

Flavonoid-induzierte Cytotoxizität, Neuroprotektion und Immunmodulation im Zellmodell

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

vorgelegt von

Gabriele Korte

aus Kelheim

Würzburg 2007

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:

Publikationsliste

Veröffentlichungen

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.

Vorträge

Korte, G., Labib, S., Kraus, M., Kavvadias, D., Richling, E., Schreier, P., Flavonoid-Synthesen und Studien zu immunmodulatorischen / neuroprotektiven Effekten von Edukten und Metaboliten. DFG-Verbundforschungsprogramm, Potsdam, 28. November 2003.

Korte, G., Sand, P., Richling, E., Schreier, P., Studien zu immunmodulatorischen / neuroprotektiven Effekten von Edukten und Metaboliten. DFG-Verbundforschungsprogramm, Karlsruhe, 09. Mai 2005.

Korte, G., Sand, P., Koutsilieri, E., Scheller, C., Richling, E., Riederer, P., Schreier, P., Immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte von Flavonoiden. Wissenschafts-seminar der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg, Würzburg, 12. Januar 2005.

Korte, G., Sand, P., Hajak, G., Schreier, P., Zelluläre Effekte von Flavonoiden. Biomedizinisches Forschungsseminar der Universität Regensburg, Regensburg, 03. Mai 2007.

Korte, G., Sand, P., Hajak, G., Schreier, P., An apple a day... .Wissenschafts-seminar der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Regensburg, Regensburg, 23. Mai 2007.

Posterbeiträge

International Meeting of the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (HBV 2006),
Vancouver (Kanada) (17.-20. September 2006)

Böhm, S., Sand, P. G., Korte, G., Weiss, T. S., Jilg, W., Inhibition of *in vitro* hepatitis B
virus antigen production by the naturally occurring flavonoid scutellarein.

8. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Würzburg (26.-28. Oktober 2006)

Korte, G., Böhm, S., Sand, P. G., Schreier, P., Weiss, T. S., Jilg, W., Antiviral effect of
flavonoids, exemplified by effects of scutellarein on hepatitis B virus.

8th International EMBL PhD Student Symposium: Biology of Disease - A Molecular
Battlefield, Heidelberg (30. November-2. Dezember 2006)

Korte, G., Sand, P. G., Schreier, P., Scutellarein-inducible changes in RNA editing may
convey immunomodulatory / neuroprotective effects.

6. Forschungskongress der psychiatrischen und neurologischen Fachkliniken der
bayerischen Bezirke, Irsee (10.-12. Oktober 2007)

Korte, G., Schreier, P., Hajak, G., Sand, P. G., Neuroprotektives Potential und
Cytotoxizität von Flavonoiden.

Erläuterungen

Die Namen von Gensequenzen sind in der vorliegenden Arbeit in kursiver, die der entsprechenden Proteine in normaler Schreibweise wiedergegeben.

Innerhalb von Nukleotidabfolgen stehen Großbuchstaben für exonische und Kleinbuchstaben für intronische Bereiche.

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 „®“ versehen.

Inhalt

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1
ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	11
1 EINLEITUNG	15
2 KENNTNISSTAND	19
2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Flavonoiden	19
2.2 Biologische Effekte von Flavonoiden	22
2.3 Einflüsse auf Neuroprotektion und Immunabwehr	24
2.3.1 Cytotoxische Effekte.....	24
2.3.2 Antioxidative Eigenschaften.....	28
2.3.3 Immunmodulation.....	31
2.3.4 Beeinflussung der Exzitotoxizität	34
2.3.4.1 Zentralnervöse Mediatoren der Exzitotoxizität	35
2.3.4.2 Glutamatrezeptoren: Struktur und Funktion	37
2.3.4.3 Exzitotoxizität durch posttranskriptionale Modifikationen	39
2.3.5 Direkte antivirale Effekte.....	43
2.3.5.1 Hepatitis B Virus Infektionen	44
2.3.5.2 Aufbau des Hepatitis B Virions und Genomstruktur	45
2.3.5.3 Virale Transkripte und Genprodukte	50
2.3.5.4 Regulatorische Elemente	53
2.3.5.5 HBV Replikationszyklus	54
2.3.5.6 Variationen und Mutationen im HBV-Genom	56
2.3.5.7 Strategien bei viraler Hepatitis B.....	57
2.3.5.8 Virusabwehr durch RNA editing	58

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	61
3.1	Cytotoxizitätsstudien	61
3.1.1	Cytotoxizitätsstudien (Jurkat und SK-N-SH).....	64
3.1.1.1	Durchflusszytometrie (Jurkat).....	64
3.1.1.2	Kinetik der Cytotoxizität (Jurkat)	68
3.1.1.3	Visualisierung der Cytotoxizität (SK-N-SH)	69
3.1.1.4	Durchflusszytometrie (SK-N-SH).....	70
3.1.1.5	Laktatdehydrogenase (LDH)-Bestimmungen (Jurkat und SK-N-SH)	72
3.1.2	Charakterisierung des Zelltods als Apoptose oder Nekrose.....	75
3.1.2.1	Charakterisierung des Zelltods mittels FACS (Jurkat und SK-N-SH)....	76
3.1.2.2	Charakterisierung des Zelltods mittels des Breitspektrum-Caspase- Inhibitors zVAD (Jurkat- und SK-N-SH).....	78
3.1.2.3	DNA-Fragmentierung (Jurkat).....	79
3.1.3	Oxidativer Stress	86
3.1.3.1	Glutathion-Bestimmungen (Jurkat und SK-N-SH)	86
3.1.3.2	Inhibierung der Cytotoxizität mittels der Antioxidantien Glutathion und NAC (Jurkat und SK-N-SH).....	88
3.1.4	Lipidperoxidation (LPO) (Jurkat und SK-N-SH).....	91
3.1.5	Fenton Reagenz (Jurkat und SK-N-SH).....	92
3.1.6	Cytotoxizitätsstudien (HL-60).....	96
3.2	Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften	101
3.2.1	Co-Inkubationsmodell	103
3.2.2	Prä-Inkubationsmodell	105
3.2.3	Vergleich der Ergebnisse beider Modelle	106
3.3	Immunmodulatorische Effekte: Genexpressionsstudien	112
3.3.1	Genexpressionsprofile mittels cDNA-Arrays	113
3.3.2	Verifizierung mittels Realtime-PCR und Nachweis alternativ gespleißter Transkripte für <i>ADAR1</i>	125
3.3.3	ADAR1-Western Blots	131

3.3.4	Quantitative Realtime-PCR für <i>ADAR2</i> und Gene der <i>APOBEC3</i> -Familie	133
3.4	Beeinflussung der Exzitotoxizität am Beispiel der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2.....	138
3.4.1	Spleißvarianten von GluR 2.....	139
3.4.2	Editierung von GluR 2-Transkripten	143
3.5	Untersuchung antiviraler Effekte anhand des Hepatitis B Virus	149
3.5.1	HBV-Experimente	149
3.5.1.1	HBV-DNA-Konzentration.....	150
3.5.1.2	HBs- und HBe-Antigenkonzentrationen.....	151
3.5.2	Cytotoxizitätsstudien von Scutellarein an primären humanen Hepatocyten.....	155
3.5.3	Wirkmechanismus.....	157
3.5.3.1	RNA Editierung als möglicher antiviraler Mechanismus.....	158
3.5.3.1.1	Region I.....	161
3.5.3.1.2	Region II	163
3.5.3.1.3	Region I nach Zugabe von PNA	164
3.5.3.2	Alternativ mögliche Wirkmechanismen	171
4	EXPERIMENTALTEIL	175
4.1	Material.....	175
4.1.1	Chemikalien	175
4.1.2	Verbrauchsmaterial	175
4.1.3	Zellen	176
4.1.4	Kits.....	176
4.1.5	Oligonukleotide, Längenstandards, Antikörper und Enzyme.....	177
4.2	Sonstige Hilfsmittel	180
4.3	Methoden	182
4.3.1	Zellen	182

4.3.1.1	Zelllinien	182
4.3.1.1.1	Auftauen von Zellen.....	182
4.3.1.1.2	Kultivieren von Zellen	183
a)	Passagieren von Suspensionszellen.....	183
b)	Passagieren von adhärennten Zellen.....	183
4.3.1.1.3	Einfrieren von Zellen	184
4.3.1.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	185
4.3.1.1.5	Mykoplasmentest	186
4.3.1.2	Primäre Zellen	188
4.3.1.3	Toxizitäts-Analyse-Methoden.....	188
4.3.1.3.1	Laktatdehydrogenase (LDH)-Test.....	189
4.3.1.3.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	191
4.3.1.3.2.1	Annexin-V-FITC/7-AAD-Doppelfärbung	191
4.3.1.3.2.2	Auswertung	194
4.3.1.3.3	ATP (Adenosin Triphosphat)-abhängige Cytotoxizitätstests.....	194
4.3.1.3.4	AlamarBlue-Test	196
4.3.1.3.5	DNA-Fragmentierung (DNA-Laddering)	196
4.3.1.4	Freie Radikale und Oxidativer Stress.....	198
4.3.1.4.1	Glutathionspiegelmessungen in der Zelle	199
4.3.1.4.2	Lipidperoxidation (LPO).....	200
4.3.1.4.3	Lumi-Max-Superoxide-Anionen-Detection-Kit.....	201
4.3.1.5	Mikroskopische Aufnahmen der SK-N-SH-Zellen und der primären humanen Hepatocyten	202
4.3.2	RNA	203
4.3.2.1	Isolierung von RNA aus Zellen.....	203
4.3.2.2	Überprüfung der RNA-Qualität und RNA-Konzentrationsbestimmung	203
4.3.2.3	Aufreinigung viraler RNA	203
4.3.3	DNA	204
4.3.3.1	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	204
4.3.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	204
4.3.3.2.1	Amplifizierung von DNA durch PCR.....	205

4.3.3.2.2	Quantitative PCR (Realtime-PCR)	207
4.3.3.2.2.1	Prinzip	207
4.3.3.2.2.2	Durchführung	209
4.3.3.2.2.3	Auswertung	211
4.3.3.2.3	PNA-angereicherte PCR	213
4.3.3.3	Agarosegelelektrophorese	214
4.3.3.4	Gelextraktion	215
4.3.3.5	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)	215
4.3.3.6	Genexpressionsstudien mittels cDNA-Array	216
4.3.3.6.1	Prinzip	216
4.3.3.6.2	Durchführung	218
4.3.3.6.3	Auswertung	218
4.3.3.7	Klonierung	219
4.3.3.7.1	Prinzip	219
4.3.3.7.2	Durchführung	220
4.3.3.8	Minipräparation von Plasmid-DNA	223
4.3.3.9	Sequenzierung	224
4.3.3.10	Glycerinkulturen	224
4.3.4	Proteinchemische Methoden	224
4.3.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	224
4.3.4.2	Western Blots	225
4.3.4.2.1	Prinzip	225
4.3.4.2.2	Durchführung	227
4.3.4.2.2.1	Puffer und Lösungen	227
4.3.4.2.2.2	Probenvorbereitung und SDS-PAGE	230
4.3.4.2.2.3	Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen	230
4.3.4.2.2.4	Immundetektion immobilisierter Proteine	232
4.3.5	Hepatitis B Virus	232
4.3.5.1	Kultivierung der primären humanen Hepatocyten	233
4.3.5.2	HBV infektiöse Serum-Proben	233
4.3.5.3	<i>In vitro</i> HBV Infektion	233

4.3.5.4	Quantifizierung der viralen Antigene (HBsAg und HBeAg) und der Virus-DNA	235
4.3.6	Statistik.....	235
LITERATURVERZEICHNIS		237

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Aa/Bis Aa	Acrylamid/Bisacrylamid
7-AAD	7-Amino-actinomycin-D
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALS	<i>amyotrophic lateral sclerosis</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
<i>B.</i>	<i>Bacteroides</i>
BCP	Basic Core Promotor
β -ME	β -Mercaptoethanol
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter

C _T	<i>Cycle-Threshold</i>
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DR I / II	<i>direct repeat I / II</i>
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E.</i>	<i>Eubacterium</i>
EC ₅₀	<i>effective concentration at 50%</i>
Eds.	Editoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
G	Guanin
ge	<i>genome equivalent</i>
GLUT2	Natrium-unabhängiger Glucose-Transporter 1
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion in Form eines Dimers
h (hrs)	Stunde(n)

HAE	4-Hydroxyalkenale
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
I	Inosin
IC ₅₀	Konzentration eines Stoffes, bei der eine 50%-ige Inhibierung einer (biochemischen) Wirkung auftritt (<i>inhibitory concentration at 50%</i>)
INT	Iodtetrazoliumchlorid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KA	Kainat (2S, 3S, 4S-2-Carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidinacetat)
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
LPO	Lipidperoxidation
m	Meter
M	molar, mol/l
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MDA	Malondialdehyd
MEIA	Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assay
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRP1/2	<i>multidrug-resistance-associated</i> Protein 1/2
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
NAC	N-Acetyl-Cystein
NAD ⁺	Nicotinamadeninukleotid (oxidierte Form)
NADH	reduzierte Form von NAD ⁺
NADP ⁺	Nicotinamadeninukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	reduzierte Form von NADP ⁺
NFκB	Nuclear Factor kappa B
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
nt	Nukleotidbereich
ORF	offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
p.a.	<i>pro analysis</i>
p.i.	<i>post-infection</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
P-gp	P-Glykoprotein
pgRNA	prägenomische RNA
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHH	primäre humane Hepatocyten

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
prä-mRNA	primäre <i>messenger</i> RNA
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinyliden-fluorid
QUIS	Quisqualat
rcDNA	<i>relaxed circular</i> DNA
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SC ₅₀	<i>half maximal scavenging concentration</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SGLT1	Natrium-abhängiger Glucose-Transporter 1
siRNA	<i>small inhibitory</i> RNA
sog.	so genannte
SSC	Seitwärtsstreulicht, <i>Sideward Scatter</i>
Strep	Streptomycin
T	Thymin
t-ACPD	trans-1-Aminocyclopentan-1,3-dicarbonsäure
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	Uracil
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>Weight per volume</i>)
X-Gal	5'-Brom-4'-chlor-3'-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketon

Zusammenfassung

Flavonoide sind weitverbreitete sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und zugleich wertvolle Bestandteile der menschlichen Ernährung. Ihr Beitrag zur Prävention von chronischen Erkrankungen wird dabei zu großen Teilen auf immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte zurückgeführt, die miteinander in enger funktioneller Verbindung stehen. Daran beteiligt sind antioxidative Mechanismen, Elemente der Signaltransduktion und Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels. Eine Voraussetzung für die Nutzung dieser Eigenschaften der Flavonoide und für die Beurteilung ihrer Eignung für die Nahrungsergänzung stellt die Erfassung cytotoxischer Effekte dar.

Mit Ausnahme von Xanthohumol und Quercetin ist für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonoide sowohl in T-Zellen (Jurkat) als auch in neuronalen (SK-N-SH)-Zellen nach 24-stündiger Inkubation eine **geringgradige Cytotoxizität** festzuhalten. Ein halbmaximaler Verlust der Zellvitalität wird je nach Modell in Konzentrationen von 33 μM bzw. 45 μM für Xanthohumol und von 118 μM bzw. 208 μM für Quercetin erreicht. Die Cytotoxizität der übrigen untersuchten Substanzen (Hispidulin, Baicalein, Scutellarein, Hesperetin, Chrysin, Apigenin, Naringenin, Catechin, Pelargonidinchlorid und EMD 21388) ist demgegenüber deutlich niedriger. Soweit anhand der ausgewählten Flavonoide ableitbar, ergibt sich bezogen auf die chemische Struktur in humanen T-Zellen eine absteigende Cytotoxizität von Chalconverbindungen (Xanthohumol), über Flavonole (Quercetin), Flavone (Chrysin, Apigenin, Hispidulin, Baicalein, Scutellarein), Flavanone (Naringenin, Hesperetin), Anthocyanidine (Pelargonidinchlorid) zu den Catechinen (Catechin).

Der weiterführenden Charakterisierung (zVAD, DNA-Laddering) ist zu entnehmen, dass die zellulären Veränderungen substanzabhängig differieren und sowohl nekrotische Mechanismen (Xanthohumol) als auch apoptotische Vorgänge (Quercetin) einschließen. Eine erhöhte Lipidperoxidation im oberen Dosisbereich lässt darüber hinaus auf eine Beteiligung von oxidativem Stress an den von Xanthohumol-induzierten nekrotischen Prozessen schließen. Eine positive Einflussnahme auf die Zellvitalität durch Antioxidantien wie GSH und NAC lässt des Weiteren vermuten, dass die erfassten Flavonoid-induzierten Prozesse jeweils sensitiv zum Redoxzustand der Zelle sind.

Während die Effekte von Xanthohumol auch in anderen Zellmodellen (HL-60) nachweisbar bleiben, verhält sich Quercetin nicht durchgehend vitalitätsmindernd und zeigt mitunter ein den anderen Flavonoiden vergleichbares Profil niedriger Toxizität.

Unterschiede zwischen den Testsubstanzen bestehen auch hinsichtlich antioxidativer Effekte. Dies ist insofern von Bedeutung, als oxidative Prozesse nach heutigem Kenntnisstand wesentlich an der Entstehung zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind. Das Eliminieren freier Radikale zählt zu den wichtigsten Mechanismen, die bei Flavonoid-vermittelter Neuroprotektion eine Rolle spielen. Insgesamt sind alle diesbezüglich untersuchten Substanzen, Quercetin, Hispidulin, Scutellarein und Xanthohumol, als **starke Superoxidationen-Radikalfänger** einzustufen. Im Co-Inkubationsversuch zeigt Scutellarein den stärksten Effekt ($SC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$), gefolgt von Quercetin ($SC_{50} = 0,9 \mu\text{M}$), Hispidulin ($SC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$) und Xanthohumol ($SC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$). Im Prä-Inkubations-Versuchsmodell liegen in der Reihenfolge ihrer Effektstärken Xanthohumol ($SC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$) und Quercetin ($SC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$) vor Hispidulin ($SC_{50} = 5,7 \mu\text{M}$). Scutellarein lässt hier die schwächsten Effekte erkennen ($SC_{50} = 33,1 \mu\text{M}$). Die modellabhängigen Konstanten können, unter Beteiligung einer passiven Diffusion der hydrophoben Flavonoidaglykone, auf eine substanzgebundene Membranpermeabilität zurückzuführen sein.

Das antioxidative Potential der Flavonoide resultiert u.a. aus einer komplexen Einflußnahme auf die Genexpression in der Zelle und auf die daran beteiligten Transkriptionsvorgänge. In der vorliegenden Arbeit sind anhand von cDNA-Arrays für mehrere Vertreter übereinstimmend **Wechselwirkungen mit Genen der zellulären Abwehr** dargestellt.

Demnach führen Scutellarein, Hispidulin, Quercetin und Xanthohumol zu einer deutlich reduzierten Expressionsstärke entsprechend dem 0,3-0,4-fachen der Referenzwerte von *STK4*, *CHD4*, *ARHGDI3*, *IL16*, *ISG20*, *PFN1* und *SOD2*. Unter den Flavonoid-induzierten Veränderungen ragen die Effekte auf *ADAR1* heraus, dessen Genexpression von Scutellarein bis auf ein 0,1-faches der Referenzwerte reduziert wird. Gleichsinnige Auswirkungen von Scutellarein auf die Expression von ADAR1-Protein in Western Blots unterstreichen diese Interaktion und legen nahe, dass ADAR-vermittelte

enzymatische Deaminierungen durch Flavonoide moduliert werden können. Diese Beobachtung wird ergänzt durch den nachgewiesenen Effekt von Flavonoiden auf die Expression einer Reihe weiterer Gene (*ADAR2*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G*), die analoge posttranskriptionale Mechanismen steuern und gleichermaßen in Immunabwehr und Neuroprotektion eingebunden sind.

Zu den wichtigsten Substraten von ADAR zählen neuronale Rezeptoren und insbesondere Glutamatrezeptoren. Erwartungsgemäß ist nach der Einwirkung von Scutellarein auf humane Zellen, die Glutamatrezeptoren exprimieren, ein Rückgang der Deaminierung im Bereich der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 zu verzeichnen (Q/R-Position). Dem entspricht in elektrophysiologischen Modellen eine gesteigerte Ca^{2+} -Permeabilität der jeweiligen Ionenkanäle und eine **veränderte neuronale Exzitabilität**. Es ergibt sich mit der Regulierung enzymatischer Deaminierungen von Primärtranskripten ein breites Spektrum zusätzlicher Optionen für die Induktion von gesundheitsrelevanten Flavonoidfunktionen in der Zelle.

So spielt die Modulation von Deaminierungen zugleich eine entscheidende Rolle im Vermehrungszyklus viraler Erreger. Die Annahme einer möglichen antiviralen Qualität von Scutellarein wird durch ein HBV-Infektionsmodell bestätigt. Zum Ausdruck kommt darin eine reduzierte Virusreplikation, die sich als Rückgang der Virus-DNA-Konzentration und der HBs- bzw. HBe-Antigenproduktion manifestiert. Offen bleibt auch nach ausführlicher Prüfung von möglichen viralen Substraten, ob der **deutliche antivirale Effekt** als das Produkt von Flavonoid-induzierten Veränderungen der Deaminierungsraten oder als Folge eines Effekts auf die virale Polymerase zu interpretieren ist.

Die hier dargestellten, bekannten und neuen Wirkmechanismen leisten einen Beitrag zum Verständnis der stetig zunehmenden Bedeutung von Flavonoiden für neue Anwendungen in Neuroprotektion und Immunabwehr. Zugleich zeigen sie ein komplexes System aus multiplen zellulären Effektoren auf, das einer weiteren, noch eingehenderen Charakterisierung bedarf.

Summary

Flavonoids are common secondary plant metabolites that confer numerous nutritional health effects. Their role in preventing chronic diseases is attributed to immunomodulatory and neuroprotective effects among others. Cellular mediators of these effects include antioxidative defense mechanisms, structures involved in signal transduction and key enzymes of cell metabolism. However, in order to fully exploit these properties and to assess the flavonoids' potential for dietary supplementation, the limitations imposed by the compounds' cytotoxic profiles must be addressed.

For the majority of compounds investigated, hispidulin, baicalein, scutellarein, hesperetin, chrysin, apigenin, naringenin, catechin, pelargonidinchloride and EMD 21388, the present study confirms **minimal cytotoxicity** in T-cells (Jurkat) and in neuronal cells (SK-N-SH). As for xanthohumol and quercetin a 50% decline in cell-vitality is observed at concentrations of 33-45 μM and 118-208 μM , respectively. When grouped by structure, cytotoxicity in human T cells decreases from chalcon-derivates (xanthohumol), via flavonoles (quercetin), flavones (chrysin, apigenin, hispidulin, baicalein, scutellarein), flavanones (naringenin, hesperetin) and anthocyanidines (pelargonidinchloride) up to catechins (catechin), which exhibit the most favourable profile.

Further characterization using zVAD and DNA-laddering indicate that cell-vitality may be compromised both by necrotic mechanisms (xanthohumol) and by apoptotic effects (quercetin). An increase in lipidperoxidation in the upper dose range suggests that oxidative stress may be involved in xanthohumol toxicity. As this is counteracted by antioxidants such as GSH and NAC, these flavonoids' impact on cell-vitality is likely codetermined by the cells' redox state. While the effects of xanthohumol extend to other cell models, quercetin toxicity in HL-60 cells is less pronounced.

Test compounds are also found to differ with regard to antioxidative profiles. The **elimination of free radicals** is a key mechanism in flavonoid-induced neuroprotection and is shown to vary with different incubation protocols. In short incubation experiments (5 min; co-incubation) scutellarein is identified as the most powerful scavenger ($\text{SC}_{50} = 0,4 \mu\text{M}$), followed by quercetin ($\text{SC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$), hispidulin ($\text{SC}_{50} =$

4,4 μM) and xanthohumol ($\text{SC}_{50} = 10,4 \mu\text{M}$). In prolonged incubations (24 hrs; prä-incubation) xanthohumol ($\text{SC}_{50} = 0,7 \mu\text{M}$) and quercetin ($\text{SC}_{50} = 1,0 \mu\text{M}$) are followed by hispidulin ($\text{SC}_{50} = 5,7 \mu\text{M}$) and scutellarein ($\text{SC}_{50} = 33,1 \mu\text{M}$). Model-specific constants suggest that passive diffusion of the hydrophobic flavonoid-aglyca may occur across cell membranes, alongside with other modes of permeation.

Flavonoids' antioxidative potential is mediated by complex effects on gene expression. The present work uses data from cDNA-arrays to highlight **interactions with genes involved in cellular defense**.

Specifically, scutellarein, hispidulin, quercetin and xanthohumol downregulate expression to 0,3-0,4-fold of reference values for *STK4*, *CHD4*, *ARHGDIB*, *IL16*, *ISG20*, *PFN1* and *SOD2*. In addition, flavonoids consistently downregulate *ADAR1*-expression, which drops to 0,1-fold of reference values and is paralleled by scutellarein-effects on ADAR1-protein-expression. Together, these findings indicate, that ADAR-mediated **enzymatic deamination may be modulated by flavonoids**. Similar effects are noted on related genes (*ADAR2*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* and *APOBEC3G*), relevant to posttranscriptional processing underlying immune defense and neuroprotection.

Glutamate receptors count among the most important neuronal substrates of ADAR. Following exposure to scutellarein a decrease in deamination rates is confirmed with respect to the glutamate receptor subunit GluR 2 (Q/R-site). As a result, an enhanced Ca^{2+} -permeability of the respective ion channels is anticipated, and **modified neuronal excitability**. Overall, the regulation of enzymatic deamination by flavonoids offers opportunities for multilevel balancing of cell homeostasis.

Thus deaminations may interfere with the replication cycle of viral pathogens. Using an *ex-vivo* HBV-infection model and three parameters of viral replication (viral load, HBs and HBe indices), **antiviral properties** of scutellarein are illustrated. Despite extensive investigation, it remains to be seen whether these effects can be ascribed to deaminations of viral DNA or to an interaction with other substrates, e.g. the viral polymerase.

In summary, the present observations serve to foster our understanding of flavonoids' roles in neuroprotection and immune defense, and invite further characterizations in view of future clinical applications.

1 Einleitung

Pflanzen produzieren eine große Anzahl an chemischen Verbindungen. Einige dieser Stoffe sind für den Stoffwechsel der Pflanze selbst wichtig und werden daher in großen Mengen in den Pflanzenzellen gespeichert. Hierzu zählen die pflanzlichen Fette und Öle, Vitamine und Aminosäuren, deren ernährungsphysiologische Effekte für den Menschen seit langem bekannt sind. In jüngster Zeit sind jedoch auch Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Sekundäre Pflanzenstoffe) immer mehr ins Blickfeld der Ernährungsforschung gerückt (Singh et al., 2003).

Der Begriff der sog. Sekundären Pflanzenstoffe wurde erstmals im Jahre 1910 von Kossel eingeführt (Watzl und Leitzmann, 1999). Dabei handelt es sich um Stoffe, welche nicht unmittelbar im Energiestoffwechsel von Pflanzen erforderlich sind, sondern unterschiedlichste Funktionen im Sekundärstoffwechsel übernehmen. Sie können u.a. zur UV-Protektion, als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, sowie als Wachstumsregulatoren dienen (Wollersen, 2004). Weiterhin sind sie für wesentliche Eigenschaften wie Farbe oder Geschmack der jeweiligen Pflanze oder Frucht mitbestimmend. Obwohl bis heute weder eine einheitliche Definition der Gruppe der Sekundären Pflanzenstoffe, noch eindeutige Kriterien für die Unterscheidung zwischen Primären und Sekundären Pflanzenstoffen bestehen, erfolgte auf dem Gebiet der Ernährung durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eine Unterteilung in neun Gruppen: Carotinoide, Saponine, Glucosinolate, Polyphenole, Protease-Inhibitoren, Terpene, Phytosterine, Phytoöstrogene und Sulfide (Oberritter, 1998; Wollersen, 2004). Insgesamt existieren etwa 60000-100000 dieser Substanzen, die auch als *Phytochemicals* bezeichnet werden (Meltzer und Malterud, 1997; Wollersen, 2004).

Eine wichtige Bedeutung kommt dabei der Gruppe der Polyphenole und hier im besonderen den Flavonoiden zu (Watzl und Leitzmann, 1995). Sie stellen eine umfangreiche Stoffgruppe mit mehr als 5000 identifizierten Verbindungen dar. Aufgrund struktureller Merkmale werden sie in Flavanole, Flavandiole, Flavanone, Flavone, Flavonole sowie Anthocyanidine unterteilt.

Bereits im Jahre 1936 wurde der ungarische Biochemiker Szent-Györgyi im Rahmen seiner Untersuchungen zur Vitaminwirkung auf die Flavonoide aufmerksam (Rusznayk und Szent-Györgyi, 1936). Aufgrund zahlreicher pharmakologischer Wirkungen kommt den Flavonoiden bis heute in der öffentlichen Wahrnehmung eine große Bedeutung zu. Sie sollen unter anderem antioxidative, antiinflammatorische, sowie antimutagene Eigenschaften besitzen (Middleton et al., 2000; Scalbert et al., 2005).

Immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte von Flavonoiden haben erst in den letzten Jahren eine zunehmende wissenschaftliche Beachtung erfahren. Sie stehen miteinander in enger funktioneller Verbindung. Für beide Wirkungskreise werden antioxidative Mechanismen bzw. Einflussnahmen auf die Signaltransduktion und auf Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels diskutiert (Youdim, 2002).

Bisherige Arbeiten attestieren dabei mehreren Vertretern der Substanzklasse ein noch ungenutztes therapeutisches Potential z.B. gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen, das in der Öffentlichkeit starkes Interesse geweckt hat (Rice-Evans et al., 1996). Zugleich birgt die zum Teil undifferenzierte Berichterstattung zu Flavonoiden in den Medien auch Risiken hinsichtlich eines exzessiven Gebrauchs. Dabei werden mögliche toxische Effekte einer übermäßigen Flavonoidaufnahme oft ignoriert. So konnte z.B. gezeigt werden, dass in hohen Dosen Flavonoide mutagen oder pro-oxidativ wirken und freie Radikale erzeugen können. Einige treten darüber hinaus auch als Inhibitoren von Schlüsselenzymen auf, welche in den Hormon-Metabolismus involviert sind (Skibola und Smith, 2000; Ott und Owens, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der Erfassung cytotoxischer Effekte von Flavonoiden auf verschiedene humane Zelllinien eine differenzierte Charakterisierung der Flavonoide vorzunehmen, und dies im Hinblick auf Neuroprotektion und Immunabwehr.

Hierzu sollten antioxidative Effekte von Flavonoiden anhand ihrer Superoxidanionen-Radikalfänger-Aktivitäten bestimmt werden. Immunmodulatorische Eigenschaften sollten dabei anhand von Genexpressionsstudien und direkter antiviraler Effekte am Beispiel des Hepatitis B Virus untersucht werden.

Schließlich sollte eine mögliche Einflussnahme von Flavonoiden auf den Mechanismus posttranskriptionaler Modifikationen geprüft werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Vorkommen und Eigenschaften von Flavonoiden

Flavonoide sind weitverbreitete, natürlich vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Sie gehören neben den Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen zur Gruppe der pflanzlichen Polyphenole (Harborne, 1994). Ihr Name leitet sich vom lateinischen „flavus“ für „gelb“ ab (Wagner, 1999). Neben gelben umfasst diese Stoffklasse aber auch andersfarbige und farblose Verbindungen.

Das Grundgerüst der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterocyclischen C-Ring und entspricht somit strukturell dem Flavan (= 2-Phenylchroman) (Abb. 2.1).

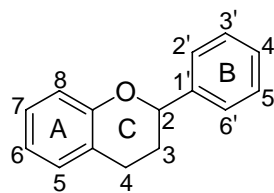


Abb. 2.1: Flavonoid-Grundstruktur (Flavan; 2-Phenylchroman).

Je nach Oxidationszustand der Kohlenstoffatome C-2, C-3 und C-4 werden verschiedene Flavonoidklassen unterschieden: Flavanole (3-Hydroxy-flavane), Flavandiole (3,4-Dihydroxy-flavane), Flavanone (4-Oxo-flavane), Flavone (3-Oxo-flav-2-ene), Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene), sowie Flavylumsalze bzw. Anthocyanidine (Abb. 2.2) (Harborne, 1994). Eine besondere Gruppe bilden die Chalcone, welche mit ihrem offenen C-Ring eine Vorstufe der Flavanone in der Biosynthese der Flavanderivate darstellen.

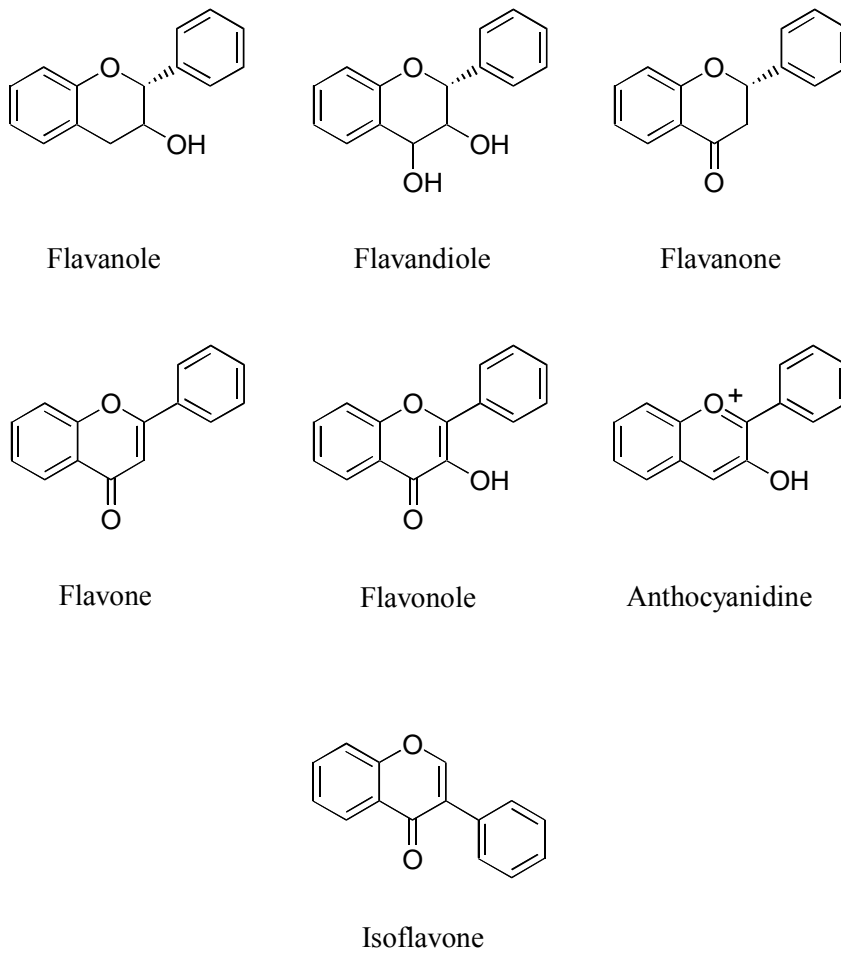


Abb. 2.2: Strukturmerkmale ausgewählter Flavonoid-Unterklassen.

Über 5000 verschiedene natürliche Flavonoide sind derzeit bekannt (Harborne und Williams, 2000). Ihre große Vielfalt ergibt sich aus Substitutionen unterschiedlicher funktioneller Gruppen, wie z.B. aus Hydroxylierungen und/oder Methoxylierungen an verschiedenen Positionen des Grundgerüsts (Tabelle 2.1). Zudem können Flavonoide auch glycosidisch gebunden vorliegen.

Tabelle 2.1: Substitutionsmuster einiger ausgewählter Flavone.

Name	OH an C-	OCH ₃ an C-
Chrysin	5, 7	-
Apigenin	5, 7, 4'	-
Hispidulin	5, 7, 4'	6
Scutellarein	5, 6, 7, 4'	-
Baicalein	5, 6, 7	-

Flavonoide werden täglich mit der Nahrung aufgenommen, da sie in zahlreichen pflanzlichen Nahrungsmitteln, vor allem in Obst und Gemüse, aber auch in Getreide, Kräutern und Getränken enthalten sind (Buschmann, 2002). Sie treten jedoch in sehr unterschiedlicher Verteilung auf. Flavanole kommen hauptsächlich in Tee, Rotwein und Obst vor (Arts et al., 2000; Scalbert und Williamson, 2000; Erlund, 2004), Anthocyanidine sind vorwiegend in Beerenobst und einigen Steinobstsorten zu finden (Herrmann, 1990; Häkkinen et al., 1999). Während Flavanone nahezu ausschließlich in Zitrusfrüchten auftreten (Erlund, 2004), sind Flavonole wiederum in anderen Obstarten, sowie in Gemüse weit verbreitet (Manach et al., 2004).

Schätzungen zufolge beträgt die tägliche Aufnahme an Flavonolen und Flavonen in Deutschland durchschnittlich 11,5 mg pro Person, wobei Quercetin mit ca. 10 mg den Hauptanteil bestreitet (Böhm et al., 1998; Linseisen et al., 1997). Die Hauptquellen der Flavonoidzufuhr stellen u.a. Tee, Zwiebeln und Äpfel dar (Hertog, 1993).

2.2 Biologische Effekte von Flavonoiden

Szent-Györgyi hatte bereits 1936 beobachtet, dass eine Mixtur der Flavanone Hesperidin und Eriodictyol zur Abnahme der Kapillarpermeabilität und -fragilität führte. Da er annahm, dass Flavonoide Vitamincharakter besäßen, gab er ihnen den Namen „Vitamin P“ für „Permeabilitätsvitamin“ (Rusznayk und Szent-Györgyi, 1936). In der Folge wurden weitere Flavonoide mit Vitamin P-Eigenschaften, wie z.B. das Rutin entdeckt. Da der eindeutige Vitamincharakter jedoch nicht klar nachzuweisen war, wurde den Flavonoiden der Vitamin-Status später wieder aberkannt. Dennoch kommt ihnen aufgrund zahlreicher pharmakologischer Wirkungen bis heute – auch in der öffentlichen Wahrnehmung – eine große Bedeutung zu.

So weisen inzwischen zahlreiche epidemiologische Studien auf eine inverse Beziehung zwischen der Flavonidaufnahme und dem Risiko eines Auftreten von koronaren Herzerkrankungen hin (Hertog et al., 1993; Knekt et al., 1996; Yochum et al., 1999; Hirvonen et al., 2001; Geleijnse et al., 2002; Erlund, 2004). Als Erklärung wird angeführt, dass verschiedene Flavonoide, darunter z.B. Quercetin, starke Inhibitoren der oxidativen Modifikation von LDL (*Low-Density-Lipoprotein*) in Makrophagen darstellen (DeWhalley et al., 1990). Erhöhte LDL-Werte und besonders die Oxidation von Lipoproteinpartikeln im Blutplasma werden als Hauptrisikofaktoren für koronare Herzerkrankungen angesehen.

Neben antioxidativen Effekten werden auch antiinflammatorische und antimutagene Eigenschaften von Flavonoiden beschrieben (Middleton et al., 2000; Scalbert et al., 2005). *In vitro*- und *in vivo*-Studien deuten auf immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden hin (Middleton und Kandaswami, 1992; Formica und Regelson, 1995; Middleton et al., 2000). Dabei werden vor allem Effekte auf Tyrosin- und Serin/Threonin-Proteinkinasen beschrieben. Diese Enzyme sind involviert in Signaltransduktions- und Zellaktivierungsprozesse, insbesondere von Zellen des Immunsystems wie z.B. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen (Middleton und Kandaswani, 1992; Nishizuka, 1988; Hunter, 1995).

Die Aktivitäten von Flavonoiden im Bezug auf die Immunantwort bleiben aber nicht nur auf wirtsspezifische Effekte beschränkt, sondern beinhalten auch Einflüsse auf

humanpathogene Erreger. So konnte für einige Flavonoide eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden (Vlietinck et al., 1998; Middleton et al., 2000). Bereits 1985 wurde die reduzierende Wirkung des Flavonols Quercetin auf die Infektiosität von Herpes-simplex-Viren Typ 1, Polio-Viren Typ 1, Parainfluenza-Viren Typ 3 und RS-Viren (Respiratory-Syncytial-Viren), sowie eine Verminderung der intrazellulären Replikation dieser Viren durch Quercetin beschrieben. Bei diesen Studien zeigte sich auch, dass Hesperetin zwar keinen Effekt auf die Infektiosität dieser Viren hatte, jedoch die intrazelluläre Replikation aller untersuchten Viren reduzieren konnte. Catechin hingegen beeinflusste nur die Infektiosität, jedoch nicht die Replikation von RS-Viren und Herpes-simplex-Viren Typ 1 (Kaul et al., 1985).

Schließlich konnten sogar einige Flavonoide als wirksame Benzodiazepinrezeptor-Liganden ermittelt werden (Wolfman et al., 1996; Marder et al., 1995; Salgueiro et al., 1997; Kavvadias et al., 2004). Das Flavon Hispidulin erwies sich als agonistischer Ligand an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren im *Xenopus laevis* Oozyten-Modell und zeigte *in vivo* an der mongolischen Wüstenrennmaus eine mit Diazepam vergleichbare antikonvulsive Wirkung (Kavvadias et al., 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere neuroprotektive und immunmodulatorische Effekte der Flavonoide analysiert. Hierzu wurde die cytotoxische Wirkung und eine Beeinflussung der Exzitotoxizität und des glutamatergen Systems, aber auch antioxidative Effekte ausgewählter Vertreter dieser Stoffgruppe untersucht. Des Weiteren wurden immunmodulatorische Aktivitäten von Flavonoiden zum einen anhand von Genexpressionsstudien und zum anderen anhand antiviraler Effekte am Beispiel des Hepatitis B Virus charakterisiert.

Auf die hierauf zurückzuführenden Wirkmechanismen soll im folgenden näher eingegangen werden.

2.3 Einflüsse auf Neuroprotektion und Immunabwehr

2.3.1 Cytotoxische Effekte

Als Cytotoxizität wird die Fähigkeit von Substanzen bezeichnet, Zellen zu schädigen bzw. zu töten. Zelltod ist als übergreifender Begriff definiert als: "... irreversibles Endstadium einer Zellschädigung als Folge hypoxischer, toxischer, physikalischer, immunologischer oder mikrobieller Ursachen. Zelltod ist aber auch ein physiologischer Vorgang im Rahmen der Embryonalentwicklung und des normalen Gewebsumsatzes." (Denk, 1997).

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten des Zelltods: Die Nekrose und die Apoptose (Abb. 2.3).

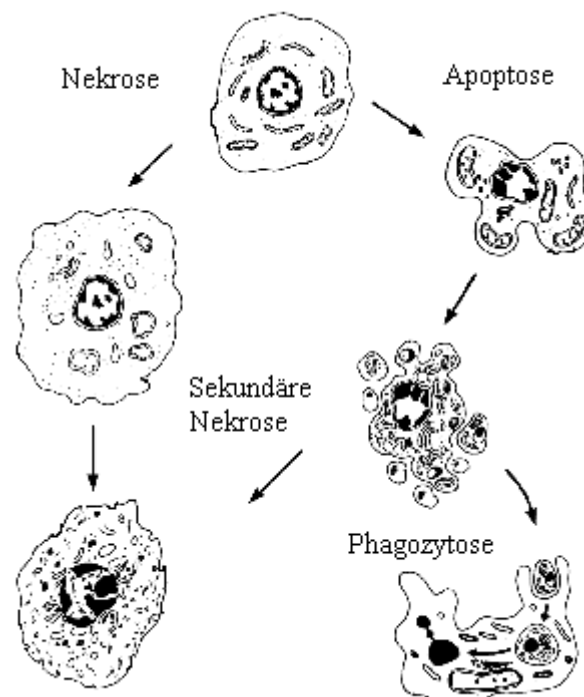


Abb. 2.3: Vergleich der strukturellen Veränderungen bei Nekrose (links) und Apoptose (rechts). Nach Miksa (2004).

