des HIV-1 Hüllglycoprotein gp120 identifiziert. Weiterhin wäre es mit dieser Methode möglich, die Stärke der Bindung zwischen Virus und Heparin zu bestimmen. Eine Alternative hierzu wäre die Bestimmung der K_d über Scatchard-Analysen mit Tritium-markiertem Heparin. 1998 wurde von Harrop und Rider über Scatchard-Experimente eine K_d für die Interaktion zwischen rgp120 (*engl.* recombinant envelope glycoprotein von HIV-1) und Heparin von 10nM ermittelt. Da Heparin *in vitro* auch einen effektiven HIV-1 Replikationsinhibitor mit

einem EC₅₀-Wert von 1-5 µg/ml darstellt (Harrop und Rider 1998, Baba *et al.* 1988), wird eine Bindungsstärke zwischen FV bzw. FV Env und Heparin von mindestens der Interaktionsstärke des rgp120 zu Heparin erwartet.

Auf Proteinebene wurden bisher mehrere HE /HS Bindedomänen identifiziert (Spillmann *et al.* 2001). Allgemein zeigten Bindedomänen der Peptide große Affinität zu HS/HE, wenn mehrere basische AS (besonders Arginin und Lysin, aber kein Histidin) und auch polare AS wie Serin oder Asparagin und Glutamin, welche Wasserstoffbrücken ausbilden können, vorhanden waren (Capila und Linhardt 2002, Caldwell *et al.* 1996). Dabei resultiert die feste Bindung zwischen Arginin und HS/HE aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Guanidinogruppe des Arginins und der Sulfatgruppe des Heparins (Fromm *et al.* 1995, Liu und Thorop *et al.* 2002).

Anhand mehrere Heparin-bindender Proteine konnten die Bindemotive XBBXB und XBBBXXB (B=basische Aminosäure, X=hydrophobischer Rest) identifiziert werden (Cardin und Weintraub 1989, Kern *et al.* 2003). Während ähnliche Motive bei Adenoviren festgestellt wurden, liegt eine derartige Sequenz innerhalb der Env-SU Region der FV, welche als Binderegion identifiziert wurde (Herchenroder *et al.* 1999, Duda *et al.* 2006), nicht vor (laborinterne Überprüfung). Es gibt Hinweise darauf, dass das FV Env Glycoprotein, wie auch das HIV gp120, eine komplexe Trimerstruktur einnimmt (Wilk *et al.* 2000, Harrop und Rider 1998). Für das Dengue Virus ist ebenfalls ein Trimerstruktur einnehmendes Glycoprotein E zur Bindung an die Wirtszelle bekannt (Spillmann *et al.* 2001). Zwei potentielle HS/HE-Bindedomänen mit erhöhter Anzahl an basischen Aminosäuren konnten bei diesem Hüllprotein ermittelt werden (Spillmann *et al.* 2001, Chen *et al.* 1997). Eine andere Möglichkeit mit HS zu interagieren liegt bei dem Picornavirus FMDV vor. Der O-Typ dieses Virus besitzt drei Kapsidproteine (VP1, VP2 und VP3), welche eine vergrößerte Oberfläche bilden und mit hochsulfatierten Bereichen des Heparins interagieren (Fry *et al.* 1999).

Derzeit überprüft man innerhalb der Arbeitsgruppe, ob die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin oder Histidin zu einer RBD gehören, indem mit foamyviralen Vektoren Transduktionsversuche nach Austausch der basischen AS gegen Alanin durch PCR/*in vivo* Rekombinationmutagenese, durchgeführt werden.

Die Chromatographie Versuche liefern zwar erste Hinweise zur Heparin-Bindekapazität jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die genaue Heparinstruktur des verwendeten Säulenmaterials nicht bekannt ist und physiologisch dennoch das weniger sulfatierte HS-Ketten relevanter ist (Spillmann *et al.* 2001, Lindahl *et al.* 1994). Da bei physiologischem pH-Wert die Sulfat- und Carboxylgruppen des Heparinmoleküls dissoziiert vorliegen, kann aber auch eine rein ionische Bindung nicht ausgeschlossen

werden, zumal noch wenig strukturelle Informationen über FV-Env-Untereinheiten vorliegen (Duda *et al.* 2006).

Weiterhin kann aus den bisherigen Ergebnissen geschlossen werden, dass foamyvirale Vektorsuspensionen über eine HE-Säule aufgereinigt werden können. Die Möglichkeit der Aufreinigung von sowohl Protein, als auch von Virussuspensionen über eine Heparin-Affinitätschromatographie ist bekannt. Für Retroviren wurde diese Variante als Alternative zur Ultrazentrifugation das erste Mal 2004 von Segura und Mitarbeitern beschrieben. In dieser Abhandlung wurde mit einem von MoMLV (*engl.* moloney murine leukemia virus) abgeleiteten Vektor gearbeitet. Mittels Heparin-Säule konnte eine Konzentrierung um Faktor 60 erreicht werden. Dies ist vergleichbar mit dem in Abbildung 3.35 dargestellten Experiment. Während in der vorliegenden Arbeit kein merklicher Verlust an Infektiosität und damit vermutlich infektiöser Partikel festgestellt werden konnte, waren in der Arbeit von Segura nach dieser Aufreinigung mittels einer Elutionsalkonzentration von 350mM nur noch 61 % intakte Vektorpartikel vorhanden. Durch vorherige Diafiltration und anschließende Größenausschlusschromatographie wurde hier ein Konzentrierungsfaktor von 2000 erreicht (allerdings einhergehend mit einem Verlust von 62 % intakter Partikel). Für foamyvirale Vektoren, die eine Besonderheit unter den Retroviren darstellen, wurde diese Möglichkeit das erste Mal im Verlauf unserer Arbeit angewendet. Es wurde in kleinem Maßstab gezeigt, dass dies auch für foamyvirale Vektoren eine vielversprechende Möglichkeit der Aufreinigung und Konzentration darstellt.

3.3.2 HS/CS-Codefiziente Zellen (pgsA-745) lassen sich nur schlecht mit FV infizieren

Um die Rolle von HS als möglicher zellulärer Rezeptor für Foamyviren zu untersuchen, wurde die Transduktionseffizienz auf zwei miteinander verwandten Zelllinien bestimmt, die sich in ihrem Gehalt an HS unterscheiden: CHO-K1 Zellen (Wildtyp), die HS und CS exprimieren und pgsA-745 Zellen (CRL-2242), die HS und CS defizient sind.

Mittels extrazellulärer Färbung gegen Heparansulfat konnte die Abwesenheit von HS auf der Oberfläche von CRL nachgewiesen werden (Abb. 3.36).

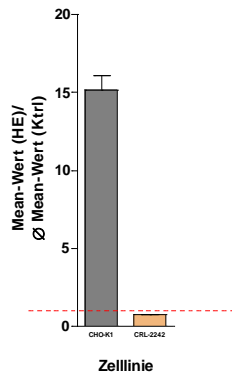


Abb. 3.36: Nachweis von Heparansulfat an der Zelloberfläche. Um Heparansulfat an der Zelloberfläche nachzuweisen, erfolgte eine extrazelluläre Färbung ($n=4$) auf Heparansulfat mittels einem monoklonalem Anti-HS Primärantikörper und einem Sekundärantikörper (PE Ratte Anti Maus IgM). Als Kontrollantikörper wurde Maus IgM, k Isotyp Control eingesetzt. Nach der FACS-Messung, erfolgte die Auswertung anhand der Mean-Werte. Dargestellt ist der Quotient der Mean-Werte der Messung und der Mittelwert der Meanwerte des entsprechenden Kontrollansatzes. Ein Quotient von 1 bedeutet daher, dass kein Heparansulfat nachgewiesen werden konnte (rote Linie).

Zunächst wurden Vorversuche getätigt, wobei anzumerken ist, dass bei Transduktionsexperimenten immer Aliquots derselben Vektorpräparation verwendet wurden:

Ein Transduktionsversuch der CHO-K1 und CRL-2242 Zellen mit unterschiedlichen Zellzahlen ($10^3 - 2 \cdot 10^4$ in 96 LP) ergab, dass auch bei diesen Zellen eine Anzahl von 10^3 Zellen am geeignetsten war (Daten nicht gezeigt).

Um Transduktionsunterschiede aufgrund von verschiedenem Wachstumsverhalten auszuschließen, wurde zunächst das Zellwachstum beider Zelllinien eine Woche lang kontrolliert, indem täglich die Zellzahl mittels relativer quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Nach sieben Tagen wurde die maximale Zellanzahl, die in der gewählten Vertiefung möglich ist, erreicht. Danach starben die Zellen, was durch den Abfall ab Tag acht deutlich wird. Beide Zelllinien zeigten die gleiche Wachstumskinetik (Abb. 3.37).

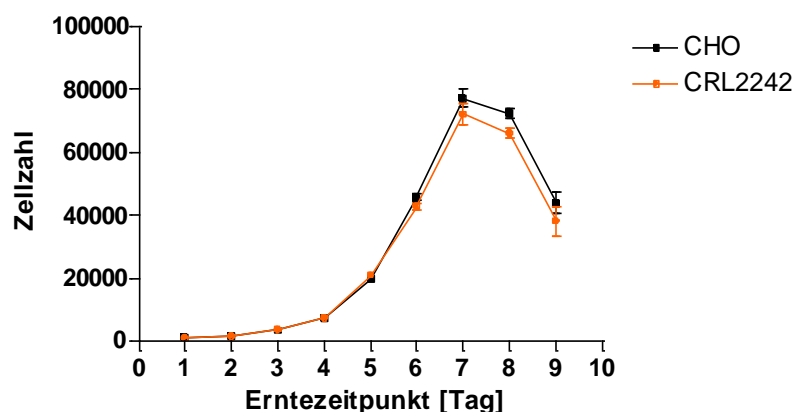


Abb. 3.37: Zellwachstum der Wildtyp-Zellen (CHO-K1) und der Mutante (CRL-2242). Am Tag 1 wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung in einer 96 Lochplatte ausgesät. In einem Zeitintervall von 24 Stunden wurde die Zellzahl pro Vertiefung ($n=4$, außer Tag 1: $n=2$) mittels FACS bestimmt.

Um einen möglichen Einfluss des Erntezeitpunktes auf die Vergleichbarkeit der Transduktionsraten auszuschließen, erfolgte mit beiden Zelllinien ein Transduktionsversuch.

Hierzu wurden 1000 Zellen pro Vertiefung mit foamyviraler Vektorsuspension für zwei Stunden inkubiert, anschließend wurde mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. In einem Zeitintervall von jeweils 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der transduzierten Zellen mittels FACS (Abb. 3.38).

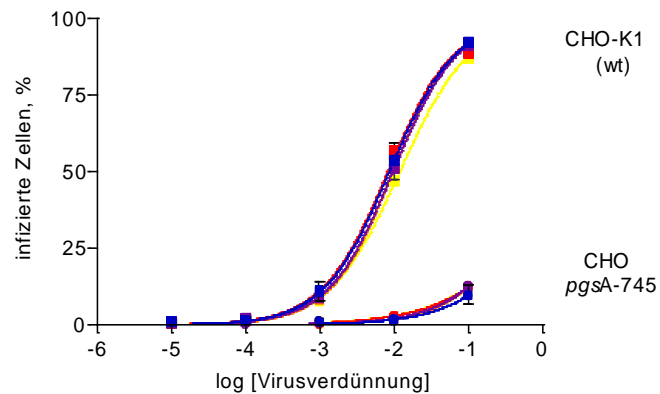


Abb. 3.38: Der Erntezeitpunkt hat keinen Einfluss auf das Transduktionsergebnis. Nach der 2-stündigen Transduktion von CHO-K1 Zellen und der Mutante CRL-2242 (10^3 Zellen/Vertiefung) mit foamyviralem Vektorsuspensionen (Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6}) erfolgte die Bestimmung der EC_{50} -Werte mittels FACS nach 3 Tagen (gelb), nach 5 Tagen (orange), nach 7 Tagen (rot), nach 9 Tagen (violett) und 11 Tagen (blau).

Wie in Abb. 3.38 gezeigt ist, hatte der Erntezeitpunkt keinen Einfluss auf die Transduktionsrate der Zelllinien. Man erkennt jedoch deutlich, dass die Mutante wie erwartet schlechter transduzierbar war als der Wildtyp. 72 Stunden nach Transduktion wurde für den Wildtyp ein EC_{50} -Wert von $1,19 \cdot 10^{-2}$ und für die Mutante von $2,00$ berechnet. Um den deutlichen Transduktionsunterschied besser darstellen zu können, erfolgte ein zweiter Transduktionstest. Um höhere Transduktionsraten zu erreichen, wurden diesmal eine logarithmische Verdünnungsreihe einer mittels UZ konzentrierten Vektorsuspension eingesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Transduktionszeiten getestet.

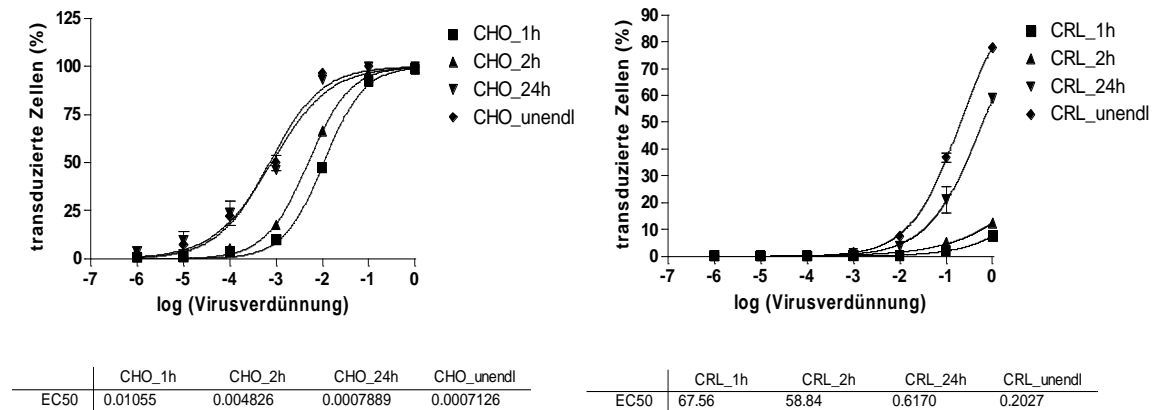


Abb. 3.39: Transduktionsexperimente mit foamyviralen Vektoren (n=3). 10^3 Zellen pro Vertiefung wurden in einer 96 Lochplatte mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe eines foamyviralen Vektorsuspension transduziert. Transduktionsdauer lag bei 1, 2 und 24 Stunden. Nach einem Waschschrift erfolgte nach mehrere Tagen Inkubation bei 37 °C die Bestimmung der transduzierten Zellen mittels FACS. In einem Experiment wurde die Virussuspension von den Zellen nicht entfernt (Transduktionsdauer: unendlich). Dargestellt ist die nichtlineare Regressionsanalyse nach best möglichem Algorithmus.

Die Darstellungen in Abbildungen 3.39 zeigen, dass, wie erwartet, mit Erhöhung der Transduktionsdauer die Transduktionseffizienz steigt. Im Falle der Wildtyp-Zellen trat in allen Experimenten eine Sättigung der Transduktion im Bereich von unverdünnten und teilweise der 10^{-1} Verdünnung ein. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich bei den CHO-K1 Zellen die Transduktionsrate einer 24-stündigen Transduktion nur minimal von der ohne Entfernung des Virus unterschied. Der Vergleich der EC_{50} -Werte beweist, dass die Transduktionsfähigkeit zwischen den Zeitpunkten um den Faktor 2,2 und 6,1 und 1,1 steigt. Vor allem bei der Mutante wird die Abhängigkeit der Transduktionsrate von der Dauer ersichtlich. Nach 1 bzw. 2 Stunden wurden lediglich ca. 7 bzw. 12% der CRL-2242 Zellen transduziert. Allerdings konnte nach 24 Stunden mit einer unverdünnten Virussuspension über 58,7% infiziert werden und bei Nichtentfernen des Virus sogar durchschnittlich 77,8%. Der Vergleich der EC_{50} -Werte beweist, dass die Transduktionsfähigkeit zwischen den Zeitpunkten um Faktor 1,2 und 95,4 und 3 steigt.

Wie zuvor zeigte sich, dass die Mutante deutlich schlechter transduzierbar war. Da aufgrund der niedrigen Transduktionsraten unterhalb von 50% keine EC_{50} bestimmt werden konnte, wurde zum Vergleich der Transduktionsraten ein Infektiositätsfaktor bestimmt. Der reziproke Wert dieses Faktors stellt die Virusverdünnung dar, mit der CHO-K1 Zellen transduziert werden müsste, um bei gleicher Transduktionsdauer die gleiche Transduktionseffizienz zu erreichen wie die unverdünnte Virussuspension bei der Mutante

(maximale Transduktionswert). Wie aufgrund von Abbildung 3.39 erwartet, verringerte sich der Transduktionsunterschied mit der Länge der Transduktionsdauer. Die Transduktionseffizienz der CRL-2242 Zellen war bei einstündiger bzw. zweistündiger Transduktionsdauer um Faktor 1587 bzw. 1202 schlechter. Bei längerer Transduktionsdauer war die mutante Zelllinie um Faktor 763 bzw. 278 schlechter transduzierbar als der Wildtyp. Die Resultate dieser Methode der Faktorbestimmung konnte durch den Vergleich der EC_{50} -Werte der 24 stündigen und fortlaufenden Transduktionsdauer (bei letzterer wurde der Vektorüberstand nicht gewaschen) bestätigt werden. Hierbei ergaben sich die Faktoren 782 und 284.

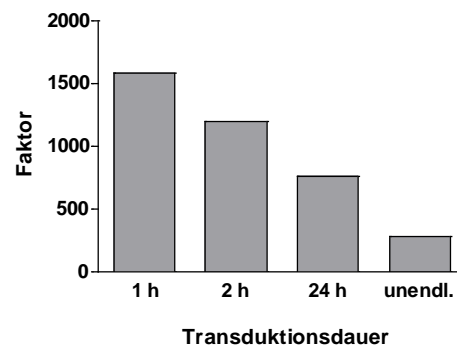


Abb. 3.40: Vergleich der Infektiosität foamyviraler Partikel. Dargestellt ist der Faktor um welchen sich die CRL-2242 Zellen im Vergleich zu CHO-K1 Zellen schlechter transduzieren lassen in Abhängigkeit der Transduktionsdauer. Der reziproke Wert dieses Faktors stellt die Virusverdünnung dar, mit der CHO-K1 Zellen transduziert werden müsste, um bei gleicher Transduktionsdauer die gleiche Transduktionseffizienz zu erreichen wie die unverdünnte Virussuspension bei der Mutante (maximale Transduktionswert)

Dass die Zelllinie, die kein HS exprimiert, im Vergleich zu ihrer Wildtyp-Zelllinie deutlich weniger transduzierbar ist, weist auf eine Rolle von HS als Rezeptor hin. Die Tatsache, dass diese HS-defiziente Zelllinie aber dennoch transduzierbar war, lässt vermuten, dass weitere bisher unidentifizierte zelluläre Oberflächenmoleküle an der Virusbindung und folglich am Viruseintritt in die Zelle beteiligt sind. Die Feststellung, dass die Transduktionseffizienz mit der Transduktionsdauer steigt, ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein anderer Moleküle mit Rezeptorfunktion für FV.

Der Transduktionsunterschied zwischen diesen beiden Zelllinien wurde aber auch für andere Viren, wie z.B. AAV (Summerford und Samulski 1997) und PCV2 (Misinzio *et al.* 2006) nachgewiesen. Auch in diesen Arbeiten konnte eine geringe Infektion der GAG-defizienten Zelllinie CRL-2242 nach 1-stündiger Inkubation nachgewiesen werden. Trotzdem wurde festgestellt, dass HS als AAV-Rezeptor fungiert (Summerford und Samulski 1997). Dies ist somit auch für FV nicht ausgeschlossen. Aufschlussreich wären

zudem Transduktionsexperimente nach Wiederherstellung der HS-Expression der GAG-defizienten Zelllinie CRL-2242 oder nach einer mittels siRNA vermittelten Herunterregulierung der UDP-Xylosyltransferase der Wildtyp-Zelllinie CHO-K1.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2010 wurde von Stirnagel und Mitarbeiter mitgeteilt, dass eine Subklon der Mause L-Zelllinie, die Sog-9-Zellen mit PFV nur um Faktor 10 schlechter transduzierbar waren als die Wildtyp-Maus L-Zellen, obwohl die Sog-9 Zelllinie keine Proteoglycane produzieren kann (Banfield *et al.* 1995). Daher wurde vermutet, dass Proteoglycane nicht ausschließlich und nicht essentiell für PFV Env vermittelte Infektionseffizienz sind. Gleichzeitig wurde aber auf eine signifikante Unterstützung der PFV Env vermittelte Infektionseffizienz durch HS hingewiesen (Stirnagel *et al.* 2010).

3.3.3 Kompetitive Hemmung mittels löslichem Heparin

Um zu überprüfen, ob Heparin bzw. Heparansulfat auf der Zelloberfläche für Foamyviren als Rezeptor fungiert, wurden Transduktionsexperimente mit foamyviralen Vektoren und löslichem Heparin - basierend auf dem Prinzip einer kompetitiven Hemmung - durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Heparinkonzentrationen in FCS-freiem Medium mit einer dekadischen Virusverdünnungenreihe inkubiert. Anschließend wurden damit HT1080 Zellen für eine Stunde transduziert (n=3). Nach sechs Tagen wurde der EC₅₀-Wert mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Um die Spezifität von Heparin zu testen, wurde identisch mit einem anderen Glycosaminglycan, dem CSA, verfahren. Um auszuschließen, dass eine signifikante Hemmung von FV-Infektion durch Heparin durch einen induzierten zellulären Effekt hervorgerufen wird, wurden zeitgleich Kontrollexperimente durchgeführt, in denen die Zellen zuerst mit den unterschiedlichen GAG-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit den Virusverdünnungen transduziert wurden (Summerford und Samulski 1997). Die entsprechenden Titrationskurven und die daraus ermittelten EC₅₀-Werte sind in folgenden Abbildungen dargestellt:

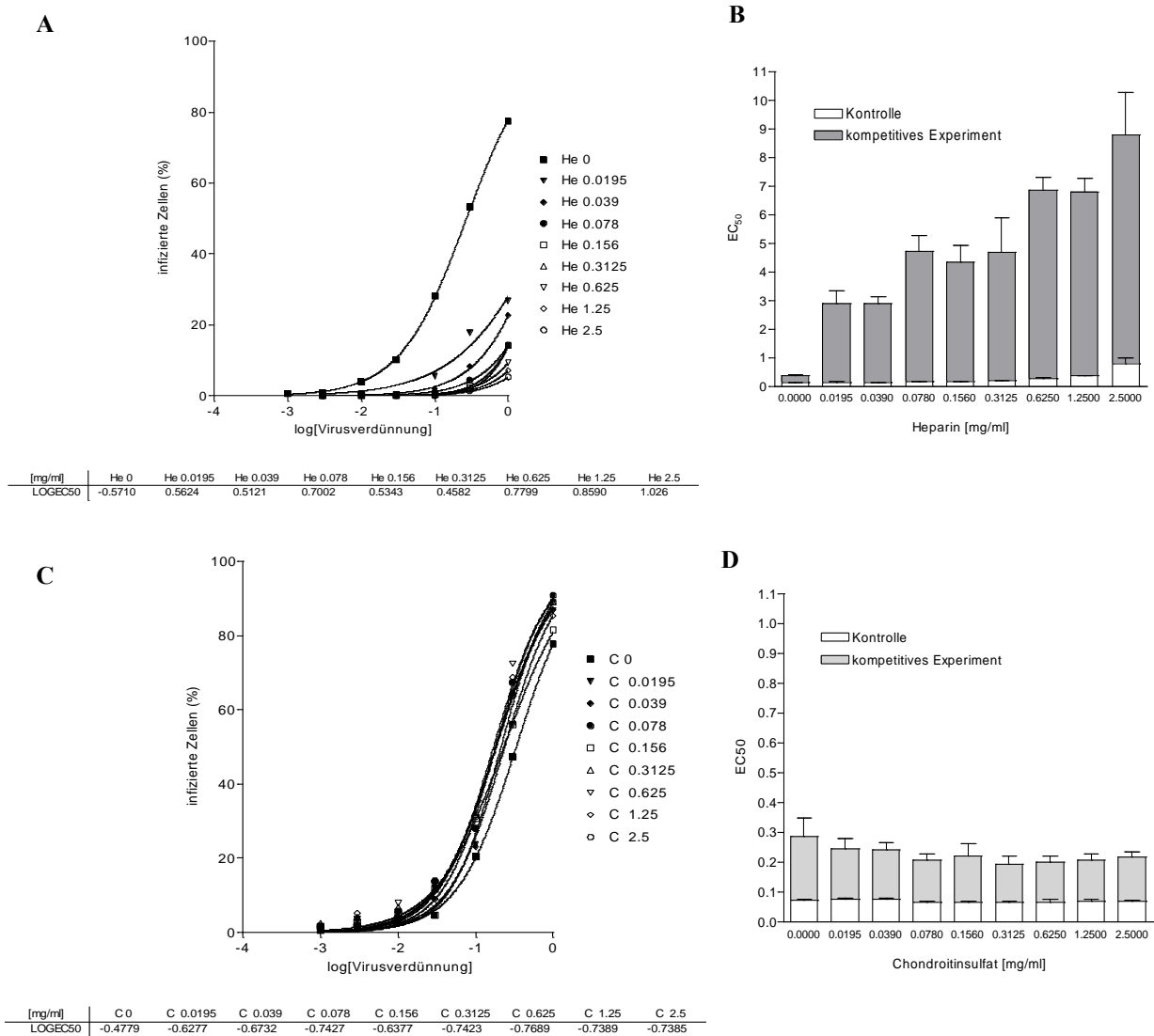


Abb. 3.41: Einfluss von GAG auf die Transduktionseffizienz eines foamyviralen Vektors.

Virussuspensionen einer dekadischen Verdünnungsreihe wurden mit unterschiedlichen GAG-Konzentrationen für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden mit diesen Lösungen HT1080 Zellen eine Stunde lang transduziert. Als Kontrolle erfolgte im Anschluss an eine Behandlung der Zellen mit GAG-Lösungen, die Transduktion mit den Virusverdünnungen. Die Transduktionseffizienz wurde nach 6 Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und EC_{50} -Werte erstellt.

A und C: Repräsentative Darstellung der Titrationskurven eines Transduktionsexperiments: Auf der X-Achse ist die logarithmische Verdünnungsstufe eingetragen, auf der Y-Achse die prozentuale Anzahl der infizierten HT1080-Zellen. Mit Hilfe der Prism-Statistiksoftware wurde eine Titrationskurve erstellt, die dem bestmöglichen Algorithmus folgte.

B und D: EC_{50} Werte der Transduktionsexperimente: Als charakteristische Kenngröße der Infektiosität wurde die Konzentration gewählt, bei der 50% der Zellen infiziert waren (EC_{50} -Wert). Dargestellt ist der Mittelwert von drei Transduktionsexperimenten \pm SEM.

Das eingesetzte Virus wies in Anwesenheit von löslichem GAG bei dem Heparinversuchsansatz einen EC_{50} -Wert von $0,2470 \pm 0,02573$ SEM und bei dem Chondroitinsulfatversuchsansatz von $0,2154 \pm 0,06090$ SEM auf. Im Vergleich zur

unbehandelten Suspension zeigte sich eine deutliche Reduktion der Infektion bei Einsatz von Heparin. Bereits eine Heparin-Konzentration von 19,5 µg/ml führte zu einer Verringerung um $61,9\% \pm 2,3$ der Transduktionseffizienz der unverdünnten Virus-suspension. Bei dem Vergleich der EC_{50} -Werte stellt man fest, dass mit steigendem Heparinanteil auch der EC_{50} -Wert kontinuierlich bis auf durchschnittlich ein 30-faches ansteigt. Eine steigende CSA-Konzentration hat hingegen eher eine Tendenz einer Steigerung der Transduktionseffizienz bzw. einer Reduzierung des EC_{50} -Wertes zur Folge. Hierbei wurde aber keine statistische Signifikanz erreicht.