Die Nekrose verläuft passiv. Sie ist gekennzeichnet durch einen Prozeß, bei dem akute, nichtphysiologische Bedingungen oder physikalische Einwirkungen die Zelle zerstören. Als typisches Merkmal der Nekrose tritt gleich zu anfang eine Zellschwellung auf, gefolgt vom Verlust der Zellmembranintegrität und daraus resultierender Enzymfreisetzung. Dies führt häufig zu inflammatorischen Reaktionen und dadurch zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Afanasèv et al., 1986; Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998; Buja et al., 1993; Hetts, 1998).

Im Gegensatz zur passiv verlaufenden Nekrose stellt die Apoptose einen aktiven Vorgang dar. Die komplexen morphologischen Veränderungen dieser Zelltodvariante wurden erstmalig 1972 zusammenfassend beschrieben und mit dem Begriff „Apoptose“ belegt (Kerr et al., 1972). Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen: „apo“ steht für das Präfix „weg-“ bzw. „ab-“ und „ptosis“ für herabfallen oder sinken.

Die Apoptose ist ein ATP-konsumierender, regulierter Vorgang, bei dem die einzelnen Schritte genetisch festgelegt sind. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Im Verlauf der Apoptose werden definierte Signaltransduktionswege aktiviert. Apoptotische Zellen lösen sich aus ihrem Zellverband und schrumpfen. Zugleich entstehen durch Verschmelzung des endoplasmatischen Reticulums (ER) mit der Plasmamembran kleine Bläschen, die sog. apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*). Diese lösen sich von der apoptotischen Zelle und werden ohne entzündliche Prozesse von Zellen des Immunsystems, vermutlich von Makrophagen, phagozytiert (Voll et al., 1997; Devitt et al., 1998). Morphologische Charakteristika der Apoptose sind neben der Bildung von „*apoptotic bodies*“ die Chromatin-Kondensation und die Kernfragmentierung (Pyknose) (Kroemer et al., 1995; Duke et al., 1997). In Zellkulturen, in denen es nicht zur Phagozytose kommt, erfolgt eine sekundäre Nekrose der apoptotischen Körperchen (Bredesen, 1995).

Die Apoptose ist ein aktiver Prozess, der durch Caspasen vermittelt wird. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz C-terminal von einem Aspartat-Rest schneiden (Chang und Yang, 2000). Sie aktivieren sich gegenseitig und amplifizieren auf diese Weise das proapoptotische Signal. Darüber

hinaus spalten sie zahlreiche Strukturproteine und Enzyme und bedingen so die charakteristischen morphologischen Veränderungen.

Man unterscheidet zwischen Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998): Initiator-Caspasen wie Caspase-2, -8, -9 oder -10 sind eine wichtige Schaltstelle für die Weiterleitung des proapoptotischen Signals. Ihre Substrate sind die Effektor-Caspasen. Sie sind verantwortlich für zahlreiche zelluläre Effekte, die im Verlauf der Apoptose zu beobachten sind: So spalten sie z.B. Enzyme und Strukturproteine und führen somit zur Exposition von Phosphatidylserin und anderen Zelloberflächenmarkern, die die Erkennung und Phagozytose durch Nachbarzellen oder Makrophagen gewährleisten (Fadok et al., 2000; Fadok et al., 2001; Henson et al., 2001). Phosphatidylserin ist im Normalfall nur auf der Membraninnenseite lokalisiert, wird jedoch im Verlauf der Apoptose sehr früh auf der Membranaußenseite präsentiert. Diese Exposition stellt einen frühen Marker der Apoptose dar (Adayev et al., 1998).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA. Aktivierte Nukleasen zerlegen die chromosomale DNA der Zelle durch internukleosomale Spaltung in Fragmente, deren Länge der um Histone gewundenen DNA (180 bp und deren Vielfache) entspricht (Arends et al., 1990; Cohen und Duke, 1984; Mc Conkey et al., 1989). Diese internukleosomale Spaltung der DNA zerstört den genetischen Informationsgehalt der Zelle und macht damit den Prozess der Apoptose irreversibel. Zudem erleichtert sie die Eliminierung der apoptotischen Zellen durch Phagozyten (Martin et al., 1994).

Die Apoptose stellt für den Organismus einen lebenswichtigen Regulator hinsichtlich der Entwicklung und Funktionsfähigkeit von Organen und Geweben dar. Sie ist von Bedeutung bei der Embryogenese, während der Entwicklung des Nervensystems und bei der Regulierung des Darmepithels (Kermer und Bähr, 2002).

Bei der malignen Transformation von Zellen kommt es häufig zum Verlust regulativer, Apoptose auslösender Mechanismen und damit zur ungehemmten Proliferation der Zellen (Thompson, 1995). Die Apoptose übernimmt die Entsorgung einzelner geschädigter oder überflüssiger Zellen. Daher können Fehlfunktionen, wie eine erhöhte oder erniedrigte Apoptoserate, zu schweren Erkrankungen führen. So kann eine

ineffektive oder fehlende Elimination von malignen oder autoreaktiven Zellen durch Apoptose zur Entwicklung von Tumoren und Autoimmunität führen.

Bei einer erhöhten Apoptoseaktivität können hingegen nicht-ersetzbare Zellen zerstört und das Gleichgewicht von Zellpopulationen gestört werden. Zu den Erkrankungen, bei denen eine erhöhte Apoptoseaktivität beschrieben wurde, zählen unter anderem neurodegenerative Erkrankungen (Sathasivam et al., 2001; Muschen et al., 1999; Zornig et al., 2001).

Nekrose und Apoptose unterscheiden sich sowohl in ihren morphologischen Erscheinungsformen als auch in biochemischen Parametern (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Morphologische und metabolische Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose. Nach Jobmann (2002).

Apoptose	Nekrose
ATP verbrauchender, aktiver Prozess	Passiver Prozess
Zellschrumpfung	Zellschwellung
Bildung von Apoptosekörperchen	Verlust der Membranintegrität
Entfernung der Apoptosekörperchen durch Phagozyten	Entzündliche Gewebsreaktion
Erzeugung von DNA-Fragmenten definierter Größe (ca. 180 bp und Vielfache davon)	Erzeugung von DNA-Fragmenten ohne definiertes Muster

Neben physiologischen Signalen induzieren Stress-Situationen, wie ionisierende Strahlung, Hitze, ROS, virale Infektionen, Immunreaktionen und chemische Agenzien den programmierten Zelltod (Hetts, 1998).

In vitro-Studien belegen die Fähigkeit einiger Flavonoide, Apoptose in verschiedenen Zelllinien zu fördern (Tilly et al., 1992; Traganos et al., 1992; Wei et al., 1994; Hirano et al., 1995; Wenzel et al., 2000).

Bei Untersuchungen der Apoptoseinduktion von Quercetin in mehreren Tumorzelllinien zeigten sich die typischen morphologischen Veränderungen, wie Zellschrumpfung, Bildung von Apoptosekörperchen und Fragmentierung der DNA (Wei et al., 1994).

Mittels Apoptose besteht die Möglichkeit, irreparabel beschädigte Zellen frühzeitig zu erkennen und zu zerstören. Die Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen ist somit ein wichtiger Mechanismus, der eine protektive Wirkung der Flavonoide gegenüber verschiedenen Krebserkrankungen erklären könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die cytotoxischen Effekte ausgewählter Flavonoide an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht, um die molekularen Mechanismen, welche hinter dem Flavonoid-induzierten Zelltod stehen, zu ermitteln, und diejenigen Strukturelemente zu identifizieren, welche für die cytotoxische Aktivität dieser Stoffklasse von Bedeutung sind.

2.3.2 Antioxidative Eigenschaften

Neben der Apoptose-Induktion haben die antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden besondere Bedeutung für ihre gesundheitsrelevanten Effekte.

Das Eliminieren freier Radikale zählt zu den wichtigsten Mechanismen, die bei Flavonoid-vermittelter Neuroprotektion eine Rolle spielen. Zusätzlich sind Flavonoide in der Lage, zahlreiche Enzyme, die an der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind, wie z.B. Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Cyclooxygenase oder Lipoxxygenase zu hemmen (Kandaswami und Middleton, 1994; Cos et al., 1998; Böhm et al., 1998; Pietta, 2000) (vgl. 2.3.3).

Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot -}$) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) gehören, neben weiteren Sauerstoffradikalen, zu den sog. „reaktiven Sauerstoffspezies“ („*reactive oxygen species*“, ROS), den Auslösern von Oxidativem Stress (Schwarzer, 2004).

Bei der Immunabwehr helfen ROS im Rahmen des sog. „Respiratory Burst“, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen zu zerstören. Dabei kommt es in den aktivierten Phagozyten zu vermehrter Sauerstoffaufnahme, mit der große Mengen an Superoxidanionen-Radikalen gebildet werden. Die Dismutation der generierten $O_2^{\cdot -}$

zum H_2O_2 und die nachfolgende Bildung von OH^\bullet führen zur Zerstörung bzw. Lyse des inkorporierten Fremdmaterials (Markert et al., 1984; Segal, 1996; Yu, 1994; Wippich, 2003). Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren, Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane, aus Arachidonsäure benötigt (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Bei unzureichender antioxidativer Abwehr können die Radikale Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten, z.B. Lipidperoxidation (LPO) in den Zellmembranen verursachen.

Abbildung 2.4 gibt einen schematischen Überblick über die Entstehung von ROS sowie über die zellulären Abwehrmechanismen gegenüber ROS.

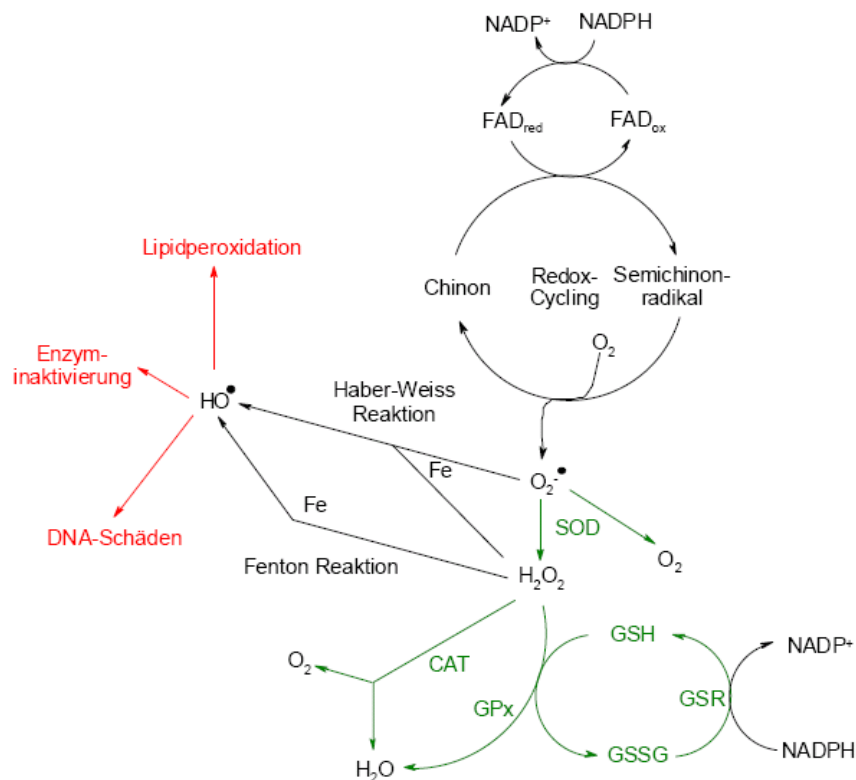


Abb. 2.4: Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS im Organismus und deren Einfluß auf physiologische/pathophysiologische Stoffwechselschritte (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen) (nach Kelly et al., 1998). CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxid-Dismutase, CYP: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen.

Ein Übermaß an Oxidantien wird als ein gemeinsames Element in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson und M. Alzheimer angesehen (Simonian und Coyle, 1996).

In diesem Zusammenhang sind antioxidative Effekte von Flavonoiden von besonderer gesundheitsrelevanter Bedeutung.

Flavonoide sind aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale in der Lage, reaktive Radikale durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren (Pietta, 2000) (Abb. 2.5).

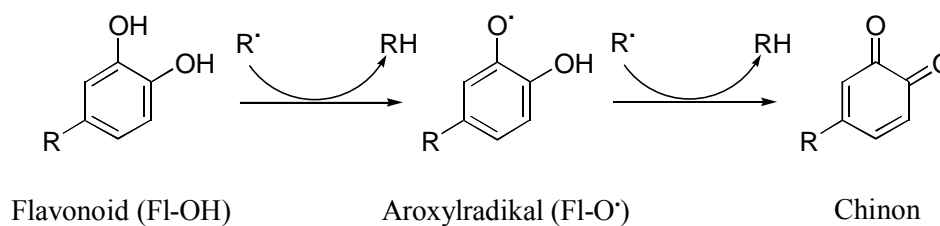


Abb. 2.5: Deaktivierung von Radikalen durch Flavonoide. Nach Rice-Evans (2001).

Die antioxidative Wirkung zahlreicher Flavonoide konnte schon mehrfach nachgewiesen werden (Ariga et al., 1988; Rice-Evans et al., 1996; Bagchi et al., 1997; Hagerman et al., 1998; Plumb et al., 1998; Ogawa et al., 1999). So beobachtete man antioxidative Effekte von Quercetin in stimulierten humanen Neutrophilen (Zielińska et al., 2000). Xanthohumol zeigte starke Eliminierungs-Effekte gegenüber physiologisch relevanten ROS, wie z.B. Superoxidanionen-Radikalen (Gerhäuser et al., 2002). Das Flavon Baicalein, ein Hauptbestandteil der Wurzel von *Scutellaria baicalensis*, wird ebenfalls als starker Radikalfänger beschrieben (Huang et al., 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften von Flavonoiden unter Verwendung eines nicht-enzymatischen Zellmodells (dendritische HL-60-Zellen) näher untersucht.

2.3.3 Immunmodulation

Immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden können durch Beeinflussung von Enzymen auftreten.

Mit Hilfe membranständiger Rezeptoren und nachgeschalteter Signalelemente wird ein Stimulus durch sogenannte Signaltansduktionskaskaden weitergeleitet und/oder amplifiziert und dadurch unter anderem das Genexpressionsprofil der Zelle moduliert (Thiel und Rössler, 2005; Djahansouzi et al., 2004).

Die Signalübertragungskaskade via Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) ist ein wichtiger und von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern genutzter Modus, um physiologische Antworten, z.B. Immunantworten zu regulieren.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen sind eine Familie von Enzymen, die durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert werden (Hallwachs, 2005). MAPK wurde durch Quercetin (30 μM) in humanen epidermalen Carzinomzellen stark inhibiert (Bird et al., 1992).

Die MAPK-Kaskade kann in zwei Module unterteilt werden, die sich in ihrer Aktivierung unterscheiden. Das eine Modul wird durch Wachstumsfaktoren (mitogen) aktiviert, das andere Modul durch Stress, Cytokine oder Zell-Zell-Interaktionen. Das extrazelluläre Signal wird über einen Transmembranrezeptor auf eine nachgeschaltete Kinasekaskade, bestehend aus drei hintereinander geschalteten Kinasen, übertragen. Durch die Kinasen wird das Signal in den Zellkern weitergeleitet, wo es zur Modulation der Expression spezifischer Zielgene kommt. Im mitogen aktivierten Modul kommt es durch Bindung eines extrazellulären Liganden an den Rezeptor zur Aktivierung der intrinsischen Proteinkinasen (PTK) und anschließend innerhalb der Kaskadenfolge zur Aktivierung verschiedener Mitglieder der Familie der Serin/Threonin-Kinasen (Kern, 2006).

Eine große Anzahl an Protein Tyrosin Kinasen (PTK) sind beschrieben. Sie werden in Verbindung gebracht mit der Regulation der Zelltransformation und des Zellwachstums, der Genexpression, Zell-Zell-Adhäsions-Wechselwirkungen, Zellmotilität und Zellform (Huang, 1989; Taniguchi et al., 1995; Qian und Weiss, 1997).

Durch sogenannte „Crosstalks“ können Elemente der MAPK-Kaskade durch andere Signalwege moduliert werden. Dies erfolgt bevorzugt auf der Ebene von Raf-1. So kann beispielsweise Raf-1 durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg oder durch die Proteinkinasen C (PKC) aktiviert werden (Clark et al., 2004).

Die Proteinkinasen C bilden eine Familie der Serin/Threonin-Kinasen. PKC-Isoenzyme sind in einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen involviert. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung in der Zelle und üben Kontrolle auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung aus (Nishizuka, 1992). Des Weiteren werden sekretorische Prozesse, inflammatorische Zellfunktionen, sowie die Funktion der T-Lymphozyten beeinflusst (Nishizuka, 1986, 1988 und 1995). Die Aktivierung der PKC erfolgt über die Cofaktoren Ca^{2+} , Diacylglycerin (DAG) und Phospholipide. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich Proteinkinasen C durch verschiedene Flavonoide inhibieren lassen (Graziani et al., 1981; Gschwendt et al., 1983; End et al., 1987; Hagiwara et al., 1988; Ferriola et al., 1989; Picq et al., 1989).

Dabei erwiesen sich Flavone und Flavonole als die stärksten PKC-Inhibitoren. Von Bedeutung für die inhibitorische Wirksamkeit war das Vorhandensein von Hydroxylgruppen an den 3'- und 4'-Positionen des B-Rings, sowie die C2-C3-Doppelbindung. Gleiches gilt für Inhibitoren der PI 3-Kinase. Die stärksten Effekte zeigten dort Flavonole, gefolgt von Flavonen. Flavan-3-ole, Flavanone sowie Isoflavone erwiesen sich als ineffektiv. Einen inhibitorischen Effekt des Flavonols Myricetin, das *in vitro* die stärkste Wirksamkeit gegen die PI 3-Kinase zeigte, hat man auch *in vivo* beobachtet (Gamet-Payraastre et al., 1999).

Flavonoide können über effektive Aktivitätshemmung von Enzymen der Signaltransduktion, wie der Proteinkinasen C (Ferriola et al., 1989; Agullo et al., 1997; Lin et al., 1997), der Phosphoinositol-3-Kinase (Agullo et al., 1997; Weber et al., 1997;

Gamet-Payraastre et al., 1999) und der Proteintyrosinkinase (Cunningham et al., 1992; Markovits et al., 1989) in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen.

Des Weiteren können Flavonoide auch an verschiedenen Stellen des Arachidonsäurestoffwechsels, der bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt, eingreifen und die Bildung von Entzündungsmediatoren unterbinden. So vermag z.B. Quercetin die Phospholipase A₂ (PLA₂) in humanen Leukozyten zu hemmen (Welton et al., 1988; Lee et al., 1982). PLA₂, welche die Hydrolyse veresterter Phospholipide katalysiert, ist in vielen Zellaktivierungsprozessen von Bedeutung. Sie ist ein wichtiger intra- und extrazellulärer Entzündungsmediator (Pruzanski und Vadas, 1991). Phospholipase A₂ führt vor allem zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden (Welton et al., 1988). Ausgehend von Arachidonsäure werden entweder durch Cyclooxygenasen Prostaglandine oder durch Lipoxygenasen Leukotriene gebildet (Kühn et al., 2005; Zhang und Salomon, 2005). Quercetin und andere Flavonoide weisen inhibitorische Effekte sowohl auf Cyclooxygenasen als auch auf Lipoxygenasen auf (Formica und Regelson, 1995; Welton et al., 1988; Schewe et al., 2002).

Auch der Nuclear Factor kappa B (NFκB) ist bei der Regulierung inflammatorischer Prozesse von Bedeutung. Bei NFκB handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die im Zellkern sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Motive innerhalb der Promotor- und Enhancerregion binden können und so zur Aktivierung bzw. Hemmung transkriptioneller Prozesse beitragen (Bowie und O'Neill, 2000). Die Aktivierung von NFκB kann auf zellulärer und physiologischer Ebene verschiedene Auswirkungen haben. NFκB verändert durch seine DNA-Bindung die Transkription verschiedener Gene für Cytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Immunregulatoren, Enzyme und Regulatoren der Apoptose sowie der Zellproliferation (Ghosh et al., 1998; Pahl, 1999). Eine kurzzeitige Induktion des Transkriptionsfaktors ermöglicht dem Organismus, auf pathogene und stressinduzierte Stimuli zu reagieren. Eine Störung dieses abgestimmten Vorgangs ist jedoch mit einer Reihe von pathologischen Prozessen verbunden. Somit kommt NFκB u.a. auch eine wichtige Rolle bei Entzündungen zu (Weisel, 2006). Das Flavonol Quercetin wurde als NFκB-hemmende Substanzen beschrieben (Musonda und Chipman, 1998).

Flavonoide werden jedoch nicht nur mit indirekten Effekten auf Transkriptionsvorgänge in Verbindung gebracht, sondern überdies auch mit direkten regulatorischen Eingriffen in die Expression einzelner Gene (vgl. 3.3.1).

Immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden treten insbesondere in inflammatorischen Zellen, wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen auf.

Abgesehen von bi-phasischen Effekten bei der Lymphozytenproliferation, d.h. Hemmung bei hoher Konzentration, Stimulation bzw. kein Effekt bei niedriger Konzentration (Brattig *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1988; Formica und Regelson, 1995), wurden hierbei bezüglich des Phagozytoseprozesses, der Synthese von Cytokinen und Immunglobulinen, sowie der Aktivität von natürlichen Killerzellen, ausschließlich immunsuppressive Wirkungen beschrieben (Middleton und Kandaswami, 1992; Formica und Regelson, 1995; Middleton *et al.*, 2000). So zeigte beispielsweise Quercetin eine starke Hemmwirkung auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen und unterdrückte die Antigenstimulation von cytotoxischen T-Lymphozyten (Berg und Daniel, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden immunmodulatorische Effekte auf wirtsspezifischer Ebene mittels Genexpressionsstudien in dendritischen HL-60-Zellen untersucht.

2.3.4 Beeinflussung der Exzitotoxizität

Der Begriff Exzitotoxizität wurde 1969 von Olney geprägt (Olney, 1969). Er bezeichnet den neurotoxischen Effekt von exzitatorischen Aminosäuren. In Folge der exzessiven Aktivierung postsynaptischer Glutamaterezeptoren wird, beginnend mit dem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, eine Kaskade von Reaktionen angestoßen, welche histopathologisch zu einer massiven Zellschwellung und letztlich zum Zelltod führen (Kristián und Siesjö, 1998; Fichtner, 2001).

Exzitotoxizität kann an Prozessen sowohl akuter, als auch chronischer neurologischer Erkrankungen beteiligt sein (Beal, 1992), und wird unter anderem mit M. Parkinson, M. Huntington und M. Alzheimer in Verbindung gebracht (Müller, 1998).

Glutamaterezeptoren, insbesondere deren Subtyp, die AMPA-Rezeptoren stellen, aufgrund ihrer Bedeutung bei der Regulierung der Ca^{2+} -Permeabilität der

Rezeptorkanäle wichtige Mediatoren der Exzitotoxizität dar (Choi, 1992 ; Rothman und Oley, 1995; Rump et al., 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden genomische Effekte auf Glutamat-rezeptoren untersucht, und dies als Modell für eine Flavonoid-induzierte Beeinflussung der Exzitotoxizität verwendet.

2.3.4.1 Zentralnervöse Mediatoren der Exzitotoxizität

Das Gehirn des Menschen besteht aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen, die an der Weiterleitung der elektrischen und chemischen Signale beteiligt sind, und der 10-50-fachen Anzahl an Gliazellen, die zur mechanischen Festigung und zur Versorgung der Nervenzellen dienen (Kandel u. Schwartz, 1985). Entlang der Nervenzellen erfolgt die Weiterleitung eines Reizes über elektrische Signale. Erreicht ein elektrisches Signal jedoch das Ende eines Neurons, so muss das elektrische Signal in ein chemisches Signal umgewandelt werden. Dazu werden Neurotransmitter gebildet und in den synaptischen Spalt freigesetzt. Diese Neurotransmitter sind in der Lage, den synaptischen Spalt zu überwinden und an Rezeptoren der postsynaptischen Zelle zu binden (Blaschke, 1993). Bei der Mehrzahl der Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die nach der Bindung der Neurotransmitter das chemische Signal wieder in ein elektrisches umwandeln. Die auf diese Weise depolarisierte postsynaptische Zelle leitet nun ihrerseits das elektrische Signal über Dendriten und Axone weiter.

Einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) ist Glutamat (Abb. 2.6). Er findet sich in 30% aller zentralen Neurone und kann nahezu alle Neuronentypen im ZNS erregen (Römer et al., 2003).

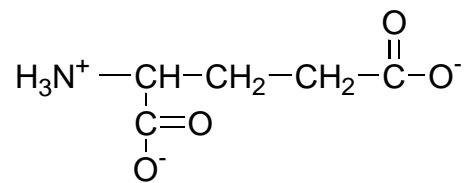


Abb. 2.6: Struktur von Glutamat.

Das in den synaptischen Spalt freigesetzte Glutamat erzeugt nach Bindung an spezifische ligandenregulierte Ionenkanäle der postsynaptischen Membran eine Depolarisation, die als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird (Kortenbruck, 2003). Glutamatrezeptoren sind u.a. von Bedeutung bei Prozessen der Synaptogenese sowie dem motorischen und assoziativen Gedächtnis (Barnes u. Henley, 1992; Gasic u. Hollmann, 1992). Phänomene der synaptischen neuronalen Plastizität, die sich als Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP), einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung, bzw. in Form der Langzeitdepression (*long term depression*, LTD), einer Hemmung oder Abschwächung der synaptischen Effektivität, ausdrücken, werden ebenfalls durch Glutamatrezeptoren gesteuert (Muller et al., 1988; Müller, 1998; Kullmann et al., 2000).

Glutamatrezeptoren sind darüber hinaus wichtige Mediatoren verschiedener Formen von Erregungstoxizität. Vermehrt freigesetztes Glutamat kann bei bestimmten pathophysiologischen Zuständen neurotoxische Wirkungen an Nervenzellen hervorrufen, die zum Zelluntergang führen (Bruno et al., 1993; Castillo u. Babson, 1998). Beispiele dafür sind durch Hypoxie, Ischämie (Benveniste et al., 1984; Choi u. Rothman, 1990) und Hypoglykämie (Auer et al., 1985; Wieloch et al., 1986) ausgelöste Veränderungen in Neuronen. Glutamatrezeptoren sind daher auch von Bedeutung für eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson (Turski et al., 1991), amyotrophe Lateralsklerose (Plaitakis, 1990), M. Huntington (Coyle u. Schwarcz, 1976; Choi, 1988; Di Figlia, 1991) und M. Alzheimer (Maragos et al., 1987; Greenamyre u. Young, 1989; Beal, 1992; Müller, 1998).

2.3.4.2 Glutamatrezeptoren: Struktur und Funktion

Die Einteilung der Glutamatrezeptoren erfolgte nach pharmakologischen Gesichtspunkten hinsichtlich ihrer spezifischen Agonisten in vier Subtypen (Barnes und Henley, 1992; Gasic und Hollmann, 1992) (Abb. 2.7).

Unterschieden werden:

- 1.) N-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren
- 2.) 2S, 3S, 4S-2-Carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidinacetat (Kainat)-Rezeptoren
- 3.) α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)-Rezeptoren
- 4.) trans-1-Aminocyclopentan-1,3-dicarbonsäure (t-ACPD)-Rezeptoren, alternative Bezeichnung: Quisqualat (QUIS)-Rezeptoren

Letztere gehören zur Gruppe der metabotropen Rezeptoren. Die t-ACPD-Rezeptoren mGluR 1-mGluR 8 können anhand von Sequenzhomologien in drei Gruppen eingeteilt werden, die sich in den für die Signalfortleitung verwendeten Transduktionsmechanismen unterscheiden (Conn und Pin, 1997). Metabotrope Rezeptoren sind mit einem sekundären Botenstoffsystem über ein G-Protein gekoppelt und vermitteln eine verzögerte langanhaltende Zellreaktion (Tanabe et al., 1992).

Die ersten drei Subklassen werden zur Gruppe der ionotropen Rezeptoren zusammengefasst. Bei diesen sind der Rezeptor und der Ionenkanal direkt miteinander gekoppelt (Rezeptorkanal). Durch einen transmembranösen Proteinkomplex, der nach der Bindung eines Liganden an die spezifische Erkennungsstelle eine Konformationsänderung vollzieht und somit den Durchtritt bestimmter Ionen erlaubt, kommt es zu einer schnellen postsynaptischen Membrandepolarisation. Diese wird durch einen intrazellulär gerichteten Na^+ -Einstrom und einen geringen extrazellulär gerichteten K^+ -Ausstrom im Bereich der Kanäle herbeigeführt.

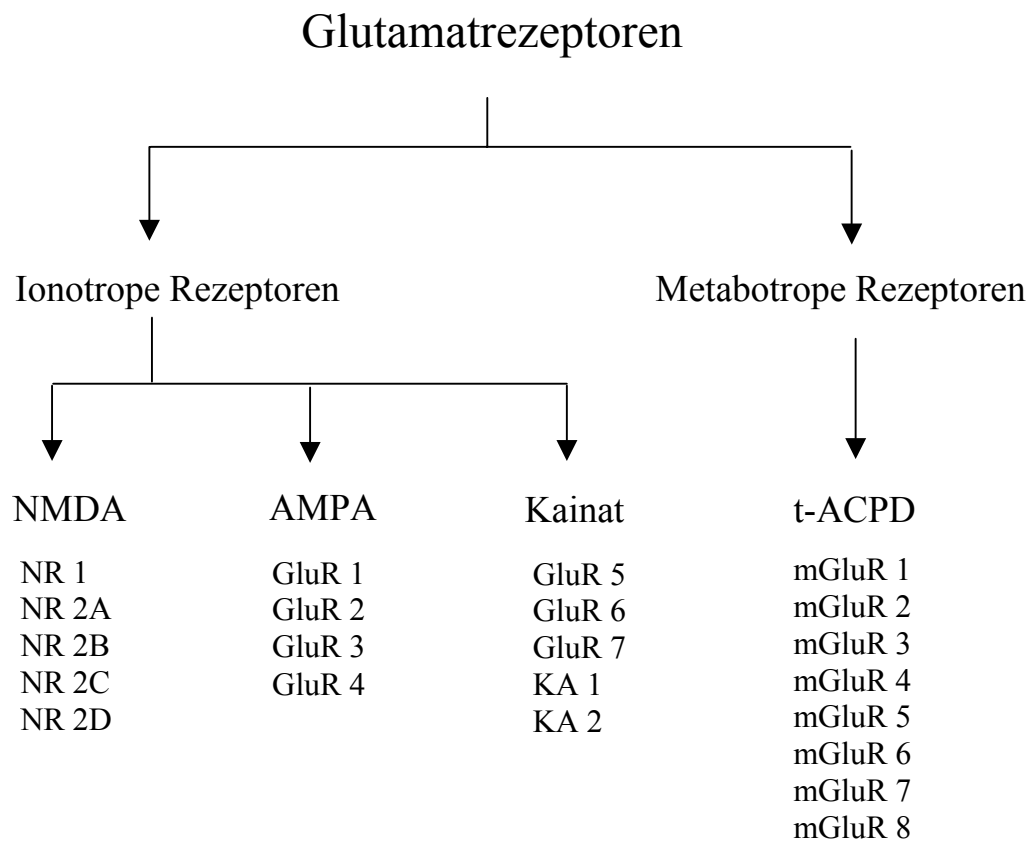


Abb. 2.7: Einteilung der Glutamatrezeptoren in die Subtypen NMDA-, AMPA-, Kainat- und t-ACPD-Rezeptoren mit ihren jeweiligen Untereinheiten. Nach Kortenbruck (2003).

Darüber hinaus weisen die NMDA-Rezeptoren eine intrazellulär gerichtete Ca^{2+} -Ionen-Leitfähigkeit auf (Burnashev et al., 1992; Dingledine et al., 1992; Hume et al., 1991). NMDA-Rezeptoren steuern zudem die langsame Komponente des EPSP. AMPA-Rezeptoren vermitteln hingegen die schnelle exzitatorische Signalkomponente des EPSP. Über eine Beeinflussung der Leitfähigkeit durch Kainat-Rezeptoren wird noch diskutiert (Chittajallu et al., 1999; Frerking et al., 2000; Schmitz et al., 2001).

Die ionotropen Glutamatrezeptoren weisen eine pentamere Struktur auf (Nakanishi, 1992). Sie können dabei sowohl aus jeweils gleichen Untereinheiten (homomer), als auch aus einer Kombination verschiedener Untereinheiten des jeweiligen Rezeptortyps (heteromer) aufgebaut sein (Kortenbruck, 2003).

Wesentliche Eigenschaften der Rezeptoren wie die Ca^{2+} -Leitfähigkeit, die Strom-Spannungs-Kennlinie und die Gesamtleitfähigkeit des Kanals werden durch die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt. Zur Familie der AMPA-Rezeptoren zählen die Untereinheiten GluR 1-GluR 4 (Boulter et al., 1990), die auch als GluR A bis GluR D bezeichnet werden (Keinänen et al., 1990), zur Gruppe der Kainat-Rezeptoren die Untereinheiten GluR 5-GluR 7, sowie KA 1 und KA 2 (Blaschke, 1993).

Jede Untereinheit setzt sich dabei aus vier Sequenzabschnitten, den Transmembranregionen (TM) I-IV, zusammen. Dem Drei-Transmembran-Domänen-Modell ionotroper Glutamatrezeptoren zufolge liegt der N-Terminus des Proteins extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Die Polypeptidkette durchquert die Membran dreimal und bildet in der Membran von der intrazellulären Seite her eine Schleife (Abb. 2.8) (Wo und Oswald, 1995).

Die Region zwischen den mit TM III und TM IV bezeichneten hydrophoben Sequenzabschnitten kommt im Extrazellularraum zu liegen. Die Transmembranregion II (TM II), welche die Kanalwand „auskleidet“ und damit entscheidend die Permeabilitätseigenschaften des Ionenkanals determiniert, ist nach diesem Modell keine wirkliche Transmembranstruktur. Es handelt sich hierbei um einen hydrophoben Bereich innerhalb der Polypeptidkette, der von der intrazellulären Seite in die Membran eintritt und sie auch auf der zytoplasmatischen Seite wieder verlässt (Kraus, 1999).

2.3.4.3 Exzitotoxizität durch posttranskriptionale Modifikationen

Neben den durch einen modularen Aufbau gewährten Möglichkeiten für eine funktionelle Diversifizierung wird die Vielfalt der AMPA-/Kainat-Rezeptoren durch posttranskriptionale Prozesse, wie alternatives Spleißen oder RNA-Editierung weiter vergrößert.

Es wird davon ausgegangen, dass 40 bis 60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden (Hide et al., 2001; Kan et al., 2001; Modrek et al., 2001).

In Eukaryonten werden kodierende Sequenzen (Exons) von nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen. Bei einem als konstitutivem Spleißen bezeichneten Prozess werden Introns aus der primären RNA entfernt und die Enden der Exons

miteinander verbunden. Während beim konstitutiven Spleißen jedes Exon mit dem nächsten stromabwärts gelegenen verknüpft wird, werden beim alternativen Spleißen andere Spleißmuster benutzt und alternative 5'- bzw. 3'-Spleißstellen aktiviert (Croft et al., 2000; Hide et al., 2001; Kan et al., 2001; Modrek et al., 2001).

Nach heutigem Kenntnisstand liegt jede der AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR 1-4 in einer von zwei verschiedenen Formen vor, die durch alternatives Spleißen einer 114 bp-Region entstehen. Die hieraus resultierenden Varianten werden mit „flip“ und „flop“ bezeichnet (Spencer et al., 1987) (Abb. 2.8). Ihre Expression variiert im Verlauf der Entwicklung. Während die „flip“-Varianten im pränatalen und frühen postnatalen Gehirn dominieren, soll die Expression der „flop“-Variante erst zwischen dem 8. und dem 14. postnatalen Tag stark ansteigen (Monyer et al., 1991).

Das Auftreten der „flip“- oder „flop“-Varianten ist von wesentlicher funktioneller Bedeutung. So bedingen die „flip“-Formen der GluR-Untereinheiten einen langsameren desensitisierenden Strom, d.h. eine langsamere Desensitisierung durch den AMPA-Rezeptor als die „flop“-Formen (Carlson et al., 2000).

Eine weitere posttranskriptionale Modifikation stellt die RNA-Editierung dar. Bei der RNA-Editierung kommt es während der Dekodierung der genomischen DNA in die mRNA zu einer Basenveränderung des Primärtranskriptes und in der Folge zu einer veränderten Aminosäurezusammensetzung des funktionalen Rezeptors.

Der Q/R Editierungsschritt führt zu einem Aminosäureaustausch in der Transmembranregion II (TM II) der Proteinstruktur der Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6. Die in der genomischen DNA kodierte Aminosäure Glutamin (Q) (ungeladen) im Bereich des Exons 11 wird auf Ebene der *messenger* RNA durch die Aminosäure Arginin (R) (positiv geladen) ausgetauscht. Beeinflusst von Adenosindeaminase kommt es zur Bildung von Inosin aus Adenin (Rueter et al., 1995). Nachfolgend wird Inosin als Guanin interpretiert und das Triplet CAG für Glutamin (Q) wird zu CGG für Arginin (R). Daher wird dieser Vorgang auch als Q/R-Editierung bezeichnet.

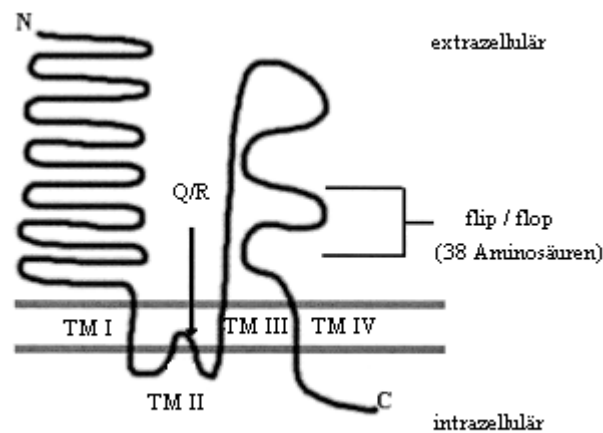
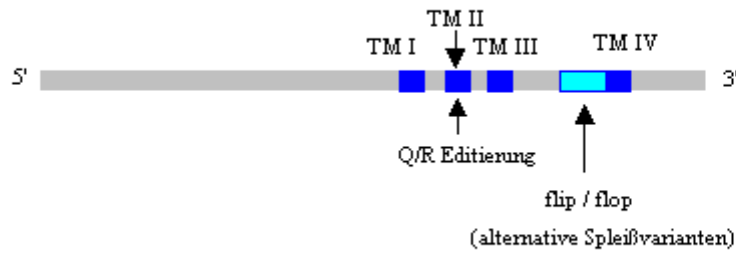


Abb. 2.8: Schematische Darstellung einer für eine GluR Untereinheit kodierenden mRNA mit der Q/R Editierungsstelle in TM II, sowie den alternativ gespleißten Exons flip und flop (oben). Unten ist das Drei-Transmembran-Domänen-Modell ionotroper Glutamatrezeptoren von Wo und Oswald (1995) mit den vier Transmembranregionen TM I-TM IV dargestellt. Nach Carlson et al. (2000).

Die Editierung ist für den Rezeptor von wesentlicher funktioneller Bedeutung. Als Folge der Editierung weist der Kanal eine geringere Leitfähigkeit auf (Swanson et al., 1996), insbesondere eine verminderte Ca^{2+} -Leitfähigkeit (Hume et al., 1991; Verdoorn et al., 1991; Egebjerg u. Heinemann, 1993; Washburn et al., 1997) (Abb. 2.9). Zudem zeigt der Rezeptor eine veränderte Strom-Spannungs-Kennlinie (Dingledine et al., 1999).

Kanäle mit einer editierten Untereinheit GluR 2 besitzen keine Leitfähigkeit für zweifach geladene Kationen, insbesondere für Ca^{2+} -Ionen, während Kanäle die aus der

nicht-editierten Version von GluR 2 aufgebaut sind über eine ausgeprägte Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen verfügen (Hollmann et al., 1991). Auch homomere Kanäle aus den Untereinheiten GluR 1, GluR 3 oder GluR 4, mit Arginin an der kritischen Position der TM Region II, zeigen nur eine geringe Ca^{2+} -Leitfähigkeit (Curutchet et al., 1992; Hume et al., 1991; Verdoorn et al., 1991).

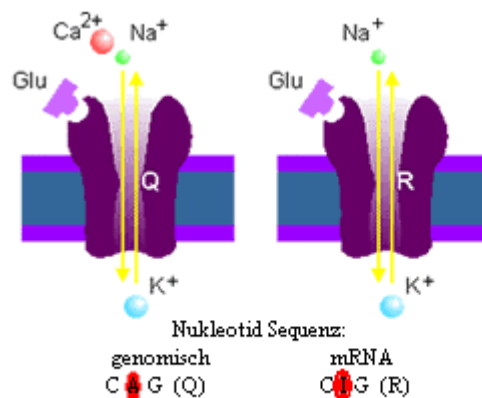


Abb. 2.9: Die Adenosin zu Inosin Editierung an der Q/R-Stelle von AMPA Rezeptoren reguliert die Ionenpermeabilitäts-Eigenschaften der Rezeptoren (speziell für Ca^{2+}). Rezeptoren mit editierter Untereinheit (rechts) besitzen keine Leitfähigkeit für Ca^{2+} , während Kanäle die aus der nicht-editierten Version aufgebaut sind (links) über eine ausgeprägte Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen verfügen¹.

Tierexperimentellen Untersuchungen zufolge wirkt sich die Q/R-Editierung von GluR 2 u.a. auf neuropathologische Prozesse aus, die eine abnorme zerebrale Erregbarkeit bedingen (Brusa et al., 1995; Feldmeyer et al., 1999; Higuchi et al., 2000; Sailer et al., 1999; Vissel et al., 2001).

In der mRNA von GluR 2, GluR 3 und GluR 4 wurden weitere Editierungsstellen nachgewiesen. Eine solche Position befindet sich in Exon 13, welches unmittelbar den flip- und flop-Exons der AMPA-Rezeptoren vorausgeht. Infolge des Austauschs eines Arginin (R)-Codons (AGA) gegen ein Glycin (G)-Codon (GGA) wird diese Stelle auch

¹ Nach: <https://medschool.mc.vanderbilt.edu/emesonlab/images/rnaediting1.gif>.

als R/G-Position bezeichnet (Lomeli et al., 1994). Während die Editierung der Q/R-Stelle in der TM II von GluR 2 zu einer drastisch verminderten Ca^{2+} -Permeabilität des AMPA-Rezeptorkanals führt, bewirkt die Editierung der R/G-Stelle einen Anstieg der Erholungsraten von der Desensibilisierung, wodurch der Kanal schneller wieder erregbar ist (Kraus, 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 anhand von Spleißvarianten- und Editierungs-Analysen erstmals untersucht, inwieweit Flavonoide auf posttranskriptionale Determinanten der Exzitotoxizität Einfluß nehmen.

2.3.5 Direkte antivirale Effekte

In der Literatur wird über antivirale Effekte von Flavonoiden berichtet (Vlietinck et al., 1998; Middleton et al., 2000). So konnte u.a. eine Beeinflussung der Replikation des HI-Viruses durch Flavonoide im Zellmodell nachgewiesen werden (Fesen et al., 1993; Brinkworth et al., 1992; Hu et al., 1994; Middleton et al., 2000). Für Quercetin und Baicalein hat man eine Inhibierung der HIV-1 Reverse Transkriptase beobachtet (Zhang et al., 2005a). Wogonin zeigte anti-Hepatitis B Virus Effekte in einer humanen Zelllinie (Huang et al., 2000).

In der fernöstlichen Medizin besitzt die Anwendung „Chinesischer Heilkräuter“ besonders bei Lebererkrankungen, wie z.B. der Hepatitis, eine lange Tradition (Schuppan et al., 1999; Dhiman und Chawla, 2005). In Japan und China wird z.B. das Medikament Sho-Saiko-to (TJ-9) in der traditionellen Medizin gegen chronische Leberbeschwerden wie Hepatitis oder Leberzirrhose eingesetzt (Mizushima et al., 1995; Motoo und Sawabu, 1994). Flavonoide aus der Heilpflanze *Scutellaria baicalensis* sind Bestandteile dieses Medikaments, das sich aus Extrakten von sieben verschiedenen Pflanzen, darunter *Bupleuri radix*, *Pinelliae tuber*, *Scutellaria radix*, *Zizyphi fructus*, *Ginseng radix*, *Glycyrrhizae radix* und *Zingiberis rhizoma* zusammensetzt (Mizushima et al., 1995; Matzuzaki et al., 1996). Hauptinhaltsstoffe sind Saponine und Flavonoide

(Matzuzaki et al., 1996). Man nimmt an, dass die Flavonoide protektive Effekte gegen virale Lebererkrankungen ausüben.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit das Hepatitis B Virus als Modell zur Untersuchung antiviraler Effekte von Scutellarein gewählt.

2.3.5.1 Hepatitis B Virus Infektionen

Unter einer Hepatitis versteht man eine Entzündungsreaktion der Leber, die aufgrund von Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Medikamenten oder toxischen Substanzen, wie z.B. Alkohol, ausgelöst werden kann (Preuss, 2000; Koller, 2005). Das Hepatitis B Virus (HBV) ist wie die Hepatitis A-, C-, D-, und E-Viren primär hepatotrop und gehört zu den häufigsten Erregern einer Virushepatitis. 90% aller Infektionen laufen lediglich akut ab, d.h. sie heilen aus, jedoch kann die durch Hepatitis B-, C- und D-Viren ausgelöste Hepatitis auch in eine chronische Verlaufsform übergehen. Hepatitis B zählt neben Tuberkulose, HIV, Malaria und Hepatitis C zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Die Übertragung dieser viralen Infektion erfolgt durch Blut oder andere Körpersekrete. Schätzungen zufolge sind derzeit etwa 300-420 Millionen Menschen (ca. 5-7% der Weltbevölkerung) chronisch mit dem Hepatitis B Virus infiziert (Koller, 2005; Robert-Koch-Institut, Stand: 17.11.2006).

Hauptendemiegebiete sind Südostasien, Zentral- und Südafrika, sowie Teile Südamerikas (Abb. 2.10). Aber auch in Deutschland ist trotz Impfpflicht der Ständigen Impfkommission (StIKo) der Bundesrepublik Deutschland für Kinder, Jugendliche und expositionsgefährdete Personen immer noch eine hohe Zahl an Neuinfektionen, im Jahre 2006 waren es ca. 1000, zu verzeichnen. Laut Angaben des Robert-Koch-Instituts (Stand 2006) ist bundesweit von 300000 bis 650000 chronischen Hepatitis B Virusträgern auszugehen (Robert Koch Institut, Stand: 17.11.2006). Eine erhebliche gesundheitspolitische Bedeutung der Hepatitis B ergibt sich vor allem aus den Folgen chronischer Infektionen. Pro Jahr wird weltweit mit bis zu einer Million

Todesfällen infolge von Hepatitis B-bedingten Leberzirrhosen oder Leberkarzinomen gerechnet (Robert Koch Institut, Stand: 17.11.2006).

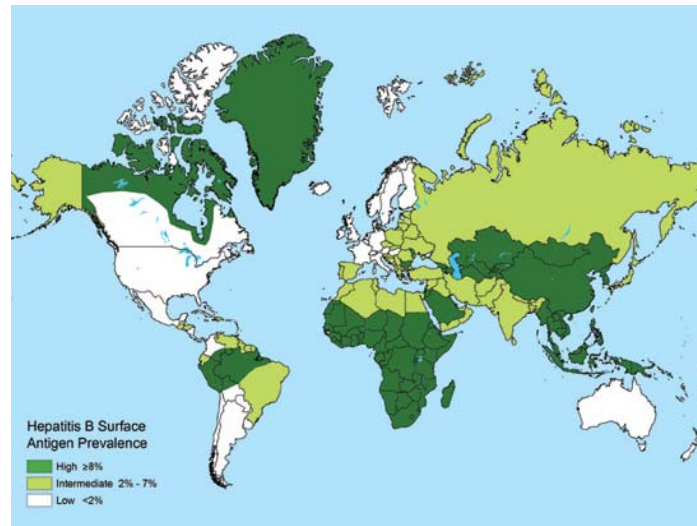


Abb. 2.10: Weltweite Prävalenz an Hepatitis B, ausgedrückt anhand der Verbreitung des HBV-Oberflächenantigens (HBsAg): dunkelgrün: hohes, hellgrün: mittleres, weiß: geringes Vorkommen (Stand: 2006) (Arguin et al., 2007).

Das Hepatitis B Virus gehört zur Familie der Hepadnaviridae und hier in die Gattung der Orthohepadnaviren. Das 42 nm große Virus wurde nach seiner Entdeckerin auch „Dane-Partikel“ genannt (Dane et al., 1970).

2.3.5.2 Aufbau des Hepatitis B Virions und Genomstruktur

Neben den kompletten Virionen, den Dane-Partikeln, finden sich im Blut von Hepatitis B Virus-Trägern auch sogenannte Hepatitis B Virus-assoziierte Partikel. Diese subviralen Partikel weisen einen Durchmesser von ca. 18-25 nm auf und kommen in Form von filamentösen (mit einer Länge von bis zu 300 nm) oder sphärischen (rundlichen) Partikeln vor (Gerin et al., 1975; Millman et al., 1970). Die Partikel bestehen nur aus HBV-Oberflächenantigen und Wirtszelllipiden. Sie enthalten weder ein Kapsid, noch virale DNA und sind daher nicht infektiös. Im Blut von Virusträgern befinden sich diese subviralen Partikel in viel größerer Menge, als die Dane-Partikel.

Das quantitative Verhältnis beider Partikel beträgt 1000:1 bis 1000000:1 (Ganem, 1996; Tausch, 2005).

Die infektiösen kompletten Virionen haben eine sphärische Gestalt, weisen einen Durchmesser von 42 nm auf und sind von einer Hüllmembran umgeben, die das ikosaedrische Nukleokapsid, sowie die viralen Erbinformationen einschließt (Abb. 2.11). In die Hüllmembran, deren Lipiddoppelschicht aus der Wirtszelle stammt, ist als Transmembranprotein das Hepatitis B Virus-spezifische Oberflächen-Protein (Hepatitis B surface-Antigen; HBsAg) eingelagert. Aufgrund seiner ersten Isolierung 1965 (von Blumberg et al.) aus dem Serum von Aborigines in Australien wurde es früher auch Australia-Antigen (AuAg) genannt (Blumberg et al., 1965). HBsAg kommt in drei unterschiedlich großen Formen vor: als großes (IHBs), mittleres (mHBs) und kleines (sHBs) Hepatitis B surface Antigen (Stibbe et al., 1983). Außerdem kann es auch in glycosylierter Form auftreten.

Im Inneren der Hülle befindet sich das aus dimerisierten, kubisch-symmetrisch angeordneten Hepatitis B core-Proteinen bestehende, ca. 28 nm große Kapsid (das sog. Core-Partikel).

Im Nukleokapsid wiederum liegt die zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA, mit der das terminale Protein kovalent verknüpft ist (Gerlich et al., 1980).

Das Hepatitis B Virus besitzt mit einem etwa 3,2 kb langem Genom eines der kleinsten Genome unter den DNA-Viren. Es liegt als zirkulärer, nicht kovalent geschlossener, partieller Doppelstrang (*relaxed circular DNA*, rcDNA) vor (Abb. 2.12). Der kodierende Minusstrang ist komplett vorhanden. An seinem 5'-Anfang ist das sog. Terminale Protein kovalent gebunden (Robinson et al., 1974). Bei zirkulärer Anordnung des Genoms überlappen sich Anfang und Ende, wodurch sterisch eine Lücke von mehreren Nukleotiden (sog. *gap*) entsteht. Der komplementäre Plusstrang sorgt für den Zusammenhalt der zirkulären DNA-Struktur und besitzt etwa 230 nt vor der Minusstrang-Lücke seinen 5'-Anfang. An ihn ist eine kurze RNA-Sequenz (Oligoribonukleotid) von 18 nt kovalent gebunden (sog. *cap*-Struktur), die vermutlich als Primer für die Plusstrang-Synthese dient (Seeger et al., 1997).

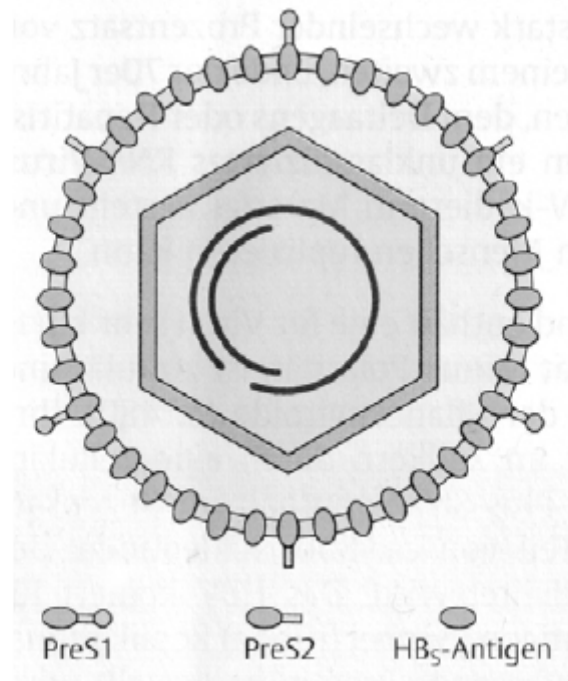


Abb. 2.11: Schematische Darstellung des Dane-Partikels: Das innere Sechseck symbolisiert das HBV-core-Protein, das die partiell doppelsträngige Virus-DNA (schwarze Linien im Zentrum) umgibt. Die äußere Virushülle wird von den drei verschiedenen Formen des vom HBs-Gen kodierten Hüll-Proteins (Prä-S1, Prä-S2, HBs) gebildet (Freilinger, 2004).

Der Plusstrang überbrückt zwar die Minusstrang-Lücke, verläuft aber nur etwa 1000 bis 2500 nt in 3'-Richtung darüber hinaus und ist somit nur inkomplett vorhanden (Landers et al., 1977; Delius et al., 1983). Dadurch entsteht eine Einzelstrangregion, die sich über 20-50% des Virusgenoms erstreckt (Summers et al., 1975).

Die zirkuläre Struktur des Genoms wird durch Basenpaarung zwischen den 5'-Enden der beiden DNA-Stränge gewährleistet. Dieser Bereich wird auch als kohäsive Überlappungsregion bezeichnet (Sattler et al., 1979).

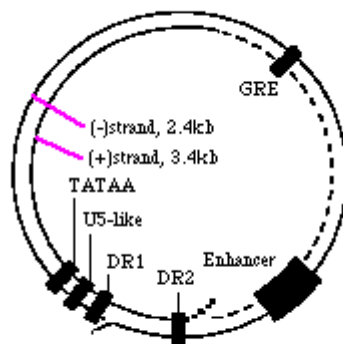


Abb. 2.12: Partieller Doppelstrang des Hepatitis B Virus. Nach Ganem (1996).

Mit vier offenen Leserahmen (ORF) zeigt das HBV-Genom eine sehr kompakte Organisation (Abb. 2.13). Durch Überlappungen der ORF wird eine hohe Kodierungskapazität des relativ kleinen Genoms erreicht. Die vier offenen Leserahmen werden mit S, C, P und X bezeichnet.

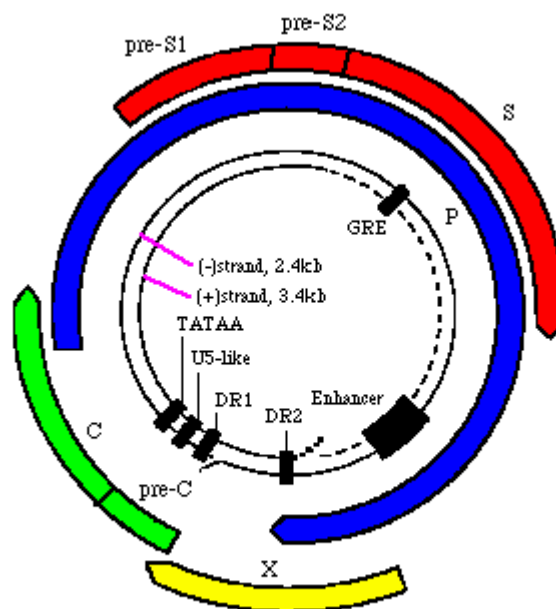


Abb. 2.13: Organisation des Hepatitis B Virus Genoms mit den vier ORF: S, C, P und X. Nach Ganem (1996).

Die P-Region, die sich über 80% des viralen Genoms erstreckt, kodiert für die virale Polymerase und das Terminale Protein. Das S (surface)-Gen, bestehend aus prä-S1-, prä-S2- und S-Region, kodiert durch unterschiedlich gelegene Start-Codons für die drei Oberflächenantigene IHBs, mHBs und sHBs (HbsAg). Das core-Gen, bestehend aus prä-core und core-Region, kodiert für das core-Protein und das Hepatitis B-e-Antigen (HBeAg). Der X-ORF kodiert für einen viralen Transaktivator, das HBx-Protein (Ganem, 1996).

Ausgehend vom DNA-Genom des HBV wird während des Replikationszyklus die genetische Information des Virus in vier verschiedene RNA-Transkripte übersetzt (Cattaneo et al., 1984; Yokusuka et al., 1986; Will et al., 1987; Su et al., 1989). Bei den Transkripten handelt es sich um (Abb. 2.14):

- ein 3,5 kb langes supergenomisches (= prägenomisches) RNA-Intermediat (pgRNA). Es steht unter Kontrolle des prä-core Promotors und enthält die Information für die Produkte des core- und des Polymerase-Gens;
- das 2,4 kb subgenomische RNA-Transkript. Es kodiert unter Kontrolle des prä-S1-Promotors für das große HBsAg;
- das 2,1 kb RNA-Transkript mit dem prä-S2-Promotor. Es beinhaltet die Information für das mittlere und das kleine HBsAg;
- sowie das 0,7 kb RNA-Transkript mit dem x-Promotor. Es kodiert für das HBx-Protein.

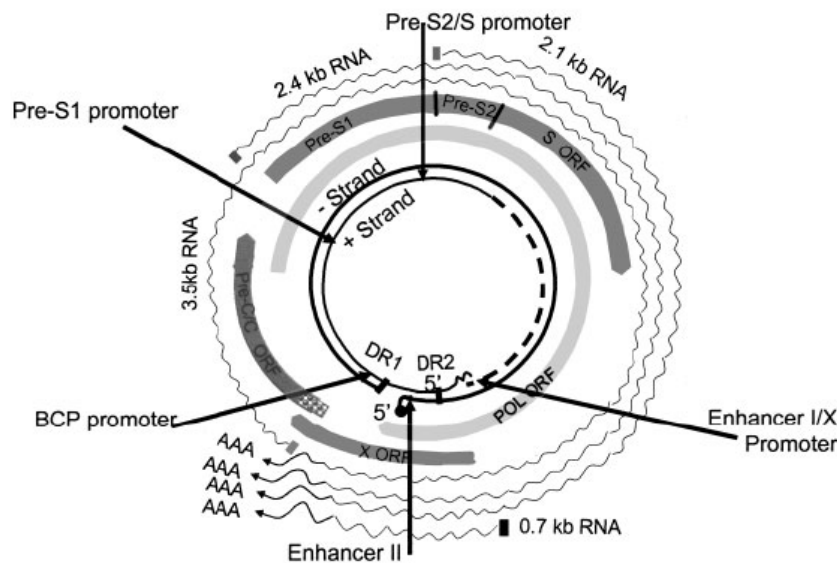


Abb. 2.14: Organisation des HBV-Genoms mit den vier verschiedenen RNA-Transkripten (3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb RNA-Transkript) und zugehörigen regulatorischen Sequenzabschnitten. Die Pfeile weisen in die Richtung der Transkription. Nach Locarnini (2005).

Alle vier Transkripte weisen eine 5'-terminale „cap“-Struktur auf und besitzen ein gemeinsames 3'-terminales polyadenyliertes Ende (Cattaneo et al., 1984).

2.3.5.3 Virale Transkripte und Genprodukte

Die Oberflächenproteine (HBsAg) des HBV werden durch den S-Leserahmen kodiert. Dieser setzt sich aus drei Regionen zusammen, der prä-S1-, der prä-S2- und der S-Region. Jede der drei genannten Regionen besitzt ein eigenes Start-Codon. Es liegt jedoch nur ein gemeinsames Stop-Codon am 3'-Ende des Gens vor. Somit werden jeweils unterschiedlich große Proteine kodiert, die alle den selben C-Terminus, aber unterschiedliche N-Termini besitzen (Locarnini et al., 2003).

Beginnt die Translation in der prä-S1-Region, so wird das lange HBsAg (lHBsAg) gebildet. Bei einem Translations-Start ab der prä-S2- bzw. S-Region entstehen analog das mittlere (mHBsAg) und das kurze HBsAg (sHBsAg) (Abb. 2.15).

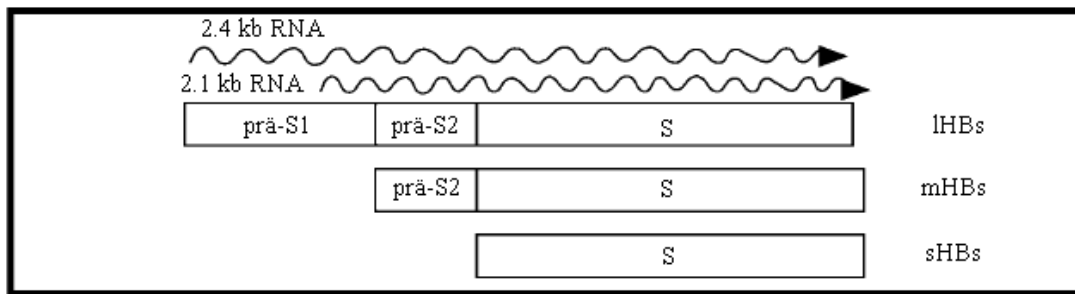


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Proteine des HBsAg. Nach Locarnini et al. (2003).

In den verschiedenen viralen Partikeln tritt ein charakteristisches Verteilungsmuster der unterschiedlichen HBsAg-Subtypen auf (Molnar-Kimber et al., 1988).

Das 3,5 kb prägenomische RNA-Transkript (pgRNA) kodiert sowohl für das Core-Gen, als auch für das Polymerase-Gen (Ou et al., 1990) (Abb. 2.16). Im Core-Gen befinden sich zwei Startcodons, die das Gen in eine prä-core- und eine core-Region unterteilen.

Die core-Region enthält die Informationen für die Synthese der 22 kDa großen Kapsid-Proteine (core-Protein, HBcAg). Diese bilden Dimere und lagern sich zum ikosaedrischen Nukleokapsid zusammen (Onodera et al., 1982; Gerlich et al., 1982; König et al., 1998).

Startet die Translation bereits in der prä-core-Region, so entsteht das Hepatitis B-e-Antigen (17,5 kDa).

Im Gegensatz zum HBcAg aggregiert das HBeAg nicht in der Zelle, sondern wird sezerniert. Da das prä-core-Start-Codon unter Kontrolle derselben regulatorischen Elemente steht wie die Transkription der pgRNA, korreliert die im Blut von Virusträgern gefundene HBeAg-Menge meist mit der replikativen Aktivität des HBV (Radziwill et al., 1990; Doo und Liang, 2001). HBeAg dient als serologisch leicht nachweisbarer Marker einer Hepatitis B-Infektion (Tausch, 2005).

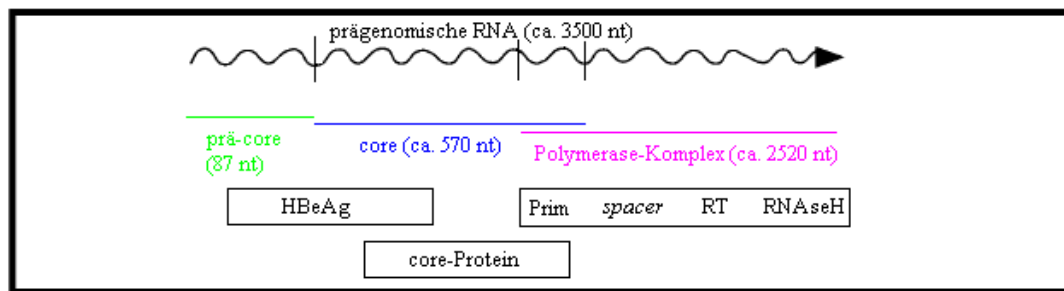


Abb. 2.16: Schematische Darstellung der Organisation der prägenomischen RNA. Prä-core- und core-Transkript bilden das core-Gen. Im unteren Bildbereich sind die Produkte des core-Gens, das HBeAg und das core-Protein, dargestellt. Die Polymerase ist ein multifunktionelles Enzym. Die Domänen sind wie folgt bezeichnet: Prim = Primase-Aktivitäts-Region; *spacer* = *Spacer*-Region; RT = Reverse Transkriptase-Aktivitäts-Region, RNaseH = RNase-Aktivitäts-Region. Nach Tausch (2005).

Die virale Polymerase ist ein multifunktionelles Enzym mit mehreren enzymatisch aktiven Domänen (Radziwill et al., 1990; Schreck, 1995; Ganem, 1996; Doo und Liang, 2001).

Dabei handelt es sich um:

- eine N-terminale Domäne mit Primase-Aktivität, häufig als Terminales Protein bezeichnet;
- einen Bereich mit Reverser Transkriptase-Aktivität weiter C-terminal. Er enthält im aktiven Zentrum eine konservierte Aminosäure-Sequenz (Tyr-Met-Asp-Asp), das sog. *YMDD*-Motiv;
- einen sog. *Spacer*-Bereich zwischen den Domänen mit Primase- und Reverser Transkriptase Aktivität;
- sowie am weitesten C-terminal eine Domäne mit RNaseH-Aktivität, die für den Abbau der RNA-Matrize während der Reversen Transkription zuständig ist.

Die virale Polymerase veranlaßt die Reverse Transkription der prägenomischen RNA in die Minusstrang-DNA, den anschließenden Abbau der RNA-Matrize durch die RNaseH und die darauf folgende Synthese der Plusstrang-DNA.

Darüberhinaus wird die Polymerase für die Verpackung der prägenomischen RNA in die Nukleokapside eingesetzt (Bartenschlager et al., 1990; Hirsch et al., 1990).

Der kleinste offene Leserahmen kodiert das HbxAg, ein 17 kDa großes Protein mit unbekannter Funktion.

2.3.5.4 Regulatorische Elemente

Neben den verschiedenen Promotoren und dem Polyadenylierungssignal sind im HBV-Genom noch weitere cis-regulatorische Elemente bekannt:

- Zwei transkriptionale „Enhancer-Elemente“:
 - Der „Enhancer I“ befindet sich unmittelbar stromaufwärts des X-Leserahmens im P-Gen (Guo et al., 1991). Er wirkt auf die viralen Promotoren C_p (Jameel und Siddiqui, 1986), $S1_p$ (Faktor et al., 1988), $S2_p$ (Su et al., 1992) und X_p (Nakamura et al., 1993) stimulierend.
 - Der „Enhancer II“ befindet sich im Nukleotidbereich (nt_{HBV}) 1497-1646 und überlappt teilweise mit C_p (Wang et al., 1990). Da die E_{II}/C_p -Region die Transkription der prägenomischen RNA reguliert, ist sie auch für die Regulation der Virusreplikation von großer Bedeutung (Honigwachs et al., 1989).
- Flankiert wird der Enhancer II von je einer direkten Sequenzwiederholung (TTCACCTCTGC) im sog. DR II (*direct repeat* II) (nt_{HBV} 1464-1473) und im stromabwärts liegenden DR I (nt_{HBV} 1697-1707). Die Sequenzwiederholungen sind von Bedeutung für die Replikation des HBV-Genoms (Will et al., 1987).
- Das Verpackungssignal ε liegt am 5'-Ende der prägenomischen RNA (nt_{HBV} 1726-1779) (Junker-Niepmann et al., 1990; Gerelsaikhon, 1998). Es wird von einer „*stem-loop*“-Struktur („RNA-Haarnadel-Struktur“) gebildet und ist von entscheidender Bedeutung für die Verpackung der viralen RNA ins Nukleokapsid (Pollack und Ganem, 1993; Gerelsaikhon, 1998).
- Das „*glucocorticoid responsive element*“ (GRE) (nt_{HBV} 222-239) befindet sich im Bereich des S-Gens. Dieses Element führt bei Anwesenheit von

Glucocorticoiden zu einer etwa fünffachen Erhöhung der Genexpression (Turkaspas et al., 1986).

2.3.5.5 HBV Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des Hepatitis B Virus umfasst mehrere Schritte: Von der Infektion der Hepatozyten über den Transport der Viruskapside zum Kern, die Transkription und Translation, bis hin zum Virustransport aus der Zelle (Abb. 2.17). HBV zeigt eine auffallende Speziespezifität und einen ausgeprägten Gewebetropismus. Gelangt das Virus über den parenteralen Weg in einen Wirtsorganismus, dann erreicht es per Blutkreislauf seine Zielzellen, die humanen Hepatozyten und infiziert diese.

Über den ersten Schritt des Vermehrungszyklus, den Eintritt des Hepatitis B Virus in die Leberzellen, ist nur wenig bekannt. Als Mechanismus wird ein rezeptorvermittelter Vorgang vermutet. Aufgrund des ausgeprägten Hepatotropismus (Robinson, 1991) wurden verschiedene hepatozelluläre Oberflächen-Membran-Proteine als Rezeptoren für das Hepatitis B Virus postuliert (Rigg et al., 1992; Scaglioni et al., 1996; Mabit et al., 1996; Le Seyec et al., 1999; Paran et al., 2003).

Nach Eintritt in die Zielzelle wird das Nukleokapsid freigesetzt und zum Zellkern transportiert. Dort bindet es an den Kern-Pore-Komplex. Innerhalb des Kerns kommt es daraufhin zur Freisetzung der viralen DNA (Kann et al., 1999; Rabe et al., 2003).

Nach Entfernung der terminal kovalent gebundenen Strukturen wird im Kern das virale Genom von der partiell doppelsträngigen zirkulären DNA mit Hilfe zellulärer Enzyme zu einer komplett doppelsträngigen, kovalent geschlossenen zirkulären DNA (cccDNA) konvertiert.

Die cccDNA dient als Matrize für die Transkription:

Die Wirts-RNA-Polymerase (zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase-II) transkribiert im Zellkern die drei subgenomischen RNA-Transkripte (2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb), die in der Folge ins Zytoplasma transportiert und dort in die entsprechenden Proteine translatiert werden.

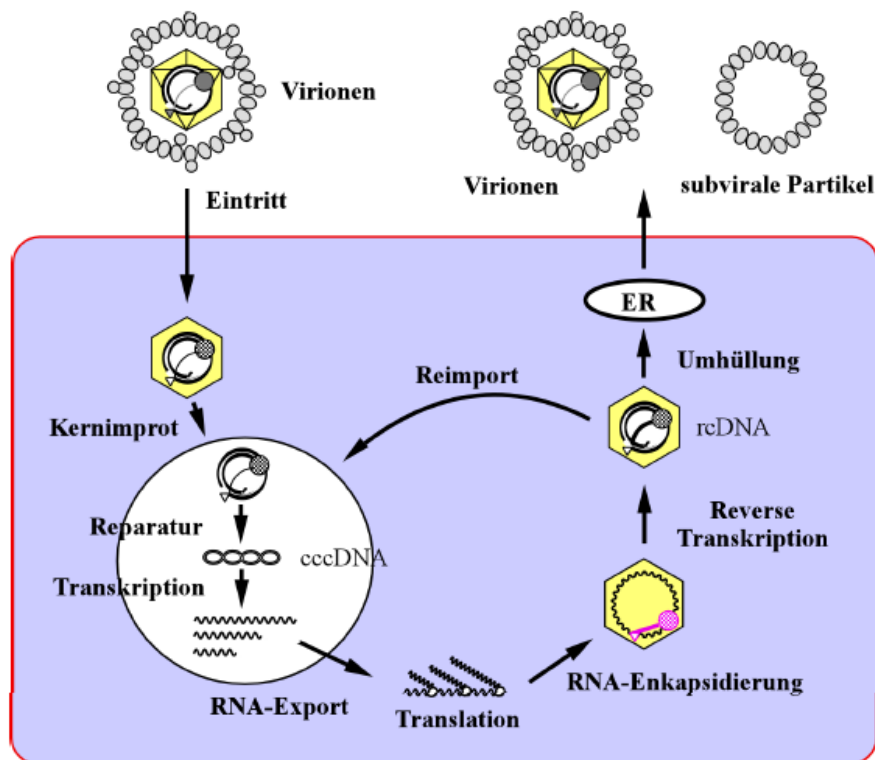


Abb. 2.17: Replikationszyklus der Hepatitis B Viren. Die viralen Kapside werden nach der Fusion mit der Membran zum Kern transportiert. Die cccDNA wird im Kern transkribiert und die RNA anschließend ungespleißt exportiert. Von der mRNA werden die Proteine translatiert. Die genomische RNA wird in Kapside verpackt. Die Kapside knospen in das endoplasmatische Retikulum (ER) oder erhöhen den cccDNA-Pool im Kern. Nach der „Knospung“ in das ER werden die Virionen aus der Zelle sezerniert (Untergasser, 2002).

Auch das 3,5 kb große prägenomische RNA-Intermediat gelangt ins Zytosol (Nassal, 1999). Dort dient es als Matrize für die Transkription des HBeAg, des core-Proteins und der viralen Polymerase. Die virale Polymerase bindet an die RNA-Haarnadel-Struktur (ϵ) am 5'-Ende der pgRNA (Hu et al., 1996); ϵ dient sowohl als Verpackungs-, als auch als Initiationssignal für die Reverse Transkription. Durch ein enges Zusammenspiel dieses Reverse Transkriptions-Komplexes mit dimerisierten core-Proteinen kommt es zur Minusstrang-DNA-Synthese und gleichzeitig zur Bildung des Kapsids (Bartenschlager et al., 1990; Kramvis und Kew, 1998; Junker-Niepmann et al.,

1990). Im Inneren des Kapsids befindet sich nun die virale rcDNA (relaxed circular DNA).

Die HBV-Oberflächenproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und zum größten Teil in Form von subviralen Partikeln vesikulär unter Einbeziehung des Golgi-Apparates aus der Zelle transportiert.

Für die Nukleokapside existieren dagegen zwei alternative Verwendungsmöglichkeiten:

Zum einen können die Kapside umhüllt und dann als komplette, infektiöse Virionen mittels Vesikeln aus der Zelle transportiert werden. Andererseits können sie auch mittels eines intrazellulären Kreislaufs zurück in den Zellkern gelangen, um dort das cccDNA-Depot wieder aufzufüllen (Doo und Liang, 2001).

2.3.5.6 Variationen und Mutationen im HBV-Genom

Eine große Anzahl an Sero- und Genotypen von HBV reflektiert die hohe Variabilität seines Genoms, ohne dass dadurch die Infektiosität und Replikationsfähigkeit des Virus beeinträchtigt werden würden. Das Hepatitis B Virus weist eine 10-fach höhere Mutationsrate als andere DNA-Viren auf (Locarnini, 2005). Ein möglicher Grund hierfür ist das Fehlen der „Proof-Reading-Funktion“ der Polymerase (Bartholomeusz und Locarnini, 2001; Zoulim, 2001).

Nicht alle Bereiche des HBV-Genoms sind gleich häufig von Mutationen betroffen. So zeigt z.B. der *Spacer*-Bereich (gelegen zwischen den Sequenzen mit Primase-Aktivität und Reverser Transkriptase-Aktivität im HBV Polymerase-Komplex) eine hohe Toleranz gegenüber Punktmutationen, Deletionen und Insertionen. Die daran anschließende Domäne der Reversen Transkriptase (RT) hingegen zeigt sich stärker konserviert (Ganem, 1996). Ähnlich verhält es sich im ϵ -Bereich. In dieser Region kann mittels experimenteller Mutagenese eine bis zu 10-fache Verringerung der Verpackungseffizienz erzielt werden (Pollack und Ganem, 1993).

Vergleichsweise häufig treten im Hepatitis B Virus Aminosäureaustausche auf, die z.B. die HBeAg- und/oder die HBcAg-Bildung beeinflussen (Locarnini, 2005). Diese Mutationen treten vor allem im Bereich des Basic Core Promotors (BCP) auf. Aber

auch im X-Gen und im Polymerase-Gen im Bereich der Reversen Transkriptase sind Mutationen bekannt (Locarnini, 2005).

Mutationen, die eine Resistenz gegen Lamivudin bewirken, einem Nukleosidanalogen, das als antivirales Therapeutikum eingesetzt wird (vgl. 2.3.5.7), sind weithin bekannt und beschrieben: Sie treten im sog. *YMDD*-Motiv auf, welches in der Domäne mit Reverser Transkriptase Aktivität im Sequenzbereich des viralen Polymerase-Komplexes gelegen ist (Stuyver et al., 2001; Locarnini, 2005).

2.3.5.7 Strategien bei viraler Hepatitis B

Mittels antiviraler Agentien soll eine Unterbrechung oder Blockierung der Virusreplikation erreicht werden. Dafür kommt theoretisch jede Stufe des viralen Replikationszyklus in Frage.

Eine Blockierung der Virusreplikation ist demnach denkbar durch:

- Verhinderung der Anheftung des viralen Erregers an die Wirtszelle, beispielsweise durch Binden freier Viruspartikel mittels löslicher Rezeptormoleküle (*decoys*) oder durch Blockieren des zellulären Rezeptors,
- Unterbindung der Freisetzung des viralen Genoms („uncoating“),
- Blockierung der Replikation der viralen Erbinformation,
- Verhinderung der Synthese viraler Hüllproteine und Enzyme, oder der posttranslationalen Modifikation dieser Proteine,
- Unterbindung des Zusammenbaus der Viren (Virusassembly) und deren Freisetzung

(Fields und Green, 1982; Weiß, 1995).

Bei einer chronischen HBV-Infektion werden vielfach Nukleosidanaloga, z.B. Lamivudin als Therapeutikum eingesetzt (Maynard et al., 2005; Shin et al., 2005).

Lamivudin, ein Cytidin-Analogon aus der HIV-Therapie, wirkt als RT-Hemmer. Nach einer einmonatigen Einnahme kommt es bei über 95% der chronisch HBV-Infizierten zu einer Senkung der Virämie um mehr als 95%. Mit einer Langzeiteinnahme von Lamivudin ist jedoch häufig die Entwicklung von resistenten Stämmen verbunden (Renner, 2000). Diese Mutationen, die eine Resistenz gegen Lamivudin bewirken, treten im *YMDD*-Motiv des HBV-Genoms auf (vgl. 2.3.5.6) (Locarnini, 2005).

Außer den Nukleosidanaloga stellen Interferone (bes. IFN- α und pegyliertes Interferon) bei chronischer Hepatitis B zur Zeit die am erfolgversprechendste Behandlungsmethode dar.

2.3.5.8 Virusabwehr durch RNA editing

(m)RNA editing wurde vor 20 Jahren entdeckt (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987). Inzwischen ist diese posttranskriptionale Modifikation ein bekannter Mechanismus geworden, der zur Erweiterung der molekularen Variabilität dient (Bass, 1997; Maas et al., 1997; Rueter, 1998). Als Folge von RNA editing können aus einem einzelnen Gen Proteine mit unterschiedlicher Funktionalität gebildet werden. Diese posttranskriptionale Modifizierung beinhaltet sowohl einzelne als auch mehrere Basen umfassende Insertionen oder Deletionen, aber auch Substitutionen. Dies kann oftmals entscheidende Auswirkungen auf die jeweilige Proteinfunktionalität haben.

Die am besten untersuchten RNA editing Beispiele finden sich dabei in Apolipoprotein B (Apo B)-Transkripten (C>U-Austausch) sowie in neuronalen Glutamat- und Serotoninrezeptoruntereinheiten (A>I-Austausch). Aber nicht nur dort, sondern auch in Virus-RNA konnte RNA editing nachgewiesen werden. Hierbei werden zwei Varianten unterschieden: Zum einen Beispiele, bei denen RNA editing für einen kompletten, funktionierenden viralen Replikationszyklus notwendig ist, RNA editing also von Vorteil für das Virus ist, und zum anderen Fälle, bei denen diese posttranskriptionale Modifikation zu einer Limitierung der viralen Replikation führt und somit einen antiviralen Effekt bewirkt.

So ist z.B. RNA editing ein essentieller Mechanismus für die Replikation des humanpathogenen Hepatitis Delta Virus (HDV). A-zu-I Editierung in dessen antigenomischer RNA kontrolliert die Bildung der Hepatitis-Delta-Antigene S und L.

Die uneditierte Variante bildet HDAg-p24 (S-Antigen), ein Protein, welches nach erfolgter Transkription und Translation des HDV Genoms für die Replikation benötigt wird. Die editierte Form hingegen bildet HDAg-p27 (L-Antigen), dessen Aufgabe es ist, die Replikation zu unterdrücken und die Verpackung des Hepatitis Delta Genoms zu fördern. Da beide Proteine notwendig sind, ist RNA editing für HDV unerlässlich (Maas und Rich, 2000).

Es wird angenommen, dass das RNA editing hier von einer RNA spezifischen Adenosin Deaminase (*ADARI*) reguliert wird (Maas und Rich, 2000).

Für das Hepatitis C Virus hingegen wurden antivirale Effekte durch RNA editing beobachtet. Von Taylor et al., konnte gezeigt werden, dass *small inhibitory RNA* (siRNA) - spezifisch für *ADARI* - die Replikation von HCV um das 40-fache erhöhte. Die Autoren erbrachten den Nachweis, dass *ADARI* bei der Limitierung der Replikation der viralen RNA von HCV von großer Bedeutung ist (Taylor et al., 2005).

Dies war einer der ersten Berichte über die Bedeutung einer durch ADAR-Proteine regulierten Adenosin zu Inosin Editierung als neuer antiviraler Mechanismus (Taylor et al., 2005).

Neben den ADAR-Proteinen beeinflussen aber auch einige Mitglieder der *APOBEC* Genfamilie posttranskriptionale Modifikationen in verschiedenen Viren. Darunter sind besonders *APOBEC3G*, *APOBEC3F* und *APOBEC3B* von Bedeutung. Sie bewirken Effekte gegen HIV und andere Lentiviren durch RNA editing. Experimente zeigen, dass *APOBEC3G* und *APOBEC3F* auch die Replikation von Hepatitis B Viren inhibieren können (Turelli und Trono, 2005).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Cytotoxizitätsstudien

Eine Voraussetzung für die Nutzung der immunmodulatorischen und neuroprotektiven Eigenschaften von Flavonoiden stellt die Erfassung cytotoxischer Effekte dieser Stoffgruppe dar.

Als Cytotoxizität wird die Fähigkeit von Substanzen bezeichnet, Zellen zu schädigen bzw. zu töten. Wie einleitend angeführt, unterscheidet man prinzipiell zwei Arten des Zelltods: Die Nekrose und die Apoptose.

Einige *in vitro*-Studien belegen die Fähigkeit einer Reihe von Flavonoiden, Apoptose in verschiedenen Zelllinien zu fördern (z.B. Tilly et al., 1992; Traganos et al., 1992; Wei et al., 1994; Hirano et al., 1995; Wenzel et al., 2000). Die Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen ist ein wichtiger Mechanismus, der eine chemopräventive Wirkung der Flavonoide erklären könnte. So wird z.B. eine flavonoidreiche Ernährung mit einem geringeren Krebsrisiko in Verbindung gebracht (Jacobasch et al., 2000; Parr und Bolwell, 2000; Watzl und Rechkemmer, 2001). Verschiedene Mechanismen werden beschrieben, die am Auslösen des Flavonoid-initiierten Zelltodes beteiligt sein könnten. Darunter werden sowohl die Inhibierung von Proteasomen (Chen et al., 2005), als auch die Hemmung der Fettsäurensynthese (Brusselmans et al., 2005) diskutiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die cytotoxischen Eigenschaften verschiedener Flavonoide aus unterschiedlichen Stoffgruppen an der humanen leukämischen T-Zelllinie Jurkat E6-1, an der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH sowie an dendritischen HL-60-Zellen untersucht, um die molekularen Mechanismen, welche hinter dem Flavonoid-induzierten Zelltod stehen, zu ermitteln und diejenigen Strukturelemente zu identifizieren, welche für die cytotoxische Aktivität dieser Stoffklasse von Bedeutung sind.

Analysiert wurden die Substanzen Chrysin, Apigenin, Hispidulin, Baicalein, Scutellarein, EMD 21388, Naringenin, Hesperetin, Catechin, Quercetin, Pelargonidinchlorid und Xanthohumol (Abb. 3.1).

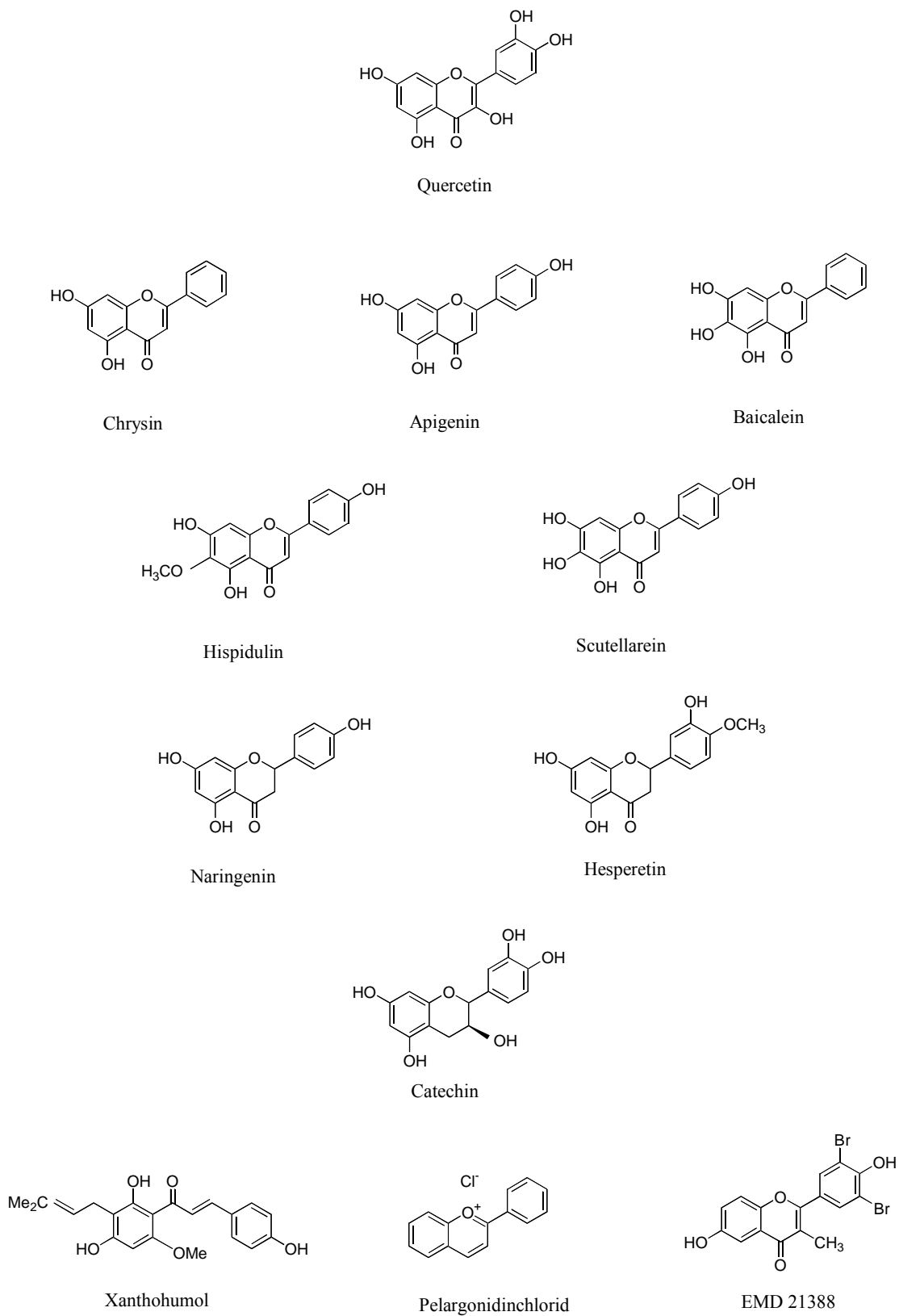


Abb. 3.1: Strukturen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonoide.