GAGs zeigten dagegen keinen Einfluss auf die Transduzierbarkeit der Zellen, wenn die Zellen für 60 Minuten mit den GAGs lediglich vorbehandelt wurden und die Viruszugabe erst nach Entfernung der GAGs erfolgte (Abb. 3.41 B und D). Zwar stieg in diesem Experiment mit steigender Heparinmenge der EC_{50} -Wert bis um das dreifache (bei einer Konzentration von 1,25mg/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen an, während mit steigender CSA-Menge der EC_{50} -Wert etwas sank, diese Tendenzen waren aber statistisch nicht signifikant. Das eingesetzte Virus wies ohne Einfluss von GAG bei den beiden Kontroll-Versuchsansätzen im Vergleich zu den Experiment-Versuchsansätzen einen um Faktor 2 niedrigeren EC_{50} -Wert auf (EC_{50} -Wert (HE): $0,1295 \pm 0,005187$ SEM; EC_{50} -Wert (CSA): $0,07085 \pm 0,002810$ SEM).

Die Hemmung der Infektion erfolgte für Heparin mit einem EC_{50} -Wert von $6,8 \mu\text{g/ml} \pm 0,75$ SEM (nicht gezeigt). Da dieser Wert aber auch von der Transduktionseffizienz des Virus abhängt und bei konstanter Heparinkonzentration mit sinkender Virusmenge weiter sinkt, wurde in einem weiteren kompetitiven Experiment eine Viruspräparation eingesetzt, die aufgrund eines Konzentrierungsschrittes mittels UZ eine höhere Transduktionsaktivität zeigte. Für den folgenden Versuch wurde eine Heparinkonzentrationsreihe in FCS-freiem Medium erstellt (0-3000mg/ml); diese Ansätze wurden anschließend mit der Virussuspension versetzt, die diesmal in konstanter Menge eingesetzt wurde. Die dadurch resultierende Verdünnung ergab einen EC_{50} -Wert von $0,0456 \pm 0,0035$ SEM und lag am Rande des Sättigungsbereichs. Alle anderen Versuchsbedingungen waren identisch mit dem vorherigen Experiment. Die Abbildung 3.42 zeigt die aus einer dreifachen Bestimmung resultierende Titrationskurve. Es ergab sich ein EC_{50} -Wert von $29,8\mu\text{g/ml} \pm 0,7$ SEM.

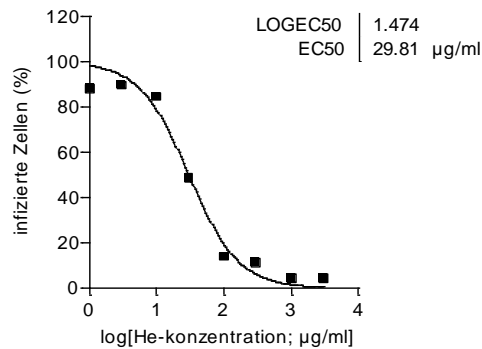


Abb. 3.42: Einfluss von Heparin auf die Transduktionseffizienz. Eine konstante Virusmenge wurde mit unterschiedlichen Heparin-Konzentrationen für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden mit diesen Lösungen HT1080 Zellen eine Stunde lang transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde nach 3 Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und der EC₅₀-Werte ermittelt. Auf der X-Achse ist die logarithmische Verdünnungsstufe eingetragen, auf der Y-Achse die prozentuale Anzahl der infizierten HT1080-Zellen. Mit Hilfe der Prism-Statistiksoftware wurde eine Titrationskurve erstellt, die dem bestmöglichen Algorithmus folgte (n=3)

Da sich eine dosisabhängige kompetitive Hemmung der Transduktion mittels HE ergab und eine Hemmung mit CSA nicht möglich war, scheint eine spezifische Bindung von foamyviralen Vektoren zu HS vorzuliegen. Dies würde bedeuten, dass die Interaktion von FV mit HS-Molekülen nicht ausschließlich auf ionische Wechselwirkung, sondern auch auf eine wichtige Bedeutung der Struktur des GAG-Grundgerüsts zurückzuführen ist.

Da auch hier keine vollständige Inhibierung der foamyviralen Transduktion möglich war, ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch eine Bindung an andere Oberflächenmoleküle erfolgte.

Unter ähnlichen Bedingungen wurde das kompetitive Experiment mit AVV, PCV2 oder auch hMRV und RSV durchgeführt (Summerford und Samulski 1997, Misinzo *et al.* 2006, Thammawat *et al.* 2008). Bezüglich AAV wurde festgestellt, dass mit einer Konzentration an Heparin von 5 µg/ml eine Inhibierung von 100% erreicht wurde. Misinzo *et al.* beschreiben 2006 eine Hemmung der Infektiosität von PCV2 von 66% bei einer HE-Konzentration von 2,5 mg/l. Ähnlich wie bei unseren Studien konnte in allen drei Veröffentlichungen eine Inhibierung der Transduktionseffizienz des jeweiligen Virus durch Heparin, im Gegensatz zu CS-A nachgewiesen werden.

3.3.4 Enzymatische Reduktion von HE/HS von der Zelloberfläche

Um die Rolle der GAGs bei der Infektion weiter zu charakterisieren, wurde die Transduktionseffizienz nach Entfernung des Heparansulfats bzw. Heparins von der Zelloberfläche von HT1080-Zellen untersucht.

Hierzu wurden Enzyme eingesetzt, die spezifisch sulfatierte Glycane, deren Glucosaminteil und Uronsäurereste im HE und HS Polymer α -(1-4)-glycosidisch verknüpft

sind, spalten. Da alle Glycosaminoglycane (GAGs) ein Grundgerüst von aufeinanderfolgenden Disacchariden bestehend aus Uronsäure und D-glucosamin oder N-acetyl-D-glucosamin aufweisen, führt dies je nach Spezifität der Enzyme zum Abbau des betreffenden Polymers. Um Heparansulfat von der Zelloberfläche von HT1080 Zellen zu entfernen, wurden von uns die Heparinasen I und III verwendet. Heparinase I katalysiert die Spaltung der Bindung zwischen den Hexosaminen und O-sulfatierten Iduronsäuren, und Heparinase III spaltet die 1-4 Verknüpfung zwischen Hexosaminen und Glucuronsäureresten.

HT1080-Zellen wurden mit dem Enzym für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschschrift erfolgte die Transduktion mit verschiedenen Virusverdünnungen (Abb. 3.38 C und D). Um die Effektivität der Enzyme zu prüfen, wurde eine Färbung auf Heparansulfat auf der Oberfläche der Zellen durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die GAG-Expression nach Entfernung der Enzyme dauerhaft erniedrigt war, erfolgte eine weitere GAG-Färbung eine Stunde nach Entfernung der Enzyme. Dieser Zeitraum entsprach dem im folgenden Experiment (Abb. 3.43 C und D) verwendeten Transduktionszeitraum (Abb. 3.43 A und B).

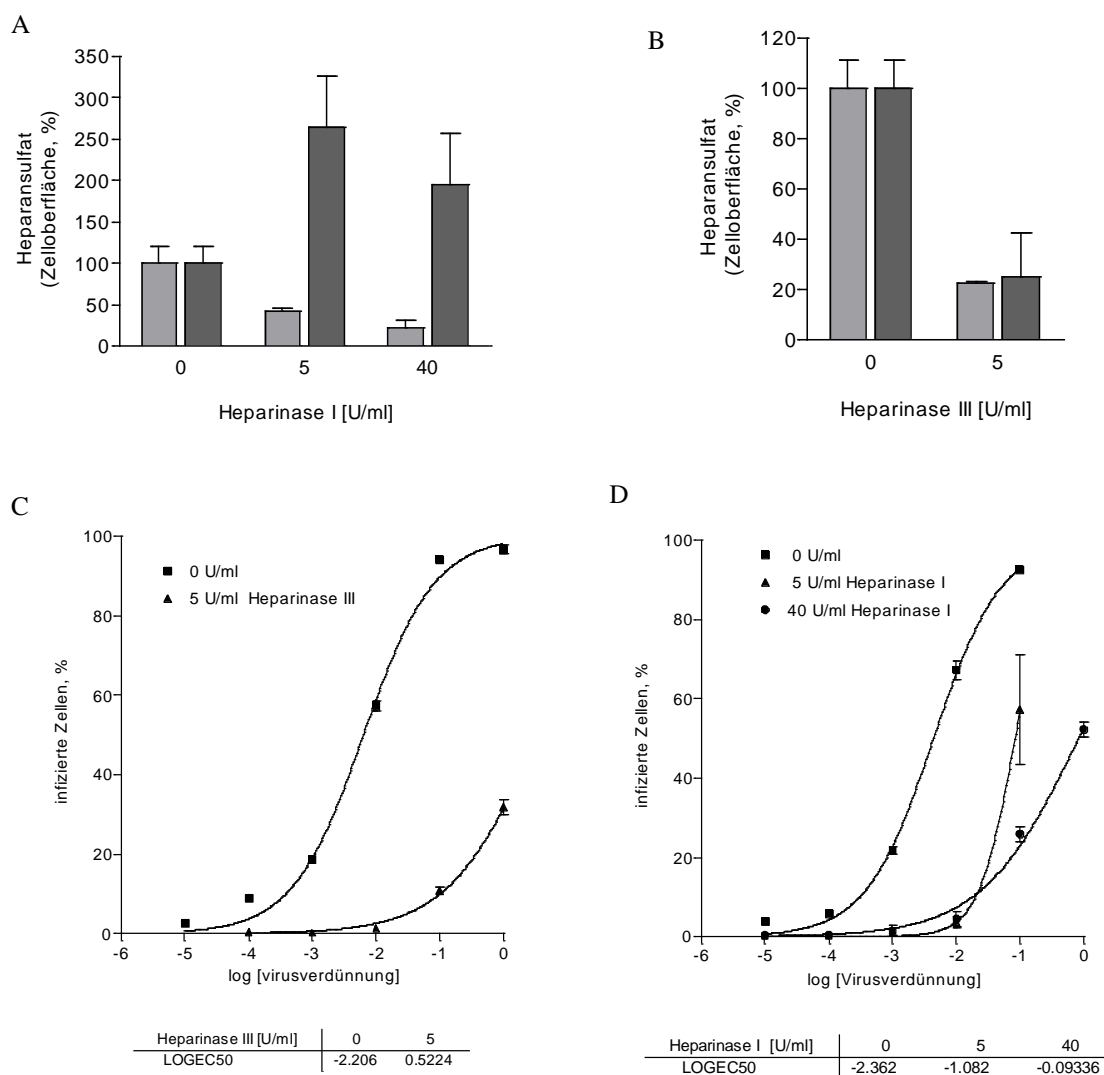


Abb. 3.43: Einfluss der enzymatischen Reduktion von GAGs von der Zelloberfläche von HT1080-Zellen auf die foamyvirale Transduktionseffizienz. HT1080 Zellen wurden mit Heparinase I bzw. III für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. **A und B:** Sowohl direkt nach der Enzymbehandlung (entspricht der Situation zu Transduktionsbeginn; hellgraue Balken), als auch eine Stunde danach (entspricht der Situation am Transduktionsende; dunkelgraue Balken) erfolgte eine extrazelluläre Färbung (n=3; außer * n=2) auf Heparansulfat mittels eines monoklonalen Anti-HS Primäntikörpers und eines Sekundäntikörpers (PE Ratte Anti Maus IgM). Als Kontrollantikörper wurde Maus IgM, k Isotyp Control eingesetzt. Dargestellt ist der Quotient der Mittelwerte der Messung und der Mittelwert des entsprechenden Kontrollansatzes, bezogen auf den entsprechenden Quotienten unbehandelter Zellen (=100%). **C und D:** Transduktionsversuch (n=3) mit dekadischen Verdünnungen einer foamyviralen Vektorsuspension nach Enzymbehandlung. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Die Titrationskurve folgt dem bestmöglichen Algorithmus.

Die Abbildungen 3.43 A und B zeigen, dass sowohl durch die Wirkung von Heparinase I und III mehr als 50 % des Heparansulfats von der Oberfläche von HT1080 Zellen entfernt wurden. Zum Beginn der Transduktion waren unter Einsatz von Heparinase I mit einer

Enzymaktivität von 5U/ml noch ca. 42 % \pm 4 SEM Heparansulfat (bezogen auf unbehandelte Zellen (100% \pm 19,7 SEM). Bei 40U/ml ist eine weitere Reduktion auf ca. 23 % \pm 7,7 SEM festgestellt worden. Der Versuch mit Heparinase III ergab im Vergleich zur Kontrolle (100% \pm 11,6%) bereits bei einer Aktivität von 5U/ml eine Verringerung des Heparananteils auf ca. 22 % \pm 0,8 SEM.

Erfolgte die Messung eine Stunde nach Enzymbehandlung (dies entspricht der Situation am Ende des Transduktionsversuches), ergab der Versuch mit Heparinase I überraschenderweise eine Steigerung des Heparananteils. Es wurden, bezogen auf die Kontrolle bei 5U/ml, ein Heparansulfatanteil von 266 % \pm 61 SEM und bei 40U/ml ein Anteil von 195 % \pm 62 ermittelt, während sich die Situation im Falle von Heparinase III kaum veränderte (25 % \pm 17 SEM). Möglicherweise ist ein kompensatorischer Effekt als Folge der Heparansulfat-Depletion nach Verdau die Ursache für die anschließend überschießende HS-Produktion auf den Zellen.

Die Abbildungen 3.43 C und D zeigen, dass die Infektiösität der eingesetzten Virussuspension auf unbehandelten Zielzellen einem EC_{50} -Wert von $4,35 \cdot 10^{-3}$ bzw. $6,23 \cdot 10^{-3}$ entsprach. Durch Abbau von Heparansulfat wurde im Vergleich zu den Transduktionsergebnissen der unbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der Infektion erreicht. Heparinase I erhöhte bei einer Enzymaktivität von 5 U/ml den EC_{50} -Wert auf 0,08282 und bei 40 U/ml auf 0,8066. Dies entspricht im Vergleich zu dem EC_{50} -Wert un behandelter Zellen einer Verringerung der Suszeptibilität der Zellen um Faktor 19 bzw. 185 (Abb. 3.38 D). Durch Einsatz von Heparinase III wurde die Suszeptibilität der Zellen um den Faktor von ca. 500 reduziert (EC_{50} -Wertes auf 3,330) (Abb. 3.43 C).

Die von uns eingesetzten Enzyme waren demzufolge jeweils in der Lage, Heparansulfat derart von der Oberfläche von HT1080 Zellen zu entfernen, dass eine Reduktion der Transduktionseffizienz erreicht wurde. Eine Reduktion des Heparansulfatanteils von ca. 75-80 % bedeutet im Falle von Heparinase I eine um Faktor 186 und im Falle Heparinase III sogar eine um Faktor 535 schlechtere Suszeptibilität der Zellen. Die Abbildung C und D macht deutlich, dass die Entfernung von Heparansulfat von der Zelloberfläche zu einer signifikanten Reduktion der Transduktion führt, diese jedoch nicht komplett blockiert. Somit wurde festgestellt, dass HS ein wichtiger Suszeptibilitätsfaktor für foamyvirale Infektion ist. Die Tatsache, dass in den Experimenten mit löslichem HS (Abb. 3.42) eine höhere Transduktionsinhibition beobachtet wurde als in den Experimenten mit Heparinase Verdau (Abb. 3.43), ist vermutlich darin begründet, dass die Heparinasen das HS nicht komplett von der Oberfläche entfernten.

Die Reduktion der Infektiösität nach enzymatischer Entfernung des HS von der Zelloberfläche wurde auch bei anderen Viren, wie z. B. bei AAV, Dengue Virus, HSV-1 und 2, gezeigt (Misinzo *et al.* 2006, Summerford und Samulski 1997, Martinez-Barragan und del Angel 2001, Spillmann *et al.* 2001, Spear 1993).

3.3.5 Korrelation zwischen Suszeptibilität und Zelloberflächen-HS

Um die Rolle von HS als möglichen zellulären Rezeptor der foamyviralen Infektion weiter zu verifizieren, wurde von weiteren Zellen (11 adhärenente Zelllinien und 3 Suspensionszelllinien) ebenfalls Heparansulfat auf der Zelloberfläche bestimmt und die Suszeptibilität gegenüber Foamyviren in analoger Weise unter Einsatz der gleichen Virussuspension bestimmt. Unter den getesteten Zelllinien sind 7 humane Zelllinien, darunter 2 mesenchymale Stammzelllinien. Die HS-Expression auf der Zelloberfläche ist in Abbildung 3.44 dargestellt. Am meisten HS ließ sich auf der Oberfläche von HT1080 Zellen detektieren. Es folgen MSC, CHO-K1 und COS-7. Am wenigsten bzw. gar kein HS war bei 293 T, HepG2 und CRL-2242 Zellen nachweisbar.

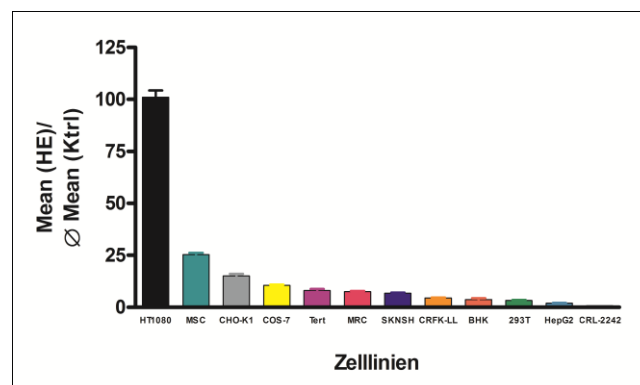


Abb. 3.44: Nachweis von Heparansulfat an der Zelloberfläche. Um Heparansulfat an der Zelloberfläche nachzuweisen, erfolgte eine extrazelluläre Färbung (n= 4) auf Heparansulfat mittels einem monoklonalem Anti-HS Primäantikörper und einem Sekundäantikörper (PE Ratte Anti Maus IgM). Als Kontrollantikörper wurde Maus IgM, k Isotyp Control eingesetzt. Dargestellt ist der Quotient der mittleren Fluoreszenz-intensitäten der jeweils untersuchten Zelllinie bezogen auf die mittlere Fluoreszenzintensität bei HT1080-Zellen. Werte als Mittelwert \pm SD.

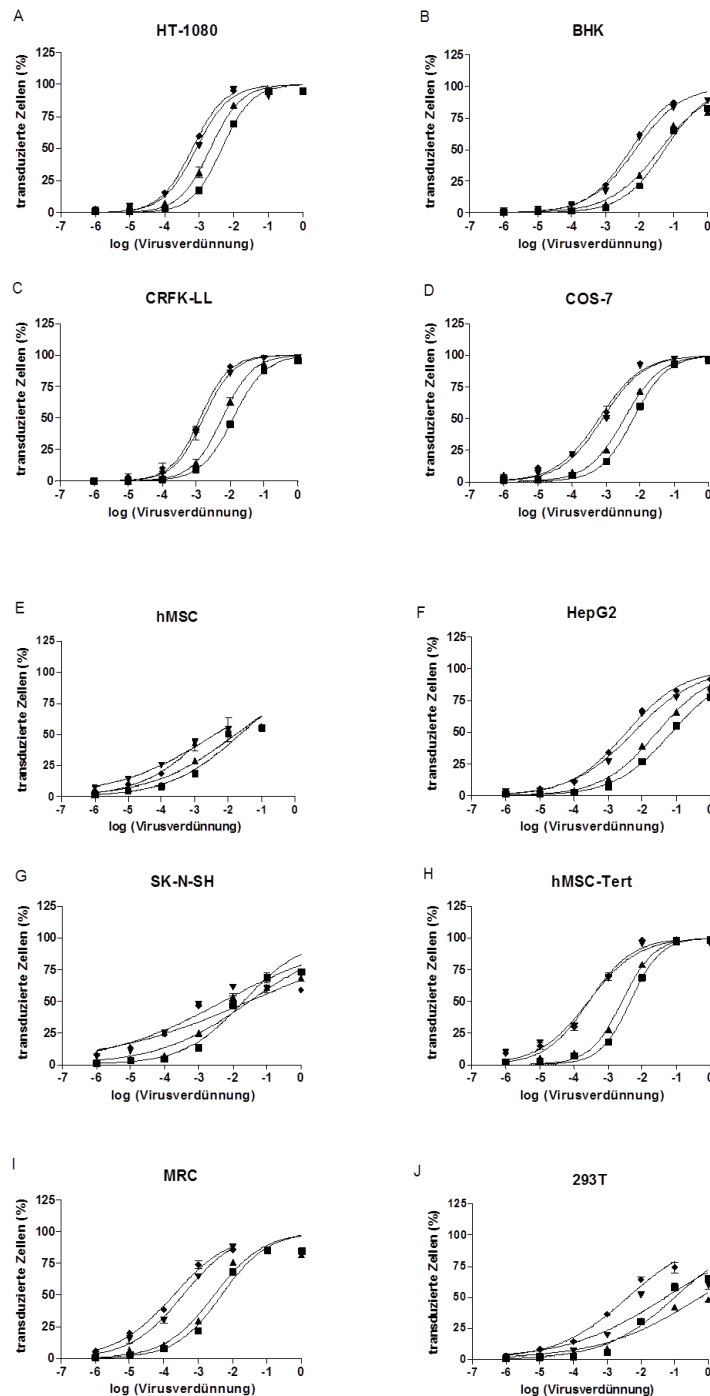


Abb. 3.45: Bestimmung der Suszeptibilität verschiedener Zelllinien gegenüber foamyviralen Vektoren. In einer 96 Lochplatte wurden 10^3 Zellen pro Vertiefung mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe der gleichen foamyviralen Vektorsuspension transduziert (Ansatz in Triplikaten). Die Transduktionsdauer lag bei 1 (■), 2 (▲) und 24 (▼) Stunden und nicht aufgenommenes Virus wurde anschließend gewaschen. In jeweils einem weiteren Ansatz wurde die Virussuspension von den Zellen überhaupt nicht entfernt (Transduktionsdauer „unendlich“ (◆)). Nach mehreren Tagen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Infektionsrate mittels FACS. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Anhand einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion wurde der EC_{50} -Wert bestimmt. A: HT1080. B: BHK. C: CRFK-LL. D: COS-7. E: hMSC. F: HepG2. G: SK-N-SH. H: hMSC-Tert. I: MRC. J: 293T.

Die Abbildungen 3.45 A-J zeigen, dass - wie erwartet - mit einer Erhöhung der Transduktionsdauer die Transduktionseffizienz steigt. Bei Zellen mit geringer Suzeptibilität (SK-N-SH, 239T, hMSC) war hingegen kaum ein Einfluss der Transduktionsdauer auf die Transduktionsrate erkennbar.

Bei Zellen mit hoher Suzeptibilität (hMSC-tert, COS-7, CRFK-LL, HT-10180) tritt eine Sättigung der Transduktion im Konzentrationsbereich 10^0 - 10^{-1} ein. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich die Transduktionsrate gut transfizierbarer Zellen einer 24-stündigen Transduktion nur minimal von der ohne Entfernung des Virus unterscheidet.

Ordnet man die Zellen nach ihren ermittelten EC_{50} -Werten der einstündigen Transduktionsexperimente, ergibt sich die in Abbildung 3.41 dargestellte Reihenfolge. Tert-4, HT1080 und MRC Zellen und COS-7 waren am besten transduzierbar und hMSC, BHK, HepG2 und 293T Zellen am schlechtesten. Diese Tendenz zeigten auch die Ergebnisse der anderen Transduktionszeiten (nicht dargestellt).

Vergleicht man die Transduktionsergebnisse mit der festgestellten Menge an HS auf der Oberfläche der Zellen (Abb. 3.47), so erkennt man eine positive Korrelation zwischen FV-Suzeptibilität und HS-Expression. In der Einzelfallbetrachtung findet man jedoch auch Ausnahmen:

So weisen Tert Zellen die gleiche Transduzierbarkeit auf wie HT1080-Zellen, obwohl wesentlich mehr HS auf der Oberfläche von HT1080 festgestellt wurde. Zudem hätte man aufgrund der detektieren HS eine bessere Transduktionseffizienz der hMSC erwartet. Dieses deutet darauf hin, dass es neben HS noch andere zelluläre Faktoren gibt, die die Suzeptibilität beeinflussen.

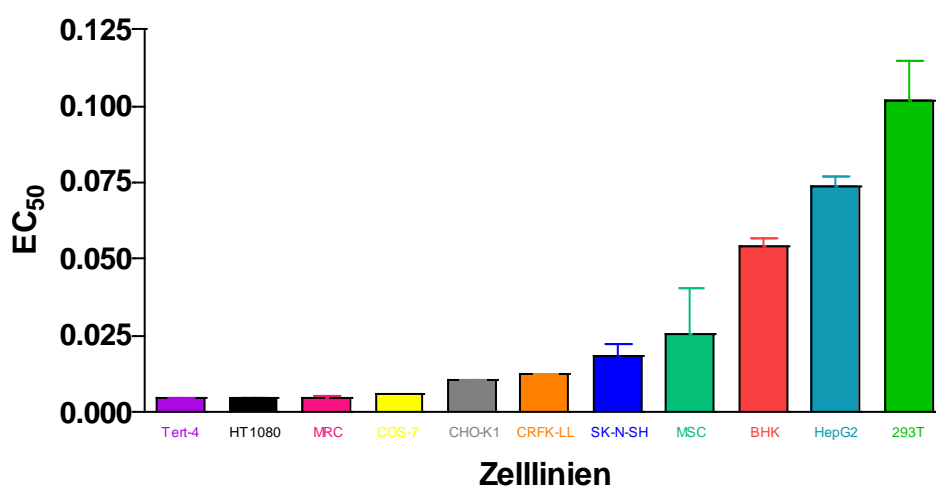


Abb. 3.46: Foamyvirale Transduktionseffizienz verschiedener Zelllinien. Dargestellt sind in steigender Reihenfolge, die EC_{50} -Werte die sich aus den Transduktionsexperimenten mit einer Inkubationszeit von einer Stunde berechnet wurden

Tabelle 3.3: Korrelationsdaten zu Abb. 3.44 und 3.46.

Zelllinie	EC50	SD	Mean	SD
Tert- 4	0.00447	0.00025	8.093	1.392
HT-1080	0.00457	0.00060	101.1	6.421
MRC	0.00482	0.00097	7.54	0.727
COS-7	0.00629	0.00001	10.55	0.669
CHO-K1	0.01055	0.00048	15.17	1.844
CRFK-LL	0.01239	0.00070	4.420	0.518
SK-N-SH	0.01855	0.00695	6.765	0.588
MSC	0.02564	0.02611	25.41	1.483
BHK	0.05435	0.00396	3.715	1.238
HepG2	0.07389	0.00538	2.003	0.299
293T	0.1019	0.02203	3.325	0.275
CRL-2242	70.58	21.55	0.770	0.012

Zudem scheinen auch Unterschiede der Suszeptibilität zwischen tierischen und humanen Zelllinien zu bestehen. Vergleicht man die fünf humanen Zelllinien (ohne Stammzellen) miteinander, so ergibt sich eine deutliche Abhängigkeit der Suszeptibilität zur HS-Expression (HT1080 > MRC > SK-N-SH > HepG2 > 293T). Innerhalb der Hamsterzelllinie ergibt sich die gleiche strenge Korrelation (CHO-K1 > BHK > CRL-2242). Unterschiede der Suszeptibilität zwischen humanen und Hamster-Zellen könnten sich aus der Tatsache ergeben, dass das verwendete Foamyvirus auf dem humanen Prototyp PFV basiert. Ob auch das Alter und der Zustand der Zelllinie eine Rolle spielt, kann nicht beurteilt werden. Allerdings wurde für einige Viren, wie für z. B. das Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSU) beschrieben, dass sich die lange Passagierungszeit in Zellkultur zu Gunsten der Selektion von HS als Rezeptor auswirkt (Sa-Carvalho et al. 1997).

Betrachtet man die Suspensionszellen, so ergibt sich, dass sich nur die H9-Zellen über 50 % transduzieren lassen. Dies stimmt mit der festgestellten HS-Menge auf der Oberfläche der Zellen überein (Daten nicht gezeigt). Die Daten wurden ohne Spinokulation ermittelt. Es ist bekannt, dass durch Spinokulation der Raji-Zellen die Transduktionseffizienz steigt.