Die Substanzen Chrysin, Apigenin, Hispidulin, Baicalein und Scutellarein gehören der Untergruppe der Flavone an. Für diese Gruppe typisch ist die C2-C3-Doppelbindung im C-Ring. Im Gegensatz zu den anderen ausgewählten Flavonen ist EMD 21388 (3',5'-Dibrom-6,4'-dihydroxy-3-methylflavon) ein synthetisches Flavon mit endokrino-logischen Aktivitäten (Rosen et al., 1994).

Die Hydrierung der C2-C3-Doppelbindung führt zur Grundstruktur der Flavanone. Aus dieser Gruppe wurden die beiden Substanzen Naringenin und Hesperetin untersucht.

Reduktion der Flavanon-4-Carbonylgruppe und Hydroxylierung von C3 führt zur Untergruppe der Catechine. Als typischer Vertreter dieser Gruppe wurde Catechin gewählt. Von Catechin wird einerseits über einen Apoptose-induzierenden Effekt in Leukämiezellen (Nakazato et al., 2005a; Nakazato et al., 2005b; Lung et al., 2004; Hibasami et al., 1996), andererseits aber auch über eine Apoptose-hemmende Aktivität in neuronalen Zellen berichtet (Heo und Lee, 2005).

Quercetin gehört der Gruppe der Flavonole an und ist eines der am besten untersuchten Flavonoide. Flavonole unterscheiden sich von Flavononen durch die Anwesenheit einer C3-Hydroxygruppe.

Pelargonidinchlorid gehört der Stoffklasse der Anthocyanidine an. Shih et al. berichteten 2005 über einen geringen pro-apoptotischen Effekt dieses Anthocyanidins (Shih et al., 2005).

Xanthohumol gehört zur Gruppe der Chalcone, welche sich durch ihren offenen C-Ring auszeichnen. In der Literatur wird über die Cytotoxizität von Chalconen, und im speziellen von Xanthohumol, in verschiedenen Tumorzellen berichtet (Miranda et al., 1999).

3.1.1 Cytotoxizitätsstudien (Jurkat und SK-N-SH)

3.1.1.1 Durchflusszytometrie (Jurkat)

Die Durchflusszytometrie (FACS; *fluorescence activated cell sorting*) kann zur Analyse bestimmter physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen verwendet werden. Sie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen und wird unter anderem für Cytotoxizitätstests eingesetzt.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Jurkat E6-1-Zellen wurde mittels FACS die Cytotoxizität der ausgewählten Flavonoide gemessen. Dabei wurden Doppelfärbungen mit dem Oberflächenmarker Annexin-V-FITC und dem in die DNA interkalierenden Farbstoff 7-AAD durchgeführt.

Die Mehrzahl der verwendeten Substanzen verursachten nach 24-stündiger Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich (0-100 bzw. 200 μM) keine bzw. nur eine geringgradige Toxizität in Jurkat E6-1-Zellen (Abb. 3.2, 3.3 und 3.4).

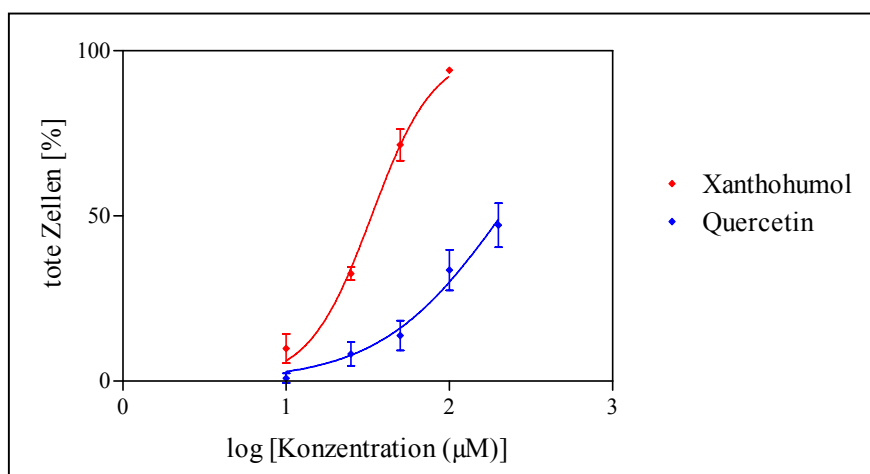


Abb. 3.2: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mit Quercetin und Xanthohumol (in den Konzentrationen 0-100 μM), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Aufgetragen sind jeweils die Regressionsanalysen, wobei x der Logarithmus der untersuchten Flavonoidkonzentration und y der Prozentanteil an toten Zellen ist.

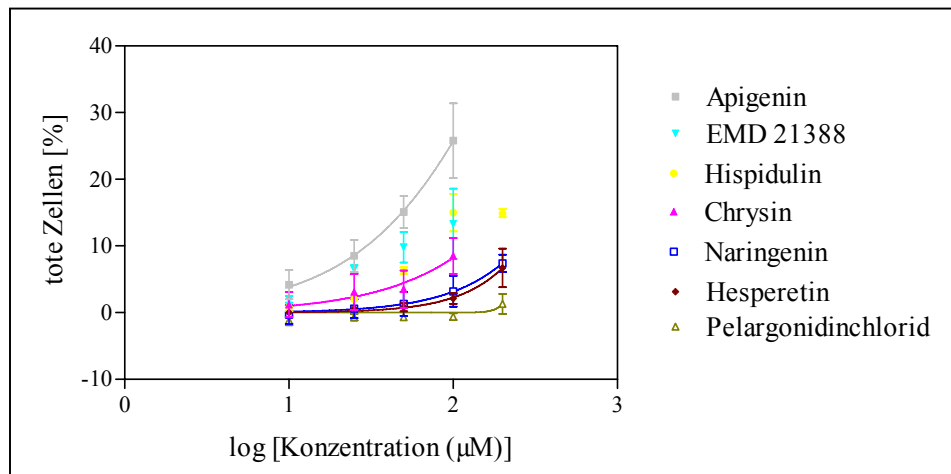


Abb. 3.3: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mit Apigenin, Chrysin, EMD 21388, Hesperetin, Hispidulin, Naringenin und Pelargonidinchlorid (in den Konzentrationen 0-100 bzw. 200 µM), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Aufgetragen sind jeweils die Regressionsanalysen, wobei x der Logarithmus der untersuchten Flavonoid-konzentration und y der Prozentanteil an toten Zellen ist.

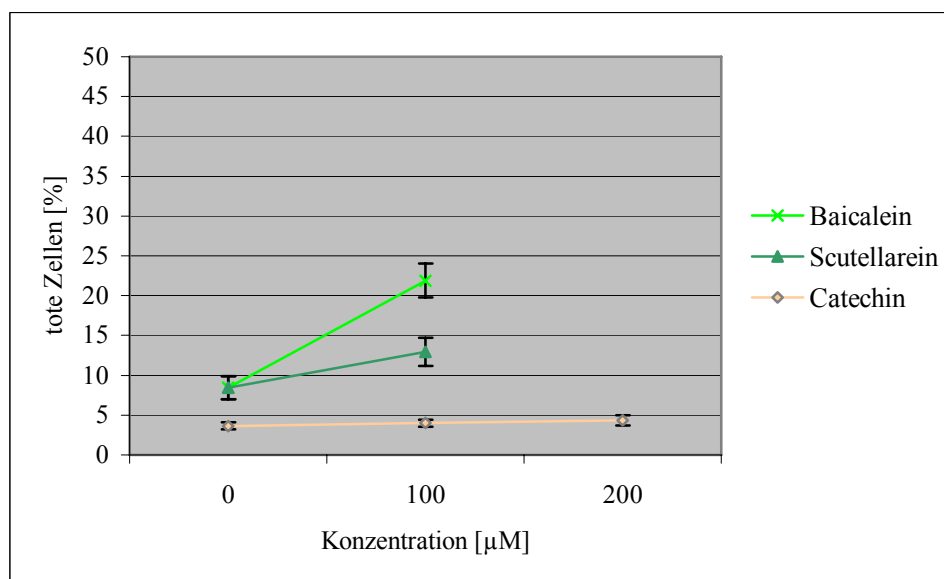


Abb. 3.4: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mit Baicalein, Scutellarein und Catechin (in den Konzentrationen 0-100 µM bzw. 200 µM), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. Signifikante Unterschiede relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) ergaben sich lediglich für Baicalein (100 µM) (Mann-Whitney-test; $p < 0,05$; Bonferroni-korrigiert).

Für Apigenin, Chrysin, EMD 21388, Hesperetin, Hispidulin, Naringenin und Pelargonidinchlorid blieb hierbei die Anzahl an toten Zellen unter 30%. Die EC_{50} -Werte lagen ausserhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs ($EC_{50} > 300 \mu\text{M}$).

Baicalein und Scutellarein induzierten nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls nur eine geringe Toxizität unter 25%, gemessen am Anteil toter Zellen. Für Catechin lag der Anteil an toten Zellen unter 5%.

Für Quercetin wurde ein EC_{50} -Wert von $208 \mu\text{M}$ nach 24-stündiger Inkubation in Jurkat E6-1-Zellen ermittelt. Xanthohumol induzierte unter allen untersuchten Flavonoiden die höchste Toxizität. Nach 24-stündiger Inkubation mit Xanthohumol ($100 \mu\text{M}$) lag der Anteil an toten Jurkat-Zellen über 90% (Abb. 3.2). Mittels Regressionsanalyse wurde für das Chalcon ein EC_{50} -Wert von $33 \mu\text{M}$ ermittelt.

Bezogen auf den Anteil an toten Zellen bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ nach 24-stündiger Inkubation in Jurkat-Zellen konnte hinsichtlich der verschiedenen untersuchten Flavonoidklassen folgender Trend beobachtet werden: Die größte Cytotoxizität zeigte das Chalcon (Xanthohumol), gefolgt vom Flavonol (Quercetin), den Flavonen (Chrysin, Apigenin, Hispidulin, Baicalein, Scutellarein), den Flavanonen (Naringenin, Hesperetin), dem Anthocyanidin (Pelargonidinchlorid) und schließlich dem Catechin (Catechin). Da pro Untergruppe meist nur jeweils eine geringe Anzahl an Vertretern untersucht wurde, für einige Klassen sogar nur eine einzige Substanz, kann diese Reihung allerdings lediglich als Trend angesehen werden.

Damit kommen folgende Strukturmerkmale für eine Erhöhung der Cytotoxizität in Betracht:

- Die C2-C3-Doppelbindung: Das Flavon Apigenin unterscheidet sich vom Flavanon Naringenin lediglich bezüglich dieser Doppelbindung. Im Vergleich der beiden Substanzen zeigte Apigenin die höhere Cytotoxizität.
- Die 4-Carbonylgruppe im C-Ring: Catechin, von allen hier untersuchten Substanzen die einzige ohne 4-Carbonylgruppe, zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Toxizität in Jurkat E6-1-Zellen.

- Der offene C-Ring: Ein offener C-Ring ist das charakteristische Merkmal der Chalcone. Xanthohumol, als Vertreter dieser Gruppe, zeigte unter allen hier untersuchten Substanzen die größte Cytotoxizität in Jurkat E6-1-Zellen.

Folgende Strukturmerkmale hingegen kommen für eine Verringerung der Cytotoxizität in Betracht:

- Hydroxylierung des A-Rings: Scutellarein, mit drei Hydroxygruppen am A-Ring, zeigte eine geringere Toxizität als Apigenin, mit lediglich zwei OH-Substituenten am A-Ring.
- Methoxygruppen an Stelle von Hydroxysubstituenten im A-Ring: Hispidulin, mit einer Hydroxygruppe im A-Ring, war stärker toxisch als Scutellarein, welches einen Methoxysubstituenten aufweist.

Widersprüchliche Befunde ergeben sich hinsichtlich der Hydroxylierung am B-Ring:

- Apigenin (mit hydroxyliertem B-Ring) zeigte eine höhere Cytotoxizität als Chrysin (ohne Hydroxylierung im B-Ring). Für Scutellarein und Baicalein hingegen ergab sich ein gegenläufiger Effekt. Bei Scutellarein (mit Hydroxylierung im B-Ring) konnte gegenüber Baicalein, der Substanz ohne Hydroxylierung in diesem Ring, eine verringerte Cytotoxizität beobachtet werden.

Um eine exakte Struktur-Wirkungsbeziehung ermitteln zu können, ist allerdings einerseits die Fallzahl zu gering und andererseits wäre für eine eindeutige Aussage ein direkter Vergleich im gleichen Experiment notwendig.

Einige dieser Beobachtungen können anhand von früheren Befunden in der Literatur bestätigt werden.

So wurde zum Beispiel das Vorhandensein der C2-C3-Doppelbindung, die zur Unterscheidung von Flavonen oder Flavonolen und Flavanonen dient, in Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Beobachtungen mit einer erhöhten Flavonoid-Aktivität in Verbindung gebracht (Dorta et al., 2005). Gleiches gilt für die 4-Carbonylgruppe. Fotsis et al. berichteten 1997 über die geringe Cytotoxizität von

Catechin, der Substanz ohne 4-Carbonylgruppe (Fotsis et al., 1997). Xanthohumol, ein prenyliertes Chalcon, zeigte unter allen untersuchten Substanzen die stärkste Cytotoxizität. Über cytotoxische Effekte von Chalconen gegenüber humanen Tumorzelllinien wird vielfach berichtet (Miranda et al., 1999).

3.1.1.2 Kinetik der Cytotoxizität (Jurkat)

Mit einer Auswahl von fünf Substanzen wurde der zeitliche Verlauf der Cytotoxizität mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dabei wurden das Chalcon Xanthohumol, das Flavonol Quercetin, die Flavone Hispidulin und Scutellarein, sowie das Flavanon Hesperetin untersucht.

Die Kinetik der Cytotoxizität wurde in Jurkat E6-1-Zellen in einer Zeitspanne von 72 Stunden bestimmt.

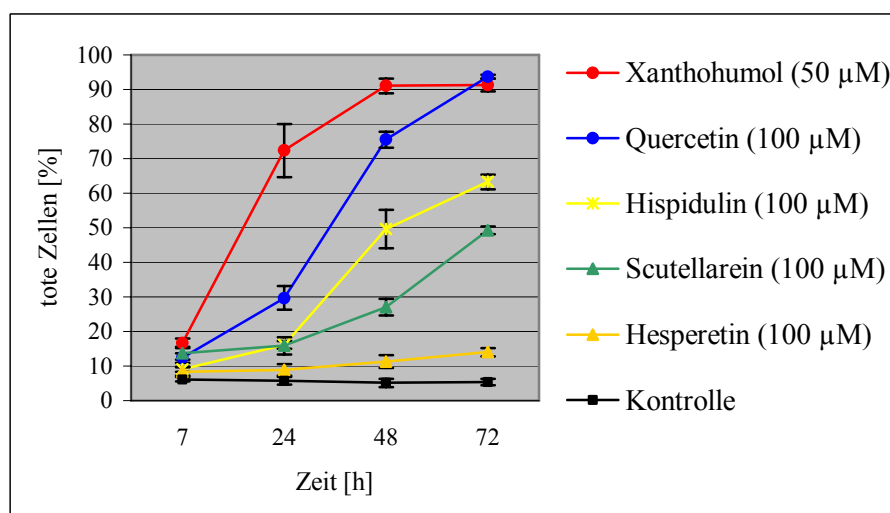


Abb. 3.5: Kinetik der Cytotoxizität in Jurkat E6-1-Zellen für Xanthohumol (50 µM), Quercetin (100 µM), Hispidulin (100 µM), Scutellarein (100 µM), Hesperetin (100 µM) und die Kontrolle (unbehandelte Zellen). Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in % in einer Zeitspanne von 72 h.

Die Substanzen Quercetin, Hispidulin, Hesperetin und Scutellarein wurden dabei in der Konzentration 100 μM , Xanthohumol in der Konzentration 50 μM eingesetzt. Alle untersuchten Flavonoide zeigten eine zeitabhängige Zunahme des Anteils an toten Zellen. Die Effektstärke stieg dabei in folgender Reihenfolge an: Hesperetin < Scutellarein < Hispidulin < Quercetin < Xanthohumol. Hierbei blieb der Anteil toter Zellen für Hesperetin selbst nach 72-stündiger Inkubation unter 20%, für Scuteallarein stieg er auf 50%, für Hispidulin auf 63% und für Quercetin auf 94%. Bereits nach 48-stündiger Xanthohumol-Exposition wurde die maximale Toxizität, über 90% tote Zellen, erreicht (Abb. 3.5).

3.1.1.3 Visualisierung der Cytotoxizität (SK-N-SH)

SK-N-SH-Zellen bilden als adhärenente Zellen einen Zellrasen auf den Böden von Zellkulturflaschen und -platten aus. Als Folge cytotoxischer Substanzen auftretende Zellschädigungen können in diesen Zellen, auch schon in frühen Stadien, mikroskopisch erkannt werden.

Die in Jurkat-Zellen beobachteten toxischen Wirkungen von Quercetin und Xanthohumol sind auch in SK-N-SH-Zellen deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen.

Bei den mit Quercetin (100 μM) behandelten Zellen traten nach 24-stündiger Inkubation erste Anzeichen toxischer Einflüsse auf. Die adhärenenten SK-N-SH-Zellen lösten sich schon teilweise aus dem Zellrasen auf dem Plattenboden heraus und rundeten sich ab (Abb. 3.6).

Für Xanthohumol waren die Merkmale toxischer Effekte noch stärker ausgeprägt. Bei Xanthohumol (50 μM) zeigten sich nach 24-stündiger Inkubation deutlich die vom Plattenboden abgelösten Zellen. Unter dem Mikroskop konnte man die abgerundeten, frei umherschwimmenden SK-N-SH-Zellen beobachten. Für Xanthohumol (100 μM) waren nicht nur alle SK-N-SH-Zellen vom Boden abgelöst, sondern bereits lysiert. Unter dem Mikroskop waren nur noch die einzelnen Zellpartikel zu erkennen (Abb. 3.6).

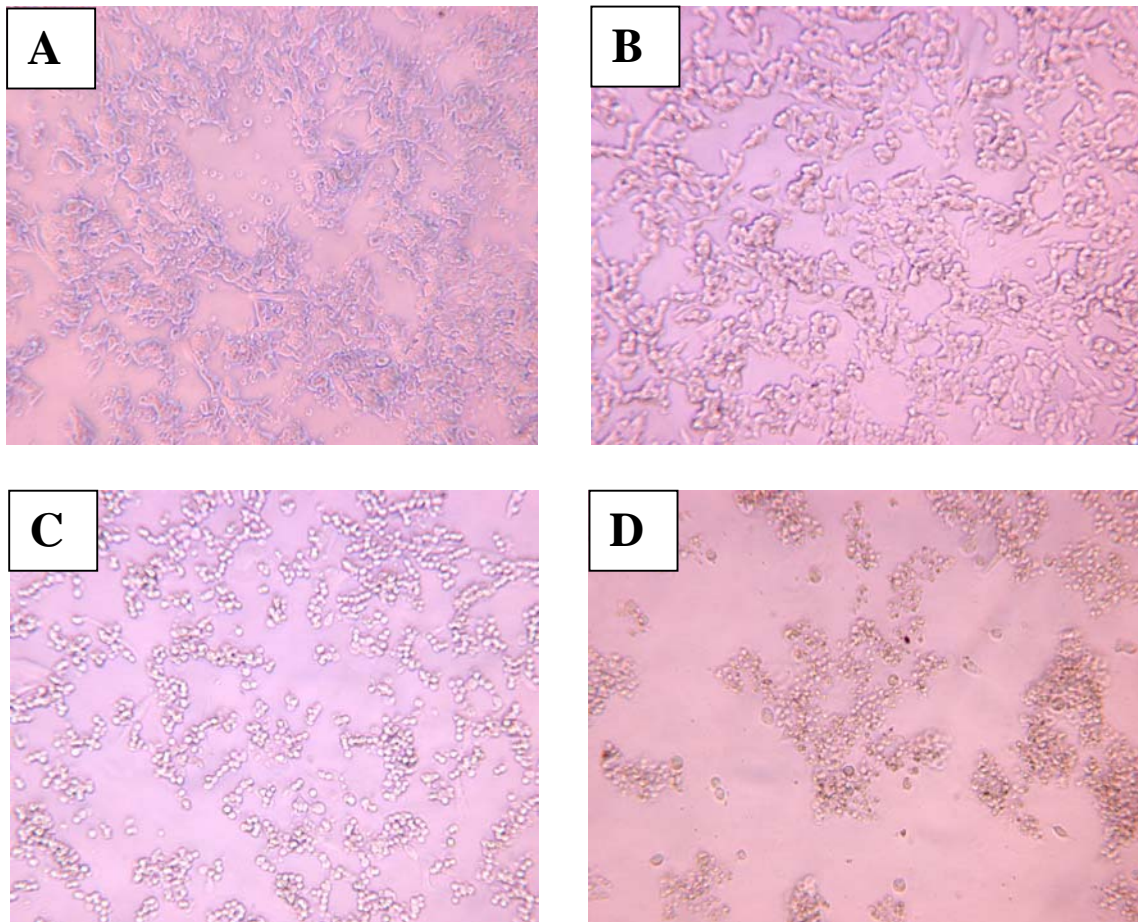


Abb. 3.6: Mikroskopische Aufnahmen der unbehandelten SK-N-SH-Zellen (**A**), sowie von SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (100 μ M) (**B**), bzw. Xanthohumol (50/100 μ M) (**C/D**). Deutlich sind hierbei die, durch cytotoxische Effekte von Quercetin und Xanthohumol im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auftretenden morphologischen Veränderungen, wie das Abrunden der abgelösten Zellen zu erkennen.

3.1.1.4 Durchflusszytometrie (SK-N-SH)

Die Cytotoxizität von Quercetin und Xanthohumol auf SK-N-SH-Zellen wurde nicht nur visuell, sondern auch mittels FACS-Messungen (nach 24-stündiger Inkubation mit den Zellen) bestimmt. Darüber hinaus wurden auch die Substanzen Hispidulin, Scutellarein, Baicalein und Hesperetin untersucht.

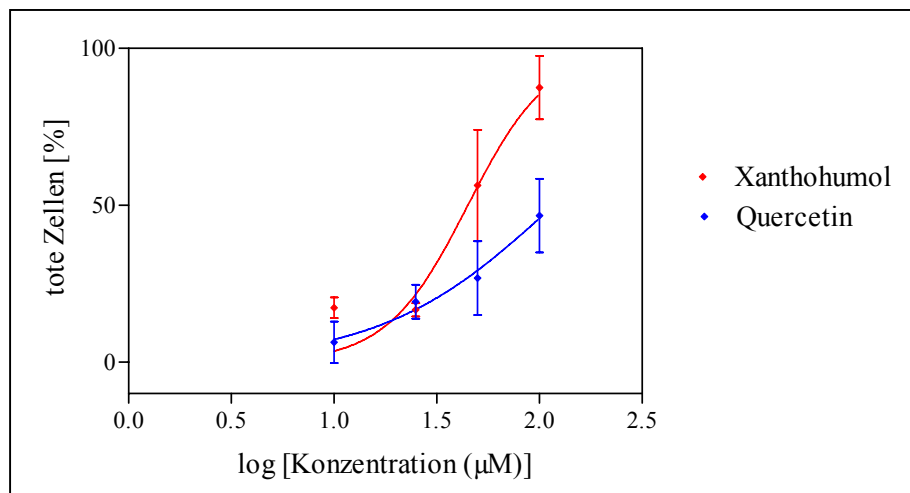


Abb. 3.7: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mit Quercetin und Xanthohumol (in den Konzentrationen 0-100 µM), ausgewertet mittels FACS an SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Aufgetragen sind jeweils die Regressionsanalysen, wobei x der Logarithmus der untersuchten Flavonoidkonzentration und y der Prozentanteil an toten Zellen ist.

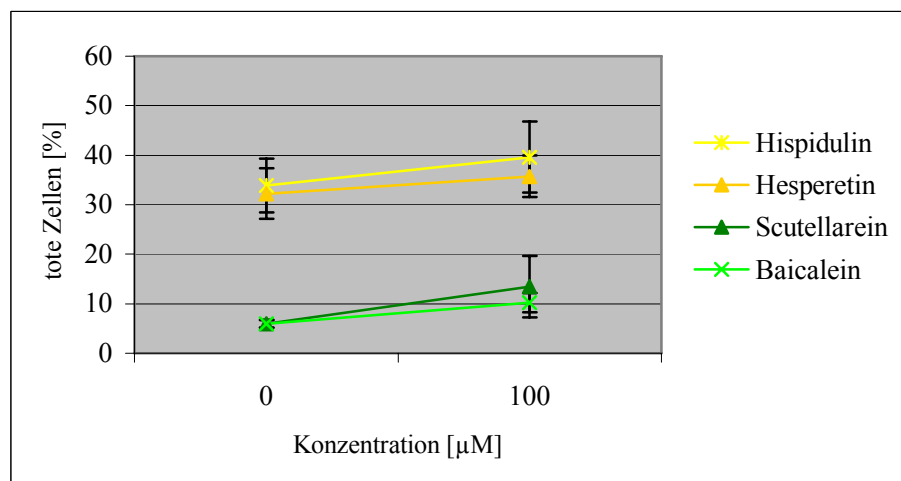


Abb. 3.8: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mit Hispidulin, Hesperetin, Scutellarein und Baicalein (in den Konzentrationen 0 und 100 µM), ausgewertet mittels FACS an SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. Alle untersuchten Flavonoide zeigten keine signifikanten Unterschiede relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) (Mann-Whitney-test; $p < 0,05$; Bonferroni-korrigiert).

SK-N-SH-Zellen sind adhärenente Zellen. Sie müssen für die FACS-Analysen erst durch Trypsinierung vom Plattenboden abgelöst und in die FACS-Röhrchen überführt werden. Hierbei kann es sehr leicht zur Beschädigung der Zellen kommen. Kontrollen (Zellen ohne Flavonoidexposition) wiesen teilweise einen Anteil von bis zu 20-30% toter Zellen auf. Erst nach Optimierung der Trypsinierung (Volumen an ATV, Inkubationszeit) konnte der prozentuale Anteil an toten Zellen auf unter 10% verringert werden (Abb. 3.8).

Für die untersuchten Flavonoidlösungen zeigten sich in SK-N-SH-Zellen folgende Ergebnisse: Für Hispidulin und Hesperetin, aber auch für Scutellarein und Baicalein trat in der Konzentration 100 μM keine signifikante Toxizität auf (Abb.3.8). Quercetin und Xanthohumol zeigten konzentrationsabhängige Cytotoxizität in den Neuroblastomzellen. In Regressionsanalysen wurden EC_{50} -Werte von 118 μM für das Flavonol, bzw. 45 μM für das Chalcon ermittelt. Xanthohumol induzierte in SK-N-SH-Zellen wie bereits zuvor in Jurkat E6-1-Zellen unter allen untersuchten Substanzen die stärkste Cytotoxizität. Nach 24-stündiger Inkubation mit Xanthohumol in der Konzentration 100 μM war für beide Zelllinien eine nahezu 100%-ige Toxizität, gemessen am Anteil toter Zellen, beobachtbar (Abb. 3.7).

3.1.1.5 Laktatdehydrogenase (LDH)-Bestimmungen (Jurkat und SK-N-SH)

Ergänzt wurden die Ergebnisse der Cytotoxizitäts-FACS-Messungen an Jurkat- und SK-N-SH-Zellen mittels eines zweiten Toxizitätstests. Der Laktatdehydrogenase (LDH)-Cytotoxizitätstest gibt auf Basis von Laktatdehydrogenase-Bestimmungen Cytotoxizitätseffekte der untersuchten Substanzen an. Laktatdehydrogenase ist in allen Zellen präsent, wird jedoch nur von geschädigten oder toten Zellen in das Kulturmedium freigesetzt. Durch Messung des LDH-Gehaltes in den Zellüberständen wird ein weiterer Parameter der Cytotoxizität analysiert (Duthie et al., 1997).

Wiederum wurden sowohl Jurkat-, als auch SK-N-SH-Zellen für 24 h mit den Flavonoiden Hispidulin, Scutellarein, Baicalein, Hesperetin, Quercetin und Xanthohumol inkubiert; anschließend wurde mittels LDH-Tests die Cytotoxizität quantifiziert.

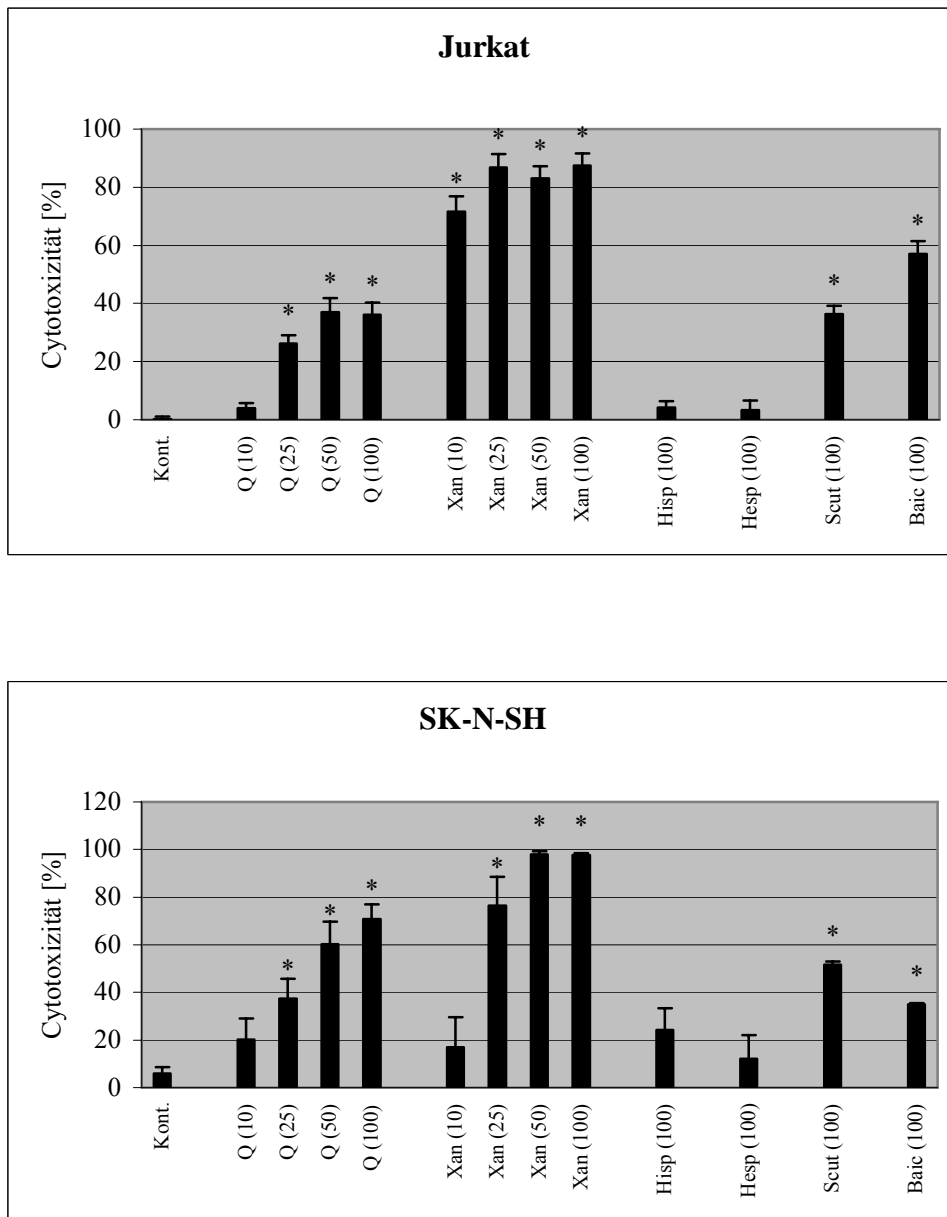


Abb. 3.9: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mittels eines Laktatdehydrogenase-Tests an Jurkat-Zellen (oben) und SK-N-SH-Zellen (unten) nach 24-stündiger Inkubation von Quercetin (Q) und Xanthohumol (Xan) in den Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 μM , sowie nach Exposition mit Hispidulin (Hisp), Hesperetin (Hesp), Scutellarein (Scut) und Baicalein (Baic) in der Konzentration 100 μM . Aufgetragen sind Mittelwert sowie die Standardabweichung an Cytotoxizität in %. * : signifikante Unterschiede relativ zur Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen) (Mann-Whitney-test; $p < 0,05$; Bonferroni-korrigiert).

Obwohl bei diesen auf Laktatdehydrogenase-Messungen beruhenden Tests die Cytotoxizitäten der Substanzen durch andere Parameter definiert werden, ergaben sich auch hier analoge Ergebnisse zu den mittels FACS ermittelten Cytotoxizitätswerten.

Hesperetin zeigte in beiden untersuchten Zelllinien in der Konzentration 100 μM keine Toxizität. Aber auch für Hispidulin (100 μM) war keine signifikante Cytotoxizität zu beobachten. In Übereinstimmung mit den FACS-Analysen ergab sich sowohl für Quercetin, als auch für Xanthohumol eine konzentrationsabhängige, signifikante Zunahme der Cytotoxizität. Dabei erfolgte der Anstieg für Quercetin kontinuierlich im Konzentrationsbereich 10 μM -100 μM , wohingegen für Xanthohumol das Maximum (100%-ige Toxizität) bereits für 25 μM (in Jurkat-Zellen) bzw. 50 μM (in SK-N-SH-Zellen) erreicht wurde (Abb. 3.9).

Lediglich die Ergebnisse für Scutellarein und Baicalein in den LDH-Tests wichen von denen in den FACS-Analysen ab. Für beide Flavone konnten bei Konzentrationen von je 100 μM signifikante Toxizitäten beobachtet werden. Dabei zeigte Scutellarein in Jurkat E6-1-Zellen eine 40%-ige, Baicalein eine 60%-ige Cytotoxizität. In SK-N-SH-Zellen zeigte Baicalein im Vergleich zu Scutellarein die stärkere Toxizität. Mittels der Methode der FACS-Analysen war lediglich für Baicalein signifikante, wenn auch nur sehr geringe Toxizität in Jurkat E6-1-Zellen bestimmt worden. Scutellarein zeigte dort keine, und in SK-N-SH-Zellen zeigte keines der beiden Flavone in der Konzentration 100 μM signifikante toxische Effekte.

Da bei den Laktatdehydrogenase-Analysen die Cytotoxizitäten der Substanzen auf anderen Parameter basierend definiert werden als bei den FACS-Bestimmungen, sind nicht direkt miteinander übereinstimmende Ergebnisse in beiden Testsystemen erklärbar. So ist z.B. denkbar, dass die durchflusszytometrischen Messungen eine höhere Sensitivität als die LDH-Messungen aufweisen, da sie frühere Ereignisse der Zellschädigung (Annexin-Exposition) detektieren als die LDH-Messungen (Membranruptur).

3.1.2 Charakterisierung des Zelltods als Apoptose oder Nekrose

Wie erwähnt, lassen sich zwei Varianten des Zelltuntergangs unterscheiden: Apoptose und Nekrose.

Die Apoptose ist durch Abrundung der Zellen und Chromatinkondensation entlang der nuklearen Membran, begleitet von einer Schrumpfung der Zellen, charakterisiert. Eine spezifische internukleosomale DNA-Fragmentation, ein Auflösen der Zellen in einzelne, membranumhüllte Fragmente, sog. „*apoptotic bodies*“, sowie Phagozytose durch Makrophagen und andere umliegende Zellen kennzeichnen den weiteren Verlauf der Apoptose. Die Zellmembran als auch die Membranen der Organellen bleiben während der ersten Phase dieses Prozesses intakt; eine funktionsfähige Permeabilitätsschranke ist somit gewährleistet. Die Exposition von Phosphatidylserin, welches normalerweise nur auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran vorhanden ist, auf die Zelloberfläche führt zur Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und andere benachbarte Zellen (Savill, 1996).

Im Gegensatz zur Apoptose verläuft die Nekrose passiv. Als typisches Merkmal der Nekrose kommt es gleich zu Beginn zur Zellschwellung, gefolgt vom Verlust der Zellmembranintegrität. Die daraus resultierende Enzymfreisetzung führt zu inflammatorischen Reaktionen und dadurch zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Afanas`ev et al., 1986; Golstein et al., 1991; Kroemer et al, 1998; Weiland, 1999; Hetts, 1998).

Da es in der Zellkultur nicht zur Phagozytose kommen kann, erfolgt dort eine sekundäre Nekrose der apoptotischen Körperchen (Bredesen, 1995). Daher kann es in der Zellkultur zu Problemen beim Differenzieren zwischen nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen kommen. Außerdem sind die beiden Zelltodarten, Apoptose und Nekrose, nicht immer klar von einander zu trennen, da auch zahlreiche Zwischenstufen auftreten können (Leist und Jäättelä, 2001; Martin, 2001). Ein weiteres Phänomen ist das Auftreten atypischer Apoptosen, bei denen ein oder mehrere Charakteristika fehlen können.

Um also *in vitro* die Spezifität des Apoptosenachweises zu erhöhen, müssen mehrere Nachweismethoden kombiniert werden. Die hier verwendeten Methoden weisen die Apoptose alle aufgrund unterschiedlicher Charakteristika nach.

3.1.2.1 Charakterisierung des Zelltods mittels FACS (Jurkat und SK-N-SH)

Durch die Doppelfärbung mittels Annexin-V-FITC und 7-AAD kann in den FACS-Analysen nicht nur zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden, sondern der Zelltod näher als Apoptose oder Nekrose charakterisiert werden.

In vitalen Zellen findet sich unter physiologischen Bedingungen eine asymmetrische Verteilung verschiedener Phospholipide zwischen intra- und extrazellulär. Es zeigen sich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich extrazellulär, wohingegen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin nach intrazellulär gerichtet sind (Op de Kamp, 1979; Zachowski, 1993). Die Zellen können Phosphatidylserin (PS) auf bestimmte Stimuli hin nach extrazellulär translozieren (Martin et al., 1995). Dieser „PS-flip“ erfolgt bereits in den frühen Stadien der Apoptose (Adayev et al., 1998). Die veränderte Phospholipidanordnung scheint bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen (Bennett et al., 1995). Mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiertes Annexin bindet an dieses Phospholipid (van Engeland et al., 1998) und kann so z.B. mittels Durchflusszytometrie (Vermees et al., 1995) nachgewiesen werden. Die Unterscheidung zur Nekrose erfolgt über Gegenfärbung mit 7-AAD. 7-AAD ist ein Farbstoff, der in DNA-Stränge interkaliert (Philpott et al., 1996). Eine fehlende Färbung zeigt somit eine intakte Membranintegrität an und schließt die Nekrose aus.

Ein Problem kann die Beurteilung spät-apoptotischer Zellzustände darstellen, bei denen die Zellmembran aufgrund erschöpfter ATP-Speicher ihre Integrität verliert und somit die Gegenfärbung mit 7-AAD positiv werden lässt (Koopmann et al., 1994).

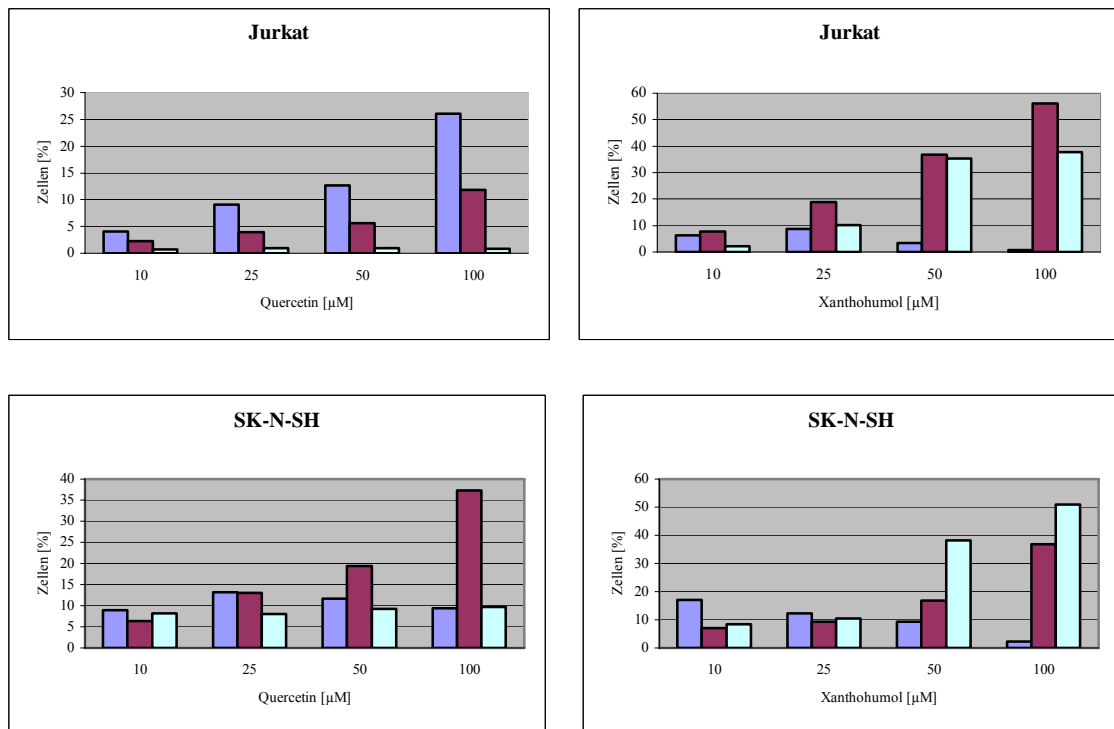


Abb. 3.10: Ergebnisse der FACS-Analysen der Jurkat-Zellen (oben) bzw. der SK-N-SH-Zellen (unten) nach 24-stündiger Exposition mit Quercetin (10/25/50/100 µM) (links) bzw. mit Xanthohumol (10/25/50/100µM) (rechts). Aufgetragen ist jeweils die Relation an früh-apoptotischen (blau), spät-apoptotischen (violett) und nekrotischen (grün) Zellen in %.