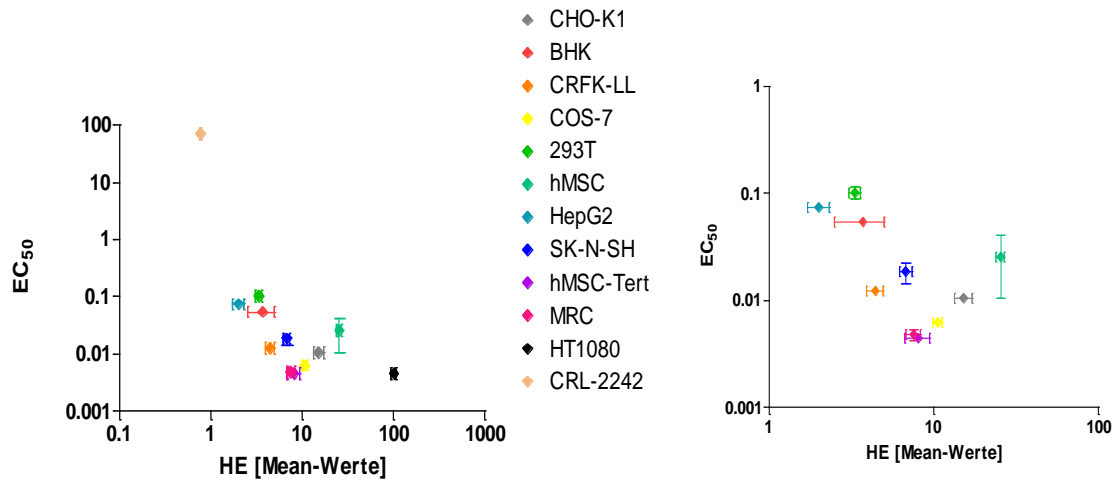


Abb. 3.47: Korrelation der Transduktionseffizienz (EC₅₀-Wert) und HS-Faktor. links: alle Zelllinien gezeigt; rechts: ohne CRL-2242 und HT1080

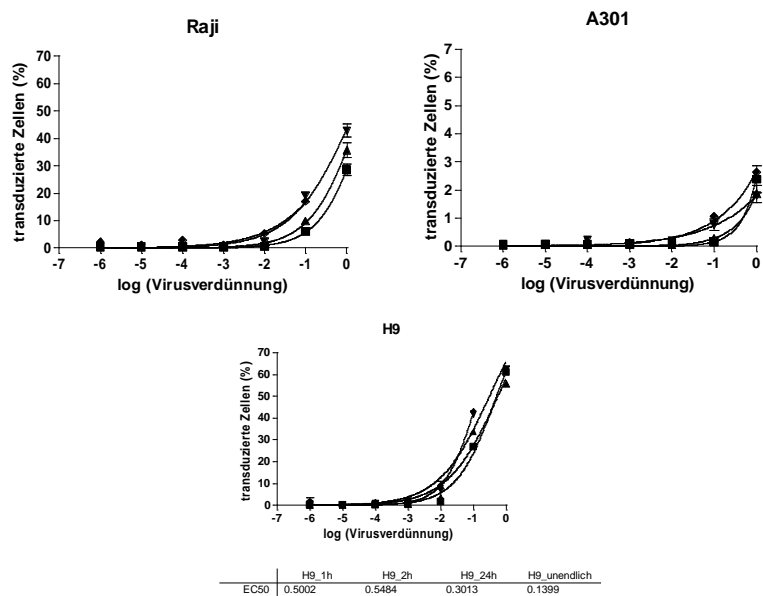


Abb. 3.48: Transduktionsexperimente mit foamyviralen Vektoren (n=3). Die Zellen wurden mit einer logarithmischer Verdünnungsreihe eines foamyviralen Vektorsuspension transduziert. Transduktionsdauer lag bei 1 (■), 2 (▲) und 24 (▼) Stunden. Nach einem Waschschritt mit Zentrifugationsschritt erfolgte nach mehreren Tagen Inkubation bei 37 °C die Bestimmung der transduzierten Zellen mittels FACS. In einem Experiment wurde die Virussuspension von den Zellen nicht entfernt (Transduktionsdauer: unendlich (◆)). Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Die Titrationskurve folgt dem bestmöglichen Algorithmus.

Im Jahr 2010 wurden zwei Zelllinien entdeckt, die bei einer Inkubationszeit von 4 bzw. 6 Stunden, selbst nach Spinokulation, resistent gegenüber FV Env vermittelte FV- und HIV-Vektor Transduktion waren (Stirnagel *et al.* 2010). Es handelt sich um eine menschliche Erythrozytenvorläufer- (G1E-ER4) und um eine Zebrafisch-Zelllinie (Pac-2). Da in der gleichen Arbeit mittels fluoreszenzmarkierten retroviralen Partikeln auch festgestellt werden konnte, dass beide Zelllinien FV Env abhängige Bindung an die retroviralen Partikel zeigen, wurde vermutet, dass nach der Bindung an die Zelle die Zellinvasion aufgrund FV Eintritts-Cofaktoren blockiert wird. Ob diese Zelllinien HS auf der Zelloberfläche aufweisen, ist noch nicht bekannt und bleibt abzuwarten.

Allgemein darf nicht außer Acht gelassen werden, dass immer noch sehr wenig bekannt ist über Gewebetropismus und das Virus selbst. So ist bis heute nicht geklärt, ob die HS Situation der Zellen in Zellkultur mit der im Organismus vergleichbar ist oder Wildtyp-Isolat des Virus sich ähnlich zu den Vektoren, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, verhält (Sa-Carvalho *et al.* 1997, Fry *et al.* 1999).

Sa-Carvalho und Mitarbeiter konnten 1997 eine *in vitro*-Selektion von HS als Rezeptor beobachten. Es wurde hierbei festgestellt, dass die Aminosäure Arginin in VP3 in kultivierten adaptierten Stämmen vorlag, während der Wildtyp FMDV an der Stelle ein Histidin Molekül aufweist, welches nicht mit HS interagiert (Jackson *et al.* 1996, Fry *et al.* 1999, Ruiz-Saenz *et al.* 2009). Um festzustellen, ob auch Wildtyp des FV auch HS nutzt, könnte man das Env-Gen aus Affen-PBMC, welche mit FV infiziert sind, amplifizieren, in einen Vektor inklonieren und die erwähnten Bindungsstudien durchführen.

In unserer Arbeit wurde die Bindung von FV an Heparin, die Korrelation der Suszeptibilität verschiedener Zellen mit zellulärem HS und die Reduktion der Infektion durch lösliches Heparin sowie durch enzymatischen HS-Abbau festgestellt. Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass HS in die Bindung der FV an die Zielzelle involviert ist und sie legen nahe, dass HS von FV als zellulärer Rezeptor für den Eintritt genutzt wird. Neben HS scheint es aber noch weitere, bisher nicht identifizierte Rezeptoren zu geben, die ebenfalls einen Eintritt in die Zelle ermöglichen können. Letzteres wird vor allem durch die Beobachtung nahegelegt, dass sich HS-defiziente Zellen wie CRL-2242 ebenfalls - wenn auch deutlich schlechter als alle anderen geprüften Zellen - transduzieren lassen. Es liegen jedoch immer noch sehr wenige Informationen über Wildtyp-Isolate und Gewebestrukturen vor, um mögliche Rezeptormoleküle *in vivo* zu bestätigen und die Rolle von HS einwandfrei festzustellen (Spillmann 2001).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant	Typbezeichnung
Agarosegel-Gießkammer	Institutseigene Werkstatt	
Agarosegel-Laufkammer	Institutseigene Werkstatt	
Bio Image Reader	Fuji-Film	LAS 3000, Intelligent Dark Box
Blottingkammer	Institutseigene Werkstatt	semi dry
Brutschrank (Bakterien)	Hartenstein	Incubat
Brutschrank, CO ₂ -begast (Zellen)	Heraeus	
Cryotom	Leica	CM1900
Durchflusszytometer	Becton & Dickinson	FACScan
Eismaschine	Scotsman	AF-10
ELISA-Reader	Tecan	Spectra
Entwicklungskammer für Western Blot	Hartenstein	Incubat
Fluoreszenzmikroskop	Leitz	DMIRES 2
Flüssigstickstoffbehälter	Cryosystem	
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch	
Geldokumentationsgerät	Intas	Gel Imager
Lichtmikroskop	Leitz	Fluorovert
Luminometer	EG&G-Berthold	MicroLumat LB 96B
Magnetrührer	Heidolph	
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf	
Mikrotom	Leica	SM 2000R
Mikrowelle	Brother	Powerwave ER-200
Multipette	Eppendorf	
Netzgerät	BioRad	3600 XI
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	
pH-Meter	Schott	
Photometer	Eppendorf	Biophotometer 6131
Plattformschwenker	Hofer Scientific Instruments	Red Hocker Modell PR50

Proteingel-Laufkammer	Institutseigene Werkstatt /Invitrogen	Xcell <i>Sure Lock</i> ™
Schüttler für Reaktionsgefäße	Janke-Kunkel	Typ VX2E
Schüttler: Plattform	B. Braun	Certomat S2
Schüttler: Thermohaube	Sartorius	Certomat-H
stereotaktischer Rahmen	Narishige, Japan	
Sterilwerkbank	Gelaire Flow Laboratories	BSB4A
Surgical instruments	World Precision Instruments	
Tankblot-Kammer	peqLab	PerfectBlue Tank- Elektroblotter
Thermoblock	Hartenstein	TDB 120
Thermocycler (PCR)	BioRad	MyCycler; MiniCycler PTC 1152
Thermocycler (qRT-PCR)	BioRad	iCycleriQ
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus
Tischzentrifuge	Eppendorf	5417C
Tischzentrifuge	Hettich	Universal 320
Ultraschallgerät	Branson	Sonifier500
Ultrazentrifuge	Sorvall	Evolution RC
Ultrazentrifugenrotor	Sorvall	SLA-3000 Super-lite
Vakuumkammer	Institutseigene Werkstatt	
Vakuumpumpe	Sarvant	VP100
Vortexer	Hartenstein	
Waage	ScaleTec	SBA 51
Wasserbad (Heizspirale)	Hartenstein	Typ WTH500
Wasserbad (Becken)	Institutseigene Werkstatt	
Zentrifuge	Heraeus	Multifuge 1sr
Zentrifuge	Sorvall	Ecolution RC

HPLC-System

Gerät:	ÄKTA™ explorer10
Pumpe:	P-900 series
Injektion:	1ml Injektionsschleife oder Superloop (GE Healthcare)
Trennsäule:	POROS® 50HE (100*4,6 mm I.D.; Applied Biosystems)
Detektor:	Monitor UV-900, Monitor pH/C-900
Fraktionensammler:	Frac-920

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

4.1.2.1 Glas

Material aus Glas, wie Bechergläser und Pipetten wurden von Schott und Brand und die Objektträger Super Frost Plus® von Langenbrinck bezogen.

4.1.2.2 Kunststoff

Kunststoffmaterialien, wie Zellkulturflaschen, Petrischalen, Pipettenspitzen, Spritzen, Falcon- und Kryogefäße wurden von Hartenstein (Würzburg, Deutschland), Greiner (Bioone, Solingen, Deutschland), Brand (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland, BioRad (München, Deutschland), Nunc GmbH (Wiesbaden, Deutschland), BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland), PeqLab (Erlangen, Deutschland), Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Nalgene (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

4.1.2.3 Sonstiges

<i>Material</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller, Lieferant</i>
Blottingpapier (0,37mm, 190g/cm ²)	Western-Blot	Hartenstein
Blottingpapier (1,4mm, 550g/cm ²)	Western-Blot	Hartenstein
CaliBRITE Beads	FACS	Becton & Dickinson
Einmalhandschuhe (Latex)		Semperit
Freeze 'N Squeeze Spin Columns	DNA Gelextraktion	BioRad
Magnetrührerstäbchen (zylindrisch, 6-50mm)		Hartenstein
Microcon	Ultrafiltration	Amicon
Microtome Blade 819	Messer für Microtom	Leica
Nitrocellulose (Hybond ECL)	Western-Blot	Amersham Bioscience
Online filter kit	HPLC	GE Healthcare
Polyacrylamidgele (Novex® 10% , 16 % Tris-Glycine Gel 0,1mm, 12/15 well)	SDS-PAGE	Invitrogen
QIAshredder	Homogenisator für Zellen	Qiagen
Röntgenfilm	Western Blot	Contatyp
Sterilfilter (Porengröße: 0,22µm)	Sterilfiltration	Millipore
Sterilfilter (Porengröße: 0,45µm)	Sterilfiltration	Schleicher & Schüll

Tissue-Tek O.C.T.	Histologie	Hartenstein
Wizard Minicolumns	Minipräparation	Promega

4.1.3 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden für diese Arbeit von folgenden Herstellern verwendet: Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), BioRad (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Thermofischer (Bonn, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Die eingesetzten Zellkulturmedien, Fötale Kälberserum (FCS), Antibiotika und sonstige für die Zellkultur benötigten Chemikalien wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und PAA (Cölbe, Deutschland) bzw. der institutseigenen Medienküche bezogen. Alle phenolischen Verbindungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, in analytischer Reinheit von den Firmen Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Extrasynthese S.A. (Genay Cedex, Frankreich), Aldrich (Steinheim, Deutschland), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Specs (Niederlande) und TimeTec (USA) bezogen. Hispidulin und Cirsimaritin wurde nach Kavvadias *et al.* . (2004) isoliert. Xanthohumol wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Becker (Universität Saarbrücken) zur Verfügung gestellt.

4.1.4 Enzyme und Reaktionspuffer

<i>Enzym/Reaktionspuffer</i>	<i>Enzymkonzentration</i>	<i>Firma</i>
Reaktionsendonucleasen + Reaktionspuffer (10X)	10u/µl	Fermentas/New England Biolabs
Calf-Intestine Phosphatase (CIAP) + Reaktionspuffer	10u/µl	Fermentas
FastAP KAPAHifi-DNA- Polymerase + Reaktionspuffer mit MgCl ₂ (5X)	1u/µl	Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase + Reaktionspuffer (mit MgSO ₄ ; 10X)	1u/µl	Peqlab
<i>Proteinase K</i>	2,5u/µl	Fermentas
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase + Reaktionspuffer complete (mit MgCl ₂ , 10X)	22,39 mg/ml	Macherey-Nagel
Rnase	1u/µl	peqLab
	-	Roche

T4-DNA-Ligase + Reaktionspuffer	5u/µl	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase (Reaktionsmix)	1,25u/25µl	Peqlab, peqGOLD PCR- Master-Mix S
Heparinase I	97U/vial	Sigma
Heparinase III	9U/vial	Sigma
Chondroitinase ABC	2,16U/vial	Sigma

4.1.5 Kits/Mastermixe

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>
AAV Helper-Free System	Stratagen
BigDye™ Terminator 1.1	Biosystems
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
GenElute™ Gel Extraction	Sigma Aldrich
GenElute™ PCR Clean-Up	Sigma Aldrich
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad
NucleoBond™ Maxi Prep	Macherey Nagel
PCR-Purification Kit	Qiagen
peqGOLD PCR Master Mix	Peqlab
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail (P3840)	Sigma
pSilencer™ siRNA Expression Vectors	Ambion
Rneasy Mini Kit	Qiagen
Rnase-free Dnase Set	Qiagen
Roti® Prep Plasmid	Roth
Taq 2x Mastermix	NEB

4.1.6 Größenstandards

<i>Standard</i>	<i>Detektionsbereich</i>	<i>Firma</i>
Biotinylated Protein Ladder	9 – 200kD	Cell Signaling
λDNA-EcoRI/HindIII Digest DNA Ladder	125 – 21.226bp	Fermentas
MassRuler™DNA Ladder, High Range	1.500 – 10.000bp	Fermentas
MassRuler™DNA Ladder, Ladder Mix	80 – 10.000bp	Fermentas

MassRuler™ DNA Ladder, Low Range	80 – 1.031bp	Fermentas
O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder	50 – 1.000bp	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10 – 170kD	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus 10 – 250kD		Fermentas

4.1.7 Puffer und Lösungen

<i>Lösung/Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
4%ige Formalin-Lösung	11 ml 37%iges Formaldehyd 89ml PBS
Annealing-Puffer	100 mM Tris-HCl pH7,5 1 M NaCl 10mM EDTA
Anodenpuffer (10X)	2M Tris pH 8,9
ATV (adjusted trypsin versen)	8,0g NaCl 400mg KCl 1,0g D-Glucose 580mg NaHCO ₃ , pH 7,2-7,4 500mg Trypsin 300mg Versen ad 1L dH ₂ O
Blocking-Puffer	0,1% (w/v) Tween20 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS
CaCl ₂ -Lösung (steril filtriert, in dH ₂ O)	60mM CaCl ₂ 10 mM Pipes (pH7,0) 15% Glycerin
DEPC-H ₂ O	0,05% DEPC in dH ₂ O
Diatomeen-Lösung	10g Diatomeen.Erde 500µl HCl ad 50ml H ₂ O

DNA-Probenpuffer (6fach)	40 % Saccharose 0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylencyanol
Tricingel-Puffer	3M Tris 0,3 % (w/v) SDS pH 8,45
HPLC-Fließmittel A: 0,02 M Phosphatpuffer	16 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 84 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ad 1000 ml dH ₂ O
HPLC-Fließmittel B: 0,02 M Phosphatpuffer + 1 M NaCl	16 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 84 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 500 ml 2M NaCl ad 1000 ml dH ₂ O
Kathodenpuffer (5x)	0,5 M Tris 0,5 M Tricin 0,5% (w/v) SDS pH 8,25
L6-Lösung (lichtgeschützt gelagert)	100ml 0,1M Tris-HCl pH6,4 8,8ml 0,5M EDTA pH8,0 2,6ml Triton X100 13,2ml dH ₂ O 129g Guanidin (Thiocyanat-Salz)
Laufpuffer (Novex)	25mM Tris 200mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Lysepuffer a	20 mM HEPES pH 7,4 0,1 % Triton X100 1 mM DTT Proteaseinhibitor-Cocktail
Lysepuffer b	10mM Tris/HCl, pH 8,0 20mM EDTA 0,5% (w/v) Aq. bidest

Natriumbutyrat-Lösung (50x)	500mM Natriumbutyrat (steril filtriert, in dH ₂ O)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na ₂ HPO ₄ 1,4mM KH ₂ PO ₄ 1,5mM CaCl ₂ 1,0mM MgCl ₂
Protein-Probenpuffer (2fach)	100 mM Tris-HCl 200mM DTT 20% Glycerin 4 % SDS 0,01% Bromphenolblau
Puffer I (Minipräparation)	20mM Tris-HCl pH7,5 4mM EDTA pH 8,0 40µg/ml Rnase
Puffer II (Minipräparation)	0,2N NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer III (Minipräparation)	3M Kaliumacetat
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris pH 6,8 4 % (w/v) SDS 12 % (w/v) Glycerin 2 % (v/v) "-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Transferpuffer (1X,Westernblot)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Methanol
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) 50x	2,0M Tris pH8,0 0,1M EDTA 1,0M CH ₃ COOH
Trypanblau-Lösung	0,1 % Trypanblau 20% Ethanol

Waschpuffer (Minipräparation)	100mM NaCl 10mM Tris-HCl pH7,5 2,5mM EDTA pH8,0 50% (v/v) Ethanol
Waschpuffer (Western-Blot)	0,1 % Tween-20 in PBS

4.1.8 Zellmedien

<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>
LB-Medium	20g LB Broth Base ad 1L ddH ₂ O
LB-Amp-Medium	100 mg/ml Ampicillin in LB-Medium
LB-Agarplatten	1,6% (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Amp-Agarplatten	1,6 % Agar 100mg/ml Ampicillin in LB-Medium
S.O.C. Medium	2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 10mM Glucose in LB-Medium Sterilfiltration (0,22µm Sterilfilter)
MEM-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 500µg/ml L(+)-Glutamin 100µg/ml Penicillin/Streptomycin in MEM (Modified eagle's Medium)
DMEM-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)

	100µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium)
RPMI-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100µg/ml Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640 (Rosswell Park Memorial Institute Medium)
F12 K-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100µg/ml Penicillin/Streptomycin in F12K (Nutrient Mixture Kaighn's Modification)
DMEM/HAM's F12-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM/HAM's F12
MEM with Earle's Salts-Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100µg/ml Penicillin/Streptomycin in MEM with Earle's Salts

4.1.9 Zelllinien

Die Zelllinien wurden von dem Kooperationspartner PD Dr. C. Scheller (Institut für Virologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die primären humanen Mesenchymzellen (hMSC und hMSC-Tert) stammten aus dem Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung am König Ludwig Haus in Würzburg und wurden freundlicherweise von Dr. A. Steinert zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Eigenschaften	Bezugsquelle	Kultur
-----------	---------------	--------------	--------

Adhärente Zellen

293T	Abgeleitet von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293), exprimieren zusätzlich das große T-Antigen des SV40	ATCC	MEM 10%
HT-1080	Humane Fibrosarkomzellen	ATCC	DMEM 10%
AAV-293	Abgeleitet von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293), exprimieren zusätzlich das adenovirale E1-Gen, verwendet zur rAAV-Produktion	Stratagene	DMEM 10%

AAV-HT-1080	Abgeleitet von HT-1080, verwendet zur Infektion mit rAAVs	Stratagene	DMEM 10%
SK-N-SH	humane Neuroblastomzellen		DMEM 10%
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen		DMEM 10%
CRL-2242	immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters; Xylosyltransferase I defizient, so dass keine Proteoglycane produziert werden	ATCC	F12K 10%
CHO-K1	immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters	ATCC	F12K 10%
BHK-21	Fibroblastomzellen aus der Hamsterniere		DMEM 10%
HepG2	Humane Leberkarzinom Epithelzellen		DMEM 10%
CRFKL	Epithelzellen aus der Katzeniere		DMEM 10%
COS-7	Nierenfibroblastomzellen der grünen Meerkatze; exprimieren zusätzlich das große T-Antigen des SV40		DMEM 10%
hMSC	Primäre humane Mesenchymale Stammzellen	(KLH)	DMEM/Ham's F12 10%
MRC	Humane Lungenfibroblastomzellen		DMEM 10%
hMSC-Tert	Humane Mesenchymale Stammzellen	(KLH)	MEM with Earles Salts 10%
<u>Suspensionszellen</u>			
Jurkat E6-1	Humane T-Lymphomzellen	NIH	RPMI 1640 10 %
Raji	Burkitt-Lymphom-Zellen		RPMI 1640 10 %

A3.01	Humane T-Lymphoblasten	NIH	RPMI 1640 10 %
H9	Humane Lymphom-Zellen		RPMI 1640 10 %

4.1.10 Bakterien

Bezeichnung	Stamm	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	TOP10F'	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	XL-2 Blue	Stratagene

4.1.11 Plasmidvektoren

Bezeichnung	Beschreibung/ Eigenschaften	Bezugsquelle
pAAV-hrGFP	Teil des AAV Helper-Free Systems; verfügt über AAV-2 ITR Sequenzen; exprimiert hrGFP unter Kontrolle des CMVPromotors	Stratagene
pAAV-hrGFP-CpoT7	abgeleitet von pAAV-hrGFP; enthält Expressions-kassette für shRNAs mit folgender Orientierung: CpoI-T7-U6-shRNA-2.0rev-Eco91I	AG Scheller
pAAV-hrGFP-EcoT7	abgeleitet von pAAV-hrGFP; enthält Expressions-kassette für shRNAs mit folgender Orientierung: CpoI-2.0rev-shRNAU6-T7-Eco91I	AG Scheller
pAAV-IRES-hrGFP	Teil des AAV Helper-Free-Systems, verfügt über AAV-2 ITR-Sequenzen, exprimiert hrGFP über eine IRES	Stratagene
pHelper	Teil des AAV Helper-Free Systems; kodiert für die adenoviralen Gene VA, E2A und E4; Ampicillinresistenz	Stratagene
pAAV-RC	Teil des AAV Helper-Free Systems; exprimiert AAV-2 <i>rep</i> und <i>cap</i> ; Ampicillinresistenz	Stratagene
psiCHECK™-2	Reportervektor zur Analyse der RNAi-Effizienz; <i>Renilla</i> -Luciferase unter Kontrolle des SV40-Promotors; <i>Firefly</i> -Luciferase unter Kontrolle des HSVTK-Promotors; Ampicillinresistenz	Promega
pSilencer™2.0-U6	Expressionsvektor für shRNAs; humaner RNA-Polymerase III Promotor U6; Ampicillinresistenz	Ambion

pMD09-hrGFP (BF014)	Foamyvirales Expressionsplasmid; exprimiert hrGFP unter Kontrolle des U3-Promotors; Ampicillinresistenz	AG Scheller
pcziGag2	Verpackungsplasmid für foamyvirales Vektorsystem; kodiert für <i>Gag</i>	AG Rethwilm
pcziPol	Verpackungsplasmid für foamyvirales Vektorsystem; kodiert für <i>Pol</i>	AG Rethwilm
pcziHFVenv012	Verpackungsplasmid für foamyvirales Vektorsystem; kodiert für <i>Env</i>	AG Rethwilm
pcDNA3.1 (+)	Expressionsvektor unter Kontrolle eines CMV-Promotors, repliziert episomal in Zellen, die latent mit SV40 infiziert sind oder das SV40 große T Antigen exprimieren; Neomycin- und Ampicillinresistenz	Invitrogen
p _{max} -GFP	Kontrollvektor; exprimiert GFP	Amara
pCMV-XL4-hADAM10_full	Vektor zur Amplifikation von ADAM-10; Ampicillinresistenz	OriGene
pTW01-IRES	Variante des foamyviralen pMD09-Plasmids; enthält IRES und verkürzte CASII	AG Rethwilm
pPS01	pTW01-IRES mit mRFP	AG Scheller

4.1.12 Primer und Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide und Primer wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert und entsalzt. Die Oligonukleotidmatrizen der shRNAs und Kurzzielsequenzen wurden mit 5'-Phosphorylierung (P) bei Sigma-Aldrich und MolBiol bestellt. Primer kamen bei Klonierungen, Sequenzierungen und Genexpressionsanalysen in Form von Real-Time PCR-Anwendungen zum Einsatz. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung in den folgenden Tabelle aufgelistet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.1.12.1 Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
stADAM fw <i>XhoI</i>	CATCTCGAGGGATCGATGTGCTGCTGTTAAC	Klonierung des ESTclones
stADAM rev <i>NotI</i>	CATGCGGCCGCGCAGAAAGGTAAATTGATTTTC	hADAM10 in psiCheck-2
hADAM10full fw <i>XhoI</i>	CATCTCGAGACCATGGTGTGCTGAGAGTG	Klonierung des hADAM10
hADAM10full rev <i>XhoI</i>	CATCTCGAGCTCTTTAAAATGCCAATTATTAC	(445-3972 bp) in pcDNA3.1+

hADAM10full fw <i>Xho</i> I	s.o.	Klonierung des hADAM10
hADAM10full rev Eco47III	CCATAGCGCTCTCTTTAAAATGCC	(445-3972 bp) in pPS01
hADAM10 full fw <i>Xho</i> I	s.o.	Klonierung des hADAM10
hADAM10cds rev Eco47III	CCATAGCGCTTTAGCGTCTCATGTGTCCC	(445-28... bp) in PS01
mRFP_AgeI fw	TATAACCGGTATGGCCTCCTCCGAGGAC	Klonierung von mRFP in
mRFP_NotI rev	TATAGCGGCCGCTTAGGCGCCGGTGGAGTG	pTW01-IRES

4.1.12.2 Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
T7 2.0rev	TAATACGACTCACTATAGG AGGCGATTAAGTTGGGTA	U6+shRNA in pSilencer/pAAV
Seq AAV-Hin1 Seq AAV-Ruc1 Seq AAV-Hin2 Seq AAV-Ruc2	TGGGATTACAGGCGTGAACC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC ACCTTGGCCTCCCAAATTGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAAC	U6+shRNA in pAAV
Seq psiCheck2 MCS 1574-1593 Seq psiCheck2 MCS 1551-1570 Seq psiCheck2 MCS 1864-1845 rev	AAATGGGTAAGTACATCAAG CAGCCAGGAGGACGCTCCAG CACCAAGACCAAACCCCGAG	Zielsequenzen in psiCheck-2
pcDNA3.1 FW pcDNA3.1 REV	CCACTGCTTACTGGCTTATCG AAACAACAGATGGCTGGCAAC	Zielsequenzen in pcDNA3.1+
pCMV6-XL4 VP1.5 pCMV6-XL4 XL39	NA	Vektorprimer für pCMV6- XL4 (Origene)
hADAM10cds 240-260 rev hADAM10cds 407-425 fw hADAM10cds 841-860 fw hADAM10cds 1366-1387 fw hADAM10cds 1844-1802 fw hADAM10full 2707-2726 fw hADAM10full 3101-3122 fw hADAM10full 3509-3529 fw	AAGTGTCCCTCTTCATTCGTAG ATGTTGAGCCAGCAGAGAG GCTGATGAGAAGGACCCTAC GGCCAACCTATTTGTGGAAATG GGAGTAGGCACTTCAGTGG TGGTTCTTCCTAGTGCCTAC CAACATTGGAGACATCACTTGC TGTCTGGTTTCTGCTTACGTC	Kodierende Sequenz hADAM10
Fw_IRES-mRFP 1 Fw_IRES-mRFP2 Fw_IRES-mRFP3	GCGACAGGTGCCTCTGCGGCC CCCAGACCGCCAAGCTGAAGG CATGGCCAAGAAGCCCGTGCAG	IRES und mRFP Sequenz