Der von Quercetin in Jurkat E6-1- und SK-N-SH-Zellen induzierte Zelluntergang konnte hierbei als Apoptose identifiziert werden. Es traten sowohl früh-apoptotische (Annexin-V-positive, 7-AAD-negative), als auch spät-apoptotische (Annexin-V-positive, 7-AAD-positive) Zellen auf (Abb. 3.10). Besonders gut ist diese Einteilung in Jurkat E6-1-Zellen zu beobachten, da in SK-N-SH-Zellen wiederum Probleme beim Trypsinieren der Zellen mit eine Rolle spielen, und sich dadurch die Population der apoptotischen Zellen mehr in den spät-apoptotischen Bereich verschiebt.

Der von Xanthohumol induzierte Zelluntergang wurde stattdessen vorrangig als Nekrose charakterisiert. Nur in den beiden niedrigsten untersuchten Konzentrationen 10 µM und 25 µM tritt auch ein geringer Anteil an früh-apoptotischen Zellen auf. Mit steigender Konzentration nimmt dann der Anteil an spät-apoptotischen (Annexin-V-positive, 7-AAD-positive) und vor allem an nekrotischen (Annexin-V-negative,

7-AAD-positive) Zellen stark zu. Dies konnte sowohl in Jurkat E6-1-, als auch in SK-N-SH-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.10).

3.1.2.2 Charakterisierung des Zelltods mittels des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD (Jurkat- und SK-N-SH)

Wie bereits beschrieben, konnten in den Cytotoxizitätsexperimenten mittels Durchflusszytometrie für Quercetin apoptotische Eigenschaften und für Xanthohumol vorwiegend nekrotische Effekte sowohl in Jurkat E6-1-, als auch in SK-N-SH-Zellen beobachtet werden.

Um diese Ergebnisse weiter zu überprüfen, wurden Versuche mittels zVAD (zVAD-fmk; N-benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketon) durchgeführt. zVAD ist ein Breitspektrum-Caspase-Inhibitor, welcher die von Apoptose induzierte Caspaseaktivierung hemmen kann (Wang et al., 1999; Ueda et al., 2001; Kim und Han, 2001).

Nach Co-Inkubation von Quercetin bzw. Xanthohumol mit zVAD (100 μM) in Jurkat- bzw. SK-N-SH-Zellen (für 24 h) wurden erneut Toxizitätsstudien mittels Annexin-V-FITC- und 7-AAD-Doppelfärbungen in der FACS durchgeführt.

Wie zu erwarten war, konnte zVAD (100 μM) die von Quercetin (100 μM) ausgelöste Cytotoxizität sowohl in Jurkat E6-1-, als auch in SK-N-SH-Zellen (signifikant) inhibieren (Abb. 3.11). Dies stellt einen weiteren Nachweis dar, dass es sich bei dem in beiden Zelllinien von Quercetin induzierten Zelluntergang um Apoptose handelt.

Die nekrotischen Effekte nach Xanthohumol-Exposition ließen sich mittels zVAD nicht signifikant inhibieren. In Übereinstimmung mit den unter Punkt 3.1.2.1 beschriebenen geringen Anteilen an früh-apoptotischen Jurkat-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Xanthohumol in den Konzentrationen 10 μM und 25 μM , war auch hier eine Reduzierung der induzierten Toxizität mittels zVAD zu beobachten (Abb. 3.11).

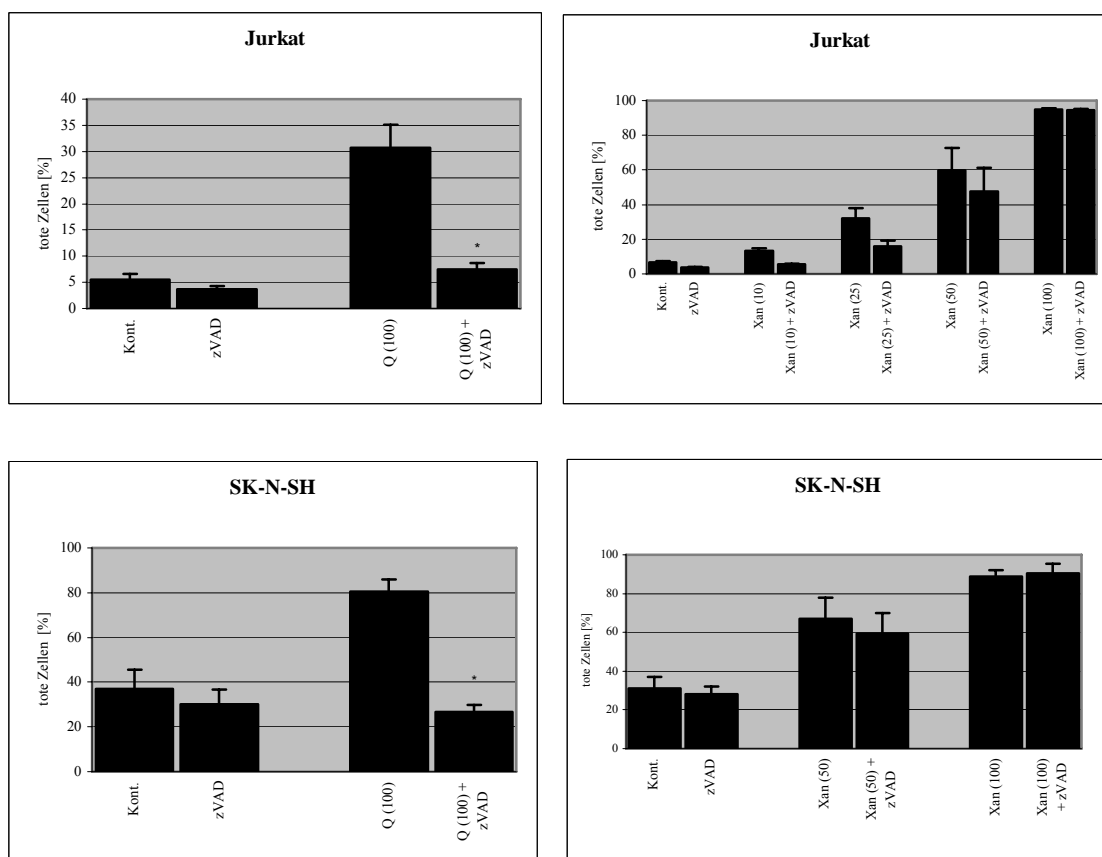


Abb. 3.11: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien einer 24-stündigen Co-Inkubation von Quercetin (Q) (100 μ M) (links) bzw. Xanthohumol (Xan) (10/25/50/100 μ M bzw. 50/100 μ M) (rechts) und zVAD (100 μ M), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen (oben) bzw. SK-N-SH-Zellen (unten). Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen), sowie Zellen nach zVAD-Exposition mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert so wie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. * : signifikante Unterschiede der Co-Inkubation relativ zur Flavonoid-Exposition alleine (SPSS-Statistik; MANOVA; $p < 0,05$).

3.1.2.3 DNA-Fragmentierung (Jurkat)

Die Apoptose-induzierenden Eigenschaften von Quercetin bzw. die nekrotischen Effekte von Xanthohumol in beiden untersuchten Zelllinien ließen sich auch auf DNA-Ebene in Jurkat E6-1-Zellen bestätigen.

Das Verfahren des „DNA-Laddering“ beruht auf der Darstellung der für die Apoptose typisch fragmentierten DNA. Der Nachweis erfolgt durch eine Auftrennung der durch Endonukleasen in etwa 180 Basenpaare oder ein Vielfaches davon geschnittener DNA auf einem Agarosegel. Die spezifisch nur bei Apoptose induzierten DNAs schneiden

nur zwischen den Histonkomplexen, also im sog. „Linker-Bereich“ (Arends et al., 1990; Cohen und Duke, 1984; Mc Conkey et al., 1989). Wurde in den Zellen Apoptose induziert, so kann man auf dem angefärbten Gel leiterförmig angeordnete Banden erkennen. Liegt hingegen Nekrose vor, dann ist auf dem Gel ein sog. „Schmier“ (*DNA-smear*) zu sehen, d.h. die Größe der DNA-Stücke ist zufällig, weil die bei Nekrose aktivierten DNAsen an jeder Stelle der DNA schneiden können.

Der große Vorteil der DNA-Fragmentierung gegenüber anderen Nachweismethoden liegt in der eindeutigen Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose, die auch in der Spätphase der Apoptose noch möglich ist. Da der Nachweis über die gelelektrophoretische Trennung der DNA geschieht, ist eine Grundvoraussetzung jedoch eine Mindestanzahl an apoptotischen Zellen bzw. deren DNA (Gong et al., 1994). Nachteil dieser Methode ist, dass hiermit keine exakte Quantifizierung der Apoptose möglich ist.

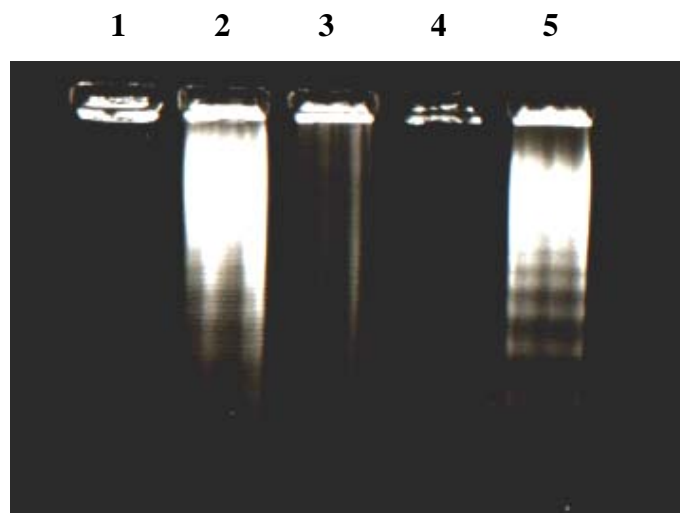


Abb. 3.12: Gelelektrophorese der fragmentierten DNA aus Jurkat-Zellen. Von links nach rechts ist aufgetragen: DNA un behandelter Zellen (1), Quercetin-behandelter Zellen (100 µM) (2), Xanthohumol-behandelter Zellen (50 µM) (3) und (100 µM) (4) (jeweils 24 h), sowie als Positivkontrolle DNA aus Zellen nach 7-stündiger mAb7C11-Exposition (0,2 µg/ml) (5).

Auf dem Agarosegel ist für Quercetin das für die Apoptose typische „DNA-Laddering“ (leiterähnliches Muster der fragmentierten DNA), wie in den mit der Positivkontrolle (mAb7C11) behandelten Zellen, deutlich zu erkennen. Für Xanthohumol zeigte sich, wie zu erwarten, dieses Muster nicht. Der bei einer Konzentration von 50 μM auftretende „DNA-smear“ lässt auf nekrotische Effekte von Xanthohumol schließen (Abb. 3.12).

In SK-N-SH-Zellen konnte aufgrund der Adhärenz der Zellen eine Fragmentierung der DNA nicht nachgewiesen werden.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass Hesperetin, Hispidulin und Scutellarein keine oder nur geringe toxische Effekte im untersuchten Konzentrationsbereich in Jurkat E6-1- und SK-N-SH-Zellen aufwiesen. Quercetin und Xanthohumol zeigten mittlere bzw. starke Cytotoxizität in beiden Zelllinien. Dabei konnten für Quercetin ein apoptotischer Mechanismus und für Xanthohumol nekrotische Eigenschaften sowohl in Jurkat E6-1, als auch in SK-N-SH identifiziert und dieser Befund mittels mehrerer Experimente (zVAD, DNA-Laddering) bestätigt werden.

- Jurkat E6-1-Zellen:

Quercetin verursachte Cytotoxizität in humanen Jurkat T Lymphozyten. Gezeigt wurde dies anhand eines signifikanten Anstiegs an Laktatdehydrogenaseaktivität im Zellkulturüberstand und mittels Annexin-V- und 7-AAD-FACS-Färbungen. Die von Quercetin verursachte Toxizität war sowohl konzentrations-, als auch zeitabhängig. Nach 24-stündiger Inkubation wurde ein EC_{50} -Wert von 208 μM ermittelt. Dabei zeigten sich typische Anzeichen eines apoptotischen Zelltodmechanismus. So beobachtete man die mittels Phosphatidylserin definierte Zellmembran-Asymmetrie, aber auch die Fragmentierung der nuklearen DNA in 180 bp Fragmente. Mit dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD ließ sich die von Quercetin in Jurkat E6-1-

Zellen induzierte Toxizität signifikant inhibieren, ein Indiz dafür, dass Caspasen-Aktivierung beim Quercetin-vermittelten Zelltod von Bedeutung sein sollte.

Xanthohumol zeigte von allen untersuchten Substanzen den höchsten Anteil an toten Zellen (EC_{50} -Wert: 33 μ M). Auch hier war die Cytotoxizität sowohl konzentrations-, als auch zeitabhängig. Im Gegensatz zu Quercetin ergaben sich beim Xanthohumol-induzierten Zelltod Hinweise auf einen vorwiegend nekrotischen Mechanismus, wohingegen Apoptose lediglich eine untergeordnete Rolle spielte. Typische Anzeichen für Nekrose zeigten sich durch vorwiegend Annexin-V- und 7-AAD-doppelt-positive, sowie Annexin-V-negative und 7-AAD-positive Populationen an humanen T-Zellen. Dies lässt auf eine Veränderung der Zellmembranen durch Xanthohumol schließen. Ebenso war die für Quercetin zu beobachtende, typisch apoptotische DNA-Fragmentierung für Xanthohumol nicht zu sehen. Der Pancaspase-Inhibitor zVAD konnte die von Xanthohumol induzierte Toxizität lediglich in den beiden geringsten Konzentrationen (10 μ M und 25 μ M) reduzieren, eine weitere Bestätigung dafür, dass eine Apoptose-typische Caspasen-Aktivierung bei Xanthohumol nur eine untergeordnete Rolle spielt und eher bei niedrigen als bei höheren Konzentrationen auftritt.

Die hier beobachteten apoptotischen Effekte von Quercetin sowie die vorwiegend nekrotischen Mechanismen von Xanthohumol in Jurkat-Zellen sind in der Literatur bereits für andere Zelllinien beschrieben worden (Nguyen et al., 2004; Miranda et al., 1999; Wang et al., 1999; Shen et al., 2003; Xiao et al., 1997; Spencer et al., 2003).

Wenn Pan et al. in einer Veröffentlichung im Jahre 2005 über apoptotische Effekte von Xanthohumol berichten, so steht dies nicht im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Nekrose-Befunden. Die für den programmierten Zelltod typischen Caspasen-Aktivierungen durch Xanthohumol wurden bei niedrigen Konzentrationen des prenylierten Chalconen gefunden (Pan et al., 2005). In diesem Bereich traten auch in der vorliegenden Arbeit geringe apoptotische Effekte durch Xanthohumol in Jurkat E6-1-Zellen auf.

Hesperetin erhöhte im untersuchten Konzentrationsbereich die LDH-Aktivität nicht. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den FACS-Analysen. Eine Inkubation mit bis zu

100 μM Hesperetin verursachte dort keine Cytotoxizität. Auch in der Literatur wird Übereinstimmendes über Hesperetin berichtet (Cos et al., 2001).

Hispidulin verursachte keine signifikanten LDH-Aktivitätsveränderungen und zeigte auch in den FACS-Analysen nur geringe Toxizität (unter 20%, gemessen am Anteil toter Zellen), bei einer Konzentration von 100 μM in Jurkat E6-1-Zellen. Cui et al. untersuchten 1999 die Cytotoxizität des aus Pflanzen isolierten Hispidulins in 12 verschiedenen anderen humanen Tumorzellen. Hierbei ergaben sich EC_{50} -Werte von 1,3 $\mu\text{g/ml}$ bis $> 20 \mu\text{g/ml}$ je nach Zelllinie (Cui et al., 1999). Es ist jedoch bekannt, dass die Cytotoxizität eines Flavonoids in Abhängigkeit von den zur Messung verwendeten Zellen Schwankungen unterliegt (Nagao et al., 2002). Im Ames-Test wurde weder Mutagenität noch Zytotoxizität des Flavons nachgewiesen (Chulasiri et al., 1992). Vielmehr hat man Hispidulin in einigen Untersuchungen als antimutagenes Agens identifiziert (Chulasiri et al., 1992).

Größere Abweichungen zwischen den Ergebnissen im LDH-Test und den FACS-Analysen ergaben sich lediglich für Scutellarein und Baicalein. Beide Flavone erhöhten die Laktatdehydrogenase-Aktivität, aber nur Baicalein zeigte nach 24-stündiger Inkubation signifikante Cytotoxizität in der Durchflusszytometrie. Die unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Toxizitätsanalysen sind dadurch erklärbar, dass in den Tests die Cytotoxizität der Substanzen auf anderen Parametern basierend definiert werden. Cytotoxizität für Baicalein wird ebenfalls für einige andere Zelllinien beschrieben (Li et al., 2004; Dong et al., 2003; Chang et al., 2002a; Chang et al., 2002b).

Ganz allgemein konnte folgende Struktur-Wirkungs-Beziehung (bezogen auf den Anteil toter Zellen bei einer Konzentration von 100 μM nach 24-stündiger Inkubation) beobachtet werden: Die größte Cytotoxizität in den humanen T-Zellen zeigte das Chalcon (Xanthohumol), gefolgt vom Flavonol (Quercetin), den Flavonen (Chrysin, Apigenin, Hispidulin, Baicalein, Scutellarein), Flavanonen (Naringenin, Hesperetin), dem Anthocyanidin (Pelargonidinchlorid) und schließlich dem Catechin (Catechin).

Verschiedene Strukturmerkmale, wie z.B. die Anwesenheit einer 4-Carbonylgruppe oder der C2-C3-Doppelbindung wurden als von Bedeutung für die Cytotoxizität in Betracht gezogen.

Ein Vorhandensein der 4-Carbonylgruppe wird mit einer Inhibierung der Fettsäurensynthese in Verbindung gebracht, ein Vorgang, welcher als ursächlicher Faktor in der Flavonoid-induzierten Cytotoxizität diskutiert wird (Brusselmans et al., 2005).

Die C2-C3-Doppelbindung führt zu einer planaren Struktur des A- und C-Rings des Flavonoid-Gerüsts. Das Vorhandensein dieser Doppelbindung steht in Beziehung mit effizienter Bindung und Inhibierung des P-Glykoproteins (P-gp), einem Plasmamembran-Protein, welches für den Export chemotherapeutischer Reagenzien verantwortlich ist (Kitagawa et al., 2005). Eine Hemmung dieses wichtigen zellulären Systems könnte an einer Flavonoid-induzierten Cytotoxizität beteiligt sein. In Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen wurde das Auftreten der C2-C3-Doppelbindung mit mitochondrialer Schädigung und Zelltod in Verbindung gebracht (Dorta et al., 2005).

Eine ortho-Hydroxylierung des B-Rings steht im Einklang mit einer erhöhten antioxidativen Aktivität (Rice-Evans et al., 1996), und ein Zusammenspiel zwischen pro- und antioxidativen Aktivitäten von Flavonoiden könnte bei Cytotoxizitätseffekten von Bedeutung sein (Fujisawa und Kadoma, 2006).

In Betracht kommt auch eine erleichterte Membranpermeabilität für Flavonoide mit geringer Anzahl an Hydroxygruppen und hieraus resultierender höherer intrazellulärer Wirkstoffkonzentration. So besitzt Xanthohumol, das unter allen untersuchten Flavonoiden die höchste Cytotoxizität zeigte, eine Prenylgruppe am C6-Atom. Dieser Substituent ist für seine Wechselwirkung mit Zellmembranen bekannt (Gomes et al., 2003).

- SK-N-SH-Zellen:

Für die Substanzen Quercetin und Xanthohumol waren typische Zelltodcharakteristika an dieser adhärennten Zelllinie mikroskopisch gut zu erkennen. Nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (100 μM) lösten sich bereits die ersten Zellen aus dem Monolayer ab. Bei einer Inkubation mit Xanthohumol konnte man die weiteren Stadien des Zelluntergangs, zunächst die vom Plattenboden abgelösten, abgerundeten und frei umherschwimmenden Zellen (Xanthohumol 50 μM), bei höherer Konzentration von Xanthohumol (100 μM) schließlich die bereits lysierten SK-N-SH-Zellen, beobachten.

Die von Quercetin verursachte (signifikante) konzentrationsabhängige Cytotoxizität war sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in Laktatdehydrogenase-Messungen zu beobachten. In Regressionsanalysen wurde ein EC_{50} -Wert von 118 μM bestimmt. Eine Charakterisierung dieses Effekts erwies sich als schwierig aufgrund der Adhärenz der Zellen.

So konnte die für Apoptose typische Fragmentierung der nuklearen DNA in 180 bp Fragmente in SK-N-SH-Zellen nicht nachgewiesen werden. Jedoch lassen die mittels Annexin-V- und 7-AAD-FACS-Färbungen beobachtete Phosphatidylserin definierte Zellmembran-Asymmetrie und eine Inhibierung der Cytotoxizität (gemessen am Anteil toter Zellen) mittels des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD auf einen apoptotischen Zelltodmechanismus für Quercetin schließen.

Xanthohumol induzierte auch in SK-N-SH-Zellen von allen untersuchten Substanzen die stärkste Cytotoxizität. Das Chalcon zeigte eine signifikante konzentrationsabhängige Toxizität in FACS-Analysen. Dabei wurde mittels Regressionsanalysen ein EC_{50} -Wert von 45 μM ermittelt. In Laktatdehydrogenase-Messungen erreichte Xanthohumol bereits in der Konzentration 50 μM das Maximum einer 100%-igen Toxizität (gemessen am Anteil toter Zellen). Im Gegensatz zu Quercetin ergaben sich für Xanthohumol Hinweise für einen primär nekrotischen Mechanismus. In den FACS-Analysen waren vorwiegend Annexin-V-negativ/7-AAD-positiv (sowie Annexin-V-/7-AAD-doppelt positiv) gefärbte SK-N-SH-Zellen zu beobachten. Außerdem konnte die von Xanthohumol induzierte Cytotoxizität nicht mittels des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD signifikant inhibiert werden.

Hesperetin, Hispidulin, Scutellarein und Baicalein zeigten in SK-N-SH-Zellen keine signifikante Cytotoxizität.

3.1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress stellt die Folge von übermäßig auftretenden Oxidantien in der Zelle dar (Sies, 1991). Zu den Auslösern von Oxidativem Stress zählen die sog. „reaktiven Sauerstoffspezies“ („*reactive oxygen species*“, ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen-Radikale ($\text{O}_2^{\cdot -}$) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) (Schwarzer, 2004).

Ein Übermaß an Oxidantien wird als ein gemeinsames Element in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson und M. Alzheimer angesehen (Simonian und Coyle, 1996).

Bei unzureichender antioxidativer Abwehr können die ROS Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten, z.B. Lipidperoxidation (LPO) in den Zellmembranen verursachen. Daher kommt der Quantifizierung von Parametern des Oxidativen Stress zentrale Bedeutung zu.

3.1.3.1 Glutathion-Bestimmungen (Jurkat und SK-N-SH)

Glutathion ist seit langem als Antioxidans bekannt (Yu, 1994; Halliwell und Gutteridge, 1999). Es kann in den Zellen in reduzierter (GSH) oder in oxidiertem (GSSG) Form vorliegen (Abb. 3.13).

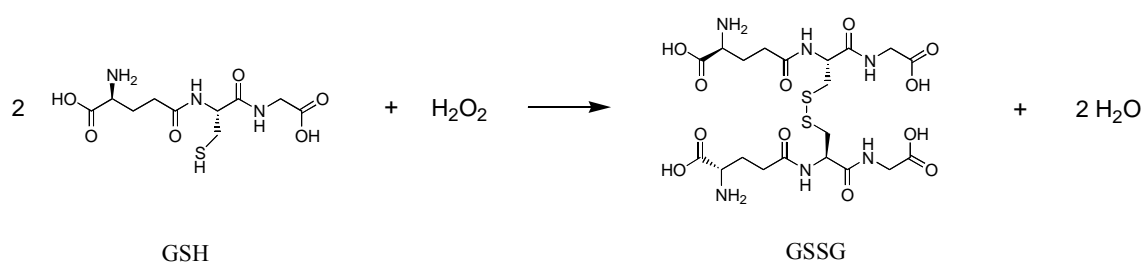


Abb. 3.13: Oxidation von GSH zu GSSG (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Das intrazelluläre Verhältnis von reduziertem (GSH) zu oxidiertem (GSSG) Glutathion beeinflusst den Redoxzustand der Zelle. Die Oxidation von GSH zu GSSG ist reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Dieser wird mit einer Reihe von Zellaktivitäten, wie der Stimulierung der Zellproliferation, einem Einfluß auf die Aktivität des Ubiquitin-Proteosomen-Stoffwechselweges, einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Nuclear Factor kappa B), oder einer Veränderung des Apoptoseverhaltens der Zellen in Verbindung gebracht (Kalder, 1999; Weisel, 2006).

Um zu überprüfen, inwieweit die Toxizitätsmechanismen von Quercetin und Xanthohumol Oxidativen Stress in der Zelle mit beeinflussen, wurde der Glutathiongehalt von Jurkat- und SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (100 μ M) bzw. Xanthohumol (50/100 μ M) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (mittels HPLC) bestimmt und auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen.

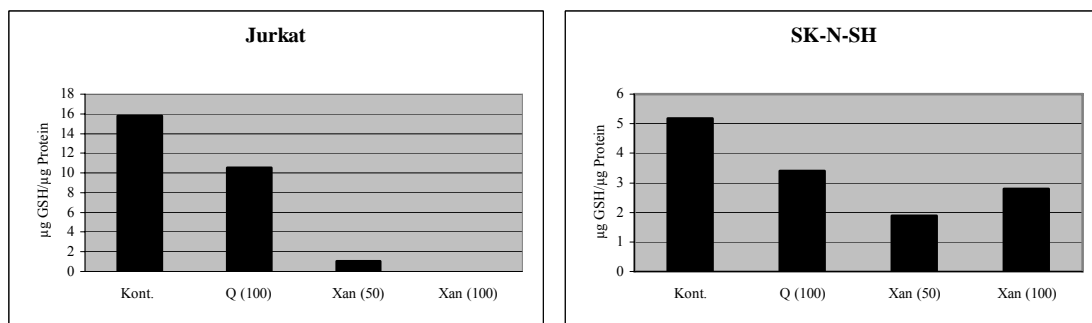


Abb. 3.14: Ergebnisse von Glutathionmessungen mittels HPLC in Jurkat-Zellen (links) bzw. SK-N-SH-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (Q) (100 μ M) bzw. Xanthohumol (Xan) (50/100 μ M). Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen) mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Gehalt an GSH in μ g je μ g Protein.

Allgemein war der GSH-Gehalt der Jurkat E6-1-Zellen etwa um den Faktor drei höher, als der der SK-N-SH-Zellen (Abb. 3.14).

Die mit Quercetin (100 μ M) behandelten Zellen zeigten einen deutlich geringeren GSH-Gehalt als die unbehandelten Zellen. Für mit Xanthohumol inkubierte Zellen sank der

GSH-Gehalt sogar noch stärker ab. In Jurkat E6-1-Zellen ergab sich dabei eine konzentrationsabhängige Abnahme des GSH-Spiegels bis unter die Nachweisgrenze (500 ng GSH/ml).

Die Verringerung des GSH-Spiegels durch Xanthohumol und Quercetin im Vergleich zur Kontrolle in den Zellen spricht für Toxizitätsmechanismen der beiden Substanzen, welche den Redoxstatus der Zellen mit beeinflussen. Allerdings wurden die GSH-Bestimmungen nur jeweils einmal durchgeführt, so dass diese Werte nur als Ansatzpunkte genommen werden können und noch durch weitere Experimente bestätigt werden müssen.

3.1.3.2 Inhibierung der Cytotoxizität mittels der Antioxidantien Glutathion und NAC (Jurkat und SK-N-SH)

Bei der Inhibierung der Toxizität mittels zVAD handelt es sich um eine spezifische Inhibierung der Caspasen-Aktivierung und somit indirekt der Apoptose. Da gezeigt werden konnte, dass die von Quercetin- und Xanthohumol-induzierte Toxizität den Redoxstatus einer Zelle mit beeinflusst (vgl. 3.1.3.1), sollten die cytotoxischen Effekte dieser beiden Substanzen auch mittels Antioxidantien wie Glutathion oder dessen Vorstufe NAC (N-Acetyl-Cystein) inhibiert werden können.

Um die von Quercetin und Xanthohumol induzierten Cytotoxizitätsmechanismen näher zu charakterisieren, wurde untersucht, inwieweit eine Co-Inkubation mit Antioxidantien deren Toxizität inhibieren kann.

Dazu wurden Experimente mittels Co-Inkubationen von NAC (10/20 mM) bzw. Glutathion (10/20 mM) und jeweiliger Flavonoidlösung (Quercetin oder Xanthohumol) in Jurkat E6-1- und SK-N-SH-Zellen durchgeführt (Abb. 3.15 und 3.16).

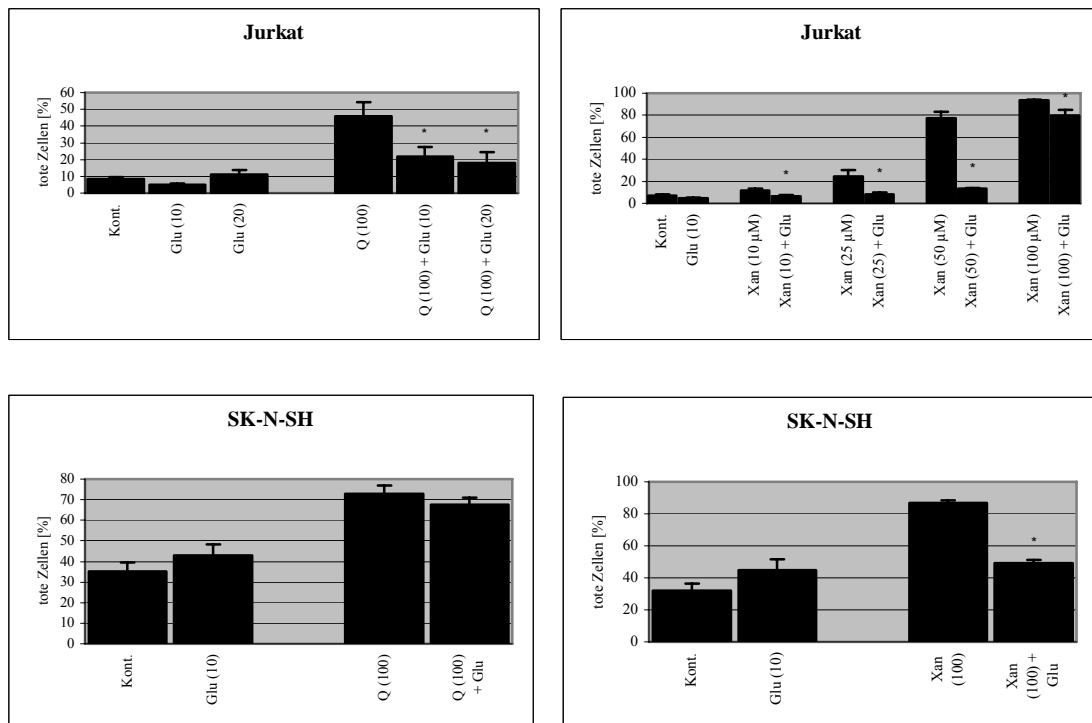


Abb. 3.15: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien einer 24-stündigen Co-Inkubation von Quercetin (Q) (100 µM) (links) bzw. Xanthohumol (Xan) (10/25/50/100 µM bzw. 100 µM) (rechts) und Glutathion (Glu) (10/20 mM bzw. 10 mM), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen (oben) bzw. SK-N-SH-Zellen (unten). Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen), sowie Zellen nach Glutathion-Exposition mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. * : signifikante Unterschiede der Co-Inkubation relativ zur Flavonoid-Exposition alleine (SPSS-Statistik; MANOVA; $p < 0,05$).

Sowohl Glutathion, als auch dessen Vorstufe NAC konnten die von Quercetin induzierte Toxizität in Jurkat E6-1-Zellen verringern. Ein signifikanter Unterschied ergab sich bei Verwendung von Glutathion (10/20 mM) sowie NAC (10/20 mM).

In SK-N-SH-Zellen traten nur sehr viel geringere Reduzierungen der Toxizitätseffekte von Quercetin durch Glutathion und NAC auf. Signifikante Unterschiede ergaben sich lediglich bei Verwendung von NAC (10/20 mM).

In Jurkat E6-1-Zellen trat in allen untersuchten Konzentrationen von Xanthohumol (10/25/50/100 µM) eine signifikante Verringerung der Toxizität durch Glutathion (10 mM) und NAC (10 mM) auf.

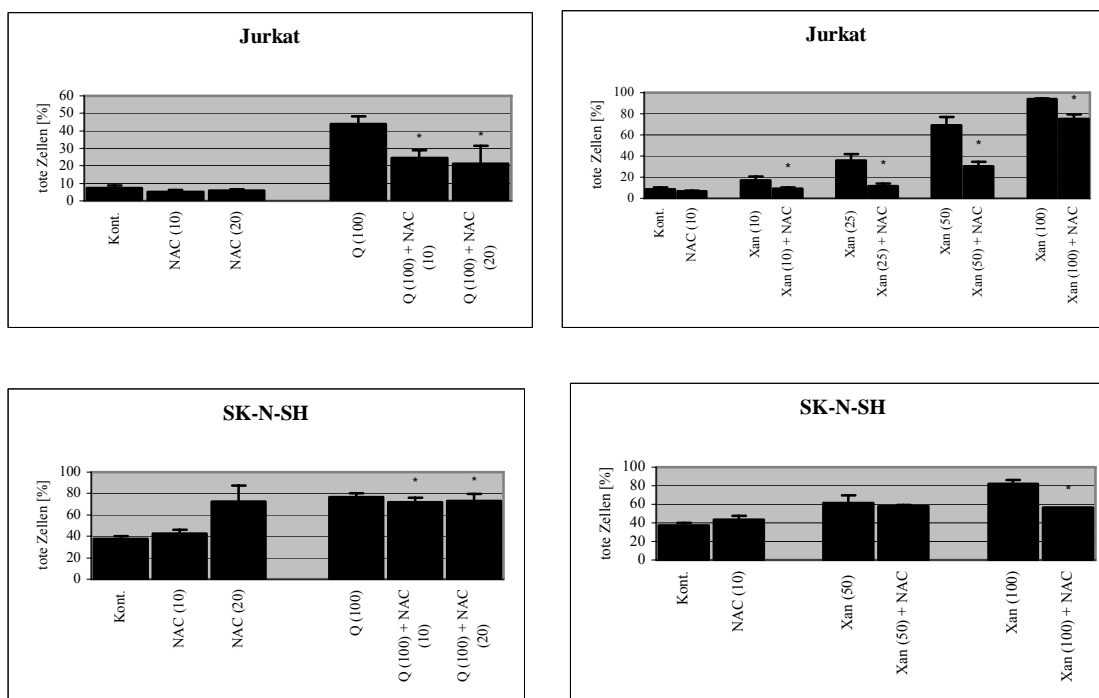


Abb. 3.16: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien einer 24-stündigen Co-Inkubation von Quercetin (Q) (100 μM) (links) bzw. Xanthohumol (Xan) (10/25/50/100 μM bzw. 50/100 μM) (rechts) und NAC (10/20 mM bzw. 10 mM), ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen (oben) bzw. SK-N-SH-Zellen (unten). Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen), sowie Zellen nach NAC-Exposition mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. * : signifikante Unterschiede der Co-Inkubation relativ zur Flavonoid-Exposition alleine (SPSS-Statistik; MANOVA; $p < 0,05$).

In SK-N-SH-Zellen wurde Xanthohumol in der Konzentration 100 μM (Glutathion) bzw. 50 und 100 μM (NAC) untersucht. Hier war sowohl für Glutathion (10 mM), als auch für NAC (10 mM) eine signifikante Inhibierung für Xanthohumol in der Konzentration 100 μM zu beobachten.

Eine Inhibierung der Toxizität durch Glutathion oder NAC trat somit für beide Substanzen in beiden Zelllinien auf. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung oxidativer Prozesse an den Toxizitätsmechanismen von Quercetin und Xanthohumol dar.

3.1.4 Lipidperoxidation (LPO) (Jurkat und SK-N-SH)

Bei unzureichender antioxidativer Abwehr können Radikale Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten anrichten. Lipidperoxidation (LPO) ist z.B. ein bekannter Mechanismus der Zellschädigung. Dieser Prozess führt unter anderem zur Bildung von Lipidperoxiden und schließlich zum Verlust von Zellmembranfunktionen und -integrität. Bei der Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren und deren Estern kommt es durch radikalische Kettenreaktionen u.a. zur Bildung von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenale (HAE).

Inwieweit die Flavonoide Quercetin und Xanthohumol durch ihre toxischen Effekte auf Jurkat E6-1- und SK-N-SH-Zellen selber LPO in den Zellen auslösen, wurde mittels eines Lipidperoxidations-Tests untersucht. Hierzu wurden Jurkat- und SK-N-SH-Zellen mit den Substanzen Quercetin (100 μM) und Xanthohumol (50/100 μM), aber auch mit Hispidulin (100 μM) bzw. Hesperetin (100 μM) für 24 h inkubiert und anschließend geerntet. Dann wurde jeweils der Gehalt an MDA und HAE bestimmt, auf den Proteingehalt der Zellen normalisiert, und mit dem jeweiligen Anteil der unbehandelten Kontrollzellen verglichen.

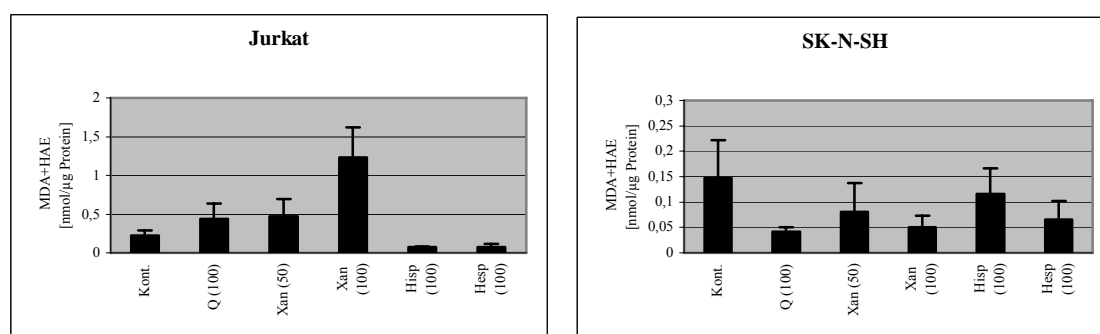


Abb. 3.17: Ergebnisse von Lipidperoxidationsanalysen in Jurkat-Zellen (links) bzw. SK-N-SH-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (Q) (100 μM), Xanthohumol (Xan) (50/100 μM), Hispidulin (Hisp) (100 μM) bzw. Hesperetin (Hesp) (100 μM). Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen) mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung des Gehalts an MDA + HAE in nmol pro μg Protein. * : signifikante Unterschiede relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) (Mann-Whitney-test; $p < 0,05$).

Trotz sehr hoher Zellkonzentrationen ergaben sich nur geringe Anteile an MDA und HAE. Dies führte zu großen Standardabweichungen, wodurch keine Signifikanz zwischen den Ergebnissen der behandelten und der unbehandelten Zellen auftrat.

Der sehr geringe Gehalt an MDA und HAE in SK-N-SH-Zellen lässt keine Aussage über einen möglichen Lipidperoxidation-auslösenden Effekt der untersuchten Substanzen in diesen Zellen zu (Abb. 3.17).

In Jurkat E6-1-Zellen traten MDA und HAE-Werte in Bereichen um ca. eine Zehnerpotenz höher auf. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen durch die untersuchten Substanzen erzielt werden. Allerdings ist der Trend einer Zunahme des MDA und HAE-Spiegels durch Quercetin und Xanthohumol deutlich zu erkennen. Für Xanthohumol, verwendet in den Konzentrationen 50 μM und 100 μM , trat ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Lipidperoxidationsendprodukte auf (Abb. 3.17).

Hispidulin (100 μM) und Hesperetin (100 μM) zeigten keine Zunahme der Lipidperoxidationsendprodukte im Vergleich zur Kontrolle.

Über Lipidperoxidationseffekte von Flavonoiden liegen widersprüchliche Befunde vor. Während verschiedene Autoren annehmen, dass einige Flavonoide in der Lage sind freie Radikale zu erzeugen, und man gezeigt hat, dass eine erhöhte Cytotoxizität von Quercetin mit einer gesteigerten Lipidperoxidation einherging (Limasset et al., 1993; Ramanathan et al., 1994), beschrieben andere Forscher, dass die Cytotoxizität von Quercetin keine Lipidperoxidation auslöst (Hanasaki et al., 1994).

3.1.5 Fenton Reagenz (Jurkat und SK-N-SH)

Um weiter zu untersuchen, inwieweit Flavonoide oxidative Prozesse beeinflussen, wurden die Zellen beider Zelllinien mit Fenton Reagenz (H_2O_2 und FeSO_4), einem bekannten Modell zum Auslösen von Oxidativem Stress, behandelt und Effekte einer Co-Inkubation mit verschiedenen Flavonoiden beobachtet.

Wasserstoffperoxid zählt zu den wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies. In Gegenwart von katalytischen Eisenionen können aus Wasserstoffperoxid Hydroxyl-Radikale

gebildet werden. Diese Reaktion wird als Fenton-Reaktion bezeichnet (Halliwell und Gutteridge, 1992) (Abb. 3.18):

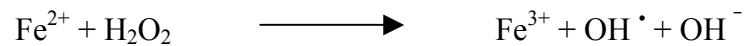


Abb. 3.18: Bildung von Hydroxyl-Radikalen mittels Fenton-Reaktion (Halliwell und Gutteridge, 1992).

Fenton Reagenz (in der Konzentration H_2O_2 200 μM und FeSO_4 50 μM) verursachte sowohl in Jurkat E6-1-, als auch in SK-N-SH-Zellen massive Cytotoxizität (gemessen am Anteil toter Zellen).

Obwohl Quercetin in den Konzentrationen 50 μM und 100 μM selbst toxische Effekte auf Jurkat E6-1-Zellen zeigte, konnte es in diesen Konzentrationen die von Fenton-Reagenz induzierte Toxizität signifikant inhibieren. Ein analoges Phänomen beobachteten auch Bestwick und Milne (2001). In deren Studien zeigte sich, dass Quercetin einerseits gegen Menadion-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche schützen konnte, jedoch andererseits Membranschäden verursachte (Bestwick und Milne, 2001).

Xanthohumol, Hispidulin und Hesperetin zeigten keine signifikante Veränderung der Cytotoxizität in Co-Inkubationen mit Fenton Reagenz im Vergleich zur Cytotoxizität von Fenton Reagenz alleine in Jurkat-Zellen (jeweils gemessen am Anteil toter Zellen) (Abb. 3.19).

In SK-N-SH-Zellen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Cytotoxizität in Co-Inkubationen der Flavonoide Hesperetin (100 μM), Hispidulin (100 μM), Quercetin (50/100 μM) bzw. Xanthohumol (50/100 μM) mit Fenton Reagenz im Vergleich zur Cytotoxizität von Fenton Reagenz alleine (jeweils gemessen am Anteil toter Zellen) (Abb. 3.20).

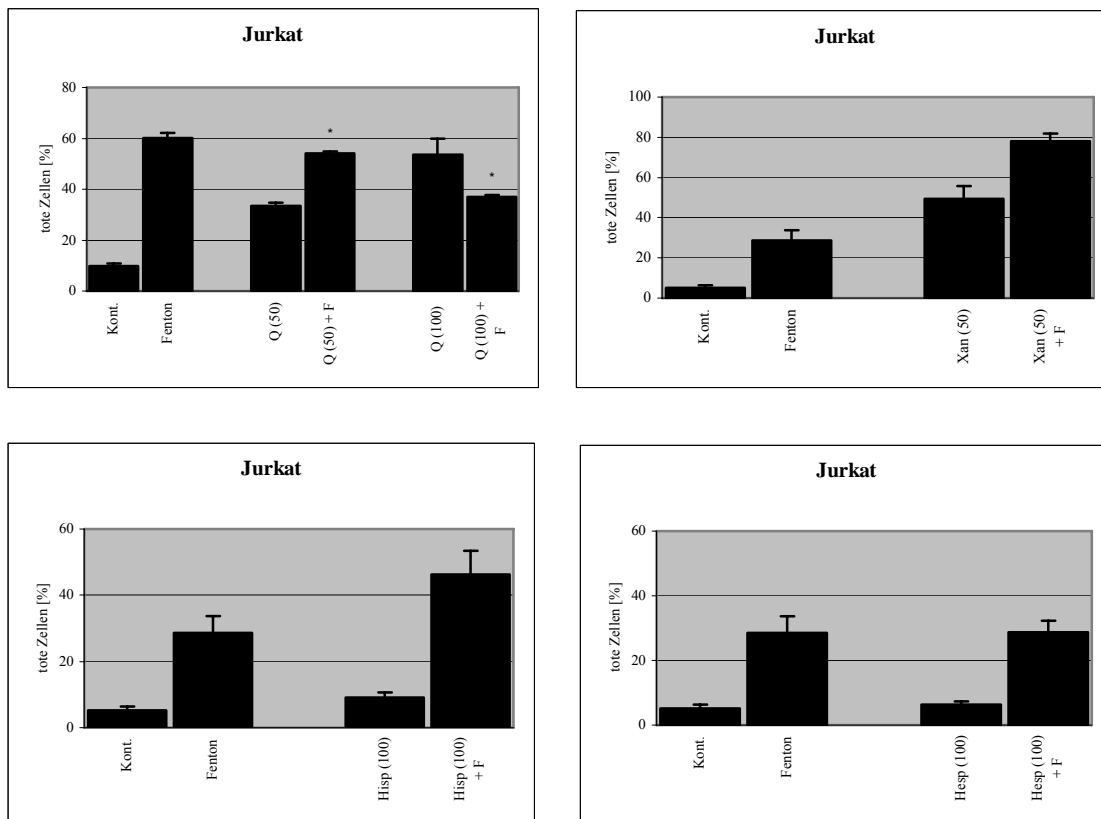


Abb. 3.19: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien einer 24-stündigen Co-Inkubation von Quercetin (Q) (50/100 μM), Xanthohumol (Xan) (50 μM), Hispidulin (Hisp) (100 μM) bzw. Hesperetin (Hesp) (100 μM) und Fenton Reagenz, ausgewertet mittels FACS an Jurkat-Zellen. Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen), sowie Zellen nach Fenton Reagenz-Exposition mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. * : signifikante Unterschiede der Co-Inkubation relativ zur Flavonoid-Exposition alleine (SPSS-Statistik; MANOVA; $p < 0,05$).

In der Literatur werden antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden häufig erwähnt (Rice-Evans et al., 1997; Pietta, 2000). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Verwendung von Hydroxyl-Radikalen mittels Fenton Reagenz mit Ausnahme von geringen antioxidativen Effekten von Quercetin nicht beobachtet werden. In diesem Zusammenhang berichteten Robak und Gryglewski 1988, dass die antioxidativen Effekte von Flavonoiden primär auf der Eliminierung von Superoxidanionen-Radikalen beruhen, wohingegen Nicht-Flavonoid-Antioxidantien andere Radikalkettenreaktionen, so z.B. die Eliminierung von Hydroxyl-Radikalen, beeinflussen (Robak und Gryglewski, 1988).

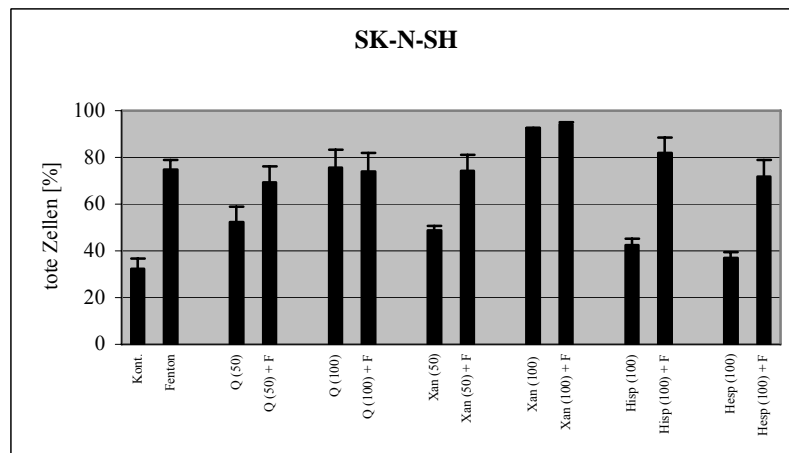


Abb. 3.20: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien einer 24-stündigen Co-Inkubation von Quercetin (Q) (50/100 μ M), Xanthohumol (Xan) (50 μ M), Hesperidin (Hisp) (100 μ M) bzw. Hesperetin (Hesp) (100 μ M) und Fenton Reagenz, ausgewertet mittels FACS an SK-N-SH-Zellen. Zum Vergleich ist die Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen), sowie Zellen nach Fenton Reagenz-Exposition mit dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der Relation an toten Zellen in %. * : signifikante Unterschiede in der Co-Inkubation mit Fenton Reagenz relativ zur Flavonoid-Exposition alleine (SPSS-Statistik; MANOVA; $p < 0,05$).

Von uns konnte gezeigt werden, dass sich die Flavonoid-induzierte Cytotoxizität (in Jurkat- und SK-N-SH-Zellen) durch Antioxidantien wie GSH und NAC reduzieren ließ. Dies lässt vermuten, dass der Flavonoid-induzierte Zelltod sensitiv zum Redoxstatus der Zelle ist. Darüber hinaus zeigten die Xanthohumol-behandelten Zellen eine erhöhte Lipidperoxidation. Dies lässt darauf schließen, dass Oxidativer Stress am Xanthohumol-induzierten Zelltod beteiligt ist. Auch in anderen Studien hat man eine durch Flavonoide ausgelöste erhöhte Cytotoxizität mit gesteigerter Lipidperoxidation in Verbindung gebracht (Ramanathan et al., 1994).

Auch wenn diese Daten vermuten lassen, dass einige Flavonoide oxidativ wirken, sind antioxidative Effekte von Flavonoiden verstärkt dokumentiert. Man kann annehmen, dass die prooxidativen Effekte, die in der vorliegenden Arbeit, aber auch von Anderen beobachtet worden sind, durch indirekte Mechanismen, wie dem Verlust des zellulären Reduktionspotentials zusätzlich zur Induktion des Zelltod-Programmes, ausgelöst werden. So hat man z.B. gezeigt, dass Zellen, die an Apoptose zugrunde gehen, einen enormen Verlust an GSH haben, was mit einer oxidativen Schädigung zusätzlich zur

Apoptose-Induktion einhergeht (Jiang et al., 2004; Slater et al., 1995; van den Dobbelsteen et al., 1996).

3.1.6 Cytotoxizitätsstudien (HL-60)

Die Flavonoide wurden auch hinsichtlich ihrer cytotoxischen Effekte auf dendritische HL-60-Zellen überprüft.

Hierzu wurde nach 24-stündiger Inkubation der Flavonoidlösungen mit HL-60-Zellen die Vitalität der Zellen mittels eines Cytotoxizitätstests, basierend auf dem ATP-Gehalt der Zellen, luminometrisch bestimmt.

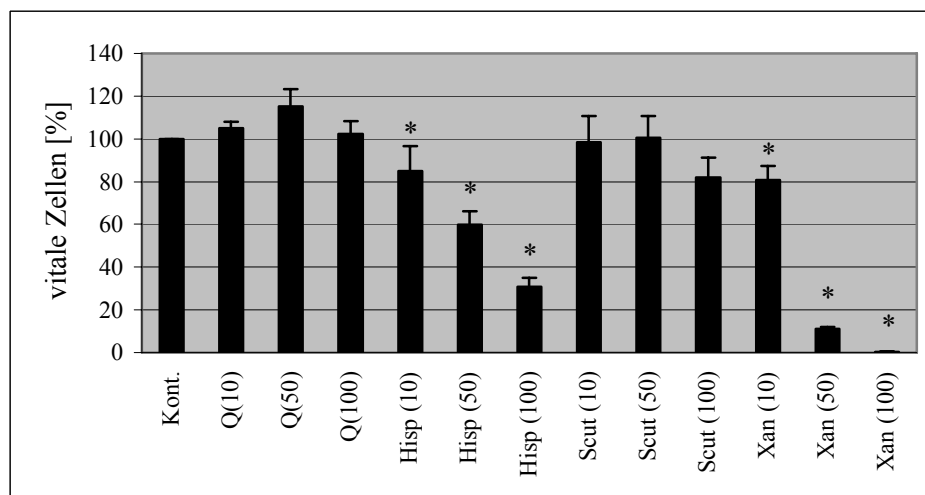


Abb. 3.21: Ergebnisse eines ATP-abhängigen Cytotoxizitätstests an HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (Q), Hispidulin (Hisp), Scutellarein (Scut) und Xanthohumol (Xan), jeweils in den Konzentrationen 10, 50 und 100 μ M. Aufgetragen sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen in %. * : signifikante Unterschiede relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen; Kont. = 100 %) (One-Way-Anova; Kruskal-Wallis-test; $p < 0,0001$).

Quercetin zeigte hierbei in allen drei untersuchten Konzentrationen (10, 50 und 100 μ M) keine toxischen Effekte. Während für Scutellarein auch in der Konzentration 100 μ M der Anteil an lebenden Zellen über 80% blieb, nahm die Vitalität der Zellen für Hispidulin und Xanthohumol konzentrationsabhängig signifikant ab. Für Hispidulin

sank der Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) in der Konzentration 50 μM auf 60% und in der Konzentration 100 μM auf unter 40% ab. Xanthohumol zeigte die stärkste Cytotoxizität aller hier untersuchten Flavonoide. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 50 μM Xanthohumol war die Vitalität der HL-60-Zellen auf unter 10% gefallen (Abb. 3.21).

Anhand eines Laktatdehydrogenase-Tests wurden weitere Cytotoxizitätsanalysen durchgeführt.

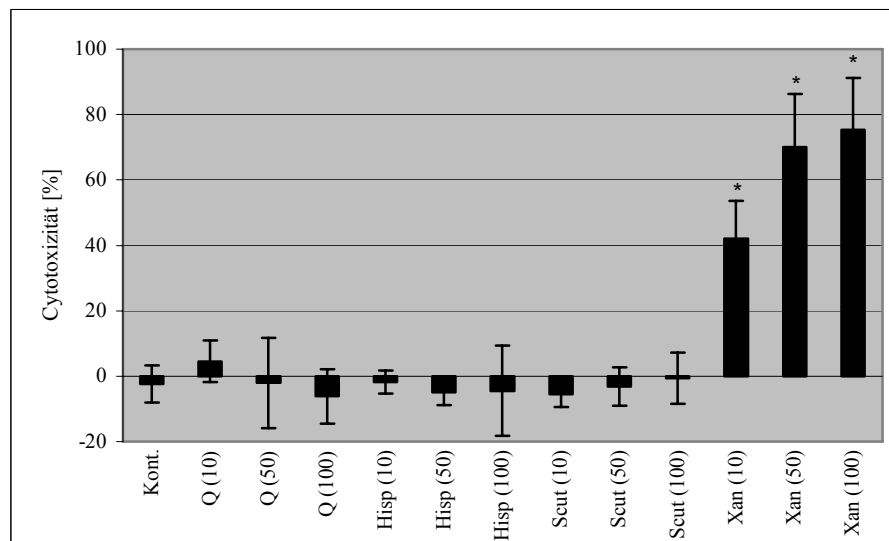


Abb. 3.22: Ergebnisse von Cytotoxizitätsstudien mittels eines Laktatdehydrogenase-Tests an HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (Q), Hispidulin (Hisp), Scutellarein (Scut) und Xanthohumol (Xan), jeweils in den Konzentrationen 10, 50 und 100 μM . Aufgetragen sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Messungen in %. * : signifikante Unterschiede relativ zur Kontrolle (Kont.; unbehandelte Zellen) (Mann-Whitney-test; $p < 0,05$; Bonferroni-korrigiert).

Für Quercetin, Hispidulin und Scutellarein war im Laktatdehydrogenase-Test in den Konzentrationen 10, 50 und 100 μM keine Toxizität in HL-60-Zellen zu beobachten. Dagegen zeigte Xanthohumol, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ATP-abhängigen Tests, signifikante, konzentrationsabhängige Cytotoxizität. Sie stieg von 42% (Xanthohumol 10 μM) auf 75% (Xanthohumol 100 μM) nach 24-stündiger Inkubation (Abb. 3.22).

Zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose wurden Experimente mittels eines weiteren ATP-abhängigen Cytotoxizitätstest und der Bestimmung des ADP:ATP-Quotienten durchgeführt. Dabei ergaben sich lediglich für Xanthohumol in der Konzentration 100 μM Anzeichen eines nekrotischen Zelltodmechanismus in HL-60-Zellen. Für alle weiteren untersuchten Substanzen, Quercetin, Hispidulin und Scutellarein, zeigten sich keine Veränderungen des ADP:ATP-Quotienten im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte HL-60-Zellen).

Einige Autoren berichten über einen Apoptose-induzierenden Effekt von Quercetin in HL-60-Zellen. So hat man eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zell-Vitalität nach 8-stündiger Inkubation mit Quercetin in den Konzentrationen 20, 40 und 80 μM gezeigt (Shen et al., 2003). Die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen, wie Chromatin-Kondensation, Kernfragmentierung and Reduktion des Zellvolumens konnten in konzentrationsabhängiger Weise in HL-60-Zellen beobachtet werden (Xiao et al., 1997). Eine Aktivierung der an der Apoptose-beteiligten Caspasen in HL-60-Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Quercetin in der Konzentration 60 μM wurde beschrieben (Wang et al., 1999).

In beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Cytotoxizitätstests konnten keine cytotoxischen Effekte von Quercetin an HL-60-Zellen beobachtet werden. Gestützt wird dieses Ergebnis durch zahlreiche Befunde, die ebenfalls gegen eine Cytotoxizität von Quercetin sprechen: So konnten nach 12-stündiger Inkubation von Makrophagen mit Quercetin in den Konzentrationen 25 und 50 μM keine Cytotoxizitätseffekte beobachtet werden. Bei 100 μM war nur eine geringgradige (< 20%) Abnahme der Anzahl lebender Zellen zu verzeichnen. Zugleich inhibierte Quercetin (50 μM) signifikant die von H_2O_2 -induzierte LDH-Freisetzung ins Zellkulturmedium (Chow et al., 2005). Auch andere Autoren konnten keine signifikante Cytotoxizität von Quercetin in HL-60-Zellen beobachten (Miroššay et al., 2001).

Im Einklang mit diesen Befunden wird die Verträglichkeit von Quercetin in klinischen Studien als gut bewertet (Okamoto, 2005). Quercetin wird als eine der stärksten chemopräventiv wirksamen Substanzen beschrieben (Gerhäuser et al., 2003).

Darüber hinaus wird in zahlreichen Studien über cytoprotektive Effekte von Quercetin berichtet: So verringerte Quercetin in der Konzentration 200 μM signifikant die LDH-Ausschüttung in Mesothelzellen im *in vitro* Modell der Peritonealen Dialyse (Riesenhuber et al., 2007). Ebenso wurden die protektiven Effekte von Quercetin in Bezug auf oxidative Schäden in Spermato gonien beobachtet (Mi et al., 2007). Quercetin (150 μM) zeigte antioxidative Effekte in Endometriumzellen und verbesserte die Vitalität oxidierter Zellen, wenn es mit Hydroxylperoxid co-inkubiert wurde (Estany et al., 2007). In Jurkat-Zellen zeigte Quercetin, im Vergleich zu Rutin und Catechin, die stärkste Aktivität gegenüber H_2O_2 -induzierter Cytotoxizität (Zhang et al., 2006). In Epithelzellen schützte Quercetin vor den toxischen Wirkungen von Arsen (Bongiovanni et al., 2007). Cytoprotektive Effekte von Quercetin in Tubuluszellen der Niere versprechen sogar Vorteile in der Konservierung von Spenderorganen (Ahlenstiel et al., 2006). Des Weiteren werden protektive Effekte von Quercetin auch in neuronalen Zellen beschrieben. In neuroendokrinen Zellen zeigte Quercetin (10-100 μM) gegenüber H_2O_2 -induziertem Oxidativem Stress eine höhere Aktivität als Vitamin C (Heo und Lee, 2004). Ebenso konnte mittels DNA-Fragmentierungs-Studien die protektiven Effekte von zahlreichen Flavonoiden, darunter auch Quercetin, gegenüber oxidativer Insults in dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden (Mercer et al., 2005).

Entscheidend für die gegensätzlichen Befunde für Quercetin scheinen zwei Aspekte zu sein: Zum einen wurde beobachtet, dass die cytoprotektiven Effekte von Quercetin nur innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs auftreten. In Aorta-Muskelzellen von Ratten zeigte das Flavonol in geringen Konzentrationen antiproliferative und antiinflammatorische Effekte, während es in Konzentration $\geq 100 \mu\text{M}$ gegensätzliche Effekte induzierte und die Zellvitalität verringerte (Shih et al., 2004). Zum anderen besteht die Hypothese, wonach die Cytoprotektion bzw. Cytotoxizität von Quercetin von der jeweiligen Menge an freien Radikalen in der Zelle abhängig ist. Untersucht wurde dies anhand der Effekte von Quercetin und H_2O_2 und der Analyse eines Zusammenhangs zum jeweiligen MDA-Status in HL-60-Zellen (Chen et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigten unter allen untersuchten Flavonoiden lediglich Xanthohumol in beiden durchgeführten Cytotoxizitätstests übereinstimmend signifikante toxische Effekte in HL-60-Zellen.

Bereits in Jurkat- und SK-N-SH-Zellen induzierte Xanthohumol die stärkste Cytotoxizität aller untersuchter Flavonoide. Wie bereits aufgeführt, wurden die cytotoxischen Effekte von Xanthohumol in der Literatur auch für andere Tumorzelllinien beschrieben (Colgate et al., 2007; Goto et al., 2005; Lust et al., 2005; Pan et al., 2005; Vanhoecke et al., 2005).

Scutellarein zeigte in HL-60-Zellen in Übereinstimmung mit den beiden anderen Zellmodellen ein Profil niedriger Toxizität. Der im ATP-abhängigen Toxizitätstest beobachtete konzentrationsabhängige, vitalitätsmindernde Effekt von Hispidulin konnte im LDH-Cytotoxizitätstest sowie in weiteren Charakterisierungen der Toxizität (mittels ATP:ADP-Quotienten) nicht bestätigt werden. Für Hispidulin war auch in humanen T-Zellen sowie in neuronalen Zellen nur eine geringgradige Toxizität zu beobachten.

3.2 Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften

Das Eliminieren freier Radikale zählt zu den wichtigsten bekannten Mechanismen, die bei Flavonoid-vermittelter Neuroprotektion eine Rolle spielen.

Flavonoide vermögen aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren (Pietta, 2000). Diese Eigenschaft wirkt oxidativem Stress entgegen, der bei einem Übermaß an Oxidantien in der Zelle auftritt und unter anderem durch Hydroxyl-Radikale, bzw. Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot -}$) ausgelöst wird.

Ein Übermaß an Oxidantien wird als ein gemeinsames Element in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson und M. Alzheimer angesehen (Simonian und Coyle, 1996). Entsprechend groß ist für die Prävention und Therapie dieser Störungen das Interesse an Substanzen, die Oxidantien neutralisieren.

Für die Quantifizierung antioxidativer Effekte *in vitro* eignen sich in besonderem Maße dendritische Zellen. Diese stellen einen wichtigen Bestandteil unserer zellulären Immunantwort dar und fungieren dabei als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität (Banchereau und Steinman, 1998). Sie gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Dendritische Zellen können an ihren Zielort migrieren, T-Zellen stimulieren, mit ihnen interagieren und ihre Antwort lenken (Hart, 1997).

Die hier verwendeten dendritischen HL-60-Zellen werden vielfach auch als Modell für Mikrogliazellen betrachtet, den Mediatoren der Immunantwort im ZNS (Mohamadzadeh und Luftig, 2004). Mikrogliazellen liegen über das gesamte ZNS verteilt vor und stellen neben Astrozyten und Oligodendrozyten etwa 20% der Gliazellen dar (Banati et al., 1993). Sie übernehmen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse des ZNS (Nakamura, 2002). Mikrogliazellen erzeugen eine Reihe von toxischen Sauerstoffverbindungen, wie Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot -}$), Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) und Stickstoffmonoxid (NO), welche u.a. für die Phagozytose von Pathogenen benötigt werden (Banati et al., 1993; Babior, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, inwieweit die Substanzen Quercetin, Hispidulin, Scutellarein und Xanthohumol Superoxidanionen-Radikale abzufangen vermögen.

Hierzu wurden HL-60-Zellen zunächst für sechs Tage mittels 1,3% DMSO differenziert und anschließend mittels PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), in der Konzentration 200 ng/ml, zur Superoxidanionen-Radikalbildung stimuliert (Bokoch und Prossnitz, 1992; Feuk-Lagerstedt, 1999). Anschließend wurde luminometrisch der Anteil freier, d.h. nicht durch Flavonoidlösungen abgefangener Radikale gemessen.

Die Superoxidanionen-Radikalproduktion wurde über 7 h hinweg verfolgt und die Fläche unter der Kurve (Integral) jeweils mit dem Integral der Kontrollkurve (HL-60-Zellen ohne Flavonoid-Inkubation) verglichen (Abb. 3.23).

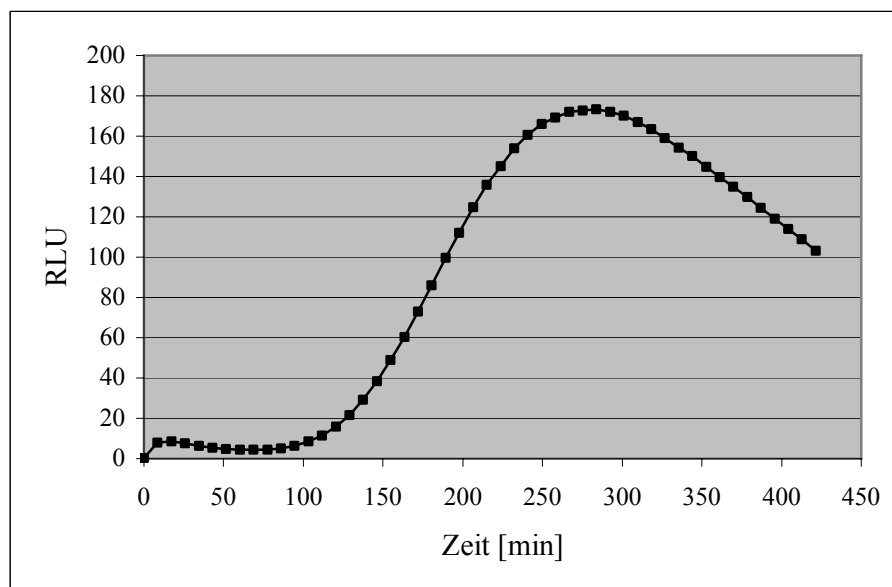


Abb. 3.23: Superoxidanionen-Radikalproduktion in HL-60-Zellen nach Stimulation mit PMA in der Konzentration 200 ng/ml (Kontrollbedingung ohne Flavonoidinkubation). Die Quantifizierung der Superoxidanionen-Radikale erfolgte nach Reaktion mit Luminol in relativen Lichteinheiten (*relative light units*; RLU) über einen Zeitverlauf von 7 h.

Es wurden zwei unterschiedliche Experimentansätze gewählt: Co- und Prä-Inkubation.

3.2.1 Co-Inkubationsmodell

Im Co-Inkubations-Experimentansatz wurden HL-60-Zellen kurzzeitig (5 min) mit den Flavonoidlösungen inkubiert und danach ohne Mediumwechsel mit PMA stimuliert. Die Flavonoide Hispidulin, Scutellarein und Quercetin wurden hierbei in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 50 μM verwendet, für Xanthohumol wurden die Konzentrationen 10 μM und 50 μM gewählt. Alle geprüften Flavonoidlösungen wiesen im Co-Inkubationsversuch deutliche konzentrationsabhängige Superoxidationen-Radikalfänger-Eigenschaften auf (Abb. 3.24).

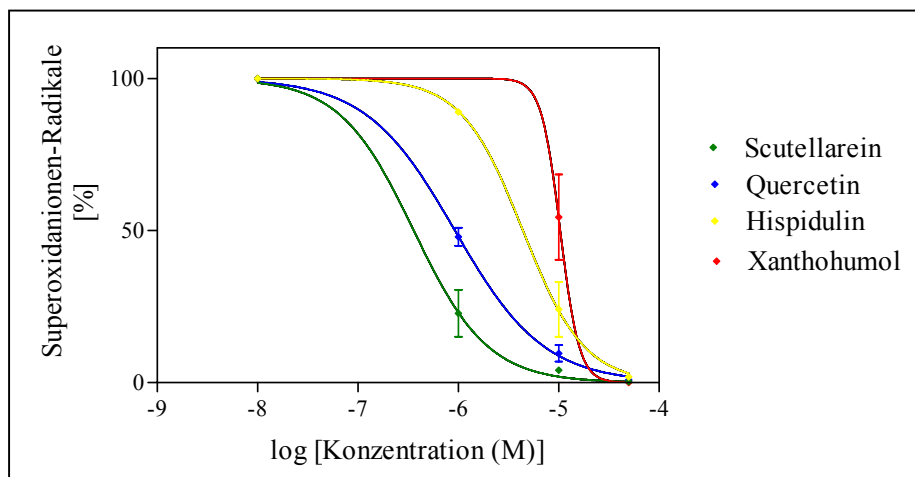


Abb. 3.24: Ergebnisse von Co-Inkubationsversuchen mit Hispidulin, Scutellarein und Quercetin in den Konzentrationen 10, 50 und 100 μM , sowie Xanthohumol in den Konzentrationen 10 und 50 μM mit HL-60-Zellen. Aufgetragen sind jeweils die Regressionsanalysen, wobei x der Logarithmus der untersuchten Flavonoidkonzentration und y der Prozentanteil an Superoxidationen-Radikalen ist. (Eine Konzentration von 0 μM wurde dabei näherungsweise als 10^{-8} M angesehen.)

Scutellarein zeigte dabei die höchste Aktivität ($SC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$), gefolgt von Quercetin ($SC_{50} = 0,9 \mu\text{M}$), Hispidulin ($SC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$) und Xanthohumol ($SC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$) (Tabelle 3.1).

Die Superoxidationen-Radikalfänger-Eigenschaften von Quercetin wurden sowohl in zellbasierten, als auch in nicht-zellbasierten Systemen untersucht. Dabei konnte eine

signifikante Verringerung des ROS-Gehaltes in stimulierten humanen neutrophilen Zellen durch Quercetin (1-100 μM) beobachtet werden (Zielińska et al., 2000). Auch im enzymatischen Versuchsmodell des Xanthin-Xanthin-Oxidase-Systems wurden Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften von Quercetin gezeigt (Robak und Gryglewski, 1988). In einem weiteren Modellansatz hat man Superoxidanionen-Radikale in einem Phenazin-Methosulphat-NADH-System erzeugt und die Radikal-Eliminierungs-Aktivität von Flavonoiden anschließend mittels Reduzierung von Nitroblue Tetrazolium analysiert. Dabei wurden starke Aktivitäten für das Flavonol Quercetin und schwache Effekte für das Flavon Hispidulin ermittelt (Chen et al., 1990).

Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der antioxidativen Aktivität von Flavonoiden wurden sowohl in zellulären, als auch in nicht-zellulären Systemen untersucht (Selloum et al., 2001). Dabei standen antioxidative Effekte besonders mit folgenden Strukturelementen in Verbindung:

- C2-C3-Doppelbindung bei gleichzeitiger Anwesenheit der 4-Carboxyl-gruppe (Cao et al., 1997; Rajendran et al., 2004);
- Anzahl der Hydroxysubstituenten (Zielińska et al., 2000; Selloum et al., 2001; Rajendran et al., 2004);
- ortho-Anordnung von zwei Hydroxygruppen (im B-Ring) (*free-catechol grouping*) (Rice-Evans et al., 1996; Zielińska et al., 2001).

Quercetin erfüllt alle diese Strukturmerkmale. Es besitzt eine 3',4'-Dihydroxylierung, also eine ortho-Anordnung der beiden Hydroxygruppen im B-Ring. Neben der C2-C3-Doppelbindung ist auch die 4-Carbonylgruppe im C-Ring vorhanden. Die Anwesenheit des C3-OH-Substituenten fördert bei gleichzeitiger C2-C3-Doppelbindung die Resonanzstabilisierung aufgrund von Elektronendelokalisierung (Bors et al., 1990; Jovanovic et al., 1998; Rajendran et al., 2004). Hiermit in Übereinstimmung zeigte Quercetin auch in der vorliegenden Arbeit ausgeprägte Superoxidanionen-Radikalfänger-Effekte im Vergleich zu anderen untersuchten Substanzen. Scutellarein, ein Flavon ohne ortho-Dihydroxylierung im B-Ring und ohne C3-OH-Substituent, zeigte

jedoch noch größere Radikalfänger-Aktivität. Hierzu ist beschrieben, dass eine Catechol-Struktur im A-Ring eine fehlende ortho-Dihydroxylierung im B-Ring kompensieren kann (Rajendran et al., 2004). Durch die ortho-Stellung der OH-Substituenten im A-Ring bei Scutellarein ist eine Catechol-Struktur möglich (Moody und Whitham, 1995).

3.2.2 Prä-Inkubationsmodell

In einem zweiten Experimentansatz wurden von uns HL-60-Zellen für 24 h mit Flavonoidlösungen prä-inkubiert; im Anschluß an einen Mediumwechsel erfolgte die Stimulation mit PMA zur Superoxidanionen-Radikal-Produktion (Prä-Inkubation).

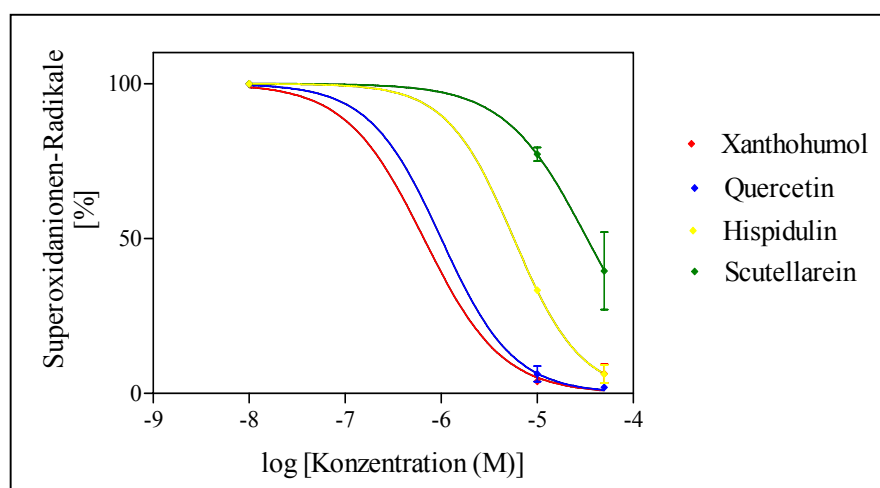


Abb. 3.25: Ergebnisse von Prä-Inkubationsversuchen mit Hispidulin, Scutellarein, Quercetin und Xanthohumol jeweils in den Konzentrationen 10 und 50 μM für 24 h mit HL-60-Zellen. Aufgetragen sind jeweils die Regressionsanalysen, wobei x der Logarithmus der untersuchten Flavonoidkonzentration und y der Prozentanteil an Superoxidanionen-Radikalen ist. (Eine Konzentration von 0 μM wurde dabei näherungsweise als 10^{-8} M angesehen.)

Die Flavonoide Hispidulin, Scutellarein, Quercetin und Xanthohumol wurden hierbei jeweils in den Konzentrationen 10 μM und 50 μM verwendet.

Alle untersuchten Flavonoidlösungen wiesen auch im Prä-Inkubations-Versuchsmodell deutliche konzentrationsabhängige Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften auf (Abb. 3.25).

In der Reihenfolge ihrer Effektstärken lagen Xanthohumol ($SC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$) und Quercetin ($SC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$) vor Hispidulin ($SC_{50} = 5,7 \mu\text{M}$). Scutellarein zeigte den schwächsten Effekt ($SC_{50} = 33,1 \mu\text{M}$) (Tabelle 3.1).

3.2.3 Vergleich der Ergebnisse beider Modelle

Über die Aufnahme von Flavonoiden in die Zelle, einem wichtigen Parameter der Bioverfügbarkeit, ist bisher nur wenig bekannt. Für die gegenüber den Glycosiden stärker hydrophoben Flavonoidaglykone wird eine passive Diffusion durch die Zellmembran postuliert (Aherne und O'Brien, 2002; Watzl und Rechkemmer, 2001). Um den Einfluß struktureller Faktoren auf die Aufnahme einzelner Flavonoide in die Zelle näher zu erfassen, wurden die Ergebnisse beider Experimentansätze (Co- und Prä-Inkubation) miteinander verglichen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den durchgeführten Experimenten um keine direkten Diffusions- bzw. Permeabilitätsstudien handelt, so dass nur eingeschränkt Aussagen bzgl. des Transports bzw. der Aufnahme der untersuchten Flavonoide in die Zelle möglich sind.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass alle hier untersuchten Flavonoidlösungen sowohl im Co-, als auch im Prä-Inkubationsmodell starke Superoxidanionen-Radikal-Eliminierungs-Eigenschaften aufwiesen.

Während die Relation der Meßwerte aus beiden Inkubationsmodellen zu Hispidulin und Quercetin weitgehend vergleichbar ist, ergaben sich für Scutellarein und Xanthohumol ermittelte Daten dagegen modellabhängige Abweichungen. So zeigte Xanthohumol im Prä-Inkubationsversuch eine 10-fach stärkere Wirkung als bei einer Co-Inkubation. Scutellarein wiederum vermochte den Superoxidanionen-Radikal-Gehalt in der Co-Inkubation stärker zu reduzieren als im Prä-Inkubationsmodell (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: SC_{50} -Werte (*half maximal scavenging concentration*) als Ausdruck der Superoxidanionen-Radikalfänger-Eigenschaften von Hispidulin, Scutellarein, Quercetin und Xanthohumol im Co- bzw. Prä-Inkubationsmodell.

	SC_{50} [μM]	
	Co-Inkubation	Prä-Inkubation
Hispidulin	4,4	5,7
Scutellarein	0,4	33,1
Quercetin	0,9	1,0
Xanthohumol	10,4	0,7

Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden Flavonen Scutellarein und Hispidulin beschränkt sich auf den Substituenten an C-6 (Methoxy- gegenüber Hydroxygruppe) (Abb. 3.26).

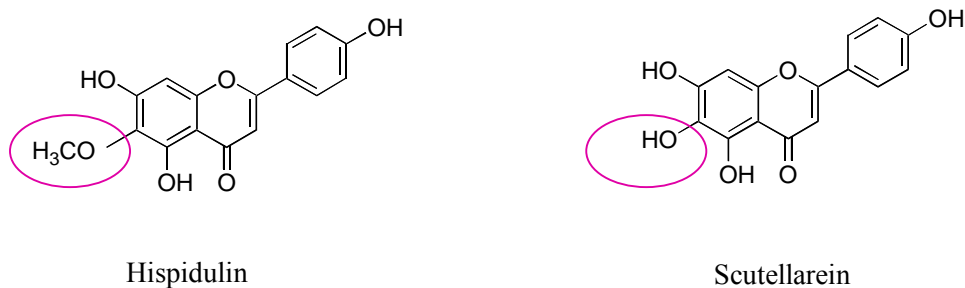


Abb. 3.26: Strukturen von Hispidulin und Scutellarein.

Eine höhere intrazelluläre Konzentration von Hispidulin gegenüber Scutellarein im Prä-Inkubationsmodell lässt sich durch eine erhöhte Membranpermeabilität und eine erleichterte passive Diffusion in die Zelle erklären. Die Zellmembranaffinität bzw. -permeabilität hängt von der Lipophilie der jeweiligen Substanz ab (Oldendorf, 1974; Habgood et al., 2000; Plochmann et al., 2007). Bei einer geringeren Anzahl an Hydroxygruppen ist Hispidulin im Vergleich zu Scutellarein stärker lipophil.

Auf einen größeren Stellenwert der passiven Diffusion für hydrophobe Flavonoid-aglykone gegenüber Flavonoidglycosiden ist bereits hingewiesen worden (Aherne und O'Brien, 2002; Watzl und Rechkemmer, 2001). So wird angenommen, dass z.B. die Aufnahme von Quercetin in die Zelle primär über passive Diffusion, d.h. ohne Beteiligung spezifischer Transportmechanismen erfolgt (Pohl, 2005).

Offen bleibt jedoch die Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten ausgeprägten Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Versuchsmodelle für Scutellarein und Xanthohumol, für die zusätzliche Einflußfaktoren zu postulieren sind.

Die Aktivität von spezifischen Transportproteinen gewinnt bei hydrophilen und sterisch komplexen Verbindungen an Bedeutung (Karawajczyk et al., 2007). So wird für Flavonoidglycoside ein gerichteter Transport in bzw. aus der Zelle unter Beteiligung von verschiedenen Membrantransportern diskutiert, darunter des Natrium-unabhängigen Glucose-Transporters (GLUT2), des Natrium-abhängigen Glucose-Transporters 1 (SGLT1), der „*multidrug-resistance-associated*“ Proteine 1 and 2 (MRP1/2), des P-Glykoproteins (P-gp), des Monocarboxylat-Transporters (MCT), sowie des Plasmamembrantransporters Bilitranslocase (Blöck, 2002; Kottra und Daniel, 2007; Karawajczyk et al., 2007).

Aussagen zur Wechselwirkung zwischen Flavonoiden und Membrantransportern beruhen dabei überwiegend auf Modellen aus Monolayern humaner intestinaler Caco-2-Zellen oder intestinaler Ratten-Präparationen (Walle, 2004).

So wird die Interaktion einer Reihe von Flavonoiden mit dem Na⁺-unabhängigen Glucose-Transporter (GLUT2) auf strukturelle Ähnlichkeit mit den etablierten

spezifischen Glucose-Carrier-Inhibitoren Phloretin bzw. Phlorizin zurückgeführt (Kimmich und Randles, 1978). Bestimmte Flavonoidglycoside, die als Phlorizin-Analoga betrachtet werden können, hemmen ebenfalls dieses Na^+ -unabhängige Transportsystem, jedoch in geringerem Maße als die zugehörigen Aglykone (Blöck, 2002).

Ein Transport von Flavonoidglucosiden über den SGLT1 wurde am Beispiel von Quercetin-4'- β -glucosid in humanen Caco-2-Zellen und in stabil mit SGLT1 transfizierten Ovar-Zellen des chinesischen Hamsters (G6D3-Zellen) nachgewiesen (Walgren et al., 2000). Die Flavonoide können dabei in zwei unterschiedlichen Orientierungen an SGLT1 binden, d.h. entweder mit ihrem Zucker-Rest oder mit einem anderen Teil des Moleküls, bevorzugt mit ihrem B-Ring (Kottra und Daniel, 2007).

Elektrophysiologische Messungen sprechen dafür, dass die Absorption der Flavonoidglucoside an der apikalen Membran durch das Wechselspiel zwischen der Aufnahme durch SGLT1 und dem Efflux über MRP2 bzw. andere MRP-Isoformen reguliert wird (Walgren et al., 2000; Walle, 2004). Eine Induktion des MRP2-Transporters durch Quercetin nimmt u.a. Einfluß auf die intestinale Entgiftung und die Verteilung von Xenobiotika in Tumorzellen des Darms (Pohl, 2005) und wird auch für Chrysin (Walle et al., 1999) und Epicatechin (Vaidyanathan und Walle, 2001) postuliert.

Epicatechin-3-gallat erwies sich darüber hinaus als Substrat von MRP1, einem ATP-abhängigen Transporter organischer Anionen (Walle, 2004).

Reduziertes Glutathion (GSH) besitzt eine sehr geringe Affinität zu MRP1, und einige MRP1-Substrate werden zusammen mit diesem Tripeptid transportiert. Verschiedene Flavonoide, so Apigenin, Naringenin, Genistein und Quercetin, vermögen den MRP1-abhängigen GSH-Transport durch Steigerung der Affinität des Transporters zu GSH zu stimulieren. Es ergaben sich aber bislang keine Hinweise auf einen Co-Transport dieser Flavonoide (Leslie et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist eine Reduzierung des GSH-Spiegels nach Flavonoidexposition in Jurkat- und SK-N-SH-Zellen beobachtet worden (vgl. 3.1.3.1). Beide Zelllinien exprimieren MRP1 (Blanc et al., 2003; Hammond et al., 2007). Eine

Steigerung der Affinität des Transporters zu GSH und damit eine Stimulierung des GSH-Transports durch die beiden untersuchten Flavonoide Quercetin und Xanthohumol kann demnach auch auf MRP1-Effekte zurückgehen.

Zur Bedeutung weiterer Transportsysteme für Flavonoide ist der Kenntnisstand derzeit noch lückenhaft. Angenommen wird eine Rolle des Efflux-Transporters P-Glykoprotein (P-gp) bei der Regulierung intrazellulärer Naringenin-Konzentrationen (Tourniaire et al., 2005), sowie eine Beteiligung des absorptiven Monocarboxylat-Transporters (MCT) am Transport von Epicatechin-3-gallat (Walle, 2004).

Schließlich sollen bestimmte Flavonoidaglykone neben Anthocyanen und organischen Anionen, wie Bilirubin und einigen Phthalinen, von der Bilitranslocase transportiert werden. Ausschlaggebend für die Bindungskapazität ist dabei die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbindungen (Karawajczyk et al., 2007).

Diese Eigenschaft bestimmt zugleich allgemeine Wechselwirkungen zwischen Flavonoiden und Zellmembranen. Die stärker hydrophoben Flavonoide wandern in den hydrophoben Kern der Membran, wohingegen die hydrophileren Flavonoide mit den polaren Kopfgruppen der Membranlipide mittels Wasserstoffbindungen interagieren (Oteiza et al., 2005).

Veränderungen der Membranrheologie können sich dann ebenfalls auf die Aktivität verschiedener Enzyme und den Transport von Metaboliten auswirken, daneben auf die Signaltransduktion, auf Membranrezeptoren, auf Endo- und Exocytose und auf zahlreiche andere Prozesse mit der Beteiligung von Membrankomponenten, einschließlich der Protektion vor Membranoxidation (Tomassoni et al., 1999; Niranjana und Krishnakantha, 2000; Hashimoto et al., 2001; Oteiza et al., 2005).

Maßgeblich für die Membranaffinität der Flavonoide sind neben dem Grad der Lipophilie auch andere strukturelle Faktoren. So ist die Membranaffinität von Flavonolen aufgrund ihrer planaren Struktur größer als die von Flavanonen (Hendrich, 2006).