4.1.12.3 Real-Time PCR Primer

Bezeichnung	Zielgen
HS_ADAM10_1_SG QuantiTect Primer Assay	hADAM10
β -Aktin_QuantiTect Primer Assay	β -Aktin
Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Custom Assay	GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

4.1.12.4 Oligonukleotidmatrizen für shRNAs und Kurzzielsequenzen

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
KT1_hADAM10 sense KT1_hADAM10 anti	P-TCGAGAGAAAAAATGGCAAGAGATCATAT CCTCAGACCAGGTGGAATTACTIONTAGC P-GGCCCGCTAAGTAATTCCACCTGGTCTGAG GATATGATCTCTTGCCATTTTTCTC	Klonierung hADAM10-Kurzziel1 in psiCheck-2
KT2_hADAM10 sense KT2_hADAM10 anti	P-TCGAGACAAAGTCTTAGAATATTATTATGT GCCCCGTGTTCCCTGTTCTTCGTGC P-GGCCGCACGAAGAACAGGGAACACGGGGC ACATAATAATATTCTAAGACTTTGTC	Klonierung hADAM10-Kurzziel2 in psiCheck-2
KT3_hADAM10 sense KT3_hADAM10 anti	P-TCGAGCTCGACCACCTCAACATTGGAGACA TCACTTGCCAATGTACATACCTTGC P-GGCCGCAAGGTATGTACATTGGCAAGTGA TGTCTCCAATGTTGAGGTGGTCGAGC	Klonierung hADAM10-Kurzziel3 in psiCheck-2
KT4_hADAM10 sense KT4_hADAM10 anti	P-TCGAGCCATGCCCATGGAAGACATTTCAACC TACGAATGAAGA GGGACACTTCGC P-GGCCGCGAAGTGTCCCTCTTCATTTCGTAGGTT GAAATGTCTTCCATGGGCATGGC	Klonierung hADAM10-Kurzziel4 in psiCheck-2
shRNA1_hADAM10 sense shRNA1_hADAM10 anti	5'-P-GATCCGAGATCATATCCTCAGACCTTCAAG AGAGGTCTGAGGATATGATCTCTTTTTTGGAAA-3' 5'-P-AGCTTTTTCCAAAAAAGAGATCATATCCTCAG ACCTCTCTTGAAGGTCTGAGGATATGATCTCG-3'	Klonierung hADAM- spezifischer shRNA1 in pSilencer
shRNA2_hADAM10 sense shRNA2_hADAM10 anti	5'-P-GATCCGTATTATTATGTGCCCGTGTTC AAGA GACACGGGGCACATAATAATTTTTTGGAAA-3' 5'-P-AGCTTTTTCCAAAAAATATTATTATGTGCCCC GTGTCTCTTGAACACGGGGCACATAATAATACG-3'	Klonierung hADAM- spezifischer shRNA2 in pSilencer

shRNA3_hADAM10 sense	5'-P-GATCCGCATTGGAGACATCACTTGCTTCAA GAGAGCAAGTGATGTCTCCAATGTTTTTGGAAA-3'	Klonierung hADAM-spezifischer
shRNA3_hADAM10 anti	5'-P-AGCTTTTCCAAAAACATTGGAGACATCACTT GCTCTCTTGAAGCAAGTGATGTCTCCAATGCG-3'	shRNA3 in pSilencer
shRNA4_hADAM10 sense	5'P-GATCCGACATTTCAACCTACGAATTTCAAGA GAATTCGTAGGTTGAAATGTCTTTTTTGGAAA-3'	Klonierung hADAM-spezifischer
shRNA4_hADAM10 anti	5'-P-AGCTTTTCCAAAAAGACATTTCAACCTACGA ATTCTCTTGAAATTCGTAGGTTGAAATGTGCG-3'	shRNA4 in pSilencer

4.1.13 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Firma
Anti-GAPDH (Kaninchen, polyklonal)	Ladekontrolle, Westernblot	Imgenex
Anti- β Aktin (Kaninchen, polyklonal)	Ladekontrolle, Westernblot	Imgenex
Anti-Biotin, HRP-linked Antibody	Detektionsantikörper für Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP Konjugat	Sekundärantikörper, Westernblot	BioRad
Anti-Maus IgG (H+L)-HRP Konjugat	Sekundärantikörper, Westernblot	BioRad
anti-ADAM10 [11G2] (Maus, monoklonal)	Detektion von hADAM10, Western-Blot, Durchflusszytometrie	Abcam
anti-Alzheimer Precursor Protein A4 (mouse, monoklonal; Klon: 22C11)	Detektion von APP, Western-Blot	Chemicon
Anti-Human β -Amyloid [1-17] (Maus, monoklonal;Klon: 6E10)	Detektion von sAPP α , Western-Blot, ELISA	Sigma
Anti-APP (A β NT), rabbit polyclonal	Detektion von sAPP α , Western-Blot	Biomol
Monoclonal Anti-Heparan Sulfate (10E4 Epitop;Klon: F58-10E4)	Detektion von Heparansulfat, Durchflusszytometrie	Seikagaku America
Purified Mouse IgM, k Isotype Control (Klon: C48-6)	Kontrolle für die Detektion von Heparansulfat, Durchflusszytometrie	BD Pharmingen
PE Rat Anti-Mouse IgM (Klon:R6-60.2)	Sekundärantikörper, Durchflusszytometrie	BD Pharmingen

4.1.14 ELISA/Assay-Kits

Kit	Firma
Human APP ELISA development Kit, Duoset	R&D Systems

CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Promega

AAV-2-Titration-ELISA Promega

4.1.15 Mauslinien

4.1.15.1 Inzuchtstamm C57BL/6 (WT)

Bei C57BL/6 handelt es sich um einen häufig verwendeten wildtypische Inzuchtstamm. Er stammt aus dem Bestand von Abby Lathrop und wurde von C.C. Little im Jahr 1921 entwickelt.

4.1.15.2 Transgene Stamm B6.Cg-Tg(PDGFB-APP_{SwInd}) 20Lms/2J

Für spätere geplante Tierversuche wurde der transgene Stamm B6.Cg-Tg(PDGFB-APP_{SwInd}) 20Lms/2J ausgesucht. Die Generierung dieser Linie erfolgte auf dem C57BL/6 Wildtyp Hintergrund. Dieser transgene Stamm enthält eine Mutante des APP, die sowohl die schwedische (K670N/M671L) als auch die indische (V717F) Mutation trägt (APP_{SwInd}). Die Expression dieses Transgens steht unter der Kontrolle des human platelet-derived Wachstumsfaktor β polypeptid, simian sarcoma viral oncogene homolog promotor (PDGFB) und erfolgt in Neuronen des Gehirns, v.a. im Neokortex und Hippocampus. Es ist beschrieben, dass diese transgenen Mäuse ab dem 5-7 Monat diffuse A β Plaques im Dentate Gyrus und Neocortex aufweisen und nach 8-10 Monaten amyloide Ablagerungen in allen transgenen Mäusen nachweisbar sind.

4.1.16 Computerprogramme und Internetseiten

<i>Programm</i>	<i>Internetseite/ Firma</i>
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc.
Ambion siRNA Design Algorithmus	http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html
Ape-A Plasmid Editor	M. Wayne Davis
Cell Quest Pro 3	Becton&Dickinson
Entrez PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
Endnote 5.0	ResearchSoft
Fermentats Double Digest	http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html
GraphPad Prism 4.00	© 1992-2003 GraphPad Software, Inc.
iCycler iQ Software	BioRad
Image J	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Microsoft Office 2004 Mac	Microsoft
NCBI-Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace
The Mouse Brain Library	www.mbl.org

Promega siRNA Design Algorithmus	http://www.promega.com/siRNADesigner/program/
Sigma-Aldrich	http://www.sigmaaldrich.com
Synelisa 5.0 D	Pharmacia & Upjohn Diagnostics
Unicorn (HPLC-Software)	
Vektorkartendesign	Vektor NTI, Invitrogen

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien, mit denen in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurde, wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Zufuhr kultiviert.

4.2.1.1 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden in Einfriermedium in einem Gefäß in flüssigem Stickstoff gelagert. Nachdem die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut wurden, wurden sie vorsichtig unmittelbar in ein Schraubverschlussröhrchen, in das 6ml vorgewärmtes Zellkulturmedium vorgelegt wurden, pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten mit 1.200rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit warmen Medium wurde das Zellpellet mit mindestens 10 ml Zellkulturmedium verdünnt und anschließend in eine geeignete Zellkulturflasche überführt.

4.2.1.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Die Zellen (ca. 2 Millionen Zellen/Kryoröhrchen) wurden in einem Einfriermedium bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO eingefroren. Hierzu wurden die Lösungen vorab auf Eis gekühlt und 500µl /Kryoröhrchen einer Lösung bestehend aus 80% FCS und 20% FCS vorgelegt. Die betreffende Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 100% FCS resuspendiert. Anschließend wurde ein äquivalentes Volumen zu der Vorlage in die Kryoröhrchen zugegeben. Um eine langsame und stufenweise Temperaturabnahme zu erzielen, wurden die so präparierten Zellen in den Kryoröhrchen zunächst in Einfrierboxen, die Isopropanol in ihrem Mantel enthielten, für 24h bei -80°C gelagert. Danach wurden die Proben in einen Stickstofftank überführt.

4.2.1.3 Passagieren adhärenter Zellen

Nachdem das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt wurde, wurden die Zellen mit 1-6 ml PBS je nach Größe der Flasche gewaschen und anschließend durch Zugabe von ca. 1-6 ml ATV und Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 3 min abgelöst. Danach wurde mindestens ein äquimolares Volumen an Medium dazugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelldichte gesplittet. Um die Zellen zu kultivieren, wurden adhärenente Zellen routinemäßig zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 je nach Zellart passagiert.

4.2.1.4 Passagieren von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden zweimal in der Woche in ein geeignetes Schraubverschlussröhrchen gegeben und für 3 Minuten mit 1.200rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie mit frischem Medium in der Regel im Verhältnis 1:20 passagiert.

4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Um die Lebenszellendichte zu bestimmen wurden 50µl einer gut homogenisierten Zellsuspension mit Trypanblaulösung (25% Trypanblau und 75% PBS) im Verhältnis 1 : 4 versetzt.

Da Trypanblau aufgrund defekter Zellmembranen eindringen und an Proteine im Zellinneren binden kann, wurden tote Zellen blau eingefärbt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Hierzu wurde zunächst die Zählkammer mit einem passenden Deckglas so abgedichtet, dass Newtonsche Ringe zu sehen waren. Dies gewährleistet, dass der Abstand zwischen Deckglas und Kammer bei 0,1mm liegt und die Messung ordentlich ausgeführt werden kann.

Nachdem die präparierte Zellsuspension seitlich aufpipettiert wurde, wurde sie durch Kapillarkräfte in den definierten Raum zwischen Deckglas und Kammer gesogen. Nun wurden mit Hilfe des Mikroskops die Anzahl der Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Da die Fläche des Quadrats (1mm²) und der Abstand zwischen Deckglas und Kammer (0,1 mm) definiert ist, konnte die Zelldichte pro Milliliter mittels der folgenden Formel bestimmt werden.

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4$$

D: Zelldichte in der Kultur [Zellen/ml], N: gezählte Zellen, Q: Anzahl der ausgezählten Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10⁴:Volumenfaktor für die Umrechnung von Zellen/µl (Volumen pro Großquadrat: 0,1mm³) auf Zellen/ml

4.2.1.6 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Das Einbringen fremder DNA in eukaryotische Zellen mit Hilfe eines Reagenz wird als Transfektion bezeichnet. Da die in den eukaryotischen Zellen eingebrachte Fremd-DNA im Laufe der Zellteilungen verloren geht, handelt es sich um eine transiente Transfektionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde Polyethylenimin (PEI), ein kationisches Polymer als Transfektionsreagenz eingesetzt. Aufgrund seiner hohen positiven Ladungsdichte bindet es Nukleinsäuren. Die so ausgebildeten DNA-Polykationen-Komplexe werden via Endozytose von der Zelle aufgenommen. Aufgrund des „Protonsponge-Effekt“ des Polykations erfolgt keine intrazelluläre Degradierung, wodurch ein effizienter Gentransfer stattfinden kann (Boussif *et al.*, 1995, Kircheis *et al.* 1997).

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Am Tag danach erfolgte nach Feststellung der Vitalität und einer 80%-Konfluenz der Zellen mittels Lichtmikroskop die Transfektion. Hierzu wurden eine PEI- und eine DNA-Lösung angesetzt. Diese wurden anschließend zügig zusammen gegeben, gut durchmischt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde gewechselt und nach Ablauf der Inkubationszeit der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen aufgetropft.

Um die Genexpression zu erhöhen, wurde nach weiteren 24 Stunden bei Plasmiden, die über einen CMV-Promotor verfügten, eine Natriumbutyratinduktion durchgeführt (Soneoka *et al.* 1995). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für weitere Versuche verwendet.

Die genaue Durchführung der Transfektion zeigt folgendes Pipettierschema:

Tag 1

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß			
			12-Loch Platte	6-Loch Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	293T oder AAV 293 Zellen ausplattieren; 10% DMEM	Zellen / Loch od. Schale	$4,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	12×10^6
		Medium / Loch od. Schale	1ml	1,7ml	5ml	10ml

Tag 2

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß			
			12-Loch Platte	6-Loch Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	PEI Lsg. ansetzen	PEI (1 mg/ml)	3,6µl	6µl	18µl	45µl
		Medium ohne Zusätze	46,4µl	77,5µl	232µl	955µl
2.	DNA Lsg. ansetzen	Gesamt DNA	1,2µg	2µg	6µg	15µg

		Medium ohne Zusätze	48,8µl	81,5µl	244µl	985µl
3.	PEI Lsg. zu DNA Lsg zügig zugeben und gut mischen	PEI Lsg.	50µl	83,5µl	250µl	1000µl
		DNA Lsg.	50µl	83µl	250µl	1000µl
4.	Gemisch 15-30 min bei RT inkubieren					
5.	Medium von Zellen entfernen					
6.	Medium mit FCS auf Zellen geben	ml Medium	0,5ml	0,833ml	2,5 ml	4ml
		% FCS	12%	12%	12%	15%
7.	Transfektions Mix zu den Zellen geben		0,1ml	0,167ml	0,5ml	2ml
8.	Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren					

Tag 3:

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß			
			12- Loch Platte	6- Loch Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	Natriumbutyrat-Induktion (Endkonzentration 10mM)	20µl Na-Bu (500mM) / ml Medium	12µl	20µl	60µl	120µl
3.	6-8 h bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren					
4.	Medium von Zellen entfernen					
5.	Medium mit FCS auf Zellen geben	ml Medium	0,6ml	1,0ml	3,0ml	5ml
		% FCS	10%	10%	10%	10%
6.	Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren					

4.2.1.7 Produktion von AAV-Partikeln in eukaryotischen Zellen

Da es sich bei den adeno-assoziierten Vektoren (AAV) um replikationsdefiziente Satellitenviren handelt, ist eine produktive Infektion nur bei Coinfektion mit einem Helfervirus möglich. Aber mit Hilfe des AAV Helper-Free System (Stratagene) können infektiöse rekombinante humane AAV-2 Virionen ohne ein Helfervirus hergestellt werden. Die zur Bildung infektiöser AAV-Partikel benötigten Adenovirusprodukte, werden durch Cotransfektion des rekombinanten pAAV-hrGFP mit dem pHELPER (E2A, E4, VA-RNA)-und pAAV-RC (rep- und cap-Gene)-Plasmid bereitgestellt. Um AAV-Vektorpartikel herzustellen, wurden $11 \cdot 10^6$ 293AAV-Zellen in 10ml Medium in eine 20cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit je 20µg der Plasmide pAAV-hrGFP, pAAVRC und pHelper sowie PEI als Transfektionsreagenz. Da pAAV-hrGFP für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) codiert, fluoreszieren positiv transfizierte Zellen bei

Anregung mit 488nm grün. Daher konnte der Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls mit FACS-Analyse bestimmt werden.

Vier Tage nach der Transfektion wurden die Vektorpartikel je nach Versuchsziel auf zwei verschiedene Arten gewonnen. Zunächst wurden die Zellen mit dem Kulturmedium vom Boden der Kulturschale gelöst. Da sich der Großteil der Partikel in den Zellen befindet, wurde , um möglichst eine konzentrierte Lösung an AAV-Partikel zu gewinnen, die geerntete Zellsuspension bei 1200rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nach einem Waschschritt mit 1ml PBS, in 500µl DMEM10 resuspendiert.

Um die AAV-Partikel aus den Zellen zu gewinnen, wurden diese aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt im Anschluss im 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut (freeze and thaw). Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurden die Zellbruchstücke bei 1200rpm für 3 min sedimentiert und der Überstand, der die Partikel enthielt, abgenommen, gegeben falls der Virustiter bestimmt und bei -80°C für weitere Versuche aliquotiert gelagert.

Um möglichst viel Volumen mit vielen Partikeln zu erhalten, wurden nach der Ernte sowohl Überstand als auch Zellen zusammen einem zweimaligen freeze and thaw -Prozess unterzogen. Dann wurden ebenfalls die Zellbruchstücke mittels Zentrifugation abgetrennt. Der gewonnene Überstand, der die Partikel aus dem Überstand und die aus den Zellen freigesetzten Partikel enthält , wurde wie oben beschrieben fortgeföhren.

4.2.1.8 Produktion von FV-Partikeln in eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung foamyvirale Partikel wurden $8 \cdot 10^6$ 293T Zellen in 9ml Medium in eine 10cm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Da foamyvirale Vektorpartikel nur eine Replikationsrunde durchlaufen können, wurde zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln ein 4-Vektorsystem verwendet. Die drei Expressionsplasmide pcziGag2, pcziPol, pczHFVenv02 kodierten entsprechend für das FV Gag, Pol und Env Protein. Der vierte Expressionsvektor pMD09 kodierte für eine verpackbare RNA und zusätzlich für das unter einem separaten Promotor getriebenen Markergen EGFP. (Heinkelein *et al.* 2002a).

Die Transfektion erfolgte im Verhältnis 5:1:1:10. Als Transfektionsreagenz diente PEI. Da es sich bei den vier Vektoren um CMV-Promotor getriebene Plasmide handelt, erfolgte am darauffolgenden Tag die Induktion mit 180µl Natrium-Butyrat .6-8 Stunden später wurde das Medium durch frisches ersetzt. Zwei Tage später wurden die Vektorpartikel geerntet, indem der Überstand abgenommen und durch einen 0,45µM-Sterilfilter filtriert wurde. Bevor die Vektorpartikel bei -80°C eingefroren wurden, wurde die Transduktionseffizienz via Durchflusszytometrie ermittelt.

4.2.1.9 Bestimmung des Virustiters

Um die Infektiosität der erzeugten Viruspartikelsuspension zu charakterisieren, wurden HT1080-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Viruspartikeln transduziert. Hierzu wurde eine dekadische Verdünnungsreihe (meistens 10^0 - 10^{-5}) der Suspension mit Kulturmedium erstellt und auf die einen Tag zuvor ausgesäten Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ eine gewisse Zeitspanne (meistens 1h oder bis zum Tag der Ernte) inkubiert. Im Falle der AAV-Partikel erfolgte dies in einer 12 Lochplatte mit 10^4 je Vertiefung in einem Volumen von einem Milliliter. Bei foamyviralen Partikeln kamen 96 Lochplatten zum Einsatz, in die pro Vertiefung 10^3 Zellen in einem Volumen von 100µl ausgesät wurden. Wurde die Inkubationszeit bereits vor der Messung beendet, wurde die Virussuspension entfernt, die Zellen mit Medium mindestens 2 mal gewaschen und frische Medium hinzugegeben. Nach 3-4 Tagen wurde die Transduktionseffizienz vor der Ernte mittels Fluoreszenzmikroskop überprüft und dokumentiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt. Je nach Größe des Loches wurden 50-500µl ATV auf die Zellen gegeben und für 3 min im Brutschrank trypsinisiert. Nachdem sich die Zellen gelöst haben, wurde ihnen zur Inaktivierung der trypsinisierenden Wirkung des ATV eine adäquate Menge an Kulturmedium zugegeben und in ein FACS Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie vorbereitet und anschließend damit analysiert.

4.2.1.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optisches Messverfahren, dass nicht nur Anzahl der Zellen in einer Suspension bestimmt, sondern auch Zellgröße, Granularität oder andere spezifische Merkmale (z.B. Markergenexpression) erkennt.

Die Zellen werden in eine dünne Kapillare gesogen und während die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren, kommt es abhängig von Zellgröße und -granularität zur Beugung bzw. Brechung des Lichts. Dabei entsteht das (FSC = Vorwärtsstreulicht) bzw. *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht).

Gleichzeitig können auch Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden. Meist setzt man hierzu Farbstoffe ein, die sich in der DNA der Zelle einlagern oder die als Marker eines Antikörpers, die an bestimmte Oberflächenproteine der Zelle binden, fungieren. Die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe hängt dabei von der Laser- und Filterausstattung des Gerätes ab. Das emittierte Licht wird von Photodetektoren und Fluoreszenzdetektoren gemessenen und mit Hilfe eines Software Programmes dokumentiert (hier: FACSCalibur und Cell Quest Pro 3 (Becton & Dickinson)). Wenn das Gerät in der Lage ist, nach diesen spezifischen Eigenschaften zu sortieren, ohne dass dabei die Zellen verloren gehen, wird die Analyse als FACS (Fluoreszenz activated cell-sorting) bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für den Nachweis der Expression des enhanced green fluorescent protein (EGFP) sowie des monomeric red fluorescent protein (mRFP), zur Lebend-Tod-Färbung und zur Detektion des Heparins auf der Zelloberfläche eingesetzt. Direkt vor der Messung wurde jede Probe kurz leicht gevortext. Zur Standardisierung wurde die Analyse nach Erreichen einer zuvor eingestellten Zellzahl (meist 10000) automatisch beendet. Bei der Auswertung wurden die Zellen, die in der FSC/SSC-Analyse innerhalb der Lebendzell-Population lagen und stets die Negativkontrolle berücksichtigt.

4.2.1.11 Nachweis der GFP/mrfp-Expression

Der Erfolg und die Effizienz der Transfektionsexperimente und Virustiterbestimmungen, bei denen Vektoren, die für ein fluoreszierendes Protein kodierten, beteiligt waren, wurde nach Überprüfung der Expression der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskop mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Zur Messung wurden die betreffenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit ATV 3 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit Kulturmedium mit 10%FCS versetzt, um die Wirkung des ATV zu inaktivieren. . Danach wurden sie in FACS-Röhrchen überführt und gegebenenfalls für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50-300µl Medium resuspendiert oder mit 50 bis 100µl 2% Formalinlösung fixiert. Im Anschluss erfolgte die Messung und Auswertung am Durchflusszytometer. Die fixierten Proben konnten bis zur Messung auch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4.2.1.12 Lebend-Tod-Färbung mit 7-AAD und Annexin-V-FITC

Um die Anzahl der toten bzw. lebenden Zellen im Cytotoxizitätstest zu bestimmen, wurden die Zellen mit den Farbstoffen 7-Aminoactinomycin D und Annexin -V-FITC angefärbt.

7-AAD wird den Avitalfarbstoffen zugeordnet. Er interkaliert unter Veränderung seiner Fluoreszenzeigenschaft bei Zellen spezifisch zwischen Cytosin und Guanin der zellulären DNA (Chen Chiao *et al.* 1979, Philpott *et al.* 1996, Rojewski 2002). Bei lebenden Zellen ist jedoch das Eindringen durch eine intakte Zellwand nicht möglich. Auch bei apoptotischen Vorgängen bleibt die Permeabilitätsschranke in Form der Zellmembran aber intakt. Aufgrund nekrotischer Vorgänge kommt es jedoch zu Schädigungen der Zellwand, so dass der Farbstoff diffundieren kann (Schmid 1994a, Rojewski 2002).

Um auch Zellen, die sich in der frühen apoptotischen Phase befinden, zu erfassen, wurde eine Doppelfärbung der Zellen mit einem zweiten Farbstoff Annexin-V-FITC durchgeführt. Hierbei spielt die Bindung von Annexin-V (in Gegenwart von Calcium-Ionen) an Phosphatidylserin (PS) an eine wesentliche Rolle. Denn PS kommt in vitalen Zellen nur in der dem Cytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran vor (Castedo *et al.* 1996, Rojewski, 2002). Doch bereits in den frühen

Stadien der Apoptose kommt es durch bestimmte Stimuli, zu einer Änderung der Phospholipidanordnung, so dass sich Phosphatidylserin in dieser Phase auch auf der extrazellulären Seite befindet (PS-flip) (Adayev *et al.* 1998). Somit können diese Zellen mit Annexin-V markiert werden. Die Markierung mit FITC erlaubte eine durchflusscytometrische Analyse. Da 7-AAD im roten Bereich und Annexin-V-FITC im grünen Bereich absorbieren, ist eine Doppelfärbung und eine anschließende Messung mit dem Durchflusscytometer möglich.

Mit dieser Methode war somit nicht nur Anzahl der toten/bzw. lebend Zellen bestimmbar, sondern sie bietet aufgrund der Doppelfärbung mit 7-AAD und Annexin-V-FITC weiter die Möglichkeit zwischen Apoptose und Nekrose zu differenzieren (Rojewski 2002). Mit Hilfe des Auswertungsprogramms der Durchflusszytometrie wurden die vier Ergebnismöglichkeiten der Doppelfärbung in vier Bereichen dargestellt. Der erste Bereich zeigt die lebenden Zellen (Annexin-V-neg. + 7-AAD-neg.) der zweite Bereich die nekrotischen Zellen (Annexin-V-neg. + 7-AAD-pos) der dritte Bereich und vierte die spät (Annexin-V-pos. + 7-AAD-pos.) bzw. früh apoptotischen Zellen (Annexin-V-pos. + 7-AAD-neg).

Zusätzlich kamen kleine Phycoerythrin markierte Polymethacrylkügelchen (Beads) zum Einsatz, die der Normalisierung der Resultate diente. Da sie mit Phycoerythrin (PE) markiert und von der Zellgröße zu unterscheiden waren, konnten sie mit Hilfe der FACS-Einstellungen separat zur Zellpopulation dargestellt und ausgewertet werden.

Zunächst wurden zur Bestimmung der Cytotoxizität eine Beads-Suspension mit $0,25 \cdot 10^4$ beads per 50 μ l frisch hergestellt. Kurz vor dem Färbevorgang, wurde eine Detektionslösung bestehend aus 1 μ l 7-AAD, 2 μ l Annexin und 50 μ l Beadslösung pro FACS-Röhrchen angesetzt.

24, 48 und 72h Stunden nach Zugabe der Flavonoidlösungen wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen der Pipette gut durchmischt. Je 50 μ l der Zellsuspensionen (entspricht ca. $2,5 \cdot 10^4$ Zellen) wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit je 50 μ l Detektionslösung versetzt. Danach wurde kurz vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert, damit keine Flüssigkeit am Gefäßrand haften blieb. Anschließend folgte die Messung mittels Durchflusszytometer. Nach 10000 gezählten Zellen wurde die Messung automatisch beendet. Unter Berücksichtigung von unbehandelten Zellen wurde bei jeder Messung die Anzahl der lebenden Zellen (Annexin-V-FITC negative/7-AAD-negative) bestimmt und auf die Anzahl der gleichzeitig gemessenen Beads normalisiert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wurde in Triplikaten bestimmt und der Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert der lebenden Zellanzahl der unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Entsprechend wurde die dazugehörige Standardabweichung angepasst.

4.2.1.13 Heparin-Färbung auf der Oberfläche von Zellen (extrazellulär)

Um die Menge an Heparin auf der Oberfläche verschiedener Zellen zu bestimmen, wurden sie extrazellulär mittels eines Primärantikörpers, der an Heparin bindet und einem Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der eine Analyse mit Durchflusszymetrie ermöglicht, behandelt. Als Kontrolle wurde der Primärantikörper durch den Immunglobulin-Antikörper (*Mouse IgM, k Isotype Control*) ersetzt. Die Antikörperlösungen wurden jeweils während des vorherigen Zentrifugationsschritts frisch hergestellt. Und zwar: *Monoclonal Anti-Heparan Sulfate*, F58-10E4: 0,5µl /50µl PBS/ Röhrchen, Kontroll-AK. 1µl /50µl PBS / Röhrchen, der Sekundärantikörper PE rat anti mouse IgM: 2,5µl /50µl PBS / Röhrchen (entspricht jeweils absolut 0,5µg).

Zunächst wurden die Zellen kultiviert und ca. bei gleicher Zelldichte geerntet. Im Anschluss an die Einstellung der Zellzahl auf $1 \cdot 10^5$ /ml wurden je 1ml in ein FACS-Röhrchen (Medium) überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 7 Minuten bei 1200 rpm wurde, um Schwankungen zu vermeiden, der Überstand mittels Saugaparatur schnell und vorsichtig entfernt. Je FACS-Röhrchen wurden 50µl primärer Antikörper direkt auf den Gefäßboden zugegeben. Und anschließend schwach gevortext und verschlossen. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank, erfolgte ein Waschschrift durch Zugabe von 3-4 ml PBS/FACS Röhrchen und ein darauffolgender Zentrifugationsschritt bei 1200rpm für 7 min. Nachdem der Überstand wiederum abgesaugt wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Volumen und Art der Zugabe, sowie Inkubationsdauer und anschließender Waschschrift entsprach den Bedingungen des Primärantikörpers. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 50µl PBS je Röhrchen resuspendiert und mit Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte in Form von Histogrammen. Um die Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde der Quotient der Mean-Werte der Messung und der Mittelwert der Mean-Werte des entsprechenden Kontrollansatzes gebildet. Somit ergab sich bei Zellen ohne Heparin an der Oberfläche ein Faktor von 1.

4.2.1.14 Fluoreszenzmikroskopie

Sofern Plasmide, die für ein fluoreszierende Protein (GFP, mrfp etc.) kodierten an Transfektionversuche und Virustiterbestimmungen beteiligt waren, wurde der Erfolg der Versuche mittels Fluoreszenzmikroskop (DMIRES 2, Leitz) kontrolliert und dokumentiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst in den jeweiligen Kulturschalen bei einer 10-fachen Vergrößerung im Durchlicht betrachtet. Die grün bzw. rot fluoreszierenden Zellen wurden sichtbar, indem man einen optischen Filter, der die zur Anregung des Farbstoffes notwendige Wellenlänge isolierte, einschaltet und gleichzeitig einen Farbteiler betätigt.

4.2.1.15 Zytotoxizitätstests

4.2.1.15.1 Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Flavonoide

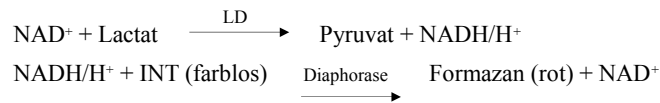
Um bei den Zytotoxizitätstests einen möglichst großen Konzentrationsbereich testen zu können, wurde zunächst die maximale Löslichkeit der einzelnen Testsubstanzen in Zellkulturmedium semiquantitativ bestimmt. Da die Substanzen teilweise sehr schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen, wurden sie hierzu zunächst in DMSO gelöst. In Abhängigkeit der Verbindung wurden, ausgehend von einer Konzentration von 200-1000mM mehrere Lösungen erstellt und zu 37°C warmen RPMI Kulturmedium im Verhältnis 1:200 zugegeben und die Kristallbildung per Mikroskop kontrolliert. Die Flavonoid-Konzentration die sich unter diesen Bedingungen in Kulturmedium löste, d.h. keine Kristalle mehr unter dem Mikroskop sichtbar waren, bzw. die sich hieraus resultierende Endkonzentration wurde als S_{\max} identifiziert.

4.2.1.15.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Flavonoide mittels Durchflusszytometrie

Um die Zytotoxizität der einzelnen Flavonoide auf Jurkat-Zellen zu bestimmen, wurden die so ermittelte Substanzkonzentration in DMSO im Verhältnis 1:200 mit 37°C warmen Medium verdünnt. Der dabei resultierende Anteil an DMSO von 0,5% hatte auch nach 72h keinen Einfluss auf die Zellen. Anschließend wurde hieraus mit RPMI-Medium eine serielle Verdünnungsreihe von S_{\max} bis 0 erstellt. Hierbei wurde gewährleistet, dass die DMSO-Anteil in allen Ansätzen konstant bei 0,5 % lag. Jurkat Zellen (105 Zellen pro Vertiefung) wurden in Triplikaten in einer 96Lochplatte mit den verschiedenen Flavonoidkonzentrationen in einem Volumen von 200µl für 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen der Pipette gut durchmischt und für die Lebend-Tod-Färbung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) und Annexin-V-FITC und anschließender Durchflusszytometrie vorbereitet.

4.2.1.15.3 Bestimmung der Zytotoxizität der Flavonoide mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Test

Um zytotoxische Effekte der Flavonoide auf die adhärenzte Zelllinie SH-SY5Y zu testen, wurde der Assay, CytoTox 96® (Promega) verwendet. Dieser Test beruht auf der Messung der Aktivität der LDH. Dieses Enzym ist in allen Zellen präsent und wird nur in geschädigten oder toten Zellen freigesetzt. Es handelt sich dabei um ein stabiles cytoplasmatisches Enzym, dessen Aktivität anhand der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat gemessen werden kann. Die Reaktionen die schließlich zu dem roten Endprodukt, dessen Absorption gemessen wird, führt sind in folgender Abbildung dargestellt.



Zunächst wurden $1 \cdot 10^5$ bzw. $8 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in einer 96 Lochplatte ausgesät und 24 Stunden mit den jeweiligen Testsubstanzen in Medium mit 10% FCS kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde nach Herstellerprotokoll des CytoTox 96[®] verfahren. Dabei wurden 50µl des Zellkulturüberstandes eingesetzt und mit einem adäquatem Volumen an einer Lösung, die die NAD⁺, Diaphorase und Iodtetrazoliumchlorid (INT) enthielt, versetzt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten unter Lichtausschluss, wurde die Absorption der Proben schließlich bei 490 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente ein mitgelieferter LDH-Standard. Die gemessenen Werte wurden auf die Absorptionsdaten der unbehandelten Zellen normalisiert.

Um den Linearitätsbereich dieses Tests im Bezug auf diese Zelllinie festlegen und Rückschlüsse auf die Anzahl toter Zellen tätigen zu können, erfolgte der externe Abgleich der gemessenen Absorption mit der Zellanzahl. Hierzu wurden $8 \cdot 10^5$ SH-SY5Y Zellen lysiert und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend erfolgte der LDH-Test mit 50µl Probenvolumen. Dies entsprach einer Zellzahl von $6,25 \cdot 10^3$ - $2 \cdot 10^5$. Da die Zellzahl bekannt war, konnte man anhand der Absorption (OD-Werte) die Anzahl toter Zellen in den Experimenten abschätzen.

4.2.1.16 Vorbereitung der sAPP-Experimente

Um den Einfluss der einzelnen Flavonoide auf die sAPP bzw. sAPP α Sekretion mittels WB bzw. ELISA zu bestimmen, wurden zunächst 2fach konzentrierte Flavonidkonzentration in Medium (10 % FCS), mit einem Anteil von 1% DMSO hergestellt. Eine bestimmte Zellzahl wurde in einem Volumen von 100µl Medium (10% FCS) ausgesät und 100µl der 2fach konzentrierte Flavonidkonzentration hinzugegeben. Dadurch ergibt sich ein Gesamtvolumen von 200µl und eine einfache Flavonidkonzentration sowie ein DMSO Anteil von 0,5%. Als Kontrolle diente eine entsprechende Lösung ohne Flavonoid. Die Versuchsansätze erfolgten jeweils in Triplikaten. Nach der Inkubationszeit wurde im Überstand, sAPP und sAPP α mittels WB oder ELISA nachgewiesen und gegeben falls die LDH-Aktivität mittels LDH-Test bestimm

4.2.1.17 Kompetitive Hemmung des replikationsdefizienten foamyviralen Vektors

Um eine kompetitive Hemmung von Heparin (Sigma) bei der Transduktion von foamyviralen Vektoren festzustellen, wurde modifiziert nach Misinzo *et al.* 2006 verfahren. HT-1080-Zellen (1000 pro Vertiefung) wurden in einer 96 Lochplatte am Tag vor dem eigentlichen Versuch ausgesät. Am Tag darauf wurde eine Heparin-Konzentrationsreihe (2,5 mg/ml – 0 mg/ml) in DMEM 0 % frisch hergestellt. Weiterhin wurde eine Virussuspension aufgetaut und eine Verdünnungsreihe ($3,3 \cdot 10^{-1}$ -0) in DMEM 0 % erstellt. Für den Versuchsansatz wurden zunächst Virussuspension und Heparin für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hierzu wurde zunächst eine Stammlösung bestehend aus unverdünntem Virus und 2,5 mg/ml Heparin hergestellt. Ausgehend von dieser wurde eine Verdünnungsreihe von Heparin mit unverdünnter Virussuspension hergestellt. Um verschiedene Virusverdünnungen zu erhalten, wurde danach ausgehend von der jeweiligen Heparin-Konzentration in unverdünnter Virussuspension eine Virusverdünnungsreihe mit der jeweiligen entsprechenden Heparinkonzentration in DMEM 0% erstellt. Nach der Inkubationsdauer wurden jeweils 100 µl dieser Lösungen zu den Zellen gegeben und bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-3 mal mit jeweils ca. 200µl PBS gewaschen und nach Zugabe von 100µl DMEM 10% bis zur Ernte bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Um auszuschließen, dass Heparin Einfluss auf die Zellen hat, z.B. auf die Bindestellen des Virus auf der Zelle) erfolgte parallel ein Kontrollansatz. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 100µl Heparinkonzentration pro Vertiefung (8 Vertiefungen je Konzentration) ersetzt. Nach einer 60 Minuten Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, wurde die Heparinlösung wieder entfernt und wie bei dem eigentlichen Versuchsansatz mit PBS gewaschen. Nach der 60 minütigen Inkubationszeit mit jeweils 100µl Virussuspension pro Vertiefung wurde wieder gewaschen. Im Anschluss wurde mit DMEM 10 % weiter kultiviert. Um den Effekt des Heparins zu verifizieren, wurde ein Versuchsansatz mit CSA an Stelle von Heparin entsprechend durchgeführt.

Alle Ansätze erfolgten jeweils in Triplikaten. Die Analyse wurde mit Durchflusszytometrie durchgeführt und die EC_{50} -Werte der Transduktionsexperimente mit Hilfe von GraphPrism erstellt.

4.2.1.18 Entfernung des Heparins auf der Zelloberfläche mittels Heparinasen

Um das Heparin auf der Zelloberfläche zu entfernen wurde Heparinase I und III verwendet. Es wurde modifiziert nach Misinzo *et al.* 2006 verfahren.

HT-1080-Zellen (1000 pro Vertiefung) wurden in einer 96 Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Heparinasen in ihren entsprechenden Puffern frisch gelöst und in einer Enzymaktivität von 40 U/ml (Heparinase I) und 5 U/ml (Heparinase III) 0 U/ml pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 60 Minuten, wurden die Zellen 2-3 mal mit ca. 200µl PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in Medium erstellt und die Zellen damit tarnduziert.

Wie zuvor wurden sich nach 60 Minuten bei 37°C mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde mit 100µl DMEM 10 % je Vertiefung weiter kultiviert. Alle Ansätze erfolgten jeweils in Triplikaten. Die Analyse wurde mit Durchflusszytometrie durchgeführt und die EC₅₀-Werte der Transduktionsexperimente mit Hilfe von GraphPrism erstellt.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung von Bakterien auf festen Nährböden (Agarplatten)

Zur Gewinnung und Aufbewahrung von Reinkulturen wurden feste Nährmedien in Form von Agarplatten eingesetzt. Um Agarplatten herzustellen wurden 1,6% Agar in LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100µg/ml) zugesetzt. Anschließend wurde diese wässrige Agarsuspension in Petrischalen aus Polystyrol gegossen (ca. 10-15ml/Schale). Nachdem der Agar erstarrt war, wurden die Platten verschlossen und bei 10°C im Kältelabor gelagert. Mit Hilfe der Agarplatten wurde eine Massenkultivierung von Bakterien erreicht. Hierzu wurde ein kleines Volumen Bakteriensuspension (max. 200µl) auf die Oberfläche des Nährbodens pipettiert und mit einem sterilen Spatel oder Glaspipette ausgestrichen. Nachdem die Platten über Nacht (circa 14 bis 18 Stunden) bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden, konnten die entstandenen Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze einzeln gepickt und in flüssiges Nährmedium überführt werden.

4.2.2.2 Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen

Zur Anreicherung von Mikroorganismen sowie zur Gewinnung großer Zellmengen wurden Flüssigkulturen verwendet. Das flüssige Nährmedium wurde aus LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100µg/ml hergestellt. Je nach Verwendungszweck wurden 2,5 ml - 150 ml dieser Lösung in schräg aufgestellte Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben gefüllt. Dabei betrug das Kulturvolumen ca. 20% des Gefäßvolumens. Zur Verbesserung der Belüftungsverhältnisse und einer gleichmäßigen Verteilung von Nährstoffen, Organismen und Sauerstoff wurden sie auf einen Plattformschüttler gestellt und bei 37 °C über Nacht mit einer Frequenz von 150-250 rpm geschüttelt.

4.2.2.3 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur kurz- und mittelfristigen Aufbewahrung wurden kleine Mengen an Flüssigkulturen in Kulturröhrchen überführt, Agarplatten mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Für die dauerhafte Aufbewahrung der verschiedenen Klone wurden Glycerinkulturen angelegt. Zu 150µl einer autoklavierten Glycerollösung, bestehend aus 17% [v/v] Glycerol in LB⁺-Medium, wurden ca. 850 µl Kultur gegeben und bei -80°C gelagert.

4.2.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage Plasmid DNA aufzunehmen. Um diesen Zustand zu erreichen, wurden Bakterien zunächst auf einer ampicillinfreien LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Vorkultur wurden am nächsten Tag zunächst mit einer Kolonie dieser Agarplatte 2ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 200ml LB-Medium beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln (180rpm) bis zu einer Dichte OD₆₀₀ von ca. 0,3 inkubiert. Danach wurden die Bakterien 15 Minuten mit 2.500rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20ml kaltem CaCl₂ resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationschritt mit 2.500rpm bei 4°C für 10 min. Das Pellet wurde erneut in 20ml kaltem CaCl₂ aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden wie zuvor sedimentiert und das Pellet in 5ml kaltem CaCl₂ resuspendiert. Diese Lösung wurde anschließend aliquotiert, mit Hilfe von Trockeneis und Ethanol schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Unter Transformation versteht man in der Molekularbiologie das Einbringen von rekombinanter DNA in Bakterien oder Hefezellen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Vermehrung und anschließender Gewinnung von Plasmid-DNA verschiedene kompetente *E.coli*-Stämme transformiert. 100µl frisch aufgetaute kompetente Bakterien wurden zu 10µl eines Ligationsansatzes (maximal 1ng DNA) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90 Sekunden, eine zwei Minütige Inkubation auf Eis und die Zugabe von 1ml ampicillinfreiem LB-Medium. Zum Aufbau der Resistenzgene wurde die Bakteriensuspension 50 Minuten bei 37°C in einen Schüttelinkubator gestellt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Minuten mit 13.000rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes blieben ca. 100µl im Gefäß zurück. Das Bakterienpellet wurde darin resuspendiert und dann zur Selektion auf einer ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde hier eine 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 verwendet. Die positiv geladenen Natrium-Ionen werden von dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA angezogen. Nach Zugabe von 2,5 Vol 100% eisgekühltem Ethanol und Lagerung bei -20°C für mindestens 15 Minuten, kommt es zur Fällung der DNA . Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm für 30 Minuten. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit 500 µl 80%igen eisgekühlten Ethanol gewaschen und für weitere 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm sedimentiert. Danach wurde das Sediment im Reaktionsgefäß bei 37°C getrocknet. Danach konnte es in sterilem H₂O gelöst werden.

4.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Über die Agarose-Gelelektrophorese werden durch Anlegung einer elektrischen Spannung Moleküle nach ihrer Größen getrennt. Diese analytische Methode wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Größen von Plasmid-DNA, PCR-Produkte und

Restriktionsfragmente verwendet. Zur Erhöhung der Dichte wurden die Proben mit Saccharose haltigen Probenpuffer versetzt. Damit der Verlauf der Wanderung, die aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode verläuft, der Proben im Agarosegel verfolgt werden kann, enthält der Puffer weiterhin den Farbstoff, Bromphenolblau. Um die Bandengrößen bei der Detektion abschätzen zu können, kommen je nach erwarteter Bandengröße verschiedene Größenstandard (Marker) zum Einsatz. Die Detektion der Nukleinsäuremoleküle erfolgte mittels eines Geldokumentationsgerät (INTAS) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der sich in die Basen einlagert und fluoresziert, wenn er mit UV-Licht angeregt wird.

Es wurden 1%ige bzw. 2%ige Agarose-Gel hergestellt. Hierzu wurden 1 g bzw. 2 g Agarose in 100 ml TAE Puffer gegeben und durch Erhitzung in der Mikrowelle für ca. 90 Sekunden gelöst. Das verdunstete Wasser wurde mit dH₂O wieder ausgeglichen. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war und 6 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) hinzugefügt wurde, wurde das Gel in einem Plexiglasschlitten gegossen. Je nach Bedarf wurden dabei ein oder mehrere Kämme mit variabler Anzahl an Taschen eingesetzt. Das nach ungefähr 30 Minuten erstarrte Gel wurde in eine mit TAE und 1% Ethidiumbromid gefüllte Gelkammer gelegt. Es wurden die Kämme entfernt, die Proben mit 6x Probenpuffer versetzt, aufgetragen und eine Spannung von 100-120 V für 45 bis 60 Minuten angelegt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mittels Geldokumentationsgerät.

4.2.3.3 Sequenzierungen

Um die genaue Nukleotidabfolge zu bestimmen, wird DNA sequenziert. Die in der Arbeit verwendete Methode beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchreaktion nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Hier wird neben dNTPs auch Didesoxynukleotiden (ddNTPs), denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt eingebaut eingesetzt. Bei der Sequenzierreaktion entstehen unterschiedlich lange Fragmente, weil beim Einbau der ddNTPs die DNA-Kette nicht mehr verlängert werden kann. Da jedes ddNTP jeweils nukleotidspezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, können mit Hilfe eines Lasers die DNA-Fragmente detektiert und die Sequenz bestimmt werden.

Für die Sequenzierreaktionen wurden Sequenzierprimer im Abstand von 500-700 gewählt, so dass immer ein 300-500 Basenpaar langes DNA Stück sequenziert werden konnte und gewährleistet war, dass das Sequenzergebnis des betreffenden DNA-Abschnitts keine Lücken aufwies. Für die Sequenzierreaktionen wurden Primer und betreffende DNA in eine vorgefertigte Reaktionslösung (BigDye Version 1.1), die Dye-

Terminatoren, Desoxynukleotide, DNA-Polymerase und Puffer enthielt, gegeben und mittels Thermocycler bearbeitet. Pro Primer ergab sich folgender Reaktionsansatz:

3,3 µl DNA

1,0 µl BigDye Version 3.1

0,7 µl Sequenzierprimer

5,0 µl Gesamtvolumen

Thermocyclerprogramm

Denaturierung 96°C / 10 sec

Hybridisierung 50°C / 5sec 25 Zyklen

Elongation 60°C / 4 min

Nach der Synthese der DNA-Einzelstränge wurden die Ansätze bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung und die Sequenzierung wurde von der Diagnostikabteilung unseres Institutes mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. durchgeführt.

4.2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

Im Anschluss an die Lyse erfolgte die Entfernung störender Substanzen, wie chromosomale DNA, RNA, Proteine usw..Die Aufreinigung wurde durch selektive Bindung an eine Matrix durchgeführt. Abhängig von der gewünschten Ausbeute erfolgte die Isolationen entweder im analytischen Maßstab oder im präparativen Maßstab.

4.2.3.5 Isolation im analytischen Maßstab mit Diatomeen-Erde

Um DNA im analytischen Maßstab zu isolieren, wurden 1,5ml einer Übernachtskultur in Eppendorfreaktionsgefäßen überführt und für 2 Minuten mit 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150µl Puffer I resuspendiert. Danach wurden 150µl Puffer II hinzugeben. Durch mehrmaliges Schwenken verschwand die vorhandene Trübung wieder. Durch Zugabe von 150µl Puffer III und mehrmaliges Umdrehen der Reaktionsgefäße wurden zelluläre DNA und Proteine durch SDS komplexiert und als weißer Niederschlag ausgefällt. Nachdem mit 13.000rpm für 10 Minuten zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß, in

das eine Suspension aus 900µl L6 und 50µl Diatomeen-Lösung vorgelegt worden war, dekantiert. Durch 5 minütiges Stehenlassen und mehrmaliges kurzes Schütteln wurde eine Bindung der Plasmid-DNA an die Matrix ermöglicht. Anschließend wurde die Suspension in Silica-Gel-Säulen überführt und eine Waschlösung hinzugegeben. Dann wurde die Waschlösung mit Hilfe von Vakuum durch die Säule gesaugt. Während die Plasmid-DNA durch die Matrix zurückgehalten wurde, befanden sich die unerwünschten Bestandteile im Durchfluss. Der Elutionsschritt wurde vorbereitet, indem die Säule auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäße gesteckt und 50µl Wasser auf die Säulenmembran pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mittels einminütiger Zentrifugation bei 13.000rpm.

4.2.3.6 Isolation im analytischen Maßstab mit peqLab-Kit

Wenn die oben beschriebene Isolation keinen Erfolg zeigte, erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma peqLab. Diese Methode beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse mit anschließender Adsorption der Plasmid DNA an einer Kieselgelmatrix. Ausgehend von einer Übernachtskultur von 1,5 ml, erfolgte die Durchführung der Isolation nach Protokoll des Herstellers. Am Ende wurde die Plasmid-DNA mit 50µl sterilem Wasser eluiert.

4.2.3.7 Isolation im präparativen Maßstab

Diese Methode wurde verwendet, um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen. Hierzu wurden zunächst 150 ml Übernachtskultur der gewünschten rekombinanten Bakterien angelegt. Nachdem am nächsten Morgen die Zellen für 15 Minuten mit 4.000rpm bei Raumtemperatur sedimentiert wurden, wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 12ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 12ml Puffer S2 und einer Inkubationszeit für maximal 3 Minuten bei Raumtemperatur, folgten 12 ml Puffer S3. Im Anschluss an eine Homogenisierung des Gemisches, fand eine mindestens 5 Minuten lange Inkubation auf Eis statt. Während mit Hilfe eines Faltenfilters das Lysat gewonnen wurde, wurden die mitgelieferten Säulen mit 6ml Puffer N2 äquilibriert. Anschließend wurde der Durchfluss auf die Säulen gegeben, so dass die DNA an das Säulenmaterial binden konnte. Nachdem die Säule mit 32ml Puffer N3 gewaschen wurde, erfolgte die Elution der DNA mit 15ml Puffer N5 in ein 50ml Blaudeckelröhrchen. Durch Zugabe von 10ml Isopropanol, einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 60 Minuten mit 4.000rpm bei 4°C wurde die DNA gefällt. Nachdem das Isopropanol anschließend entfernt wurde, wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen.

Danach wurde der Alkohol vorsichtig abgesaugt, das Sediment bei 37°C im Brutschrank getrocknet und im Anschluss in 50 bis 100µl H₂O resuspendiert.

4.2.3.8 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Zur Bestimmung der Konzentration der Nucleinsäuren wurde die optische Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von 260nm (UV-Licht) gemessen. Das Photometer errechnete automatisch die Konzentration aus der Extinktion bei 260nm, der Verdünnung und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA 50, für einzelsträngige DNA 33, für RNA 40 und für Oligonukleotide 20) gemäß der Formel:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot V \cdot F$$

(mit OD₂₆₀: optische Dichte bei 260nm, V: Verdünnungsfaktor, F: Multiplikationsfaktor)

Verunreinigungen durch zum Beispiel Proteine oder Kohlenhydrate werden durch die optische Dichte bei 280 nm bzw. 230 nm angezeigt. Die Reinheit der Probe war ausreichend, wenn das Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm und der optischen Dichte bei 280nm über 1,8 und das Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm und der optischen Dichte bei 230nm über 2,0 lag. Zur Messung wurde die Probe im Verhältnis 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und geeignete Kunststoff-Küvette überführt. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 230, 260 und 280nm sowie das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₃₀ und das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ erfolgte mittels Photometer. Die Berechnung der Nucleinsäurekonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] erfolgte ebenfalls automatisch.

4.2.3.9 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde für die quantitative Real-Time PCR RNA aus eukaryotischen Zellen isoliert.

250.000 bis 10⁶ Zellen wurden für 3 Minuten mit 1.200rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 350µl Puffer RLT mit 1% [V/V] β-Mercaptoethanol resuspendiert und in einen QIAshredder überführt. Nachdem der Ansatz für 2 Minuten mit 13.000rpm zentrifugiert wurde, wurde dem Durchfluss ein äquivalentes Volumen an 70%igem Ethanol zugegeben, vorsichtig gemischt und in eine RNeasy Mini-Säule überführt. Die Säule wurde für 15 Sekunden bei 10.000rpm zentrifugiert, mit 700µl Puffer RW1 und zweimal mit 500µl Puffer RPE gewaschen und anschließend für 1 Minute zur Trockene zentrifugiert. Hierbei wurde der Durchfluss jeweils verworfen. Danach erfolgte die Elution der RNA in ein RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß mit 30 bis 50µl RNase-freiem Wasser.

4.2.3.10 Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifische DNA-Basensequenz erkennen und an bestimmten Positionen spalten. Diese Sequenzen bestehen aus vier bis acht Basenpaare und sind normalerweise palindromisch. Durch die hydrolytische Spaltung des Doppelstrangs entstehen entweder ein glattes Ende oder 5' bzw. 3' Überhänge. Über diese können DNA-Stücke, wie zum Beispiel die komplementären Überhänge bei Vektor und Insert, wieder hybridisieren (siehe Ligation). In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen entweder bei Klonierungen oder zu analytischen Zwecken verwendet. Um DNA zu verdauen, kann man nicht nur ein, sondern auch zwei Enzyme gleichzeitig einsetzen. Für eine Doppelrestriktion muss dabei eine Aktivität von beiden Enzymen in dem vorliegenden Puffer von mindestens 75% gewährleistet sein. Folgender Ansatz wurde für Klonierungen mit Plasmid-DNA und PCR-Produkten im präparativen Maßstab durchgeführt:

5,0 µg Plasmid-DNA/ 20,0 µg PCR-Produkt
0,5 µl Restriktionsenzym
2,0 µl Restriktionspuffer (10fach)
ad 20,0 µl H₂O

Um isolierte Plasmid-DNA zu kontrollieren, sollten spezifisch vorhersagbare Fragmente erzeugt werden.

Dazu wurden Restriktionsspaltungen im analytischen Maßstab durchgeführt. Folgender Restriktionsansatz wurde daher für Plasmide aus Mini und Maxi-Präparationen verwendet:

5,0/1 µl Mini-DNA/Maxi-DNA
0,5 µl Restriktionsenzym
1,0 µl Restriktionspuffer (10fach)
ad 10,0 µl H₂O

Unter Berücksichtigung der individuellen Anforderungen eines Enzyms an Puffer und Temperatur, erfolgte ein präparativer Verdau (meist bei 37°C) über Nacht im Brutschrank und der analytische Verdau für mindestens zwei Stunden im Wasserbad. Die folgende gelelektrophoretische Auftrennung ermöglichte die Inaktivierung der Enzyme und die Isolierung der DNA. Um eine Replikation des Ursprungsplasmides nach Transformation der Ligation in Bakterien zu verhindern, wurde es nach Amplifikation des Inserts, mit dem

Enzym *DpnI* verdaut. Dieses weist in den meisten Plasmiden viele Erkennungssequenzen auf und schneidet ausschließlich methylierte DNA. Hierzu wurde ein 20µl PCR-Ansatz mit 1µl Enzym versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels PCR-Purification Kits gereinigt.

4.2.3.11 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um unerwünschte Bestandteil, wie zum Beispiel PCR-Nebenprodukte zu entfernen, wurden DNA-Fragmente, die für die Klonierung eine Rolle spielten, wie PCR-amplifizierte DNA-Abschnitte oder verdaute Plasmidvektoren über Agarosegel aufgereinigt. DNA-Proben wurden entweder mittels eines GenElute™ Gel Extraktions-Kit nach Herstellerprotokoll oder mit Hilfe von Diatomeen-Erde aus Agarosegelen isoliert und gereinigt. Bei der zweiten Methode wurde das Gel nach der Durchführung der Gelelektrophorese auf einen UV-Tisch gelegt. Die Zielbande wurde mit einem sterilisiertem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Durch Wiegen wurde die Masse der Gelbande bestimmt und danach die zweifache Volumenmenge an L6 hinzugefügt. Anschließen fand ein Schmelzvorgang im Heizblock bei 60°C statt. Danach wurden 50µl Diatomeen-Lösung hinzugegeben und bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Aufschütteln für 5 Minuten inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf kleine Kieselgel- Säulen gegeben und viermal mit je 2ml Waschpuffer gewaschen. Das Durchsaugen der Lösungen wurde durch anlegen eines Vakuums unterstützt. Um die Säule vor dem Elutionsschritt zu trocknen, wurde für 20 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Dann konnte die DNA mit 20 bis 50µl sterilem Wasser in einen neues Reaktionsgefäß eluiert werden.