In der Zusammenschau spricht somit vieles für eine komplexe Wechselwirkung zwischen Flavonoiden und Zellmembranen. Zur Ermittlung substanzspezifischer Diffusionskonstanten und zur Bestimmung der an einem aktiven Transport beteiligten Membranproteine bedarf es weiterführender Quantifizierungen von Flavonoiden im Intra- und Extrazellulärraum.

3.3 Immunmodulatorische Effekte: Genexpressionsstudien

Neuroprotektive Wirkung von Flavonoiden läßt sich einerseits aufgrund antioxidativer Effekte begründen, andererseits können jedoch auch immunmodulatorische Effekte von Bedeutung sein.

Während zunächst hauptsächlich ein Übermaß an Oxidantien in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Alzheimer beschrieben wurde, werden zunehmend auch inflammatorische Prozesse als Komponenten dieser Erkrankung angesehen (Heneka und O'Banion, 2007). Die Bedeutung von Inflammationen in der Pathogenese von M. Alzheimer wurde bei epidemiologischen Untersuchungen, anhand eines weniger häufigen Auftretens dieser Erkrankung nach Einnahme antiinflammatorisch wirksamer Medikamente indirekt nachgewiesen. Derartige Wirkstoffe zeigten mehr protektive als therapeutische Wirkung (Zilka et al., 2006).

In diesem Zusammenhang könnten immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden, neben deren antioxidativen Effekten, eine neuroprotektive Wirkung dieser Stoffgruppe mit begründen. Einige immunmodulatorische Effekte dieser Stoffgruppe sind bereits beschrieben:

So kommt es u.a. zu einer funktionellen Beeinflussung des an Entzündungsprozessen beteiligten Enzymsystems, insbesondere der Tyrosin und Serin/Threonin-Proteinkinasen durch verschiedene Flavonoide (vgl. 2.3.3).

Flavonoide werden demnach nicht nur mit unspezifischen Effekten auf Transkriptionsvorgänge in Verbindung gebracht, sondern überdies mit direkten regulatorischen Eingriffen in die Expression einzelner Gene (Li und Sarkar, 2002; van Erk et al., 2005).

So wird z.B. bezüglich der NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase postuliert, dass spezifische DNA-Bindungsstellen, *antioxidativ-responsive* Elemente (ARE), die Wechselwirkung in diesem Falle einleiten (Valerio et al., 2001). Für Epicatechin konnte die Stimulierung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *cAMP-response element binding* Protein (CREB), einem Regulator der neuronalen Vitalität und synaptischen Plastizität, gezeigt werden (Schroeter et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden beispielhaft für die große Substanzklasse der Flavonoide das Flavonol Quercetin, die Flavone Hispidulin und Scutellarein, sowie das Chalcon Xanthohumol hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften mittels Genexpressionsstudien in HL-60-Zellen untersucht.

Diese dendritischen Zellen eignen sich, wie im Abschnitt 3.2 bereits ausgeführt wurde, in besonderem Maße zur Untersuchung immunmodulatorischer Eigenschaften. HL-60-Zellen werden als Modell für Mikrogliazellen betrachtet, welche sowohl Mediatoren der Immunantwort im ZNS darstellen (Mohamadzadeh und Luftig, 2004), als auch eine Schlüsselrolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse des ZNS spielen (Nakamura, 2002).

3.3.1 Genexpressionsprofile mittels cDNA-Arrays

Die Genexpressionsstudien wurden anhand von Arrays durchgeführt.

Vorteile der Arrays gegenüber „traditionellen“ Genexpressionstechniken wie PCR oder Northern Blot Analysen ergeben sich dabei aufgrund der Anzahl an Genen, die innerhalb eines Experiments bestimmt werden können. Während bei erstgenannten Techniken lediglich ein oder wenige Gene parallel nebeneinander untersucht werden können, sind es bei Array-Analysen mehrere hundert. Bei Microarray-Technologie erhöht sich die Anzahl der Gene sogar auf mehrere tausend. Dabei ergibt sich anhand von u.a. Clusteranalysen die Möglichkeit, die Korrelation im Expressionsverhalten verschiedener Gene zu untersuchen, d.h. Gensubgruppen zu identifizieren, welche ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Des Weiteren kann auch überprüft werden, ob verschiedene Gene, deren Genprodukte in einem Stoffwechselweg miteinander verknüpft sind, ähnlich reguliert werden (Müller und Röder, 2004).

Diesem Vorteil stehen Nachteile wie sehr hohe Kosten und Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegenüber. Besonders bei schwacher Expression von Genen wurde eine hohe Variabilität der Array-Daten gezeigt (Schulze und Downward, 2000). Die Arbeitsgruppe „*Microarray Gene Expression Data Society*“ (mged) hat einen Leitfaden „*minimum information about a microarray experiment*“ (MIAME)

herausgegeben, um die Qualität veröffentlichter Ergebnisse besser beurteilen und Resultate verschiedener Studien einfacher miteinander vergleichen zu können (Victor et al., 2005; Brazma et al., 2001). Der Nachweis der Reproduzierbarkeit mittels Mehrfachbestimmungen (Duplikate) und eine Verifizierung einzelner ausgewählter Array-Ergebnisse mittels Realtime-PCR, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, sind Qualitätskriterien zur Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse.

Je nach Anwendungsgebiet wird zwischen Protein- und Nukleinsäure-Arrays unterschieden. Nukleinsäure-Arrays können in zwei Untergruppen aufgeteilt werden, die sich durch die Länge der auf den Arrays gebundenen DNA-Fragmenten unterscheiden: Oligonukleotid- und cDNA-Arrays. Während bei ersteren kurze Oligonukleotide von 7 bis 25 Basen-Länge auf den Arrays gebunden sind, sind die DNA-Sonden bei letzteren mehrere hundert Basen lang. Ein Anwendungsgebiet der cDNA-Arrays stellen Expressionsstudien dar, da durch die Länge des Targets die Spezifität erhöht wird (Thibault et al., 2001; Müller und Röder, 2004).

Mittels Array-Technologie wurden bereits Genexpressionsprofile von Flavonoiden zu unterschiedlichen Fragestellungen erstellt. Ein Hauptgebiet stellen dabei die Untersuchungen von tumorpräventiven Effekten dieser Stoffgruppe dar. Expressionsstudien mit Genistein in humanen PC3-Tumorzellen zeigten insbesondere eine Beeinflussung von Genen, welche an der Regulation des Zellwachstums, des Zellzyklus, der Apoptose und der Zellsignaltransduktion beteiligt sind (Li und Sarkar, 2002). Ein Experiment mit Quercetin und 4000 humanen Genen in Caco-2-Zellen zeigte, dass Quercetin die Expression von Genen, welche den Zellzyklus regulieren, wie z.B. *CDC6*, *CDK4* und *Cyclin D1* abschwächt. Ebenso wird die Expression von Genen, welche für die Zellproliferation von Bedeutung sind, reduziert. Die Expression von verschiedenen Tumor Suppressor-Genen wird hingegen durch Quercetin in Caco-2-Zellen verstärkt (van Erk et al., 2005). Genistein zeigte hohe Aktivität in der Prävention gegenüber Prostata-Krebs (Takahashi et al., 2004), es beeinflusste aber auch *in vitro* als negativer Mediator die Proliferation und Angiogenese von Endothelzellen. Dabei wurde insbesondere die Expression von Zelladhäsions-Genen herabreguliert und die Zelladhäsion vermindert (Piao et al., 2006). Die Bedeutung von Quercetin in der Prävention und Therapie von Colon-Krebs wurde anhand von DNA-Mikroarrays in der CO115 Colon-

Adenokarzinom Zelllinie untersucht. Quercetin induzierte hierbei Zellzyklusarrest anhand der Modulation von Zellzyklus- und Apoptose-relevanter Gene (Murtaza et al., 2006). Des Weiteren wurden die tumorpräventiven Eigenschaften von Biochanin A, einem Phytoestrogen aus Pflanzen, mittels eines *96-Gen human drug Metabolismus Enzym Mikroarray* untersucht (Moon et al., 2007).

Aber auch andere Fragestellungen wie die anti-allergischen Effekte von Chrysin und Apigenin (Yano et al., 2007) oder eine Beeinflussung der Expression von Adipocytokinen nach Anthocyan-Exposition (Tsuda et al., 2006) wurden mittels Array-Analysen untersucht.

Um mittels eines Testsystems möglichst viele Gene, welche an der Regulierung immunrelevanter Prozesse beteiligt oder für diese direkt oder indirekt von Bedeutung sind, untersuchen zu können, wurde von uns ein *GEArray S Series Human Dendritic and Antigene Presenting Cell Gene Array (Superarray)* ausgewählt. Dieser cDNA-Array umfasst eine repräsentative Auswahl von 171 verschiedenen immunrelevanten Genen, die in HL-60-Zellen exprimiert werden. Hierzu zählen Cytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren sowie Gene, die für Zelloberflächenrezeptoren bzw. für Strukturen der Antigenaufnahme, der Antigenpräsentation und der Signaltransduktion kodieren.

Die dendritischen HL-60-Zellen wurden mit den Flavonoidlösungen Quercetin (50/100 μM), Hispidulin (10/50/100 μM), Scutellarein (10/50/100 μM) und Xanthohumol (10 μM) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Nach Reverser Transkription in cDNA und Markierung mit Biotin folgten die Hybridisierung mit den Array-Membranen über Nacht und schließlich, nach mehreren Waschschritten, Chemilumineszenz-Detektion der Signale auf Röntgenfilmen (Abb. 3.27 und 3.28). Für alle Array-Experimente wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

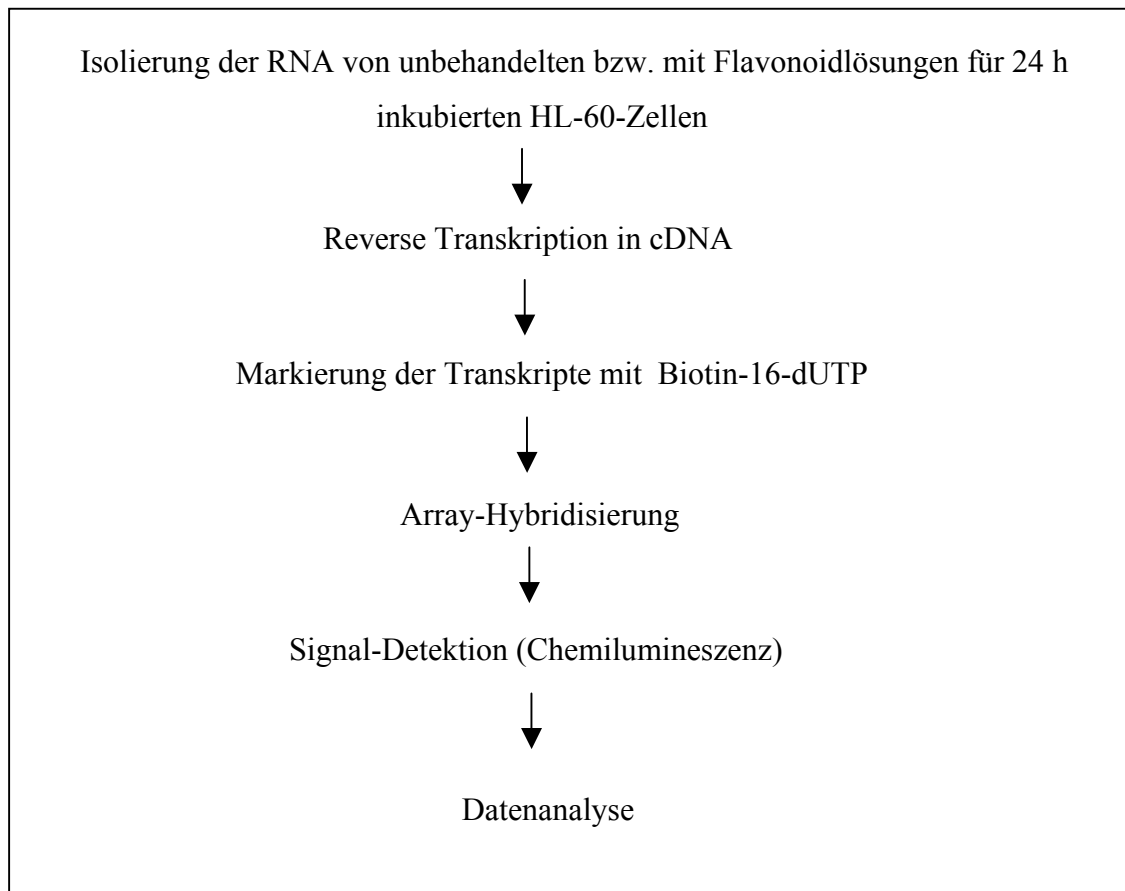


Abb. 3.27: Erstellung von Genexpressionsprofilen nach Flavonoidexposition.

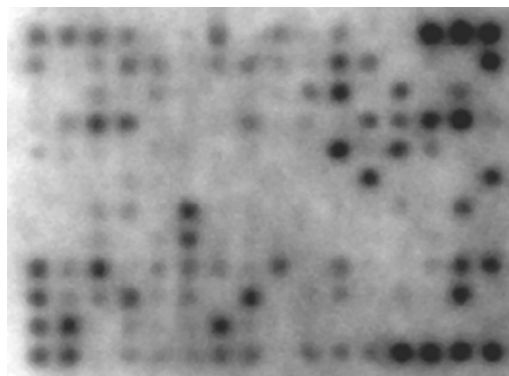


Abb. 3.28: Chemilumineszenz-Detektion der Hybridisierungssignale auf einem Röntgenfilm (hier: Genexpressionsmuster unbehandelter HL-60-Zellen). Punktförmige Schwärzungen („Spots“) stehen dabei für die untersuchten Gene und deren unterschiedliche Expressionsstärken.

In Abbildung 3.29 ist beispielhaft ein typisches Genexpressionsprofil dargestellt.

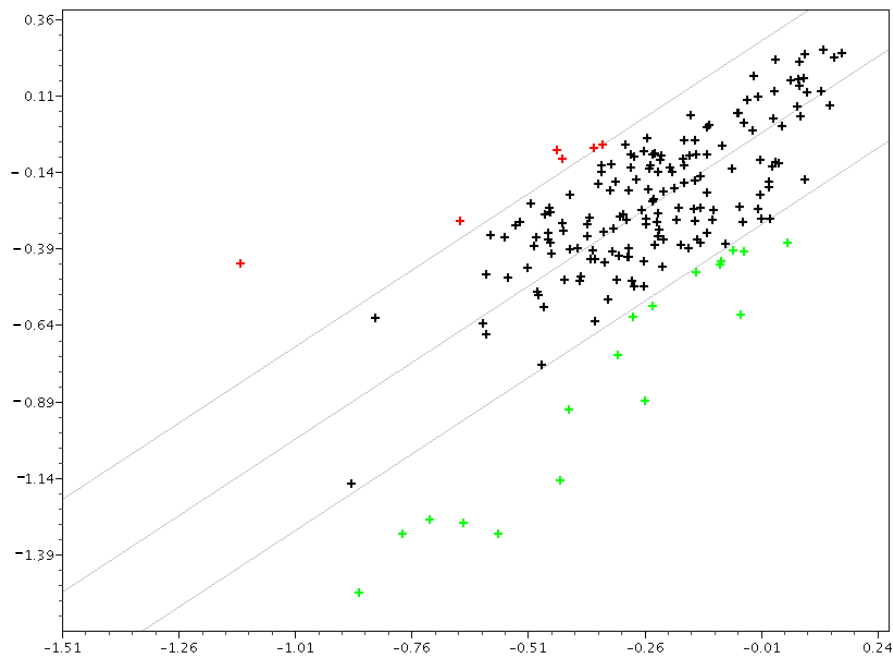


Abb. 3.29: Für Scutellarein (10 μM) erstelltes Genexpressionsprofil. Logarithmische Auftragung der Genexpressionswerte aus unbehandelten Zellen (x-Achse) gegen Werte der mit Scutellarein inkubierten Zellen (y-Achse). Mit schwarzen Kreuzen sind Gene gekennzeichnet, die eine Expressionsveränderung gegenüber der Kontrolle (kleiner Faktor 2) aufweisen, in rot und grün Gene deren Expression sich stärker verändert. Dabei steht rot für eine hochregulierte Expression und grün für eine herabregulierte Expression relativ zur Kontrolle.

Die Auswertung ergab, dass etliche Gene nur bei einzelnen Flavonoiden bzw. nur bei einer von mehreren Konzentrationsstufen deutliche (mindestens um den Faktor 2) Veränderungen ihrer Expression aufwiesen. Dagegen konnten nur wenige Gene identifiziert werden, deren Expression von *mehreren* der untersuchten Substanzen und darüber hinaus bei verschiedenen Konzentrationsstufen entsprechend variiert wurde. Dabei spricht die Konsistenz der gemessenen Veränderungen, soweit replizierbar, für einen gemeinsamen Wirkmechanismus der untersuchten Flavonoide.

In der Zusammenschau wurde unter dem Einfluß der angegebenen Flavonoide insgesamt bei acht Genen relativ zur Kontrollbedingung die Expressionsstärke deutlich (mindestens um den Faktor 2) herabreguliert (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Gene mit deutlich verringerter Expression (relativ zu unbehandelten Zellen um mindestens Faktor 2) nach Flavonoidexposition.

Gen	Flavonoid		Expressionsfaktor
<p style="text-align: center;"><i>ADAR1</i> (Adenosine deaminase, RNA specific) (<u>Chr1q21</u>)</p>	Hispidulin	100 µM	0,40
	Scutellarein	10 µM	0,46
		50 µM	0,25
		100 µM	0,13
	Quercetin	50 µM	0,46
		100 µM	0,15
	Xanthohumol	10 µM	0,50
<p style="text-align: center;"><i>STK4</i> (Serine/Threonine kinase 4) (<u>Chr20q11</u>)</p>	Hispidulin	10 µM	0,48
	Scutellarein	100 µM	0,41
	Quercetin	50 µM	0,37
		100 µM	0,31
	Xanthohumol	10 µM	0,41
<p style="text-align: center;"><i>CHD4</i> (Chromodomain helicase DNA binding protein 4) (<u>Chr12p13</u>)</p>	Hispidulin	10 µM	0,48
		50 µM	0,46
	Scutellarein	50 µM	0,47
		100 µM	0,24
	Quercetin	50 µM	0,35
		100 µM	0,22

Tabelle 3.2: Fortsetzung.

Gen	Flavonoid		Expressionsfaktor
<i>ARHGDIB</i> (Rho GDP dissociation inhibitor beta) (<u>Chr12p12</u>)	Hispidulin	100 µM	0,46
	Scutellarein	50 µM	0,33
		100 µM	0,18
	Quercetin	50 µM	0,38
		100 µM	0,40
	<i>IL16</i> (Interleukine 16) (<u>Chr15q26</u>)	Scutellarein	100 µM
Quercetin		100 µM	0,39
<i>ISG20</i> (Interferone stimulated gene 20 kDa) (<u>Chr15q26</u>)	Scutellarein	100 µM	0,48
	Xanthohumol	10 µM	0,40
<i>PFN1</i> (Profilin 1) (<u>Chr17p13</u>)	Scutellarein	100 µM	0,45
	Quercetin	100 µM	0,43
<i>SOD2</i> (Superoxide dismutase 2, mitochondrial) (<u>Chr6q25</u>)	Scutellarein	100 µM	0,40
	Quercetin	100 µM	0,36

Hierzu zählen Gene, die für Strukturen der Antigenaufnahme bzw. der Signaltransduktion kodieren, wie *SOD2*, *PFN1*, *ISG20*, *ARHGDIB*, *CHD4*, *STK4* und *ADAR1*, aber auch Cytokine wie Interleukin 16 (*IL16*). In der Mehrzahl der Fälle zeigte sich eine Expressionsverringering auf das 0,3-0,4-fache der Expressionsstärke im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Folgenden soll auf die Funktion dieser Gene und auf den möglichen Zusammenhang mit zellulären Effekten von Flavonoiden näher eingegangen werden.

Alle acht aufgeführten Gene dienen primär der zellulären Abwehr und werden bevorzugt in Gegenwart von Toxinen bzw. von anderen aggressiven Wirkstoffen hochreguliert. So hat man Induktion von Superoxiddismutase 2 (*SOD2*) nach Exposition mit prooxidativen Substanzen wie Kohlenmonoxid (CO) in Ratten gezeigt (Piantadosi et al., 2006). Die von uns in den Array-Studien beobachtete Verringerung der Expression von *SOD2* auf den Faktor 0,4 (relativ zur Kontrolle) nach Exposition mit Scutellarein (100 µM) oder Quercetin (100 µM) kann demnach als Ausdruck der antioxidativen Flavonoid-Effekte interpretiert werden, die keine zusätzliche *SOD2*-Aktivität erforderlich machen.

Profiline wiederum sind kleine, Aktin-bindende Proteine, welche die Dynamik der Aktin-Polymerisation regulieren. Ihre Expression wird u.a. in mesangialen Zellen hochreguliert, wenn Oxidativer Stress vorherrscht und eine Schädigung des Zytoskeletts droht (Clarkson et al., 2002). Die Expression von *PFN1* wurde bei unseren Studien in HL-60-Zellen dagegen sowohl von Scutellarein, als auch von Quercetin (jeweils in der Konzentration 100 µM) auf einen Expressionsfaktor von ca. 0,4 im Vergleich zur Kontrolle verringert. Damit verzichtet die Zelle auf eine Inanspruchnahme von Mechanismen, die meist durch Oxidantien induziert werden.

Auch die an inflammatorischen Geschehen beteiligten Gene *ISG20* und *IL16* wurden nur eingeschränkt exprimiert:

ISG20 (Interferon stimulated gene 20 kDa) ist ein Interferon (IFN)-induziertes Gen. Scutellarein (100 µM) und Xanthohumol (10 µM) verringerten die Expression von *ISG20* auf den Expressionsfaktor 0,48 bzw. 0,40 im Vergleich zur Kontrolle.

IL16 (Interleukin 16) zeigte in HL-60-Zellen nach Exposition mit Scutellarein oder Quercetin (jeweils in der Konzentration 100 µM) einen Expressionsfaktor von 0,39 relativ zur Kontrolle. *IL16* ist an der Entstehung von autoimmunen Prozessen und anderen Entzündungserkrankungen, wie z.B. der atopischen Dermatitis oder dem Reizkolon (*irritable bowel syndrome*), aber auch von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (Glass et al., 2006). *IL16* kann die Synthese proinflammatorischer Cytokine, wie z.B. IL1, IL6 und des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) α in Monozyten stimulieren. Die durch *IL16* induzierten Cytokine sind damit in der Immunantwort auf Antigene

involviert. Daneben fungiert *IL16* als Initiator der zellulären und der humoralen Immunität durch eine Vermittlung des zellulären *cross-talk* zwischen T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen (Deng und Shi, 2006).

Berücksichtigt man, dass der Radikalfänger Edaravon (EDA; 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-on) die Expression von Interleukinen zu verringern vermag (Kono et al., 2003), so kann für die untersuchten Flavonoide Quercetin, Hispidulin, Scutellarein und Xanthohumol ein ähnlicher Zusammenhang postuliert werden. Die für diese Substanzen belegten Radikalfängereigenschaften wären demzufolge durch antiinflammatorische Effekte zu ergänzen.

Darüber hinaus existieren bereits zahlreiche Studien, in denen über eine herabregulierte Expression von Interleukinen nach Flavonoidexposition berichtet wird. So inhibierte Quercetin (40 μM) die *IL6*-Produktion in Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Neutrophilen (Liu et al., 2005). Auch Apigenin zeigte antiinflammatorische Effekte aufgrund der Verminderung der LPS-induzierten *IL12*-Expression in dendritischen Zellen (Yoon et al., 2006). Des Weiteren verringerte Apigenin die TNF-alpha-induzierte Produktion von *IL6* in Osteoblasten (Choi, 2007). Auch die Gruppe der Chalone beeinflusste die Expression von Interleukinen. Sie erwiesen sich u.a. als starke Inhibitoren von *IL5*. Dabei wurde die Benzylgruppe als entscheidend für die Effektstärke identifiziert (Yang et al., 2007).

ARHGDIB (Rho GDP dissociation inhibitor beta) zählt zu den Mitgliedern der Rho (oder ARH) Proteinfamilie. Die Expression von *ARHGDIB* wird in Makrophagen nach Kontakt mit Erregern einer Pilzinfektion hochreguliert (Martinez-Solano et al., 2006). Damit wird u.a. eine prooxidative Reaktionslage in der Zelle in Verbindung gebracht. Bei unseren Studien verringerte sich unter Einfluß von Hispidulin (100 μM) die Expression von *ARHGDIB* dagegen um den Faktor 2 (relativ zur Kontrolle). Nach Exposition mit Quercetin (50/100 μM) zeigte sich eine 0,4-fache Expression im Vergleich zur Kontrolle. Unter Scutellareinexposition war eine konzentrationsabhängige Reduzierung der *ARHGDIB*-Expression in HL-60-Zellen zu beobachten. Dabei verringerte sie sich von 0,33-facher Expression (50 μM) auf 0,18-fache Expression für Scutellarein in der Konzentration 100 μM jeweils relativ zur Kontrolle. Eine verringerte

Expression von *ARHGD1B* nach Flavonoidexposition stützt erneut die Hypothese des antioxidativen und damit protektiven Profils der untersuchten Flavonoide.

CHD4 steht für „Chromodomain helicase DNA binding protein 4“. Es wird bei inflammatorischen Antworten, u.a. bei Autoimmunprozessen vermehrt exprimiert (Srinivasan et al., 2006). Unter Einfluß von Hispidulin (10/50 µM) verringerte sich die Expression von *CHD4* um den Faktor 2 relativ zu den unbehandelten Zellen. Sowohl nach Exposition mit Scutellarein, als auch nach Inkubation mit Quercetin zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung der *CHD4*-Expression. Dabei sank die Expression von 0,47-facher Expression (50 µM) auf 0,24-fache Expression (100 µM) für Scutellarein bzw. von 0,35-facher Expression (50 µM) auf einen Faktor von 0,22 (100 µM) für Quercetin (jeweils relativ zur Kontrolle). Das mittels der Arrays bestätigte Ergebnis einer verminderten Expression von *CHD4* nach Flavonoidexposition stimmt überein mit den bereits gewonnenen Anzeichen für antiinflammatorische Eigenschaften der untersuchten Flavonoide.

Die Serin/Threonin Kinase 4 (*STK4*) schließlich ist ein wichtiger Caspase-Effektor, der zur Apoptose beiträgt. Eine Überexpression von *STK4* kann Apoptose auslösen und führt zu den für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen der Zelle (Ura et al., 2001). Die Expression von *STK4* wurde von allen vier untersuchten Flavonoiden, Hispidulin (10 µM), Scutellarein (100 µM), Quercetin (50/100 µM) und Xanthohumol (10 µM) auf 0,3-0,4-fache Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduziert. Eine verringerte Expression nach Flavonoidexposition spricht damit am ehesten für cytoprotektive Effekte der untersuchten Substanzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nach Flavonoidexposition konsistent herabregulierte Expression von Genen, die alle primär der zellulären Abwehr dienen, mit einem antioxidativen, antiinflammatorischen sowie (cyto)protektiven Profil der Testsubstanzen gut vereinbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Array-Experimente auch die Expression von *ADAR1* untersucht.

Die Abkürzung *ADAR* steht für „RNA-spezifische Adenosin deaminase“. Im Menschen treten drei Mitglieder der *ADAR*-Genfamilie auf: *ADAR1*, *ADAR2*, sowie *ADAR3*.

Während *ADARI* und *ADAR2* ubiquitär exprimiert werden, wird *ADAR3* lediglich in geringen Mengen im Gehirngewebe, vor allem im Amygdala und im Thalamus, exprimiert (Barbon et al., 2003).

Bei *ADAR* handelt es sich um ein sog. „RNA editing-Gen“ (Barbon et al., 2003). RNA editing stellt eine posttranskriptionale Modifikation der Gensequenz dar. Dabei kann es sich um die Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Basen oder um die Substitution einer Base handeln (Maas und Rich, 2000). *ADAR* bewirkt die Substitution von Adenosin durch Inosin (Yang et al., 2003; Levanon et al., 2004). Dieser Austausch und seine funktionelle Relevanz wurden vor allem für neuronale Rezeptoren wie den Glutamatrezeptoren beschrieben (Yang et al., 2003; Levanon et al., 2004).

Alle bekannten neuronalen A-zu-I-Editierungen werden dabei durch *ADARI* und *ADAR2* katalysiert. Während *ADAR2* bezüglich des Aminosäuregehaltes lediglich 31% Gesamtidentität mit *ADARI* aufweist, zeigt es große Homologie mit dessen Deaminase-Domäne. *ADAR3* zeigt keine Adenosindeaminase-Aktivität (Schmauss und Howe, 2002; Maas und Rich, 2000).

Die Expression des Gens *ADARI* wurde in den Array-Experimenten am deutlichsten und zudem konsistent dosisabhängig nach Flavonoidexposition verändert.

Wie die Streudiagramme (Abb. 3.30) zeigen, war unter Scutellarein-Exposition eine konzentrationsabhängige Reduzierung der *ADARI*-Expression in HL-60-Zellen zu beobachten. Dabei verringerte sich die Expression von *ADARI* von 0,46-facher Expression (10 μ M), über 0,25-facher Expression (50 μ M), bis hin zu 0,13-facher Expression für Scutellarein (100 μ M) jeweils relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Nach Quercetin-Exposition zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduzierung der *ADARI*-Expression.

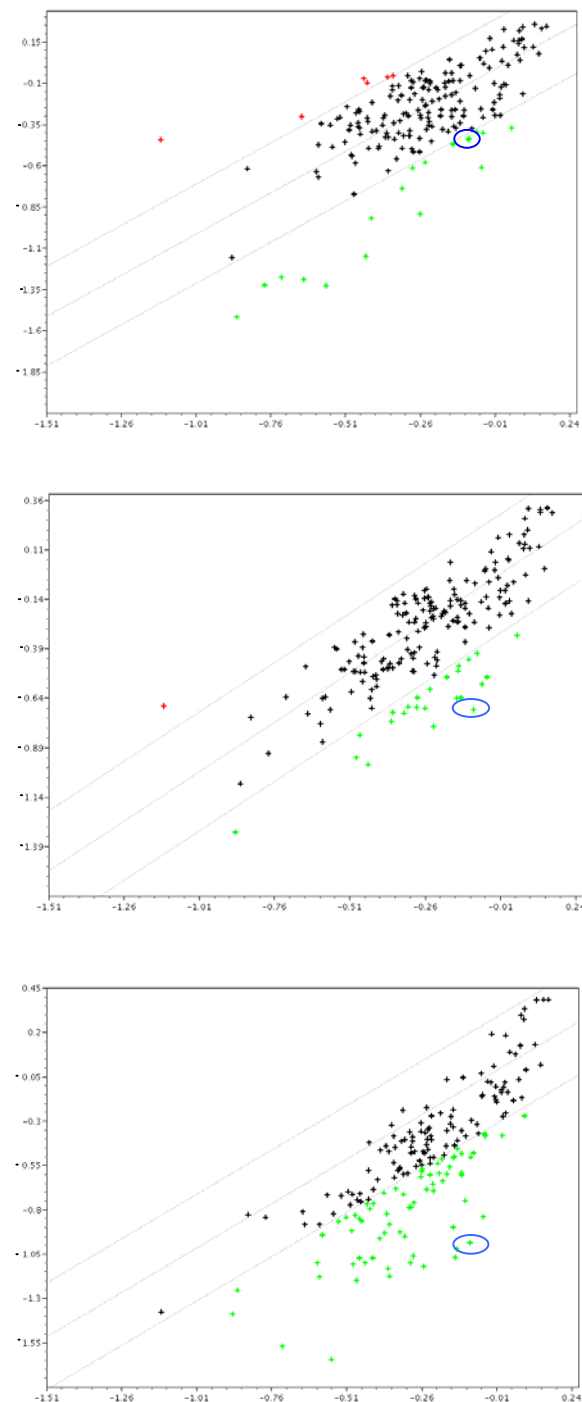


Abb. 3.30: Genexpressionsprofile für Scutellarein in den Konzentrationen 10 μM (oben), 50 μM (Mitte) und 100 μM (unten). In schwarz sind Gene gekennzeichnet, die eine Expressionsveränderung gegenüber der Kontrolle (unbehandelte Zellen) kleiner Faktor 2 aufweisen, in rot und grün Gene deren Expression stärker hoch- bzw. herabreguliert wird (vgl. Abb. 3.30). Die Expression des Gens *ADARI* (mit blau eingekreist) verringert sich konzentrationsabhängig unter Scutellareinexposition relativ zu den unbehandelten Zellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.3.2 Verifizierung mittels Realtime-PCR und Nachweis alternativ gespleißter Transkripte für *ADARI*

Es wurde eine Verifizierung der Array-Ergebnisse mittels Realtime-PCR durchgeführt.

DNA-Array-Analysen identifizieren Genexpressionsveränderungen, berücksichtigen hierbei jedoch mögliche Expressionsunterschiede verschiedener auftretender alternativer Spleißvarianten eines Gens nicht (Kothapalli et al., 2002).

In Eukaryonten werden kodierende Sequenzen (Exons) von nicht-kodierenden (Introns) unterbrochen. Bei einem als Spleißen (konstitutives Spleißen) bezeichnetem Prozess werden die Introns aus der primären RNA (prä-mRNA) entfernt und die Enden der Exons miteinander verbunden. Während beim konstitutiven Spleißen jedes Exon mit dem nächsten stromabwärts gelegenen verknüpft wird, werden beim alternativen Spleißen andere Spleißmuster benutzt und alternative 5'- bzw. 3'-Spleißstellen aktiviert. Dabei können beim Zusammenfügen der Exons ein oder mehrere Exons übersprungen werden („Exon-Skipping“), zwei Exons können alternativ und sich gegenseitig ausschließend benutzt werden, oder es kann innerhalb eines Exons ein Bereich als Intron erkannt werden („Intron-Retention“). Dadurch können aus einem Primärtranskript, und damit einem Ursprungsgen, durch alternatives Spleißen verschiedene mRNAs (Spleißvarianten) entstehen, die letztendlich zu funktionell unterschiedlichen Proteinen führen (Bindereif, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass 40-60% der humanen Gene alternativ gespleißt werden (Croft et al., 2000; Hide et al., 2001; Kan et al., 2001; Modrek et al., 2001).

Abbildung 3.31 zeigt in einer Übersicht einige durch alternatives Spleißen auftretende bekannte *ADARI*-Transkripte.

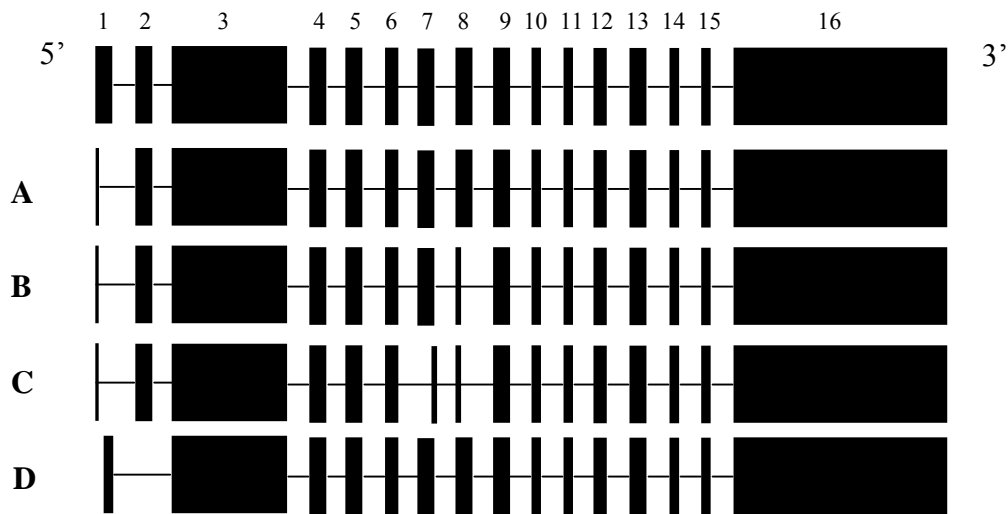


Abb. 3.31: Schematische Übersicht über einige durch alternatives Spleißen erzeugte, bekannte *ADARI*-Transkripte. **A:** Transkript: NM_001111; **B:** Transkript: NM_015840; **C:** Transkript: NM_015841; **D:** Transkript: NM_001025107 (Benson et al., 2007).

Da das Hybridisierungssignal je nach cDNA-Matrize variieren kann, wenn ein Gen alternativ gespleißt wird, und nur begrenzte Erkenntnisse über die tatsächliche Zahl von unterschiedlichen Transkripten vorliegen, wurden von uns zunächst die häufigsten Spleißformen von *ADARI* ermittelt und anschließend die Expressionsunterschiede für mehrere Transkripte quantifiziert.

Hierbei wurden keine Expressionsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe der cDNA aus unbehandelten Zellen und der cDNA aus mit den Flavonoidlösungen Hispidulin (10/50/100 μM), Scutellarein (10/50/100 μM), Quercetin (50/100 μM) oder Xanthohumol (10 μM) für 24 h inkubierten HL-60-Zellen ermittelt.

Jedoch konnte bei Expressionsstudien in verschiedenen Regionen des *ADARI*-Gens die Existenz zweier, in bestimmten *ADARI*-Transkripten zusätzlich auftretender Exons nachgewiesen werden (Abb. 3.32).

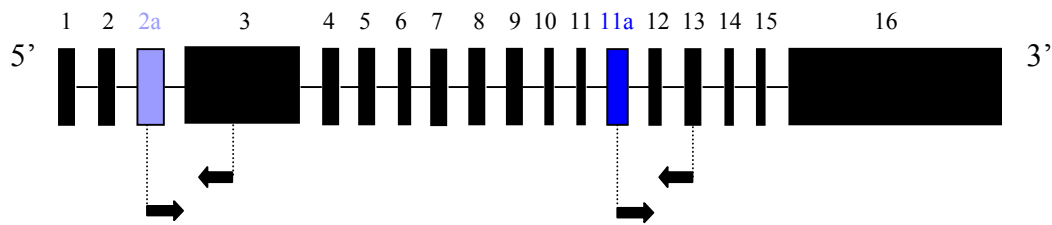


Abb. 3.32: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von *ADARI* mit 16 Exons. Eingezeichnet ist die Lage der nachgewiesenen zusätzlich auftretenden Exons: Exon 2a (Sequenz in Transkript X79448 beschrieben), zwischen Exon 2 und Exon 3, sowie Exon 11a (Sequenz in Transkript BE175656 beschrieben), zwischen Exon 11 und Exon 12. Pfeile zeigen die Position der verwendeten exonspezifischen Primerpaare (Exon 2a: ADAR2a+/ADAR2a-; Exon 11a: ADAR11a+/ADAR11a-).

Es handelt sich hierbei zum einen um das Exon 2a, welches zwischen den Exons 2 und 3 liegt, sowie um das Exon 11a, dessen Position zwischen den Exons 11 und 12 der *ADARI*-Gensequenz ist (Abb. 3.33 und 3.34) (Bezeichnungen der Exons willkürlich selbst gewählt).

5' - CAGCACTTTG	GGAGGCCGAG	GAGGGCGGAT
CAGGAGATCG	ACACCATCCT	GGCCAGCATG
GTGAAACCCC	ATCTCTACTA	AAAATACAAA
AATTAGCTGG	GTGTGGTGGC	GTGCGCCTGT
AATCCCAGCT	ACTCCGGAGG	CTGAGGCAGG
AGAATCACTT	GAACCCGGGA	GGCGGAGATT
GCAGTGAGCT	GAGATCACAC	TGCACTCCAG
CCTGATTGCA	GTGAGCCGAG	ATCATGCCAC
TGCACTCCAG	CTTGCAACA	GAGCGAGACT
CCGTCTCACA	AGAAAAAAAA	TAACC -3'

Abb. 3.33: Sequenz des Exons 2a des Gens *ADARI* (Sequenz beschrieben im *ADARI*-Transkript X79448) (Benson et al., 2007).

5' -GTCTGTACAG	TTCCTGTTGC	TGCCAGGGTG
GGCCCTGCCA	GGCTGTTAGA	ATTGGGTATC
CAAATGCTCT	CCTGGCCTGT	AAATCGAACC
TGATACAATA	AGCCACACTC	CACTGTGGGT
TTGAGGTCCA	TATTCAGGTG	TAGATGACTC
ACATGTACTG	CTGTCCACCT	CCAGTCTCCC
ATGGTAGGCC	TTAGAAAACA	TCCCTTGCTT
CTGTCACATC	TGACTGTTTT	GGAGCCCCAC
GAAATTGCAG	ATTTCCCACA	GGTGAGTTTT
AACAGCCACC	CCTGTTTTTC	AG -3'

Abb. 3.34: Sequenz des Exons 11a des Gens *ADARI* (Sequenz beschrieben im *ADARI*-Transkript BE175656) (Benson et al., 2007).

Um die auf den Arrays detektierten Expressionsunterschiede mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde die Expression von *ADARI* mittels genspezifischer Primer (*Superarray*) und Realtime-PCR in einer Region im Exon 16 untersucht (Abb. 3.35).

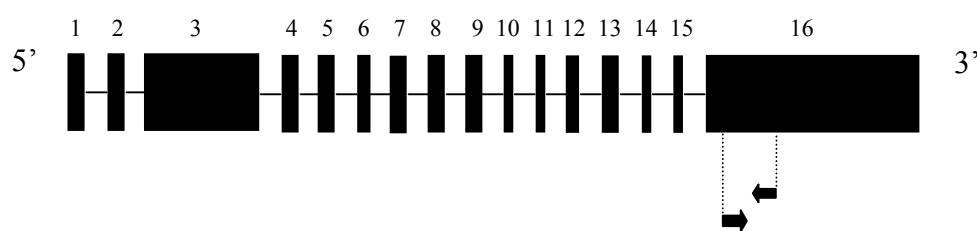


Abb. 3.35: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von *ADARI*. Eingezeichnet ist die mittels Realtime-PCR untersuchte 150 Basen umfassende Region im Exon 16. Pfeile zeigen die Position des verwendeten spezifischen Primerpaares.

Darüber hinaus wurden die Expressionsdaten für drei weitere Gene (*IL16*, *SOD2* und *STK4*) mittels Realtime-PCR quantifiziert.