4.2.3.12 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkten wurden mittels GenElute™ PCR Clean-UP-Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt. Hierbei retardiert die DNA selektiv in Anwesenheit großer Salzkonzentrationen an eine Kieselgelmatrix. Am Schluss wurde die DNA mittels einminütiger Zentrifugation bei 13.000rpm mit 50µl sterilem Wasser eluiert.

4.2.3.13 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren

Um die Religation der geschnittenen Klonierungsvektoren zu verhindern, wurden diese mittels dem Enzym *Calf intestine Phosphatase* (CIAP) am 5'Ende der Plasmid DNA

dephosphoryliert. Hierzu wurde nach dem Restriktionsverdau 1 µl CIAP zum Restriktionsansatz gegeben und 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Enzym im Heizblock bei 85°C für 10 Minuten inaktiviert. Schließlich erfolgte die Aufreinigung des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors über ein Agarosegel.

4.2.3.14 Ligationsreaktion

Ziel einer Ligationsreaktion ist es, zwei DNA-Fragmente, zum Beispiel Insert und Vektor über komplementäre DNA-Überhänge oder glatte Enden zusammenzufügen. Dies ist mit Hilfe des Enzym T4-Ligase, die unter Energieverbrauch neue Phosphodiesterbindungen bildet möglich. Wenn ein Insert mit dem passenden Vektor ligiert, entstehen neue zirkuläre rekombinante Plasmide. Hierbei wurde meistens ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:3 gewählt. Dazu wurde die DNA-Konzentration der Ligationskomponenten vor der Ligation semiquantitativ über eine Agarosegelelektrophorese anhand eines Massenstandards (MassRuler™, O'Range Ruler™) durch optischen Vergleich der Banden bestimmt.

Schema der Ligationsansatzes:

2 µl T4 Ligasepuffer (10fach)

1 µl T4 Ligase

50-100 ng geschnittene Vektor-DNA

3facher Überschuss an geschnittener Insert-DNA

ad 20 µl dH₂O

Um die Religationshäufigkeit des Vektors zu kontrollieren, wurde stets ein Ansatz ohne Insert angesetzt.

Ligationsreaktionen wurden über Nacht bei 14°C im Wasserbad gelagert. 10µl des Ansatzes wurde am nächsten Tag in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert bzw. bei -20°C aufbewahrt.

4.2.3.15 Isolierung der genomischen DNA aus Gewebeproben

Um die Jungtiere zu genotypisieren, wurde die genomische DNA der Schwanzspitzen der Mäuse mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kit isoliert. Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten Schwanzspitzen bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA nach Protokoll. Daher wurde aus den mit Proteinase K lysierten

Proben die genomische DNA extrahiert und in 100µl Elutionspuffer gelöst. Mit dieser Lösung konnte dann die PCR-Reaktion mit Transgen-spezifischen Primern durchgeführt werden.

4.2.3.16 Genotypisierung transgener Mäuse

Zur Genotypisierung wurde die aus den Schwanzgewebe isolierte genomische DNA verwendet. Sie diente als Template für die folgende PCR Reaktion mit transgen-spezifischen Primern und Kontrollprimern. Das spezifisches Primerpaar amplifiziert ein 360 bp langes Fragment des transgenen mutierten APP-Gens. Die Kontrollprimer wurden als interne Reaktionskontrolle eingesetzt und amplifizierten ein ein 200bp langes Stück der delta Kette des T-Zellenrezeptors. Der PCR-Protokoll und Amplifikation erfolgte modifiziert nach Primerprotokoll.

Standard-PCR-Protokoll für die Genotypisierungen (Endkonzentration)12µl

1-5 µl DNA-Elutionslösung (~20ng genomische DNA)

1,2 µl 10fach PCR Reaktionspuffer Y (1fach)

0,96 µl dNTPs (0,2 mM)

0,96 µl MgCl₂ (2mM)

0,55 µl Primer IMR2044 (0,75 µM)

0,56 µl Primer IMR2045 (0,75 µM)

0,4µl Primer IMR2015 (0,5 µM)

0,36µl Primer IMR2016 (0,5 µM)

0,03µl Taq-DNA-Polymerase [5U/µl] (0,0125 U/µl)

ad 12µl ddH₂O

Bedingungen für die Amplifikation

- (1) initiale Denaturierung 94°C, 1,5 min
- (2) Denaturierung 94°C, 30 sec
- (3) Primeranlagerung 60°C, 45 sec
- (4) Polymerisation 72°C, 45 sec
- (5) finale Polymerisation 72°C, 2 min
- (6) Abkühlung 10°C

Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):35

4.2.3.17 Annealing von DNA-Oligonukleotiden

In dieser Arbeit war diese Methode bei Erstellung der Kurztargets und shRNAs nötig. Diese Sequenzen wurden als Oligonukleotide in *sense* und *antisense*-Orientierung bestellt. Die bestellten einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide wurden mittels Annealingreaktion mit dem jeweiligen komplementären Part zusammengelagert. Die daraus resultierende Doppelstrang-DNA besaß einzelsträngige Überhänge, die zuvor so gewählt wurden, dass eine Ligation mit den gewünschten Vektor erfolgen konnte. Der Reaktionsansatz, der aus je 10 µl Oligo 1 [1µg/µl] und Oligo 2 [1µg/µl], 5ml 10x Annealing-Puffer und 25 µl H₂O bestand, wurde für 3 Minuten auf 90°C erhitzt und anschließend innerhalb einer Stunde auf 37°C abgekühlt.

4.2.3.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei dieser molekularbiologische Standardmethode werden mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen DNA-Abschnitte durch zyklischen Wiederholung folgender Reaktionsschritte *in vitro* vervielfältigt. Die Polymerasekettenreaktion besteht aus Denaturierung, Annealing und Elongation der DNA. Um einen Teil zu amplifizieren, werden kurze Oligonukleotidsequenzen, sogenannte Primer, die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren, verwendet. Im ersten Schritt erfolgt die Trennung der zu vervielfältigenden DNA (Denaturierung). Im zweiten Schritt wird durch ein Absenken der Temperatur ermöglicht, dass die Primer mit dem jeweiligen komplementären einzelsträngigen Matrizenstrang hybridisieren können (Annealing). Anschließend wird gewährleistet, dass durch eine Erhöhung Temperatur auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase die Primer verlängert werden. Somit wird ein neue mit dem Ursprungsabschnitt identische doppelsträngige DNA gebildet.

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Anwendungen der PCR zum Einsatz. Eine Standard-PCR wurde zur einfachen Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte im Rahmen von Klonierungen sowie zur Kontrolle von Plasmid-DNA durchgeführt.

4.2.3.19 Primerdesign und Schmelztemperatur

Sequenzier-Primer waren zwischen 18 und 22 Nukleotiden lang. Klonierungsprimer benötigten zusätzlich die Erkennungssequenz der eingesetzten Restriktionsendonukleasen am 5'-Ende. Damit eine PCR-Reaktion funktioniert, sollte ein Primer bestimmte Anforderungen erfüllen. Um kompetitive Mehrfachbindungen zu verhindern, sollte die Sequenzabfolge des Primers möglichst einzigartig innerhalb des zu

vervielfältigenden DNA-Abschnitts sein. Weiterhin sollte der Gesamtanteil an Guanin oder Cytosin ca. 50% betragen und am 3'-Ende auf Guanin oder Cytosin enden. Zudem wurde darauf geachtet, dass die erstellten Sequenzen möglichst keine Dimere oder Sekundärstrukturen ausbilden konnten. Gleichzeitig sollten die Primer eines Primerpaares eine ähnliche Schmelztemperatur haben. Die Schmelztemperatur T_m konnte man näherungsweise aus dem G/C- und A/T-Gehalt mit folgender Formel bestimmen:

$$T_m [G/C] [A/T] = 4 \cdot / + 2 \cdot / ^\circ$$

4.2.3.20 Standard-PCR

Die Standard-PCR erfolgte mit einem PCR-Master-Mix (peqGOLD PCR-Master-Mix S, Peqlab) mit *Taq-DNA-Polymerase*. Sie besaß ein Temperaturoptimum bei 72°C, keine Fehlerkorrekturlesefunktion (3'-5' Exonukleaseaktivität und *proof – reading*) und erzeugte am 3'Ende des PCR-Produkts einen A Überhang. Die Prozessivität dieser Polymerase lag bei ca. 1.000 Nukleotiden pro Minute. Folgender Reaktionsansatz wurde für Standard-PCRs zusammengestellt:

1,0 µl Plasmid-DNA (verdünnt auf 100ng/µl)

12,5 µl peqGOLD PCR-Master-Mix

1,0 µl Vorwärtsprimer (100ng/µl)

1,0 µl Rückwärtsprimer (100ng/µl)

4,5 µl H₂O bidest

20,0 µl Gesamtvolumen

Der Einsatz eines Enzyms mit Fehlerkorrekturlesefunktion (3'-5' Exonukleaseaktivität), war im Rahmen von Klonierungen notwendig, da eine fehlerfreie Amplifikation der Ziel-DNA erzielt werden musste. Es wurden Pfu-, Pwo- oder KappaHiFi-Polymerasen eingesetzt. Die Prozessivität der Enzyme lag bei ca. 1.000 Nukleotiden pro 15 Sekunden und ihr Temperaturoptimum bei 68°C. Folgender Reaktionsansatz wurde für Klonierungs-PCRs zusammengestellt:

1,0 µl Plasmid-DNA (verdünnt auf 100ng/µl)

1,0 µl Vorwärtsprimer (100ng/µl)

1,0 µl Rückwärtsprimer (100ng/µl)

1,0 µl dNTP-Lösung (10mM)

5,0 µl Pwo-DNA-Polymerase Reaktionspuffer(10fach, Peqlab)

1,0 µl Pwo-DNA-Polymerase (1u/µl, Peqlab)

40,0 µl H₂O bidest

50,0 µl Gesamtvolumen

Die PCR-Ansätze wurden jeweils in einem 0,25ml PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Die Amplifikation wurde in Thermocyclern (BioRad), die eine automatische aber individuell programmierte Steuerung der Temperaturprogramme zuließen, durchgeführt. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Zyklusanzahl	Schritt	Dauer, Temperatur
1 Zyklus	initiale Denaturierung	5 Minuten, 95°C
25-35 Zyklen	Denaturierung	30 Sekunden, 95°C
	Primer-Annealing	30 Sekunden, Temperatur Primer-Spezifisch
	Elongation	Taq-Polymerase:72°C, 1 Minuten/kb Pwo-Polymerase: 68°C, 15 Sekunden/1 kb Pfu-Polymerase:72°C, 2 Minuten/kb KappaHiFi-Polymerase:72°C,30 Sekunden/kb
1 Zyklus	Finale Elongation	10 Minuten, 68°C bzw. 72°C
1 Zyklus	Kühlung	4°C

Je nach eingesetzter Polymerase und Länge des erwarteten Produktes wurde die Elongationszeit jeweils individuell angepasst. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 5µl der Reaktionsansätze mittels 1%igem Agarose- TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Wenn die Länge der Amplifikate der Erwartung entsprach, konnte das PCR- Produkt gereinigt und für weitere Versuche eingesetzt werden.

4.2.3.21 Gradienten-PCR

Diese Variante wurde durchgeführt, um die optimale Annealing-Temperatur mit möglichst hoher Sequenzspezifität für ein Primerpaar zu ermitteln. Hierbei erfolgte die Reaktion nach den Bedingungen einer Standard-PCR. Lediglich die Annealing-Temperatur wurde insofern geändert, dass ein Temperaturgradient mit einer Spanne von bis zu 20°C eingestellt wurde. Es wurde ein PCR-Reaktionsansatz mit 2x Taq-Master Mix erstellt und

auf acht Reaktionsgefäße (meist zu je 12,5 µl) aufgeteilt. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Für weitere PCRs wurde dann die Temperatur gewählt, welche die höchste Sequenzspezifität und Produktausbeute aufwies.

4.2.3.22 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnte, ohne zuvor die Plasmid-DNA aus dem Bakterium isolieren zu müssen, die Insertion des betreffenden DNA-Stückes in einen Vektor kontrolliert werden. Hierzu wurde ein Primerpaar ausgewählt, so dass ein DNA-Bereich meist sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Insertionsstelle amplifiziert wurde. Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte anschließend getrennt. Anhand der Bandenlänge des DNA-Fragments konnte man erkennen, ob das Insert eingebaut wurde. Danach konnten aus den identifizierten Einzelkolonien die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert und genauer kontrolliert werden. Es wurde eine Stammlösung, die pro Reaktionsansatz 6 µl 2x Taq-Mastermix, 0,5 µl vorwärts und rückwärts Primer und 5 µl ddH₂O enthielt, erstellt und zu je 12 µl in PCR-Gefäße aufgeteilt. Die Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte gepickt und in den vorbereiteten PCR-Ansatz resuspendiert. Um später damit Weiterarbeiten zu können, wurde die Pipettenspitze anschließend auf einer neuen Agarplatte mit gleichen Selektionsbedingungen ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatte erfolgte bei 37°C.

4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

4.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Gesamtproteingehalt zu bestimmen, wurde ein Bradford-Test, eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen durchgeführt. Das Prinzip basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximum von $\lambda = 465\text{nm}$ (ohne Protein) nach $\lambda = 595\text{nm}$ (mit Protein) im Sauren bei der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250. Diese Komplexbildung führt zu einer Stabilisierung der blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform des Farbstoffes. Das Maß für den Proteingehalt der Lösung ist die Zunahme der Absorption bei 595nm. Nachdem das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt worden ist, wurde eine Standardreihe mit 10 Verdünnungsstufen erstellt. Sowohl der Proteinstandard (0-30µg BSA), als auch die Proben wurden je zu 1ml Bradford-Reagenz gegeben. Die Probenzugabe (1-10µl) erfolgte schrittweise bis eine deutliche Blaufärbung des Reagenzes zu sehen war. Nachdem alle Ansätze gevortext und im Anschluss für

mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, konnte mittels ELISA-Reader ihre Extinktion bei $\lambda = 595$ nm bestimmt werden. Hierzu wurden Standardreihe, Nullwert (= Bradford Reagenz versetzt mit Probenpuffer) und Proben zu je 200 μ l pro Vertiefung in eine 96-Loch Platte in Triplikaten pipettiert. Die Proteinkonzentration der Proben konnte mittels Kalibriergerade der Standards ermittelt werden.

4.2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden mit der Methode der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei Variante der SDS-PAGE werden Proteine mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Da dieses anionische Tensid an die Moleküle bindet, wird die Eigenladung der Proteine maskiert. So werden Proteine proportional zu ihrer Größe negativ geladen und können im elektrischen Feld mit Hilfe eines Polyacrylamidgels nach ihrer Größe getrennt werden. In der vorliegenden Arbeit kam das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE zum Einsatz. Hierbei werden die Proben zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend werden die Proteine im Trenngel aufgetrennt. Es wurden 10 und 16 %ige Polyacrylamidgele verwendet.

Die Gele wurden aufrecht in eine Gelkammer (Instituseigene Werkstatt) gespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Nachdem die Proben mit vierfach konzentrierten Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C im Heizblock aufgeköcht wurden, wurden je 15 μ l-20 μ l der Proben in die Kammern des Gels überführt. Zusätzlich werden je Gellauf zwei Proteinmarker aufgetragen. Zum Einen 8 μ l PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas), um den Lauf optisch zu verfolgen und den Transfer beim Western Blot zu kontrollieren. Zum Anderen 10 μ l Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling) zur Bestimmung der Proteingröße nach dem Westernblot. Die Proteine wurden bei 50mA für circa 50 Minuten aufgetrennt. Der Rest der Proben wurden bei -20°C eingefroren und vor jedem weiteren Lauf für 3 Minuten aufgeköcht.

Um größere Probenmengen und Probenanzahl auftragen zu können wurden Agarosegele auch selbst gegossen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 8 % Trenngel mit einem 4 % Sammelgel überschichtet. Die durch APS abgegebenen Radikale werden von TEMED stabilisiert und es kommt zur Polymerisation des Acryamids. Quervernetzungen kommen durch die Polymerisierung von Bisacrylamid zu stande (Ossipow *et al.* 1993). Die Elektrophorese erfolgte dann in einem Zweikammersystem: die untere Kammer der Gelapparatur wurde mit 1x Anodenpuffer und die obere Kammer mit 1x Kathodenpuffer

gefüllt. Nachdem die Sammeltaschen mit 1x Kathodenpuffer gespült wurden, wurden Proben und Standards aufgetragen und über Nacht bei 25-50 mA aufgetrennt.

Trenngel (8 %) (20 ml):

6 ml Aquadest

5,3 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30; 37,5 Anteile Acrylamid zu 1 Anteil Bisacrylamid)

6,6 ml Tricingel-Puffer

2,2 ml Glycerin

0,2 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

0,02 ml TEMED

Sammelgel (4 %) (20 ml):

12,3 ml A. dest.

2,7 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30)

5,0 ml Tricingel-Puffer

0,2 ml 10 % (w/v) APS

0,02 ml TEMED

4.2.4.3 Westernblot

Um verschiedene Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden Westernblots durchgeführt. Hierbei wurden die zuvor im SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurden auf der Membran die Proteine mittels Antikörper detektiert.

4.2.4.4 Transfer auf Nitrocellulosemembranen

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Anlegen eines zum Gel senkrecht gerichteten elektrischen Feldes hat zur Folge, dass die Proteine aus dem Gel Richtung Membranoberfläche wandern. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen kommt es dann zur Bindung der Proteine auf der Membran. Für diesen Transfer wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Apparaturen verwendet. Zum Einen ein Semi-Dry System und zum Anderen das Tankblot-System. Zunächst wurden Gel, Nitrocellulosemembran, Blottingpapiere und Fasermatten im Transferpuffer äquilibriert. Dieser wurde stets bei 4°C gelagert und enthielt zur Aktivierung der Protein-bindungsstellen 20% Methanol. Danach

wurde die Nitrocellulosemembran auf Blottingpapiere (zwei dünne und ein dickes , 190g/cm² bzw. 550g/cm²) platziert. Anschließend wurde unter Ausschluss von Lufteinschlüssen das Gel auf die Membran gelegt und mit zwei dünnen und einem dicken Blottingpapier bedeckt. Innerhalb der Blottingapparatur befand sich die Nitrocellulose auf der Seite der Anode. Im Semidry system erfolgte diese Schichtung in der Blottingapparatur und der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 160mA für 90 Minuten vollzogen. Im Tankblotsystem wurde der gesamte Aufbau zwischen zwei Fasermatten in eine Blottingkassette eingespannt und anschließend in den Transferpuffer gefüllten, unter Eis gekühlten Tank eingelegt und eine konstanten Stromstärke von 280mA für 90 Minuten angelegt.

4.2.4.5 Ponceau-S-Färbung

Der Erfolg des Proteintransfers wurde nicht nur anhand der Übertragung des Markers PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas), sondern auch mittels einer reversiblen Ponceau-S-Färbung überprüft. Da dieser anionische Farbstoff an positiv geladene Aminosäurereste bindet, können Proteine unspezifisch nachgewiesen werden. Um die Membran anzufärben, wurde sie direkt nach dem Transfer für ca. 1 Minute in Ponceau-S-Lösung geschwenkt. Durch Dekantieren und Spülen mit VE Wasser wurde überschüssige Färbelösung entfernt. Es wurden deutlich rote Proteinbanden sichtbar. Bei Bedarf konnte somit die Membran in vertikale oder horizontale Streifen geschnitten werden. Anschließend wurde die Membran durch zweiminütiges Schwenken in 0,1N Natronlauge entfärbt. Nachdem Membran zweimal in VE Wasser gewaschen wurde, wurde der Blockvorgang durchgeführt.

4.2.4.6 Blocken nichtbesetzter Proteinbindungsstellen

Um die noch nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu blockieren, wurde die Membran über Nacht (oder für mindestens 2 Stunden) bei 4°C in 5%iger Milchlösung geschwenkt (5% [v/v] Milchpulver, 0,1% [v/v] Tween-20 in PBS). Dieser Vorgang war notwendig, da es sonst bei der Immunfärbung zu nichtspezifischen Antikörperbindungen kommt.

4.2.4.7 Immunfärbung und Detektion

Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Für jeden einzelnen Antikörper wurde die optimale Konzentration zuvor in Verdünnungsreihen bestimmt. Um

die Spezifität dieser Antikörper nachzuweisen, wurde parallel eine Färbung ohne Primärantikörper durchgeführt. Weiterhin wurde für jeden Antikörper bestimmt, ob die Inkubation über Nacht oder tagsüber für zwei Stunden erfolgte. Nachdem die Membran mit Magermilchlösung geblockt wurde, wurde die Membran zunächst zweimal für 3 Minuten in Waschpuffer (0,1% [v/v] Tween-20 in PBS) durch vorsichtiges Schwenken auf einem Plattformschwenker gewaschen. Anschließend wurde der spezifische Erstantikörper im geeigneten Verhältnis in Waschpuffer hinzugegeben und Stunden bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 3 Minuten, einmal für 15 Minuten und zweimal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde der entsprechende Sekundärantikörper, der im Verhältnis 1:3.000 in 5% Magermilchlösung verdünnt wurde, zugegeben. Um die Biotin-Leiter detektieren zu können, wurde zusätzlich der Anti-Biotin-Antikörper (Anti-Biotin, HRP-linked Antibody, Cell Signaling) (im Verhältnis 1:2.000) in diese Milchlösung zugegeben. Nachdem die Membran für eine Stunde mit den Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur auf dem Plattformschwenker inkubiert worden war, erfolgten wie zuvor beschrieben Waschschrte mit drei Zeitintervallen. Da die Sekundärantikörper an HRP gekoppelt waren, erfolgte die Detektion mit ECL. Hierzu wurden in einem lichtgeschützten Schraubdeckelröhrchen die beiden im SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce) enthaltenen Reagenzien, Luminol und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran darin für eine Minute im Dunkeln inkubiert... Die Umsetzung des Substrates Luminol unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase führt zu einer schwachen Lumineszenz. Die Luminol-Reaktion wurde anschließend in einer *Intelligent Dark Box* (LAS -3000; FujiFilm) mit kontinuierlichen Zeitintervallen von 10-60 Sekunden detektiert.

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper und ihren zugehörigen Versuchsbedingungen.

<i>Antikörper, Name</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Inkubation szeit</i>
<i>Anti-GAPDH (Kaninchen, polyklonal)</i>	<i>1:500</i>	<i>α-Rabbit</i>	<i>2 Stunden</i>
<i>Anti- β Aktin (Kaninchen, polyklonal)</i>	<i>1:1000</i>	<i>α-Rabbit</i>	<i>2 Stunden</i>
<i>anti-ADAM10 [11G2] (Maus, 1:2000 monoklonal)</i>		<i>α-Mouse</i>	<i>Über Nacht</i>
<i>anti-Alzheimer Precursor Protein A41zu2000 (mouse, monoklonal; Klon: 22C11)</i>		<i>α-Mouse</i>	<i>2 Stunden</i>
<i>Anti-Human β-Amyloid [1-17] (Maus, 1:2000)</i>		<i>α-Mouse</i>	<i>2 Stunden</i>

monoklonal;Klon: 6E10)

Anti-APP (A β NT), rabbit polyclonal 1:1000

α -Rabbit

2 Stunden

4.2.4.8 Unspezifischer Proteinnachweis

Um Proteine in Polyacrylamidgelen unspezifisch anzufärben, wurde zum Einen eine kolloidale Coomassie-Färbung und zum Anderen die aufwendigere aber sensitivere Methode der Silberfärbung verwendet.

4.2.4.8.1 *Coumassiegel*

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau färbt Proteine unspezifisch an, indem er sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Hierzu wurde das Gel unmittelbar nach der Elektrophorese 2-15 Stunden in ca. 300 ml Roti-Blue-Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden mit 100 ml Waschlösung (25% MeOH 99,8% +75% Wasser) für 5 Minuten in einer sauberen Schale Farbstoffreste entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele mit 100 ml Trocknerlösung (10% Glycerin 99,5% + 20% EtOH+70% Wasser) versetzt, für 30 Minuten inkubiert und anschließend zwischen Cellophan oder mittels Trockner (2 h, 80°C) getrocknet. Laut Herstellerprotokoll liegt die Nachweisgrenze unter 30 ng/Protein.

4.2.4.8.2 *Silbergel*

Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst mit Hilfe einer Fixierlösung behandelt. Nachdem das Gel dreimal mit 50%igem EtOH für je 30 Minuten gewaschen wurde, wurde es für eine Minute mit einer frisch hergestellte Natriumthiosulfatlösung versetzt. Anschließend wurde das Gel dreimal für je 20 Sekunden mit ddH₂O gewaschen und 20 Minuten auf dem Schwenker mit Silbernitratlösung inkubiert. Hierbei kommt es zur Bindung der Silberionen an die Proteine. Nach einem weiteren Waschschrift mit ddH₂O, wurde das Gel in Entwicklerlösung überführt. Aufgrund dieser alkalischen Formaldehydlösung kommt es zur Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber und die vorhandenen Proteine werden schwarz eingefärbt. Zudem enthält der Entwickler wiederum Natriumthiosulfat. Dies führt zur Reduktion der Hintergrundfärbung, da dieses Salz unspezifische Silber-Präzipitate auf Acrylamidgelen verhindert. Diese Entwicklerlösung wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten durch frische ausgetauscht. Nach wiederum 30 Minuten, wurde zweimal mit Wasser gewaschen und mindestens für eine halbe Stunde fixiert. Die Nachweisgrenze liegt unter 1 ng pro Bande.

4.2.4.9 Luziferase-Assay

Um zu überprüfen, inwieweit die in den Vektor psiCheck-2 klonierten Zielsequenz herunterreguliert wurde, wurde in dieser Arbeit der Luziferase-Test mittels Dual-Glo™ Luciferase Assay Systems (Promega) durchgeführt. Dieser Vektor kodiert für die zwei Luziferasen (Renilla und Firefly) und gewährleistet dass die Renilla Luziferase transkriptional an die Zielsequenz fusioniert. Während somit die Aktivität dieser Luziferase den Knockdown anzeigt, diente die Firefly Luziferase der internen Normalisierung der Werte.

Für die Durchführung der Versuche wurden der psiCheck-Vektor, der die Firefly Luziferase und das Fusionsprotein aus Zielsequenz und Renilla exprimiert mit einem die shRNA exprimierendem Vektor in 293T-Zellen nach Protokoll kotransfiziert. In jedem Experiment wurde zudem als Kontrolle ein Expressionsvektor eingesetzt, der für die shRNA-Neg kodierte.

Zunächst wurden am Tag des Luziferasetests die zuvor transfizierten Zellen auf eine Zellzahl von 4.000/µl eingestellt und anschließend davon je 25 µl (100.000 Zellen) pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt. Um Verfälschungen der Messergebnisse durch Lichtemissionen aus den Nachbarnäpfen zu verhindern, handelte es sich dabei um eine weiße 96-Loch-Platte. Die einzelnen Versuche wurden jeweils in Triplikaten angesetzt.

Nach der Zugabe von 25µl Dual-Glo-Reagenz, welches die Zellen lysierte und das Substrat für die *Firefly* Luziferase enthielt, wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Aktivität dieser ersten Luziferase mittels Luminometer (MicroLumat LB 96P; EG&G Berthold). Danach wurden 25µl Dual-Glo Stop&Glo Reagenz, welches die von der *Firefly* Luziferase katalysierte Reaktion beendete und das Substrat für die *Renilla* Luziferase enthielt, hinzugegeben. Im Anschluss an eine erneute 10 minütige Inkubationszeit, erfolgte wiederum die Detektion. Hierzu wurde am Luminometer folgendes eingestellt:

	Mode:
Integrate	
Measurement Time:	5 sec
Delay Inj P- Inj M:	3,6 sec
Delay Inj M- Inj Measure:	0,0 sec
Injector P:	on
Injector M:	on
Background Mode:	off

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel , indem zunächst die relativen Aktivitäten durch Bildung des Quotient aus der Aktivität der *Renilla*-Luziferase und der Aktivität der *Firefly*-Luziferase wie folgt bestimmt wurden:

$$X = \text{Aktivität}_{Renilla} / \text{Aktivität}_{Firefly}$$

Im Anschluss an diese Normalisierung ergab sich die relative Restexpression R , indem die relativen Aktivitäten für die Herunterregulierungen mit der relativen Aktivität für die Negativkontrolle wie folgt verglichen wurden:

$$R = X_{shRNA} / X_{shRNA_{neg}}$$

Entsprechend ergibt sich eine relativer Knockdown durch Subtraktion dieses Wertes R von 1.

4.2.4.10 ELISA

ELISA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auch gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen genutzt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-Tests zum Nachweis des sAPP bzw. sAPP α im Überstand von Neuroblastomzellen und zum Nachweis von AAV-2 Partikeln nach Aufreinigung einer AAV-Produktion mittels HPLC eingesetzt. Bei beiden ELISA-Methoden handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Hierbei werden zwei spezifisch ans Antigen bindende Antikörper, die jeweils ein anderes Epitopen erkennen, verwendet. Zunächst wird der erste Antikörper (Capture- Antikörper) an eine ELISA-Mikrotiterplatte gebunden (Coating) und anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Antigen. Zur Detektion wird der zweite Antikörper, ein monoklonaler biotinkonjugierter Antikörper und danach ein HRP-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat zugegeben. Als Substrat wurde in dieser Arbeit Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Da die enzymatische Umsetzung dieses Substrats über eine Farbreaktion verläuft, erfolgte die Messung mittels ELISA-Reader.

4.2.4.10.1 Bestimmung von sAPP

Das lösliche APP wurde mit Hilfe des Human APP ELISA development Kit, Duoset, Sandwich ELISA Kits nachgewiesen und quantifiziert. Hierbei wurden Antikörper eingesetzt, im Bereich L18-R288 oder P365-R411 von APP770 binden. Somit wurden

APP695+1 und APP770 erkannt. Als Standard wird das mitgelieferte Protein rhAPP770 (18aa-692aa), dessen Detektionsreichweite bei 0,625ng/ml bis 20ng/ml lag, verwendet.

Als Proben wurden die Überstände von kultivierten Neuroblastomzellen, die u.a. unter Flavonideinfluss inkubiert wurden, verwendet. Es wurde ein Probenvolumen von 50-100µl eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß Herstellerprotokoll. Um zum Schluss die Farbreaktion abzustoppen wurde hiernach 2 N Schwefelsäure verwendet. Das blaue Reaktionsprodukt wird hierbei in ein gelbes Endprodukt überführt. Die Detektion erfolgte mittels Tecan Spectra Mini ELISA Reader bei 450 nm. Die Auswertung der Daten wurde automatisch durch die Synelisa Software vorgenommen. Um den Einfluss der Flavonoide auf die sAPP-Produktion zu beurteilen, wurden die Daten mit den Werten der Überstände von unbehandelten Neuroblastomzellen verglichen. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden des Standards konnte sAPP quantifiziert werden.

4.2.4.10.2 Nachweis von sAPP α

Auch für den Nachweis des löslichen APP α wurde Human APP ELISA development Kit, Duoset, eingesetzt. Um aber nur das lösliche sAPP α im Überstand detektieren zu können, wurde ein anderer Capture Antikörper eingesetzt. Hierbei handelte es sich um 6E10, der im Überstand spezifisch das APP α erkennt. Hierzu wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml in einem Volumen von 100µl pro Vertiefung auf die ELISA-Platte gebunden. Die Bedingungen des Coatings sowie alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben nach Protokoll des Human APP ELISA development Kit, Duoset. Da sich der Standard dieses Kits, aufgrund des fehlenden Epitops für den Nachweis für sAPP α nicht geeignet hat, konnte sAPP α nicht quantifiziert werden. Um den Einfluss der Flavonoide auf die sAPP-Produktion dennoch zu beurteilen, erfolgte eine relative Auswertung der Daten. Die Werte wurden mit denen der Überstände von unbehandelten Neuroblastomzellen und untereinander verglichen.

4.2.4.10.3 AAV 2 Titration-ELISA

Um AAV -Partikel vom Serotyp 2 in Zellkulturüberständen bzw. aufgereinigten Virusproduktionen zu detektieren, wurde der AAV 2 Titration ELISA verwendet. Bei diesem Sandwich ELISA ist bereits ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch ein konformatives Epitop auf den AVV2 Capsiden erkennt, auf 96 Lochplatten Streifen gebunden. Die Proben (je 100µl) konnten daher direkt, ohne Vorbereitung der Platte in die Vertiefungen gefüllt werden. Als Standard wird die mitgelieferte AAV 2 Partikellösung, die leere Capside enthielt, verwendet. Dessen Detektionsreichweite lag bei $0,44 \cdot 10^8$ bis

$28 \cdot 10^8$ capsid/ml. Bei der Bearbeitung dieser Sandwich ELISAs wurde nach Hertsellerangaben verfahren. Nachdem die Farbreaktion mit einer Stopplösung beendet wurde, erfolgte das Einlesen der Mikrotiterplatte bei 450nm in einem ELISA Reader. Die Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

4.2.5 Chromatographische Methoden

Die Aufreinigung bzw. Konzentrierung der Vektorsuspensionen erfolgte mittels HPLC-UV-pH/C anhand des Kationenaustauschers, POROS[®] 50HE (Geräteparameter siehe Materialteil). Hierfür wurde 1 ml Vektorsuspension durch einen 0,45µm Filter steril filtriert und mittels einer 1 ml großen Injektionsschleife, die vorher mit 1-2 ml Suspension durchspült wurde, injiziert. Um die Probenmenge zu erhöhen, wurde entweder mehrmals injiziert oder es wurde ein Superloop mit einem Fassungsvermögen von 50 ml verwendet. Flussgeschwindigkeit war 1, 3 oder 6 ml/min. Da es sich um eine Ionen- bzw. Affinitätschromatographie handelte, wurde als Fließmittel 20mM Phosphatpuffer und 20mM Phosphatpuffer mit 1M NaCl verwendet. Der Chromatographielauf erfolgte mittels Stufengradient.

Die Säule wurde zunächst mit Phosphatpuffer bzw. mit etwas Salz equilibriert. Nach Probenaufgabe, wurde die Säule mit 10 CV einem PB mit einer Salzkonzentration von 300mM gewaschen. Eluiert wurde die Probe mit 20 PB mit 500 mM Salzkonzentration. Anschließend wurde mit 1 bzw. 2 M NaCl die Säule gewaschen. Gegebenfalls wurde die Säule zusätzlich mit je 2 CV 0.5 N NaOH-1 M NaCl, 0.5N HCl, Methanol gewaschen und mit destilliertem Wasser regeneriert.

Die Fraktionen wurden automatisch in 1 oder 3 ml Fraktionen aufgesammelt und auf Viruspartikel (ELISA) bzw. Transduktionseffizienz (Virustiter) getestet. Das Chromatogramm wurde mit der HPLC Software Unicorn ausgewertet.

4.2.6 Ultrazentrifugation der Vektorsuspension

Um eine Vektorsuspension zu konzentrieren, wurde unter anderem die Methode der Ultrazentrifugation verwendet. Nachdem der Überstand geerntet wurde, wurde er vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen 38,5 ml, Beckmann) auf ein 6 ml 20 % Saccharosekissen aufgetragen. Die Röhrchen wurden dann

für 2 h bei 28000 rpm und 4°C zentrifugiert (Surespin 630 Rotor, Sorvall). Danach wurde der flüssiger Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das unsichtbare Viruspellet für die Transduktionsexperimente in Medium oder PBS aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei – 80°C.

4.2.7 Ultrafiltration der Vektorsuspension

Nachdem die Vektorsuspension über HPLC aufgereinigt wurde, erfolgte gegenfalls eine Ultrafiltration. Diese Methode diente der Entsalzung oder einer zusätzliche Konzentrierung der Vektorsuspension. Hierzu wurden je 500µl aufgereinigte Virussuspension in eine Microcon Säule (Ausschlussgröße 30kDa) gegeben und bei 14000 g 12 Minuten filtriert. Alle unerwünschten Bestandteile, die unter 30 kDa lagen, wurden hierdurch entfernt. Alles was 3fach überhalb der Ausschlussgröße liegt, wurde durch die Matrix zurückgehalten und durch Umdrehen der Säule mit anschließender Zentrifugation bei 1000 g für 3 Minuten eluiert. Endvolumen war schließlich 10-20µl.

4.2.8 Tierexperimentelle Methoden

4.2.8.1 Tötung und Organentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Begasung mit CO₂ (Trockeneis) im Exikkator. Nach ein paar Minuten wurde der Tod durch das Setzen eines Schmerzreizes mit der Hilfe einer anatomischen Pinzette überprüft und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde mit Pinzette und Schere aus dem Schädel herauspräpariert. Für native Gewebeschnitte wurden sie in ein Plastikschrälchen, dass zur Hälfte mit Tissue Teck gefüllt war, überführt. Ohne Luftblasen zu erzeugen wurde dann das ganze Gehirn mit Tissue Teck überdeckt, auf Trockeneis tiefgefroren und anschließend bei -80°C bis zur Herstellung der Gewebedünnschnitte gelagert.

Für Paraffinschnitte wurden sie in Histofix überführt und für weitere Versuche wurden die entnommenen Gehirne in Histofix bei RT aufbewahrt oder mit Skalpell sagittal halbiert und eine Hälfte bei -80°C eingefroren und die andere Hälfte in Histofix ebenfalls bei RT gelagert.

4.2.8.2 Stereotaktische Injektion

Um virale Vektoren später in die krankheitsspezifisch betreffende Gehirnregionen einbringen zu können, wurde in dieser Arbeit die Methodik der Durchführung und die Präzision der stereotaktischen Injektion mit Hilfe der Injektion von handelsüblicher blauer Tinte erprobt. Hierzu wurden zunächst die demenzspezifischen betreffenden Gehirnregionen ausgewählt und die genauen Koordinaten aus dem „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“-Atlas (Paxinos & Franklin, 2003) entnommen.

Eine Insulinspritze wurde mit handelsüblicher Tinte befüllt und zunächst noch mit Kanülenhaube in den stereotaktischen Rahmen an der dafür vorhandene Stelle befestigt. Nachdem die C57/Bl6-Mäuse mittels CO₂-Begasung getötet wurden, wurden sie in einen stereotaktischen Rahmen durch Fixierung mittels Stäben in den Gehörgängen eingespannt. Nachdem die Kopfplatte mit 70 %igem Ethanol desinfiziert wurde, wurde die Kopfhaut und die Unterhaut durch einen medianen Schnitt (ca. 15mm) mit einem Skalpell geöffnet. Im Anschluss wurde das Periost der freigelegten Schädeldecke mittels Skalpellklinge vom Knochen gelöst. Die nun sichtbaren Kreuzungspunkte der Knochennähte, die Sutura lambdoidea (Lambda) und Bregma wurden mittels Fixierung der Schnauze auf eine Höhe ausgerichtet werden. Die Kanülenhaube wurde nun entfernt und die Kanülenspitze wurde mit Hilfe der vertikalen und horizontalen Führungsschrauben auf den Bregmapunkt eingestellt. Ausgehend von diesem Punkt konnte die Kanüle mit Hilfe der zuvor ausgewählten Koordinaten zu der gewünschten Einstichstelle geführt werden. Dann wurde die Kanüle mittels einer Höhenschraube so abgesenkt, dass die Spitze die Schädeldecke leicht berührt. Nun wurde durch Einstellen der Tiefen-Koordinate die Kanüle durch den Schädel gestochen und zu der erwünschten Region geführt. Anschließend wurden 10-20µl Tinte injiziert, kurz gewartet und dann die Kanüle wieder durch Bewegen der Höhenschraube nach oben aus dem Schädel geführt. Die Maus wurde aus der Halterung gelöst. Das Gehirn wurde entnommen und in Tissue Teck bei -80 C eingefroren.

4.2.8.3 Aufbau und Sicherung des transgen Stammes B6.Cg-Tg (PDGFB-APP_{SwInd})20Lms/2J

4.2.8.3.1 Zucht und Haltung

Zucht und Haltung der transgenen Stammes B6.Cg-Tg(PDGFB-APP_{SwInd})20Lms/2J erfolgten im institutseigenen Tierstall unter Standardbedingungen (Raumtemperatur ca.

23 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %, zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 6-18Uhr). In Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckung wurden die Tiere in Gruppen von 2-8 Mäusen auf Standardeinstreu gehalten. Sie bekamen Trinkwasser und Standardfutter ad libitum.

Da die transgene Linie den genetischen Hintergrund des C57Bl/6 Stammes besaß, wurden zum Aufbau und Sicherung des heterozygot transgenen Stammes die drei gekauften Foundertiere mit nicht transgenen (wild-typ) C57Bl/6 Kontrolltieren aus der institutseigenen Zucht verpaart. Hierzu wurden jeweils ein transgen-positiver Mäusebock mit 2-3 wild-typ C57Bl/6 Mäusen in einen Käfig für eine Woche zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden nach 21 Tagen abgesetzt, an den Ohren markiert und Schwanzgewebe für die Genotypisierung entnommen. Da laut Stammbeschreibung, transgene Weibchen weniger für die Zucht geeignet sind, wurden transgene männliche Nachkommen zur weiteren Zucht verwendet. Es wurde ein Zucht- und Haltpungsplan erstellt und alle Zuchtvorgänge darin dokumentiert wurden.

4.2.8.3.2 Schwanzspitzen-Biopsie

Drei Wochen post partum wurden die gezüchteten Jungtiere abgesetzt. Gleichzeitig wurden zur Identifizierung die Ohren durch Einschneiden markiert und für eine Genotypisierung ein kleines Stück des Schwanzgewebes abgetrennt. Das Biopsie-Material wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert.

4.2.9 Histologische Methoden

4.2.9.1 Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung

Das entnommene Organ wurde je nach Versuchsziel entweder fixiert oder eingefroren.

4.2.9.2 Einfrieren und Herstellung von Gefrierschnitten

Natives Schwanzgewebe für PCR-Analyse wurde sofort auf Eis eingefroren und bei -20°C gelagert.

Native Gehirne wurden für die Anfertigung von Gewebeschnitten in einer Plastikschaale oder Kryo-Röhrchen mit ausreichender Menge Tissue-Tek auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Gewebeschnitte wurden im CM 1900 Kryostaten bei -20°C Objekttemperatur angefertigt. Die 10µm-30µm dicken Schnitte wurden auf dem SuperFrost Plus Objektträger aufgenommenen und bis zur weiteren Verwendung bei -

20°C gelagert. Native Gehirne für proteinchemische Methoden wurden sofort auf Eis eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.9.3 Fixieren und Herstellen von Paraffinschnitten

Native Gehirne für immunhistologischer Versuche wurden direkt nach der Entnahme zunächst in einem 15 ml Falcon in 15ml 4 % igem Formalin verschlossen 24 h gelagert. Die Präparate wurden in Paraffinwachs eingebettet und am Mikrotom 5 µm-dünne Schnitte angefertigt. Damit diese sich ausbreiten und glätten können, wurden sie in ein 40°C warmes Wasserbad gelegt und danach schnell auf SuperFrost Plus Objektträger überführt. Sie wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.9.4 Immunohistochemischer Nachweis von Aβ Plaques

Für den Nachweis der Aβ Plaques wurden die paraffinierten Gewebeschnitte verwendet. Zunächst wurden sie durch eine zweimal 10 minütige Inkubation in Xylol und je zweimal 5 minütige Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (in 100%, 96% und 70% EtOH) entparaffiniert. Um die Gewebeschnitte färben zu können, mussten zunächst die Epitope für die Antikörper aus dem fixierten Gewebe freigelegt werden. Hierzu wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in Zitratpuffer und dann 10 min in TBS abgekühlt. Im Anschluss eines kurzen Waschschrilles mit dd H₂O, wurden zur Inaktivierung der endogene Peroxidasen die Schnitte 15 Minuten in eine 0,7%igen(v/v) Wasserstoffperoxidlösung getaucht. Die Objektträger wurden dann wiederum mit TBS gewaschen, für 30 Minuten mit 1,5% igem Pferdeserum geblockt und bei 4°C über Nacht mit dem ersten Antikörper (mouse monokl. Human amyloid β Protein IgG2b -Firma Signet) inkubiert. Als negative Kontrolle wurde 0,1% BSA/PBS Lösung verwendet. Nach zwei TBS-Waschschrillen (je 10 min) folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper.(horse anti-mouse IgG (H+L)) für eine Stunde bei RT. Die Entwicklung der Schnitte erfolgte nach Anweisung des Herstellers (Vectastain ABC Reagenz, Vector/Linaris, DAB,Sigma).

4.2.10 Statistik

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen, einschließlich die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts wurden mit Microsoft Excel oder GraphPad Prism ausgeführt.

Mit Hilfe von Prism wurden die statistische Signifikanzen über den parameterfreien Mann-Whitney-U-Test und einem Konfidenzintervall von 95% bestimmt.

Die Bestimmung der EC_{50} -Werte erfolgte ebenfalls mit diesen Statistikprogramm. Hierzu wurden nach logarithmische Transformation der Daten, eine nichtlineare Regressionskurve unter Verwendung eines Algorithmus zur bestmöglichen Anpassung der Kurve an die Versuchsdaten erstellt. Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte unter Darstellung der sigmoidale Dosis-Wirkungs Kurve, mit Festsetzung des Maximalwertes auf 100 und des Minimalwertes auf 0 und einer variablen Steigung.

Der statistische Vergleich der Zytotoxizität zweier verschiedener mit der Durchflusszytometrie bestimmte Datensätze wurden mit der Applikation des F-Tests erstellt.

5 Literatur

Abd El Mohsen, M.M., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., and Rice-Evans, C.A. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* 33, 1693-1702.

Adayev, T., Estephan, R., Meserole, S., Mazza, B., Yurkow, E.J., and Banerjee, P. (1998). Externalization of phosphatidylserine may not be an early signal of apoptosis in neuronal cells, but only the phosphatidylserine-displaying apoptotic cells are phagocytosed by microglia. *J Neurochem* 71, 1854-1864.

Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Fernandez, Y., Anciaux, N., Demigne, C., and Remesy, C. (1996). Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 105, 61-70.

Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Remesy, C., Chap, H., and Payraastre, B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53, 1649-1657.

Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W., and Markesbery, W.R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103, 373-383.

Akula, S.M., Ford, P.W., Whitman, A.G., Hamden, K.E., Shelton, J.G., and McCubrey, J.A. (2004). Raf promotes human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection. *Oncogene* 23, 5227-5241.

Anliker, B., and Muller, U. (2006). The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3, 239-246.

Arends, M.J., and Wyllie, A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32, 223-254.

Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 231-235.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Asokan, A., Conway, J.C., Phillips, J.L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H.J., Agbandje-McKenna, M., *et al.* (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* 28, 79-82.

Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., and Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 68, 209-245.

Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van Bladeren, P.J., Vervoort, J., and Rietjens, I.M. (2002a). The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chem Res Toxicol* 15, 343-351.

Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van der Woude, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J., Vervoort, J., and Rietjens, I.M. (2002b). Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett* 520, 30-34.

Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1988). Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6132-6136.

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Tran, M.X., and Stohs, S.J. (1997). Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95, 179-189.

Bagli, E., Stefanidou, M., Morbidelli, L., Ziche, M., Psillas, K., Murphy, C., and Fotsis, T. (2004). Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res* 64, 7936-7946.

Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.

Banfield, B.W., Leduc, Y., Esford, L., Schubert, K., and Tufaro, F. (1995). Sequential isolation of proteoglycan synthesis mutants by using herpes simplex virus as a selective agent: evidence for a proteoglycan-independent virus entry pathway. *J Virol* 69, 3290-3298.

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R. (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci* 12, 1882-1890.

Berg, A., Pietschmann, T., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Determinants of foamy virus envelope glycoprotein mediated resistance to superinfection. *Virology* 314, 243-252.

Berkowitz, R., Fisher, J., and Goff, S.P. (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 177-218. Bermudez-Soto, M. J.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* 2007, 102, 865-874.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bieniasz, P.D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M.D., Chrystie, I., and McClure, M.O. (1995). A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* 207, 217-228.

Birkmann, A., Mahr, K., Ensser, A., Yaguboglu, S., Titgemeyer, F., Fleckenstein, B., and Neipel, F. (2001). Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol* 75, 11583-11593.

Birt, D.F., Hendrich, S., and Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 90, 157-177.

Bodem, J., Kang, Y., and Flugel, R.M. (2004). Comparative functional characterization of the feline foamy virus transactivator reveals its species specificity. *Virology* 318, 32-36.

- Bodem, J., Krausslich, H.G., and Rethwilm, A. (2007). Acetylation of the foamy virus transactivator Tas by PCAF augments promoter-binding affinity and virus transcription. *J Gen Virol* 88, 259-263.
- Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., and Kroke, A. (1998). [Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases]. *Z Ernährungswiss* 37, 147-163.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Boyer, J., Brown, D., and Liu, R.H. (2005). In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutr J* 4, 1.
- Brouwers, N., Slegers, K., Engelborghs, S., Bogaerts, V., Serneels, S., Kamali, K., Corsmit, E., De Leenheir, E., Martin, J.J., De Deyn, P.P., *et al.* (2006). Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Brain* 129, 2984-2991.
- Brownson, D.M., Azios, N.G., Fuqua, B.K., Dharmawardhane, S.F., and Mabry, T.J. (2002). Flavonoid effects relevant to cancer. *J Nutr* 132, 3482S-3489S.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 280, 5636-5645.
- Buschmann, P., Eine Recherche anhand von Publikationen zwischen 1995 und 2002 unter besonderer Berücksichtigung der Wirkungen und Wirksamkeiten der Flavonoide. *Dissertation*, Universität Graz 2002.
- Butterfield, D.A., Reed, T., Newman, S.F., and Sultana, R. (2007). Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 43, 658-677.
- Byrnes, A.P., and Griffin, D.E. (1998). Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72, 7349-7356.
- Caldwell, E.E., Nadkarni, V.D., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., and Weiler, J.M. (1996). Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 203-216.
- Callahan, M.E., Switzer, W.M., Matthews, A.L., Roberts, B.D., Heneine, W., Folks, T.M., and Sandstrom, P.A. (1999). Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene. *J Virol* 73, 9619-9624.
- Calvert, P.M., and Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137, 603-612.
- Cao, G., Sofic, E., and Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22, 749-760.

- Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 391-412.
- Carbonaro, M., and Grant, G. (2005). Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Ann Nutr Metab* 49, 178-182.
- Cardin, A.D., and Weintraub, H.J. (1989). Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32.
- Cartellieri, M., Herchenroder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2005). N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* 79, 12464-12476.
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., and Kroemer, G. (1996). Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157, 512-521.
- Castillo, G.M., Ngo, C., Cummings, J., Wight, T.N., and Snow, A.D. (1997). Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability. *J Neurochem* 69, 2452-2465.
- Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
- Chang, H., Mi, M., Ling, W., Zhu, J., Zhang, Q., Wei, N., Zhou, Y., Tang, Y., and Yuan, J. (2008). Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro. *Arch Pharm Res* 31, 1137-1144.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866-871.
- Chen Chiao, Y.C., Gurudath Rao, K., Hook, J.W., 3rd, Krugh, T.R., and Sengupta, S.K. (1979). 7-Amino-actinomycin D complexes with deoxynucleotides as models for the binding of the drug to DNA. *Biopolymers* 18, 1749-1762.
- Chen, C.Y., Peng, W.H., Tsai, K.D., and Hsu, S.L. (2007). Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci* 81, 1602-1614.
- Chen, D., Daniel, K.G., Chen, M.S., Kuhn, D.J., Landis-Piwowar, K.R., and Dou, Q.P. (2005). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 69, 1421-1432.
- Chen, J.H., Lin, K.P., and Chen, Y.C. (2009). Risk factors for dementia. *J Formos Med Assoc* 108, 754-764.
- Chen, M., and Wang, J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7, 313-319.
- Chiang, C.T., Way, T.D., and Lin, J.K. (2007). Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21(WAF1/CIP1) expression with rapamycin. *Mol Cancer Ther* 6, 2127-2138.

- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71, 621S-629S.
- Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., and Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72, 1577-1585.
- Citron, M. (2000). Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 6, 392-397.
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9, 387-398.
- Cole, S.L., and Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2, 22.
- Cole, S.L., and Vassar, R. (2008). The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem* 283, 29621-29625.
- Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-841.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Vanden Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61, 71-76.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., and Gaydou, E.M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 20, 35-43.
- Cotrim, A.P., and Baum, B.J. (2008). Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol* 36, 97-103.
- Crublet, E., Andrieu, J.P., Vives, R.R., and Lortat-Jacob, H. (2008). The HIV-1 envelope glycoprotein gp120 features four heparan sulfate binding domains, including the co-receptor binding site. *J Biol Chem* 283, 15193-15200.
- Cullen, B.R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-692.
- Cunningham, B.D., Threadgill, M.D., Groundwater, P.W., Dale, I.L., and Hickman, J.A. (1992). Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anticancer Drug Des* 7, 365-384.
- Dasgupta, J., Bienkowska-Haba, M., Ortega, M.E., Patel, H.D., Bodevin, S., Spillmann, D., Bishop, B., Sapp, M., and Chen, X.S. (2011). Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J Biol Chem* 286, 2617-2624.

Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., and Williamson, G. (2000a). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468, 166-170.

Day, A.J., Bao, Y., Morgan, M.R., and Williamson, G. (2000b). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 29, 1234-1243.

Dehecchi, M.C., Tamanini, A., Bonizzato, A., and Cabrini, G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 268, 382-390.

De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.

Deglon, N., and Hantraye, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J Gene Med* 7, 530-539.

Delacourte, A., and Buee, L. (2000). Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 13, 371-376.

Delelis, O., Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004). Foamy viruses--a world apart. *Curr Opin Microbiol* 7, 400-406.

Depeint, F., Gee, J.M., Williamson, G., and Johnson, I.T. (2002). Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61, 97-103.

Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., and Gregory, C.D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., and Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65, 337-353.

Dickson, D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339.

Dickson, D.W., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., and Yen, S.H. (1988). Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol* 132, 86-101.

Dimitrov, D.S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2, 109-122.

Divi, R.L., and Doerge, D.R. (1996). Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol* 9, 16-23.

Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Prado, I.M., Helena, A.F., Uyemura, S.A., Santos, A.C., and Curti, C. (2005). The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact* 152, 67-78.

- Duda, A., Luftenegger, D., Pietschmann, T., and Lindemann, D. (2006). Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain. *J Virol* 80, 8158-8167.
- Duda, A., Stange, A., Luftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S.W., Linial, M.L., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2004). Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J Virol* 78, 13865-13870.
- Dulin, F., Leveille, F., Ortega, J.B., Mornon, J.P., Buisson, A., Callebaut, I., and Colloc'h, N. (2008). P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582, 1865-1870.
- Duthie, S.J., and Dobson, V.L. (1999). Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 38, 28-34.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, 258-289.
- Eisenbrand, G.; Metzler, M., *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Wiley, VCH: Weinheim, 2005.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Ende, C., and Gebhardt, R. (2004). Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* 70, 1006-1008.
- Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86, 277-286.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., and Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 71, 7312-7317.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4137-4141.
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., and Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* 80 (Pt 6), 1445-1452.
- Erlund, I., Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* 2004, 24, 851-874.
- Erlund, I., Alfthan, G., Maenpaa, J., and Aro, A. (2001). Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more bioavailable from rutin in women than in men. *Arch Intern Med* 161, 1919-1920.
- Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., Kesaniemi, Y.A., and Aro, A. (2002). Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human

subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 56, 891-898.

Erlwein, O., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (1998). Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol* 72, 5510-5516.

Erlwein, O., and Rethwilm, A. (1993). BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* 196, 256-268.

Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.

Escrevente, C., Morais, V.A., Keller, S., Soares, C.M., Altevogt, P., and Costa, J. (2008). Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1780, 905-913.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 1071-1077.

Fahrenholz, F., Gilbert, S., Kojro, E., Lammich, S., and Postina, R. (2000). Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci* 920, 215-222.

Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenroder, O., Spatz, W., Volk, B., Bohm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., *et al.* (1999). Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14.

Falcone, V., Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (2003). Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 161-180.

Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349-1356.

Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M.A., Eckman, E.A., Bertram, L., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., and Selkoe, D.J. (2004). Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* 164, 1425-1434.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J.G., and Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J Virol* 72, 1610-1615.
- Flanagan, M. (1992). Isolation of a spumavirus from a sheep. *Aust Vet J* 69, 112-113.
- Flugel, R.M., and Pfrepper, K.I. (2003). Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 63-88.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57, 2916-2921.
- Fromm, J.R., Hileman, R.E., Caldwell, E.E., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1995). Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys* 323, 279-287.
- Fry, E.E., Lea, S.M., Jackson, T., Newman, J.W., Ellard, F.M., Blakemore, W.E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A.M., and Stuart, D.I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J* 18, 543-554.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.
- Galati, G., and O'Brien, P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37, 287-303.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., *et al.* (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Gratacap, M.P., Tulliez, J., Chap, H., and Payraastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* 32, 279-286.
- Gandhi, S., Refolo, L.M., and Sambamurti, K. (2004). Amyloid precursor protein compartmentalization restricts beta-amyloid production: therapeutic targets based on BACE compartmentalization. *J Mol Neurosci* 24, 137-143.
- Gandy, S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115, 1121-1129.
- Ganguly, C., Saha, P., Panda, C.K., and Das, S. (2005). Inhibition of growth, induction of apoptosis and alteration of gene expression by tea polyphenols in the highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460. *Asian Pac J Cancer Prev* 6, 326-331.
- Gao, G., Qu, G., Burnham, M.S., Huang, J., Chirmule, N., Joshi, B., Yu, Q.C., Marsh, J.A., Conceicao, C.M., and Wilson, J.M. (2000). Purification of recombinant adeno-associated

virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther* 11, 2079-2091.

Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schnolzer, M., and Lochelt, M. (2004). Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein. *J Virol* 78, 13573-13581.

Geiselhart, V., Schwantes, A., Bastone, P., Frech, M., and Lochelt, M. (2003). Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for virus morphogenesis. *Virology* 310, 235-244.

Gibson, G.G. (1996). Peroxisome proliferators and cytochrome P4504A induction. *Ann N Y Acad Sci* 804, 328-340.

Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75, 1565-1570.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., *et al.* (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Goepfert, P.A., Shaw, K.L., Ritter, G.D., Jr., and Mulligan, M.J. (1997). A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J Virol* 71, 778-784.

Golstein, P., Ojcius, D.M., and Young, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121, 29-65.

Gomes, A.Q., Ali, B.R., Ramalho, J.S., Godfrey, R.F., Barral, D.C., Hume, A.N., and Seabra, M.C. (2003). Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell* 14, 1882-1899.

Gonzalez-Alegre, P. (2007). Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: From promise to progress. *Pharmacol Ther* 114, 34-55.

Goyarzu, P., Malin, D.H., Lau, F.C., Taglialatela, G., Moon, W.D., Jennings, R., Moy, E., Moy, D., Lippold, S., Shukitt-Hale, B., *et al.* (2004). Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. *Nutr Neurosci* 7, 75-83.

Gralle, M., and Ferreira, S.T. (2007). Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* 82, 11-32.

Griffith, O.W. (1982). Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257, 13704-13712.

Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., and Prior, R.L. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem* 51, 7513-7521.

Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., and Altevogt, D.P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* 17, 292-294.

- Hallak, L.K., Spillmann, D., Collins, P.L., and Peeples, M.E. (2000). Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 74, 10508-10513.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harborne, J. B., *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London 1994.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20, 154-159.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harrop, H.A., and Rider, C.C. (1998). Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology* 8, 131-137.
- He, F., Blair, W.S., Fukushima, J., and Cullen, B.R. (1996). The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol* 70, 3902-3908.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2002a). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* 76, 3774-3783.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., and Rethwilm, A. (2002b). Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* 76, 10069-10073.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., *et al.* (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J* 19, 3436-3445.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* 72, 6307-6314.
- Helton, E.S., and Chen, X. (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100, 883-896.
- Heneine, W., Schweizer, M., Sandstrom, P., and Folks, T. (2003). Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 181-196.
- Henson, P.M., Bratton, D.L., and Fadok, V.A. (2001). Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11, R795-805.

Heo, H.J., and Lee, C.Y. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 53, 1984-1989.

Herchenroder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P.A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201, 187-199.

Herrmann, K., Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbsobstbau*. 1990, 32, 31-37.

Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.

Hetts, S.W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279, 300-307.

Hibasami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T., and Komiya, T. (1996). Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res* 16, 1943-1946.

Higuchi, W. I.; Ho, N. F.; Park, J. Y.; Komiya, I., Rate-limiting steps and factors in drug absorption. In *Drug Absorption*, Prescott, L. F.; Nimmo, W. S., Eds. ADIS Press: New York, 1981; pp. 35-60.

Hill, C.L., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (1999). Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* 80 (Pt 8), 2003-2009.

Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., *et al.* (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 3017-3023.

Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., and Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47, 357-362.

Hirano, T., Abe, K., Gotoh, M., and Oka, K. (1995). Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer* 72, 1380-1388.

Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Ovaskainen, M.L., Hakkinen, S., Albanes, D., and Virtamo, J. (2001). Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 12, 62-67.

Ho, A., and Sudhof, T.C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2548-2553.

Hoglund, K., Thelen, K.M., Syversen, S., Sjogren, M., von Bergmann, K., Wallin, A., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Lutjohann, D., and Blennow, K. (2005). The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19, 256-265.

- Holcomb, L.A., Gordon, M.N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K., and Morgan, D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 29, 177-185.
- Hooks, J.J., Gibbs, C.J., Jr., Cutchins, E.C., Rogers, N.G., Lampert, P., and Gajdusek, D.C. (1972). Characterization and distribution of two new foamy viruses isolated from chimpanzees. *Arch Gesamte Virusforsch* 38, 38-55.
- Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H., and Sakai, T. (2005). Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene* 24, 7180-7189.
- Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O., and Bogers, J.P. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 407, 11-19.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., and Glynn, P. (1996). Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 (Pt 1), 45-50.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Hubbard, S., Darmani, N.A., Thrush, G.R., Dey, D., Burnham, L., Thompson, J.M., Jones, K., and Tiwari, V. (2010). Zebrafish-encoded 3-O-sulfotransferase-3 isoform mediates herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Zebrafish* 7, 181-187.
- Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L., and King, C.C. (1999). Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* 257, 156-167.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., and Selkoe, D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 268, 22959-22962.
- Hung, A.Y., Koo, E.H., Haass, C., and Selkoe, D.J. (1992). Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9439-9443.
- Hunter, E. (1997). *Viral Entry and Receptors*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2005). Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99, 437-447.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W., and King, A.M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 70, 5282-5287.
- Jacobasch, G.; Florian, S.; Pforte, H.; Hempel, J.; Schmehl, K.; Schmiedl, D., Inhibition of hereditary intestinal carcinoma development by flavonoids. In *Dietary anticarcinogens and antimutagens. Chemical and biological aspects*. Johnson, I. T.; Fenwick, G. R., Eds. Royal Soc. Chem.: Cambridge, 2000; pp. 312-323.

Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D.E., Fauci, A.S., and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348, 245-248.

Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., and Nikolov, D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291-304.

Joseph, J.A., Denisova, N.A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B., and Morgan, D. (2003). Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neurosci* 6, 153-162.

Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., and Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 5810-5822.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.

Kandaswami, C., and Middleton, E., Jr. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 366, 351-376.

Kang, Y., Blair, W.S., and Cullen, B.R. (1998). Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J Virol* 72, 504-511.

Katz, R.A., and Skalka, A.M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63, 133-173.

Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., and Yano, M. (1999). Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 896-899.

Kennedy-Stoskopf, S., Stoskopf, M.K., Eckhaus, M.A., and Strandberg, J.D. (1986). Isolation of a retrovirus and a herpesvirus from a captive California sea lion. *J Wildl Dis* 22, 156-164.

Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A., and Kleinschmidt, J.A. (2003). Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* 77, 11072-11081.

Kim, J., Lee, H.J., and Lee, K.W. (2010). Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112, 1415-1430.

Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M., and Wagner, E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4, 409-418.

Kitagawa, S., Nabekura, T., Kamiyama, S., Takahashi, T., Nakamura, Y., Kashiwada, Y., and Ikeshiro, Y. (2005). Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. *Biochem Pharmacol* 70, 1262-1266.

- Kogel, D., Aboud, M., and Flugel, R.M. (1995). Mutational analysis of the reverse transcriptase and ribonuclease H domains of the human foamy virus. *Nucleic Acids Res* 23, 2621-2625.
- Koutsilieris, E., Rethwilm, A., and Scheller, C. (2007). The therapeutic potential of siRNA in gene therapy of neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl*, 43-49.
- Kowalska, A. (2004). [The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease]. *Neurol Neurochir Pol* 38, 405-411.
- Kuhn, H., Romisch, I., and Belkner, J. (2005). The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Mol Nutr Food Res* 49, 1014-1029.
- Kuo, C.W., Mirsaliotis, A., and Brighty, D.W. (2011). Antibodies to the Envelope Glycoprotein of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Robustly Activate Cell-Mediated Cytotoxic Responses and Directly Neutralize Viral Infectivity at Multiple Steps of the Entry Process. *J Immunol*.
- LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3, 862-872.
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J., and Yang, C.S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 81, 284S-291S.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
- Le Gall, S.M., Bobe, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2009). ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20, 1785-1794.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother* 56, 296-301.
- Lee, H.J., Wang, C.J., Kuo, H.C., Chou, F.P., Jean, L.F., and Tseng, T.H. (2005). Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 124-131.
- Lee, W.J., Wu, L.F., Chen, W.K., Wang, C.J., and Tseng, T.H. (2006). Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways. *Chem Biol Interact* 160, 123-133.
- Lesser, S., Cermak, R., and Wolfram, S. (2004). Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr* 134, 1508-1511.
- Levites, Y., Amit, T., Mandel, S., and Youdim, M.B. (2003). Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* 17, 952-954.

- Levites, Y., Amit, T., Youdim, M.B., and Mandel, S. (2002). Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 277, 30574-30580.
- Lewinski, M.K., and Bushman, F.D. (2005). Retroviral DNA integration--mechanism and consequences. *Adv Genet* 55, 147-181.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 11, 3053-3058.
- LeWitt, P.A., and Taylor, D.C. (2008). Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics* 5, 210-225.
- Lin, J.K., Chen, Y.C., Huang, Y.T., and Lin-Shiau, S.Y. (1997). Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 28-29, 39-48.
- Lin, J.K., Liang, Y.C., and Lin-Shiau, S.Y. (1999a). Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 58, 911-915.
- Lin, J.H., Chiba, M., and Baillie, T.A. (1999b). Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev* 51, 135-158.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., and Shen, H.M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 634-646.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273, 24979-24982.
- Lindemann, D., and Goepfert, P.A. (2003). The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 111-129.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 75, 5762-5771.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* 8, 284-289.
- Linial, M.L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* 73, 1747-1755.
- Liu, J., and Thorp, S.C. (2002). Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med Res Rev* 22, 1-25.
- Lochelt, M., Muranyi, W., and Flugel, R.M. (1993). Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7317-7321.
- Lochelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y.B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., *et al.* (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7982-7987.

- Lovell, M.A., Ehmann, W.D., Butler, S.M., and Markesbery, W.R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 1594-1601.
- Lung, H.L., Ip, W.K., Chen, Z.Y., Mak, N.K., and Leung, K.N. (2004). Comparative study of the growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of black tea theaflavins and green tea catechin on murine myeloid leukemia cells. *Int J Mol Med* 13, 465-471.
- Luo, C., Wu, Q., Huang, X.N., Sun, A.S., and Shi, J.S. (2003). Ginkgo biloba leaf extract enhances levels of caspase-3 and amyloid precursor protein in normal rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 24, 152-156.
- Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68, 2061-2069.
- Malmquist, W.A., Van der Maaten, M.J., and Boothe, A.D. (1969). Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res* 29, 188-200.
- Manach, C. and J. L. Donovan (2004). "Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans." *Free Radic Res* 38(8): 771-785.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Mandel, S., Weinreb, O., Amit, T., and Youdim, M.B. (2004). Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 88, 1555-1569.
- Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., and Mandelkow, E.M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17, 83-90.
- Manthey, J.A. (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 7, S29-34.
- Marian und Mi Marian und Micksche 2006:
<http://www.clinicum.at/dynasite.cfm?dsmid=72499&dspaid=559489>
- Marshall, A.J., Rattray, M., and Vaughan, P.F. (2006). Chronic hypoxia in the human neuroblastoma SH-SY5Y causes reduced expression of the putative alpha-secretases, ADAM10 and TACE, without altering their mRNA levels. *Brain Res* 1099, 18-24.
- Martinez-Barragan, J.J., and del Angel, R.M. (2001). Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol* 75, 7818-7827.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., and Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757-2763.
- Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., and Kaneko, T. (2005). Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull* 28, 253-259.

Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.

Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003). Foamy virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 131-159.

Mergia, A., Leung, N.J., and Blackwell, J. (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol* 25, 2-7.

Michels, G. Vergleichende Untersuchungen protektiver und zytotoxischer Effekte von Polyphenolen in kultivierten Säugercellen. Dissertation, Heinrich – Heine Universität, Düsseldorf, 2005.

Middleton, E. J.; Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids-Advances in Research Since 1986*, Harborne J. B., Ed. Chapman & Hall: London, 1994; pp. 621-622.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751.

Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., and Ciaccio, P.J. (2004). Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* 82, 341-358.

Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., and Thiele, D.L. (2003). Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6221-6226.

Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., and Jennings, K.R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36, 1199-1208.

Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yang, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W., and Buhler, D.R. (1999). Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 37, 271-285.

Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., and Nauwynck, H.J. (2006). Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol* 80, 3487-3494.

Mitteilung an die Presse – 2876. Tagung des Rates Beschäftigung, Sozialpolitik, Gesundheit und Verbraucherschutz. 9.–10. Juni 2008, abgerufen am 21. Juli 2008 (PDF). S. 21

Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O., and Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71, 7305-7311.

Mok, S.S., Clippingdale, A.B., Beyreuther, K., Masters, C.L., Barrow, C.J., and Small, D.H. (2000). A beta peptides and calcium influence secretion of the amyloid protein precursor from chick sympathetic neurons in culture. *J Neurosci Res* 61, 449-457.

Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., *et al.* (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* 282, 35712-35721.

Mouria, M., Gukovskaya, A.S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O.J., Reber, H.A., and Pandol, S.J. (2002). Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer* 98, 761-769.

Moya, K.L., Benowitz, L.I., Schneider, G.E., and Allinquant, B. (1994). The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol* 161, 597-603.

Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.

Muranyi, W., and Flugel, R.M. (1991). Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol* 65, 727-735.

Nagai, M., and Osame, M. (2003). Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J Neurovirol* 9, 228-235.

Nakamura, M., and Slots, J. (1983). Salivary enzymes. Origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res* 18, 559-569.

Nakazato, T., Ito, K., Miyakawa, Y., Kinjo, K., Yamada, T., Hozumi, N., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2005). Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Haematologica* 90, 317-325.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C., and Virgili, F. (2001). Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med* 30, 722-733.

Nemeth, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., and Kroon, P.A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42, 29-42.

Netzer, K.O., Schliephake, A., Maurer, B., Watanabe, R., Aguzzi, A., and Rethwilm, A. (1993). Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* 192, 336-338.

Nishiyama, E., Iwamoto, N., Ohwada, J., and Arai, H. (1997). Distribution of apolipoprotein E in senile plaques in brains with Alzheimer's disease: investigation with the confocal laser scan microscope. *Brain Res* 750, 20-24.

Nunan, J., and Small, D.H. (2000). Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483, 6-10.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., *et al.* (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767.

Oberritter, H., Bericht zur DGE-Arbeitstagung 1998, Sekundäre Pflanzenstoffe. DGE-Info, 1998.

Obregon, D.F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G.W., Shytle, D., *et al.* (2006). ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281, 16419-16427.

O'Donnell, C.D., and Shukla, D. (2008). The Importance of Heparan Sulfate in Herpesvirus Infection. *Virol Sin* 23, 383-393.

Oh, M.J., Akhtar, J., Desai, P., and Shukla, D. (2010). A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 176-181.

Oken, B.S., Storzbach, D.M., and Kaye, J.A. (1998). The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55, 1409-1415.

Opie, S.R., Warrington, K.H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S., and Muzyczka, N. (2003). Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* 77, 6995-7006.

Orlacchio, A., Bernardi, G., and Martino, S. (2007). RNA interference as a tool for Alzheimer's disease therapy. *Mini Rev Med Chem* 7, 1166-1176.

Parr, A. J.; Bolwell, G. P. Review: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 985-1012.

Pagonis, C., Tauber, A.I., Pavlotsky, N., and Simons, E.R. (1986). Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem Pharmacol* 35, 237-245.

Pamplona, R., Dalfo, E., Ayala, V., Bellmunt, M.J., Prat, J., Ferrer, I., and Portero-Otin, M. (2005). Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 280, 21522-21530.

Pechanek, U. Phenolsäuren und Flavonoide. *Österreichische Apothekerzeitschrift*, 2006, 15, 6-16.

Peng, H.W., Cheng, F.C., Huang, Y.T., Chen, C.F., and Tsai, T.H. (1998). Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 714, 369-374.

Peters, K., Barg, N., Gartner, K., and Rethwilm, A. (2008). Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology* 373, 51-60.

Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2005). RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* 79, 7005-7013.

- Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalgleish, A.G., and Gibson, F.M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 87, 2244-2251.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722-4730.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieris, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., and Scheller, C. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 460, 1-9.
- Plumb, G.W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., and Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res* 29, 351-358.
- Pohl, C., Will, F., Dietrich, H., and Schrenk, D. (2006). Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J Agric Food Chem* 54, 10262-10268.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., *et al.* (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1456-1464.
- Prydz, K., and Dalen, K.T. (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113 Pt 2, 193-205.
- Ramanouskaya, T.V., Smolnykova, V.V., and Grinev, V.V. (2009). Relationship between structure and antiproliferative, proapoptotic, and differentiation effects of flavonoids on chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer Drugs* 20, 573-583.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545, 51-64.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52, 507-526.
- Reiss, K., and Saftig, P. (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20, 126-137.
- Rethwilm, A. (2007). Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 7, 261-271.
- Rethwilm, A. (2010). Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol* 199, 197-207.
- Rethwilm, A., Darai, G., Rosen, A., Maurer, B., and Flugel, R.M. (1987). Molecular cloning of the genome of human spumaretrovirus. *Gene* 59, 19-28.

Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B., and ter Meulen, V. (1991). The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 941-945.

Rezai-Zadeh, K., Arendash, G.W., Hou, H., Fernandez, F., Jensen, M., Runfeldt, M., Shytle, R.D., and Tan, J. (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* 1214, 177-187.

Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeanniton, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., *et al.* (2005). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J Neurosci* 25, 8807-8814.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.

Rider, C.C. (1997). The potential for heparin and its derivatives in the therapy and prevention of HIV-1 infection. *Glycoconj J* 14, 639-642.

Riggs, J.L., Oshirls, Taylor, D.O., and Lennette, E.H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222, 1190-1191.

RKI, Robert-Koch-Institut, *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, RKI: Berlin, 2006a; pp. 69-70.

Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., *et al.* (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.

Rojewski, M.T., Baldus, C., Knauf, W., Thiel, E., and Schrezenmeier, H. (2002). Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br J Haematol* 116, 555-563.

Roth, K.A. (2001). Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 829-838.

Rucinska, A., Kirko, S., and Gabryelak, T. (2007). Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cell Biol Int* 31, 1371-1378.

Ruiz-Saenz, J., Goez, Y., Tabares, W., and Lopez-Herrera, A. (2009). Cellular receptors for foot and mouth disease virus. *Intervirology* 52, 201-212.

Russell, R.A., Wiegand, H.L., Moore, M.D., Schafer, A., McClure, M.O., and Cullen, B.R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* 79, 8724-8731.

Rustigian, R., Johnston, P., and Reihart, H. (1955). Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc Soc Exp Biol Med* 88, 8-16.

Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., and Mason, P.W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* 71, 5115-5123.

- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., and de The, H. (1997). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* *71*, 1155-1161.
- Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., and Hunter, L.A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* *10*, 3941-3950.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., and Ignacimuthu, S. (2006). Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact* *164*, 1-14.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Saphire, A.C., Bobardt, M.D., and Gallay, P.A. (1999). Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J* *18*, 6771-6785.
- Sathasivam, S., Ince, P.G., and Shaw, P.J. (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* *27*, 257-274.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., and Saltmarsh, M. (2005a). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* *81*, 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2005b). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* *45*, 287-306.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* *130*, 2073S-2085S.
- Schewe, T., Kuhn, H., and Sies, H. (2002). Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr* *132*, 1825-1829.
- Schiller, J.T., Day, P.M., and Kines, R.C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* *118*, S12-17.
- Schliephake, A.W., and Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* *68*, 4946-4954.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C.H., and Giorgi, J.V. (1994). Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* *15*, 12-20.
- Schmidt, M., Herchenroder, O., Heeney, J., and Rethwilm, A. (1997). Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* *230*, 167-178.
- Schulte-Hermann, R.; Marian, B.; Bursch, W.; Grasl-Kraupp, B. In *Lehrbuch der Toxikologie*, Marquardt, H.; Schäfer, S., Eds. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2004; pp. 195-242.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* *254*, 439-459.

- Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17, 7-30.
- Secchiero, P., Sun, D., De Vico, A.L., Crowley, R.W., Reitz, M.S., Jr., Zauli, G., Lusso, P., and Gallo, R.C. (1997). Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* 71, 4571-4580.
- Segura, M.M., Kamen, A., Lavoie, M.C., and Garnier, A. (2007). Exploiting heparin-binding properties of MoMLV-based retroviral vectors for affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 846, 124-131.
- Segura, M.M., Kamen, A., Trudel, P., and Garnier, A. (2005). A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng* 90, 391-404.
- Sekher Pannala, A., Chan, T.S., O'Brien, P.J., and Rice-Evans, C.A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1161-1168.
- Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-597.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D.J., and Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 545-584.
- Selvendiran, K., Koga, H., Ueno, T., Yoshida, T., Maeyama, M., Torimura, T., Yano, H., Kojiro, M., and Sata, M. (2006). Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res* 66, 4826-4834.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., *et al.* (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.
- Shannon-Lowe, C., and Rowe, M. (2011). Epstein-Barr Virus Infection of Polarized Epithelial Cells via the Basolateral Surface by Memory B Cell-Mediated Transfer Infection. *PLoS Pathog* 7, e1001338.
- Shaw, K.L., Lindemann, D., Mulligan, M.J., and Goepfert, P.A. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* 77, 2338-2348.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., Frangione, B., *et al.* (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Sies, H., *Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action*. Academic Press, London-New York 1991.

- Silvestri, R. (2009). Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev* 29, 295-338.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460-6464.
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., and Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 56, 4855-4873.
- Singh, R.P., and Agarwal, R. (2006). Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Curr Drug Targets* 7, 345-354.
- Skibola, C.F., and Smith, M.T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29, 375-383.
- Slegers, K., and Van Duijn, C.M. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Pathogenesis and Risk Prediction. *Community Genet* 4, 197-203.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14, 2117-2127.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Smith, J.V., and Luo, Y. (2003). Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 5, 287-300.
- Smith, K.M., Gaultier, A., Cousin, H., Alfandari, D., White, J.M., and DeSimone, D.W. (2002). The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 159, 893-902.
- Snow, A.D., Nochlin, D., Sekiguichi, R., and Carlson, S.S. (1996). Identification in immunolocalization of a new class of proteoglycan (keratan sulfate) to the neuritic plaques of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 138, 305-317.
- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.
- Spear P.G., Entry of alphaherpesviruses into cells, *Semin. Virol.* 4 (1993) 167–180.
- Spencer, J.P. (2003). Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* 133, 3255S-3261S.
- Spillmann, D. (2001). Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83, 811-817.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R.M., Gartner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., *et al.* (2002). Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23, 39-100.

- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Gottlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., and Lindemann, D. (2005). Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol* 79, 5466-5476.
- Stirnnagel, K., Luftenegger, D., Stange, A., Swiersy, A., Mullers, E., Reh, J., Stanke, N., Grosse, A., Chiantia, S., Keller, H., *et al.* (2010). Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology* 7, 45.
- Stocker, W., and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol* 5, 383-390.
- Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H., and Fujiki, H. (1998). Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 19, 1771-1776.
- Stirnnagel, K., Luftenegger, D., Stange, A., Swiersy, A., Mullers, E., Reh, J., Stanke, N., Grosse, A., Chiantia, S., Keller, H., *et al.* (2010). Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology* 7, 45.
- Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72, 1438-1445.
- Swerdlow, R.H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2, 347-359.
- Switzer, W.M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M.E., Parekh, B., Lerche, N.W., Yee, J.L., Ely, J.J., Boneva, R., Chapman, L.E., *et al.* (2004). Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* 78, 2780-2789.
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 11, 380-381.
- Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2001). New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32, 181-184.
- Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545-555.
- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572-580.
- Thammawat, S., Sadlon, T.A., Hallsworth, P.G., and Gordon, D.L. (2008). Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J Virol* 82, 11767-11774.

- Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283, 29615-29619.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M.L., Neves, M., Koken, M., Saib, A., and de The, H. (2001). Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *J Virol* 75, 4367-4375.
- Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., Bruno, S., and Darzynkiewicz, Z. (1992). Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res* 52, 6200-6208.
- Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J., and Russell, D.W. (2002). Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther* 6, 321-328.
- Trobridge, G., and Russell, D.W. (2004). Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol* 78, 2327-2335.
- Tsai, T.-H. und Chen, Y.-F. Determination of Unbound Hesperetin in Rat Blood and Brain by Microdialysis Coupled to Microbore Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 8, No. 4, 2000, Pages 331-336*
- Ugolini, S., Mondor, I., and Sattentau, Q.J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 7, 144-149.
- Uhrig, S., Coutelle, O., Wiehe, T., Perabo, L., Hallek, M., and Buning, H. (2011). Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. *Gene Ther*.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Perez-Vicente, A., and Garcia-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 52, 135-138.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 53-66.
- Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Jr., Lindenmayer, G.E., and Walle, T. (2000a). Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 830-836.
- Walgren, R.A., Lin, J.T., Kinne, R.K., and Walle, T. (2000b). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 837-843.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., and Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 135, 48-52.

- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44**, 181-193.
- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172-1184.
- Wang, Y., and Ha, Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell* **15**, 343-353.
- Watzl, B., Leitzmann, C., *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart **1995**.
- Watzl, B.; Rechkemmer, G. Flavonoide. *Ernährungsumschau* 2001a, **48**, 499-503.
- Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K., and Uchida, A. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* **54**, 4952-4957.
- Wellmann, H., Kaltschmidt, B., and Kaltschmidt, C. (2001). Retrograde transport of transcription factor NF-kappa B in living neurons. *J Biol Chem* **276**, 11821-11829.
- Welton, A.F., Hurley, J., and Will, P. (1988). Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog Clin Biol Res* **280**, 301-312.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M.D., and Daniel, H. (2000). Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* **60**, 3823-3831.
- White, J.M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 598-606.
- Wiktorowicz, T Herstellung eines neuen foamyviralen Vektors durch Einengung der cis-aktiven Sequenzen Dissertation, Würzburg 2009
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2000). The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* **74**, 2885-2887.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S.D., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2001). Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol* **75**, 7995-8007.
- Williams, C.A., and Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* **21**, 539-573.
- Wisniewski, H.M., Vorbrod, A.W., Moretz, R.C., Lossinsky, A.S., and Grundke-Iqbal, I. (1982). Pathogenesis of neuritic (senile) and amyloid plaque formation. *Exp Brain Res Suppl* **5**, 3-9.
- Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* **145**, 1030-1035.
- Wolfe, N.D., Switzer, W.M., Carr, J.K., Bhullar, V.B., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Prosser, A.T., Torimiro, J.N., Wright, A., Mpoudi-Ngole, E., *et al.* (2004). Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* **363**, 932-937.

- Wolffram, S., Block, M., and Ader, P. (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* 132, 630-635.
- Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., and White, J.M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 131, 275-278.
- Wollersen, H., Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DADMS/MS. *Dissertation*, Universität Paderborn 2004.
- Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.J., *et al.* (2004). Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* 279, 12876-12882.
- Yamazaki, T., Koo, E.H., and Selkoe, D.J. (1997). Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J Neurosci* 17, 1004-1010.
- Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., and Folsom, A.R. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 149, 943-949.
- Yoon, G., Kang, B.Y., and Cheon, S.H. (2007). Topoisomerase I inhibition and cytotoxicity of licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. *Arch Pharm Res* 30, 313-316.
- Youdim, K.A., Dobbie, M.S., Kuhnle, G., Proteggente, A.R., Abbott, N.J., and Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* 85, 180-192.
- Yu, S.F., Baldwin, D.N., Gwynn, S.R., Yendapalli, S., and Linial, M.L. (1996). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, 1579-1582.
- Yu, S.F., Sullivan, M.D., and Linial, M.L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* 73, 1565-1572.
- Yu, H., Munoz, E.M., Edens, R.E., and Linhardt, R.J. (2005). Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1726, 168-176.
- Zessner, H., Pan, L., Will, F., Klimo, K., Knauff, J., Niewohner, R., Hummer, W., Owen, R., Richling, E., Frank, N., *et al.* (2008). Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1, S28-44.
- Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6, 973-9

Zhu, W., Li, J., and Liang, G. (2011). How does cellular heparan sulfate function in viral pathogenicity? *Biomed Environ Sci* 24, 81-87.