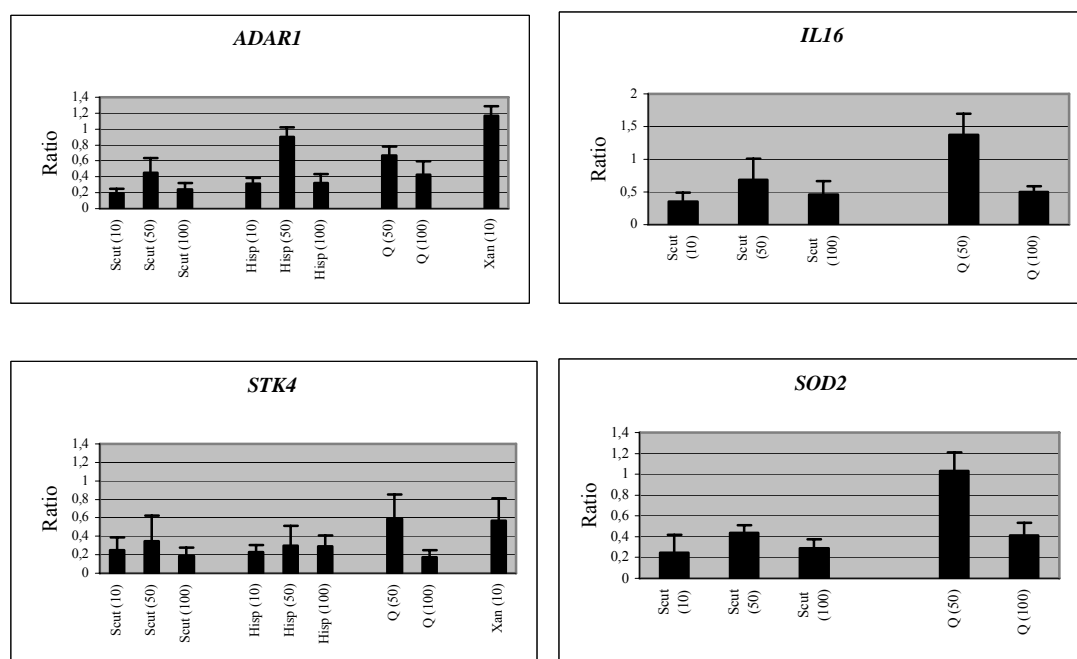


Abb. 3.36: Relative Expressionswerte der Gene *ADARI*, *IL16*, *STK4* und *SOD2* in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Scutellarein (Scut) (10/50/100 μM) und Quercetin (Q) (50/100 μM) (*IL16*, *SOD2*), bzw. Scutellarein (Scut) (10/50/100 μM), Hispidulin (Hisp) (10/50/100 μM), Quercetin (Q) (50/100 μM) und Xanthohumol (Xan) (10 μM) (*ADAR*, *STK4*). Aufgetragen sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung der relativen Expressionswerte aus unabhängigen Realtime-PCR-Experimenten. * : signifikante Veränderung relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen; Ratio = 1) (One-way-Anova; Kruskal-Wallis-Test; $p < 0,05$). (Für Xanthohumol war eine Signifikanzbestimmung mittels dieses Tests nicht möglich.)

Für *ADARI* wurden die Ergebnisse der Arrays für die Flavonoidlösungen Scutellarein, Hispidulin und Quercetin mittels Realtime-PCR bestätigt. Alle untersuchten Substanzen zeigten auch hier im Vergleich zur Kontrolle verringerte Expressionsstärken. Lediglich Scutellarein (50 μM) und Hispidulin (50 μM) wichen ab.

Während sich die *ADARI*-Expression in den Konzentrationen 10 und 100 μM auf 0,2-fache Expression für Scutellarein, bzw. auf 0,3-fache Expression für Hispidulin verringerte, lag die Expressionsratio für diese beiden Flavone in der Konzentration 50 μM bei Werten von 0,4- bzw. 0,9-facher Expression jeweils relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Für Quercetin konnte, als einziges von allen mittels Realtime-

PCR untersuchten Flavonoiden, eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expressionsstärke von *ADARI* in HL-60-Zellen beobachtet werden. Dabei sank die Expressionsratio unter Quercetinexposition auf Werte von 0,7 bzw. 0,4 für die Konzentrationen 50 bzw. 100 μM . Nach Exposition mit Xanthohumol (10 μM) zeigte *ADARI* in den Realtime-PCR-Analysen keine verringerte Expression im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Als Expressionsratio wurde ein Wert von 1,2 ermittelt (Abb. 3.36).

Für die drei weiteren beispielhaft ausgewählten Gene, *IL16*, *SOD2* und *STK4*, gilt: Mittels der Realtime-PCR-Analysen wurden vergleichbare Genexpressionsveränderungen unter Flavonoidexposition wie in den Arrays beobachtet.

Die Expressionsstärke der Gene *IL16* und *SOD2* wurde unter Einfluß von Scutellarein (100 μM) und Quercetin (100 μM) in beiden Analysen deutlich verringert. Dabei wurde für beide Gene ein Expressionsfaktor von ca. 0,4 (relativ zu den unbehandelten Zellen) ermittelt. Auch in den Array-Experimenten ergaben sich nach Exposition mit Scutellarein bzw. Quercetin (jeweils 100 μM) für beide Gene Expressionsfaktoren von 0,4 (Abb. 3.36).

Die Expression des Gens *STK4* wurde, analog zu den cDNA-Array-Ergebnissen, auch in den Realtime-PCR-Analysen unter Einfluss von Scutellarein, Hispidulin, Quercetin und Xanthohumol verringert. Nach Exposition mit Scutellarein bzw. Hispidulin (10, 50 und 100 μM) ergaben sich Expressionsfaktoren zwischen 0,2 und 0,3, während sich für Xanthohumol (10 μM) 0,6-fache Expression (relativ zur Kontrolle) zeigte. Für Quercetin beobachtete man eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expressionsstärke von 0,6-facher Expression (bei 50 μM) auf 0,2-fache Expression (bei 100 μM) in der Realtime-PCR. Die in den Array-Analysen ermittelten Expressionsfaktoren für *STK4* lagen zwischen 0,3 und 0,5 für Hispidulin (10 μM), Scutellarein (100 μM), Quercetin (50 und 100 μM) und Xanthohumol (10 μM) (Abb. 3.36).

3.3.3 ADAR1-Western Blots

Genexpressionswerte reflektieren nicht automatisch die Expression der entsprechenden Proteine. Die Proteinexpression ist stark von den jeweiligen Bedingungen abhängig und unterliegt stärker als die Genexpression einem dynamischen Prozess (Spielbauer und Stahl, 2005).

Effekte der Flavonoidlösungen auf die Expression von ADAR1 wurden von uns daher nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene mittels Western Blots überprüft (Abb. 3.37). Dabei wurde als Standard zusätzlich die Expression von GAPDH untersucht.

Die gleichbleibende Intensität der GAPDH-Bande bei allen Experimenten bestätigt die Verwendung gleicher Proteinmengen für alle Expositionen.

Für alle vier untersuchten Substanzen ergab sich konsistent eine abgeschwächte ADAR1-Proteinbande nach Flavonoidexposition der HL-60-Zellen relativ zur Referenz (unbehandelte Zellen) (Abb. 3.37).

Für Scutellarein zeigte sich für die drei geprüften Konzentrationen (10, 50 und 100 μM) eine deutlich schwächere Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle. Das Korrelat zu der in den Arrays ermittelten konzentrationsabhängigen Reduzierung der *ADAR1*-Genexpression konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, da aufgrund der schwachen Expression eine quantitative Bestimmung nicht möglich war. Für das Flavonol Quercetin (10/50/100 μM) trat eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proteinbandenintensität von ADAR1 auf. Eine konzentrationsabhängige Genexpressionsverringering war für Quercetin (50/100 μM) auch in den Realtime-PCR-Analysen ermittelt worden. Die ADAR1-Proteinbande für Xanthohumol (10 μM) war deutlich schwächer als die Bande der unbehandelten Zellen. Analog hierzu wurde unter Einfluß von Xanthohumol (10 μM) auch in den Array-Analysen die *ADAR1*-Genexpression um den Faktor 2 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verringert. Für Hispidulin war der Proteingehalt an ADAR1 erst ab einer Konzentration von 50 μM schwach verringert. Auch für die Genexpression von *ADAR1* ergab sich in den Array-Analysen unter Hispidulin-Exposition erst bei einer Konzentration von 100 μM eine Expressionsverringering unter den Faktor 0,5 im Vergleich zur Kontrolle.

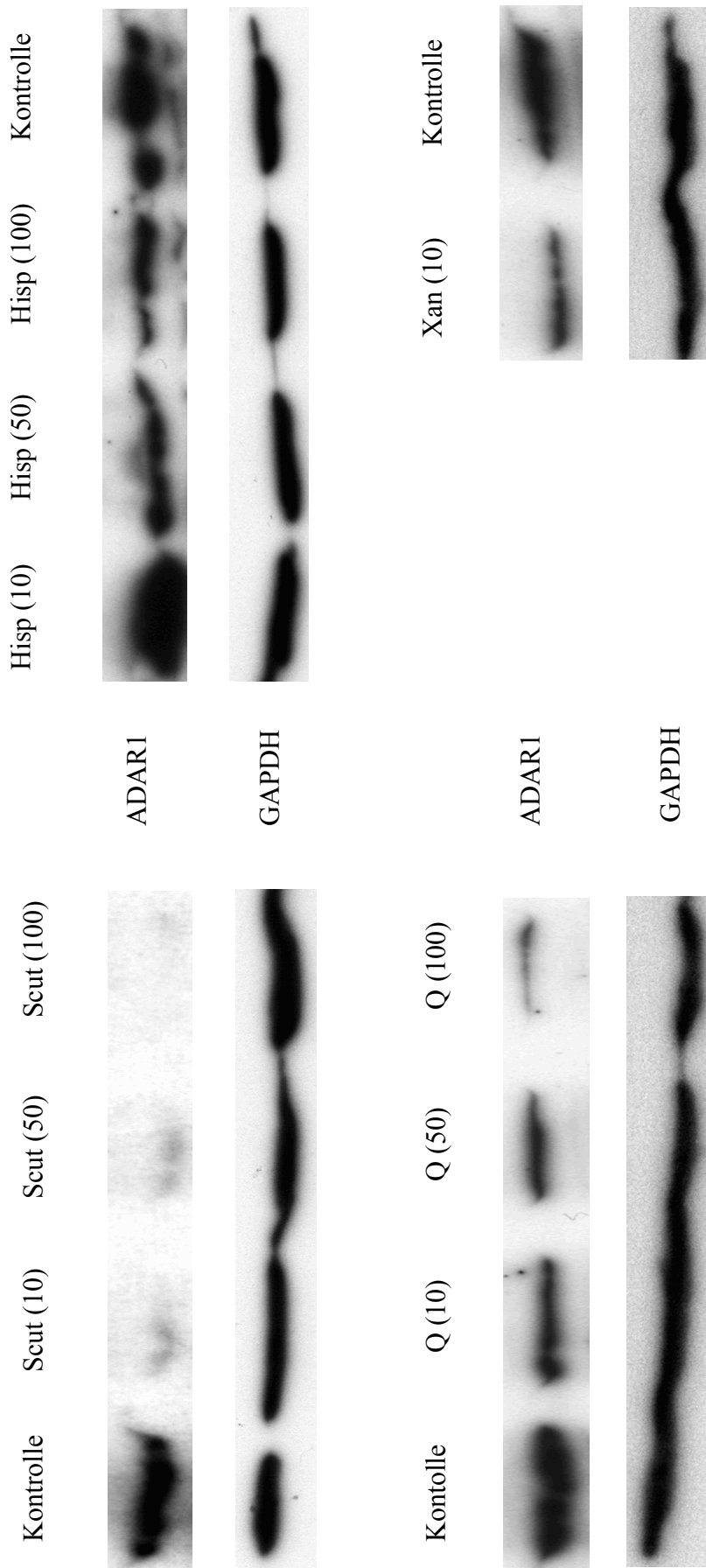


Abb. 3.37: Western Blot-Analysen: Expression von ADAR1-Proteinen unter Einfluß von Scutellarein (Scut), Hispidulin (Hisp) und Quercetin (Q) in den Konzentrationen 10, 50 und 100 μM , sowie von Xanthohumol (Xan) in der Konzentration 10 μM . Als Standard wurde die Expression von GAPDH untersucht.

ADAR1 zeigte somit sowohl auf RNA-Ebene in cDNA-Array- und Realtime-PCR-Analysen, als auch auf Proteinebene in den Western Blots eine verringerte Expression nach Exposition mit den Flavonoiden Scutellarein, Quercetin, Hispidulin und Xanthohumol.

3.3.4 Quantitative Realtime-PCR für *ADAR2* und Gene der *APOBEC3*-Familie

Zusätzlich zu den Genen aus den Arrays wurde die Expression von *ADAR2* und von vier Mitgliedern aus der Familie der *APOBEC3*-Gene nach Flavonoidexposition untersucht.

APOBEC3 (Apolipoprotein B-editing catalytic subunit 3) umfasst die Gene *APOBEC3_A*, *_B*, *_C*, *_D*, *_E*, *_DE*, *_F*, *_G*, und *_H* (Turelli und Trono, 2005).

Die *APOBEC3*-Genfamilie gehört, wie auch *ADAR*, zu den sog. „RNA editing-Genen“. RNA editing stellt eine posttranskriptionale Modifikation der Gensequenz dar. Dabei kann es sich um die Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Basen, oder um die Substitution einer Base handeln (Maas und Rich, 2000). Während *ADAR1* und *ADAR2* eine Substitution von Adenosin durch Inosin bewirken (A>I-Editing) (Yang et al., 2003; Levanon et al., 2004), regulieren die Mitglieder der *APOBEC3*-Genfamilie den Austausch von Cytosin durch Uracil (C>U-Editing) (Turelli und Trono, 2005).

Wie *ADAR* beeinflussen auch Mitglieder der *APOBEC3* Familie posttranskriptionale Modifikationen in verschiedenen Viren. Darunter sind besonders *APOBEC3G*, *APOBEC3F* und *APOBEC3B*, aber z.B. auch *APOBEC3C* von Bedeutung. Sie bewirken antivirale Effekte gegenüber HIV und anderen Lentiviren durch Deaminierungen von Cytosin im Virus-DNA-Minusstrang (Franca et al., 2006).

Auch die Replikation von Hepatitis B Viren kann mittels *APOBEC3*-Genen inhibiert werden (Turelli und Trono, 2005). Dabei scheint Editing keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Derzeit wird diskutiert, dass *APOBEC3*-Proteine mittels nicht-katalytischer Mechanismen das Verpacken der viralen prägenomischen RNA ins Nukleokapsid blockieren, den Reverse-Transkriptions-Komplex destabili-

sieren und die Akkumulation der HBV-DNA in die Virionen verhindern (Chiu und Greene, 2006).

Untersucht wurden die Gene *ADAR2*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* hinsichtlich ihrer Expression in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Flavonoiden Scutellarein (10/50/100 μM), Hispidulin (10/50/100 μM), Quercetin (50/100 μM) bzw. Xanthohumol (10 μM).

Alle vier untersuchten Gene der *APOBEC3*-Familie zeigten unter Flavonoidexposition ein nahezu einheitliches Expressionsmuster (Abb. 3.38). Unter Einfluß von Scutellarein (10/50/100 μM) verringerte sich die Expression von *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* mindestens um den Faktor 2 im Vergleich zu den unbehandelten HL-60-Zellen. Eine Ausnahme stellt *APOBEC3G* dar. Hier ergab sich nach Exposition mit Scutellarein in der Konzentration 50 μM ein Expressionsfaktor von 0,8.

Hispidulin zeigte in allen Versuchen die stärkste Expressionsverringering in der Konzentration 10 μM . Für alle vier untersuchten Gene ergab sich hierbei ein Expressionsfaktor zwischen 0,2 und 0,3.

Die von Quercetin initiierte konzentrationsabhängige Abnahme der Genexpression war sowohl für *APOBEC3B* und *APOBEC3C*, als auch für *APOBEC3F* und *APOBEC3G* zu beobachten. Die Expressionsratio verringerte sich von 0,8 (*APOBEC3C*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*) bzw. 1,0 (*APOBEC3B*) für Quercetin in der Konzentration 50 μM auf Werte von ca. 0,2 für alle vier Gene nach Exposition mit Quercetin in der Konzentration 100 μM .

Unter Einfluss von Xanthohumol zeigte sich in keinem der vier untersuchten *APOBEC3*-Gene eine Expressionsabschwächung. Die Expressionsfaktoren stiegen hingegen nach Exposition mit Xanthohumol (10 μM) auf Werte zwischen 1,5 und 2,0 relativ zur Kontrolle.

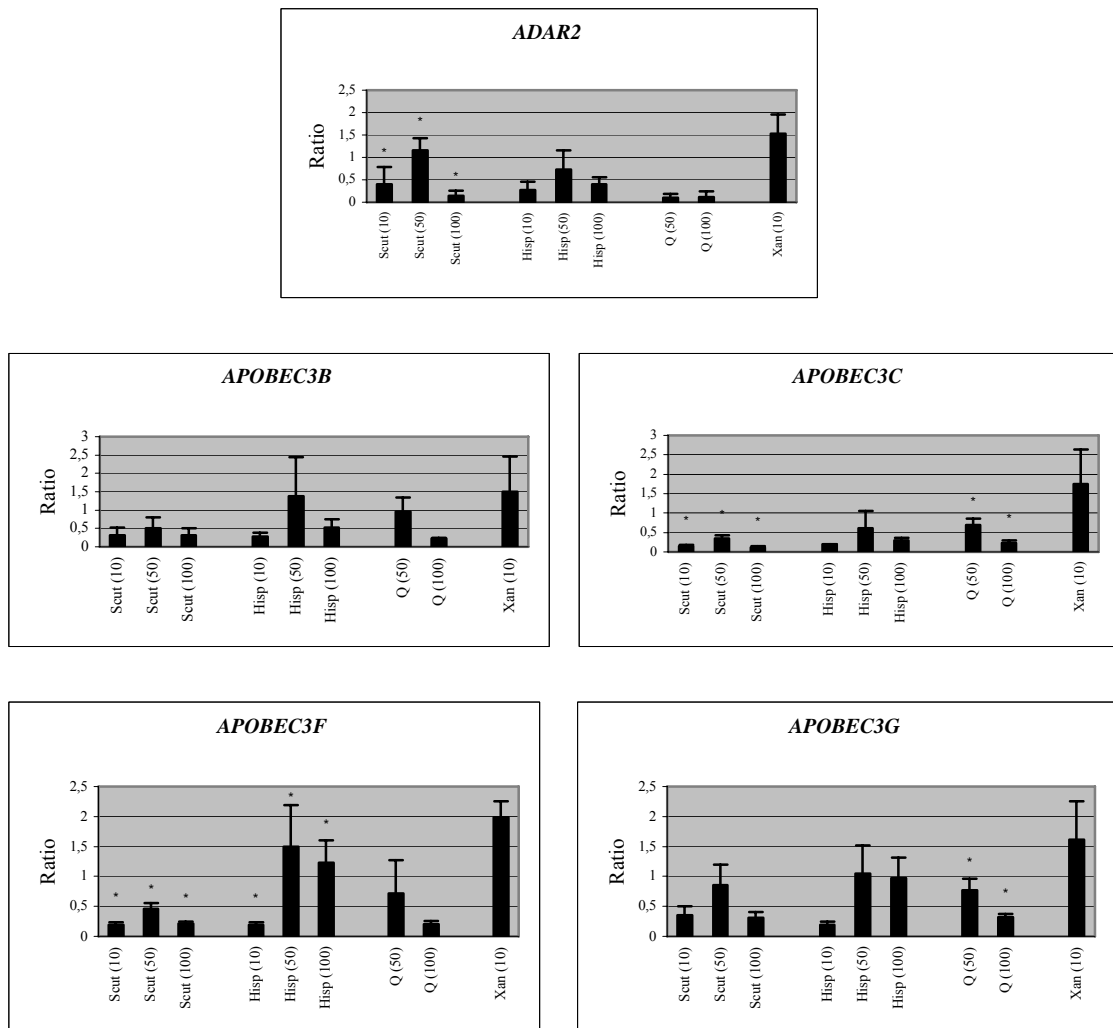


Abb. 3.38: Relative Expressionswerte der Gene *ADAR2*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* in HL-60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Scutellarein (Scut) (10/50/100 μM), Hispidulin (Hisp) (10/50/100 μM), Quercetin (Q) (50/100 μM) und Xanthohumol (Xan) (10 μM). Aufgetragen sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung der relativen Expressionswerte aus unabhängigen Realtime-PCR-Experimenten. * : signifikante Veränderung relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen; Ratio = 1) (One-way-Anova; Kruskal-Wallis-Test; $p < 0,05$). (Für Xanthohumol war eine Signifikanzbestimmung mittels dieses Tests nicht möglich.).

Das Gen *ADAR2* zeigte unter Flavonoidexposition ein ähnliches Expressionsmuster wie *ADAR1* (Abb. 3.36 und Abb. 3.38). Nach Exposition mit den Flavonoidlösungen Scutellarein, Hispidulin und Quercetin zeigten sich in Übereinstimmung mit *ADAR1* auch bei *ADAR2* im Vergleich zur Kontrolle verringerte Expressionstärken. Lediglich Scutellarein (50 μM) und Hispidulin (50 μM) wichen wiederum ab. Während sich die

ADAR2-Expression in den Konzentrationen 10 und 100 μM auf 0,2- bis 0,4-fache Expression für Scutellarein bzw. Hispidulin verringerte, lag die Expressionsratio für diese beiden Flavone (je 50 μM) bei Werten von 1,2- bzw. 0,7-facher Expression jeweils relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen).

Für Quercetin ist eine Expressionsratio von 0,1 für *ADAR2* bei beiden untersuchten Konzentrationen ermittelt worden. Für *ADAR1* wurde nach Exposition mit Quercetin eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expressionsstärke in HL-60-Zellen beobachtet. Dabei sank die Expressionsratio unter Quercetinexposition auf Werte von 0,7 bzw. 0,4 (für die Konzentrationen 50 bzw. 100 μM).

Nach Exposition mit Xanthohumol (10 μM) zeigte *ADAR2* in den Realtime-PCR-Analysen keine verringerte Expression im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Als Expressionsratio wurde ein Wert von 1,5 ermittelt. Für *ADAR1* ist ein Wert von 1,2-facher Expression relativ zur Kontrolle erzielt worden (Abb. 3.36).

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Um die Flavonoide Hispidulin, Scutellarein, Quercetin und Xanthohumol hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Wirkung in HL-60-Zellen zu untersuchen, wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Hierbei wurde die Expression der Gene *STK4*, *CHD4*, *ARHGDIB*, *IL16*, *ISG20*, *PFNI* und *SOD2* nach Flavonoidexposition (signifikant) auf 0,3-0,4-fache Expressionsstärke im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Diese Gene zählen vor allem zur Klasse der für Strukturen der Antigenaufnahme bzw. der Signaltransduktion kodierenden Gene. *IL16* zählt zu den Entzündungsmediatoren (Deng und Shi, 2006). Das erhaltene Expressionsmuster weist auf eine antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung der untersuchten Flavonoide hin und spiegelt das (cyto)protektive Profil dieser Substanzen wider.

Die Expression von *ADAR1* wurde nach Flavonoidexposition am stärksten und am konsistentesten verändert. Die Expression dieses Gens wurde von allen vier untersuchten Flavonoidlösungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in den Array-Experimenten signifikant reduziert. Unter Scutellarein-Einfluss zeigte sich eine konzentrationsabhängige Expressionsverringering von *ADAR1*.

Die Ergebnisse aus den Arrays ließen sich mittels Realtime-PCR beispielhaft für vier ausgewählte Gene bestätigen. Im Falle von *ADAR1* fand eine Verifizierung der Ergebnisse zusätzlich auch auf Proteinebene mittels Western Blots statt.

ADAR reguliert, als sog. „RNA editing-Gen“, eine posttranskriptionale Modifikation, die RNA-Editierung. Alle bekannten neuronalen A-zu-I-Editierungen werden dabei durch *ADAR1* und *ADAR2* katalysiert (Schmauss und Howe, 2002).

Auch der Effekt von Flavonoiden auf die Expression von *ADAR2* wurde mittels Realtime-PCR untersucht. Dabei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie für *ADAR1*. Nach Exposition mit Scutellarein, Hispidulin und Quercetin verringerte sich die Expression beider Gene; nach Xanthohumol-Exposition zeigte sich keine Herabregulierung.

Darüber hinaus wurden Effekte von Flavonoiden auf die Expression weiterer RNA editing-Gene, ausgewählte Mitglieder der *APOBEC3*-Genfamilie, untersucht. Dabei veränderte sich das Expressionsmuster von *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* nahezu einheitlich nach Flavonoidexposition. Unter Einfluss von Scutellarein, Hispidulin und Quercetin ergaben sich Expressionsfaktoren zwischen 0,8 und 0,2 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte HL-60-Zellen). Nach Exposition mit Xanthohumol stiegen die Expressionsfaktoren hingegen auf Werte zwischen 1,5 und 2,0 relativ zur Kontrolle.

Damit ist zum ersten Mal gezeigt worden, dass Flavonoide die Expression von sog. „RNA editing-Genen“ beeinflussen können. Dies eröffnet ganz neue Möglichkeiten von Wirkmechanismen dieser Stoffgruppe insbesondere auch im Hinblick auf neuroprotektive, immunmodulatorische sowie virologische Fragestellungen.

3.4 Beeinflussung der Exzitotoxizität am Beispiel der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2

Als Exzitotoxizität wird die Apoptose von Nervenzellen, ausgelöst aufgrund übermäßig freigesetzter Neurotoxine, z.B. Glutamat, bezeichnet (Bruno et al., 1993; Castillo und Babson, 1998). Exzitotoxizität kann an Prozessen sowohl akuter, als auch chronischer neurologischer Erkrankungen beteiligt sein und wird unter anderem mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson, M. Huntington oder M. Alzheimer in Verbindung gebracht (Beal, 1992; Müller, 1998).

Glutamatrezeptoren, insbesondere AMPA-Rezeptoren, stellen aufgrund ihrer Bedeutung bei der Regulierung der Ca^{2+} -Permeabilität der Kanäle wichtige Mediatoren der Exzitotoxizität dar (Choi, 1992; Rothman und Oley, 1995). So nimmt man an, dass RNA editing in Glutamatrezeptoren an Prozessen der Exzitotoxizität beteiligt ist (Vollmar et al., 2004). Aber auch ein Zusammenhang mit dem Auftreten neurologischer Erkrankungen wie Epilepsie wird diskutiert (Beal, 1992).

Aus den unter Punkt 3.3 beschriebenen Genexpressionsversuchen war bekannt, dass die hier untersuchten Flavonoidlösungen die Expression sogenannter „RNA editing-Gene“ verändern. So zeigte beispielhaft das Gen *ADARI* in den Array-Experimenten sowohl die stärksten, als auch die konsistentesten Expressionsverringerungen nach Flavonoidexposition. Des Weiteren wurde auch die Expression von *ADAR2* und von Mitgliedern der *APOBEC3*-Genfamilie beeinflusst.

Um die funktionellen Effekte einer durch Flavonoide veränderten Expression dieser Gene in HL-60-Zellen zu untersuchen, wurde die AMPA-Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 gewählt.

Abbildung 3.39 zeigt die genomische Organisation der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2. Wie im Abschnitt 2.3.4.3 bereits beschrieben, besitzt GluR 2 zwei bekannte RNA editing-Stellen, die sog. Q/R- und die R/G-Position. Darüber hinaus liegt GluR 2 nach heutigem Kenntnisstand in zwei Spleißvarianten, den sog. „flip“- und „flop“-Varianten vor (Zhou, 2001; Vollmar, 2004) (Abb. 3.39 und 3.41).

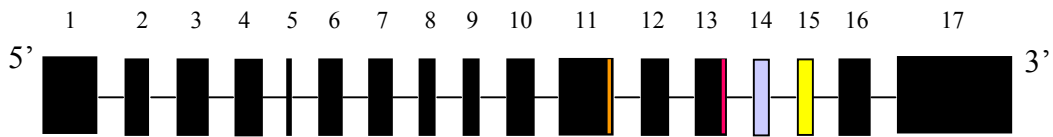


Abb. 3.39: Genomische Organisation der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 mit 17 Exons. Eingezeichnet sind die beiden RNA editing-Positionen, Q/R (orange) und R/G (rot), sowie die alternativ gespleißten Exons flop (blau) und flip (gelb).

3.4.1 Spleißvarianten von GluR 2

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Substanzen Scutellarein und Xanthohumol Einfluß auf das Auftreten verschiedener Spleißvarianten von GluR 2 in HL-60-Zellen nehmen. Hierzu wurde mittels der Primer R/G-V48+ und flip/flop-, welche die aus der Literatur beschriebenen Spleißstellen flankieren, ein PCR-Produkt amplifiziert und anschließend mittels Gelelektrophorese ausgewertet (Abb. 3.40).

Dabei traten für Scutellarein zwei Amplicons unterschiedlicher Länge auf. Je nach Konzentration war das kürzere, ca. 500 bp lange Amplicon (für 10 und 50 μM), bzw. für 100 μM das längere, ca. 600 bp-Amplicon, zu beobachten. In der Kontrolle (unbehandelte Zellen) zeigten sich beide Amplicons.

Für Xanthohumol trat in der Konzentration 10 μM nur das längere Amplicon auf.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, um welche Spleißvarianten es sich jeweils handelte, wurden die beiden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, hieraus die DNA extrahiert und mittels der Primer R/G-V48+ und flip/flop- sequenziert.

Dabei ergab sich folgendes Ergebnis:

Das 500 bp lange Amplicon wurde durch Sequenzabgleich zur GluR 2-Sequenz als die in der Literatur beschriebene „flip“-Variante identifiziert. Bei dieser Variante fehlt das flop-Exon vollständig (Abb. 3.41).

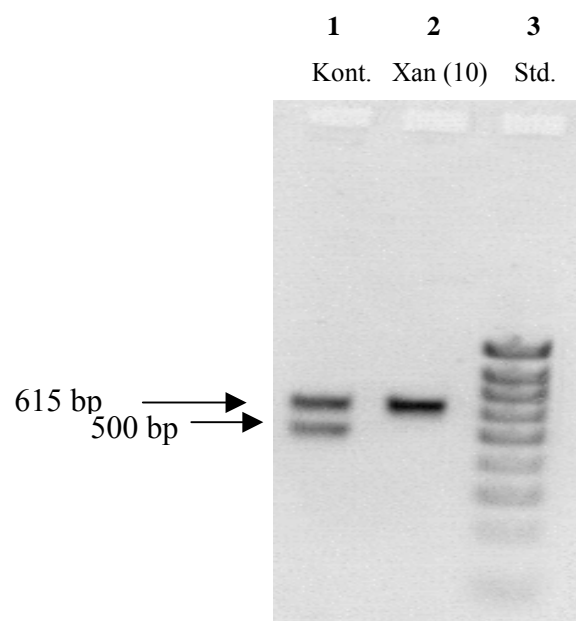
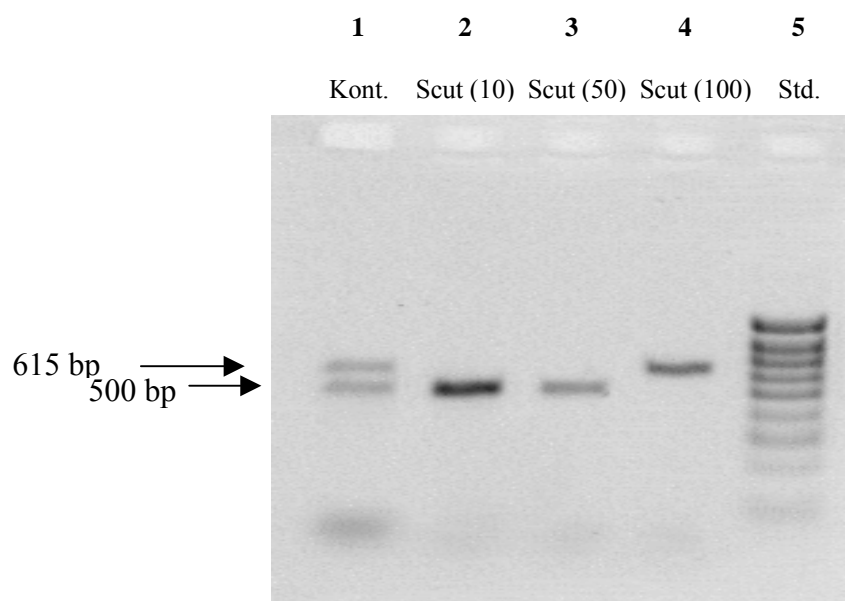


Abb. 3.40: Gelelektrophorese der mittels der Primer R/G-V48+ und flip/flop- amplifizierten PCR-Produkte von GluR 2 mit der RNA aus HL-60-Zellen nach Exposition mit Scutellarein (Scut) (10/50/100 μ M) (oben) bzw. Xanthohumol (Xan) (10 μ M) (unten) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle; Kont.). Mit aufgetragen ist ein 100 bp Standard (Std.).

Das längere Amplikon hingegen stellt eine neue, in der Literatur noch nicht beschriebene Spleißvariante dar. Bei dieser Variante des GluR 2-Transkriptes sind sowohl flip-, als auch flop-Exon vorhanden.

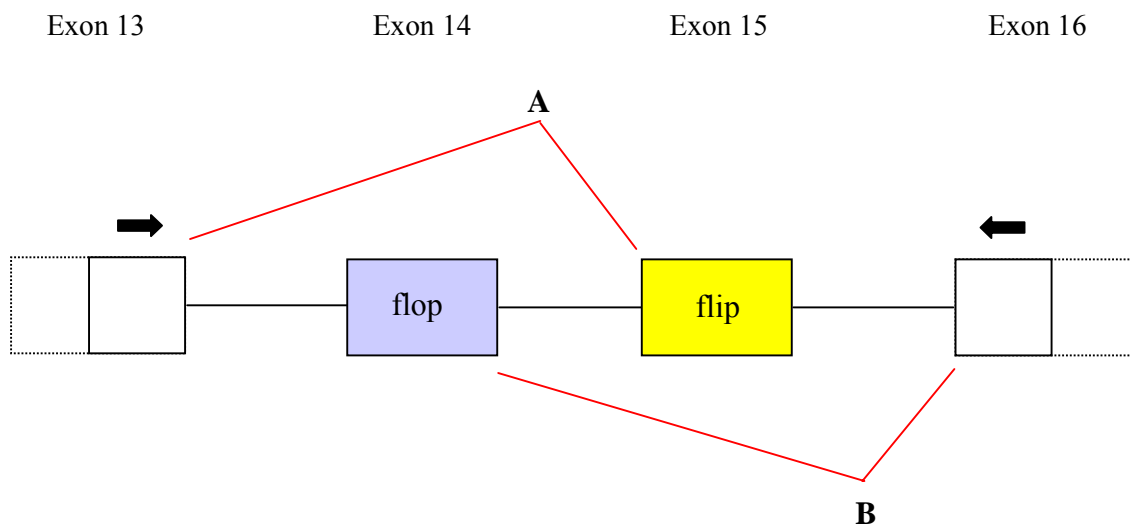


Abb. 3.41: Schematische Darstellung der erwarteten Spleißvarianten „flip“ (**A**) und „flop“ (**B**) des GluR 2-Transkriptes. Eingezeichnet sind die Positionen der für die PCR verwendeten Primer: R/G-V48+ in Exon 13 und flip/flop- in Exon 16.

Aus diesen mittels PCR durchgeführten Experimenten können lediglich qualitative Aussagen über das Auftreten der verschiedenen Spleißvarianten getroffen werden. Um quantitative Schlüsse über die prozentuale Verteilung der jeweils vorkommenden Spleißvarianten unter dem Einfluß verschiedener Flavonoid-substanzen treffen zu können, wurden weitere, quantitativ ausgerichtete Experimente durchgeführt.

Vollmar et al. entwickelten 2004 einen enzymatischen Assay zur Quantifizierung von „flip“- und „flop“-Spleißvarianten der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2. Dabei wird anhand des stattgefundenen bzw. nicht-erfolgten Verdaus des PCR-Amplifikates mit den Enzymen *Stu* I und *Hga* I eine Differenzierung zwischen den beiden Spleißvarianten vorgenommen (Vollmar et al., 2004).

Analog hierzu wurde mittels flankierender Primer (R/G-V48+ und flip/flop-) ein 605 bp-langes PCR-Produkt amplifiziert. Dieses wurde bei den jeweiligen optimalen Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) mit *Stu* I bzw. *Hga* I über Nacht inkubiert und der Verdau anschließend mittels Gelelektrophorese ausgewertet.

Die Erkennungssequenz des Enzyms *Stu* I liegt im flop-Exon von GluR 2. Bei einem Restriktionsverdau spaltet *Stu* I das amplifizierte PCR-Produkt in zwei Fragmente mit je 183 bzw. 422 bp (Tabelle 3.3).

Die Erkennungssequenz des Enzyms *Hga* I liegt hingegen im flip-Exon von GluR 2. Nach dem Restriktionsverdau beträgt die Länge der beiden auftretenden Fragmente 287 bzw. 318 bp (Tabelle 3.3).

Anhand der Länge der erhaltenen Fragmente ist dann eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Varianten möglich.

Tabelle 3.3: Quantifizierung der „flip“- und „flop“-Spleißvarianten von GluR 2 mittels enzymatischen Verdau mit *Stu* I und *Hga* I.

Nachweis von „flip“- und „flop“-Spleißvarianten			
Enzym	Spez. Erkennungssequenz in	Länge des PCR-Amplifikates	Fragmentlängen nach Restriktionsverdau
<i>Stu</i> I	flop	605 bp	183 bp; 422 bp
<i>Hga</i> I	flip	605 bp	287 bp; 318 bp

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten waren die Banden nach Restriktionsverdau mit *Stu* I bzw. *Hga* I nur sehr schwach ausgeprägt. In diesem Zusammenhang war eine Quantifizierung des Auftretens der verschiedenen Spleißvarianten in HL-60-Zellen unter Flavonoideinfluß mittels dieses enzymatischen Assays nicht möglich.

Fasst man zusammen, so ergibt sich: AMPA-Rezeptoren stellen wichtige Mediatoren der Erregungstoxizität dar. In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass die AMPA-Glutamaterezeptoruntereinheit GluR 2 jeweils in zwei Formen auftritt (Zhou, 2001; Vollmar, 2004). Die durch alternatives Spleißen entstehenden Varianten werden als „flip“ bzw. „flop“ bezeichnet. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass darüber hinaus auch nicht-gespleißte GluR 2-Transkripte auftreten, in denen sowohl das flip-, als auch das flop-Exon enthalten sind.

Bei der Überprüfung von Flavonoiden hinsichtlich ihres Effektes auf das Spleißverhalten von GluR 2 wurden darüber hinaus folgende Beobachtungen gemacht: Die untersuchten Flavonoide scheinen das Spleißverhalten von GluR 2-Transkripten gerichtet zu verändern, ein einheitliches Muster war dabei aber nicht zu erkennen.

3.4.2 Editierung von GluR 2-Transkripten

Aber nicht nur die verschiedenen Spleißvarianten von GluR 2, sondern auch die „Q/R-editing“-Position der AMPA-Glutamaterezeptoruntereinheit GluR 2 wurde bezüglich einer Beeinflussung durch Flavonoidexposition in HL-60-Zellen von uns untersucht.

Die „Q/R-editing“-Position ist in der Transmembran-Region II (TM II) der Proteinstruktur der Untereinheit GluR 2 lokalisiert. Die in der genomischen DNA codierte Aminosäure Glutamin (Q) im Bereich des Exons 11 wird auf Ebene der messenger-RNA in die Aminosäure Arginin (R) umcodiert. Durch Bindung einer Adenosindeaminase an das Primärtranskript im Kern kommt es zur Bildung von Inosin aus Adenin (Rueter et al., 1995). Nachfolgend wird Inosin als Guanin interpretiert und das Triplet CAG für Glutamin (Q) wird zu CGG für Arginin (R). Aus diesem Grund wird dieser Vorgang auch als Q/R-Editierung bezeichnet.

Die Editierung der Q/R-Position ist für den Glutamaterezeptor von wesentlicher funktioneller Bedeutung. Als Folge der Editierung besitzt der Kanal eine geringere Leitfähigkeit (Swanson et al., 1996) und insbesondere eine verminderte Ca^{2+} -Leitfähigkeit (Hume et al., 1991; Verdoorn et al., 1991; Egebjerg und Heinemann,

1993; Washburn et al., 1997). Des Weiteren zeigt der Rezeptor eine veränderte Strom-Spannungs-Kennlinie (Dingledine et al., 1999).

Um die Q/R-Editierung der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 in HL-60-Zellen nach Flavonoidexposition zu analysieren und gleichzeitig zu quantifizieren, wurde die Methode der Sequenzierung gewählt.

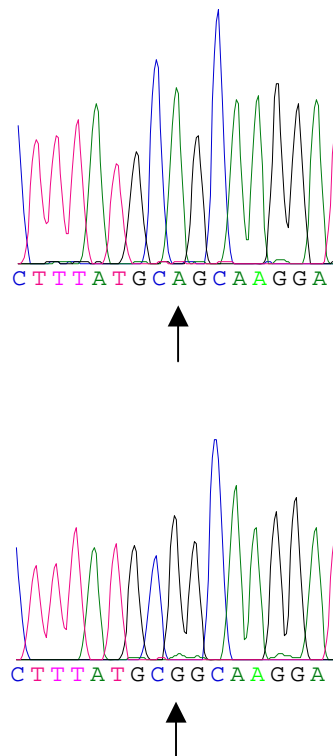


Abb. 3.42: Teil der Sequenz des GluR 2-Transkriptes. Mit einem Pfeil ist die nicht-editierte (A) (oben) bzw. editierte (G) (unten) Q/R-Position gekennzeichnet.

Hierzu wurden HL-60-Zellen für 24 h mit Scutellarein (50/100 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA überführt. Mit der cDNA aus mit Scutellarein inkubierten bzw. unbehandelten Zellen und den Primern Q/R-V13+ und Q/R-V24- wurde ein 369 bp langes PCR-Produkt amplifiziert. Nach der Gelelektrophorese wurden die gesuchten Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNAs extrahiert und kloniert. Zur Quantifizierung der

GluR 2 Q/R-Editierung wurden als Kontrolle 12 Klone der DNA aus unbehandelten HL-60-Zellen sowie 14 bzw. 10 Klone der DNA aus mit Scutellarein 50 μM bzw. 100 μM inkubierten Zellen sequenziert (Abb. 3.42).

Tabelle 3.4: Quantifizierung der Q/R-Editierung der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2. Untersucht wurden insgesamt 36 Klone der DNA aus unbehandelten HL-60-Zellen (Kontrolle), bzw. aus für 24 h mit Scutellarein (50/100 μM) inkubierten Zellen. Scutellarein zeigte hierbei eine signifikante Veränderung der Editierungshäufigkeit der Q/R-Position (Contingency tables-Test; Chi-square test for trend; $p < 0,0001$).

	unbehandelt	Scutellarein (50 μM)	Scutellarein (100 μM)
untersuchte Klone	12	14	10
G („editiert“)	12	14	2
A („nicht editiert“)	-	-	8

Bei der Editierung der Q/R-Stelle in der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 kommt es, kontrolliert durch ADAR, zu einem Austausch der Basen A zu I, wobei I im weiteren als G interpretiert wird.

Alle 14 untersuchten Klone der mit Scutellarein (50 μM) für 24 h inkubierten HL-60-Zellen waren, wie auch alle 12 Klone der Kontrollgruppe der unbehandelten Zellen, editiert. Von den 10 Klonen der mit Scutellarein (100 μM) behandelten HL-60-Zellen zeigten nur 2 Klone die editierte Base G. Acht Klone hingegen waren nicht editiert und wiesen an der Q/R-Position ein A auf (Tabelle 3.4). Scutellarein bewirkte somit eine signifikante Veränderung der Editierungseffizienz der Q/R-Position in GluR 2 im Modell der HL-60-Zellen.

Die Editierung der Q/R-Position der Glutamatrezeptoruntereinheit GluR 2 beeinträchtigt die Ca^{2+} -Permeabilität der Kanäle der mit dieser Untereinheit aufgebauten AMPA-Rezeptoren. Während Kanäle mit einer editierten GluR 2-Untereinheit keine Leitfähigkeit für zweifach geladene Ionen, insbesondere für Ca^{2+} -Ionen besitzen, verfügen Kanäle, die aus der nicht-editierten Version von GluR 2 aufgebaut sind, über eine ausgeprägte Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen (Hollmann et al., 1991).

Studien zeigten, dass in Gehirnen von adulten Ratten nahezu alle GluR 2 mRNAs editiert sind (Burnashev et al., 1992; Takuma et al., 1999). Während einige Autoren berichten, dass auch im humanen postnatalen Gehirn die Q/R-Position von GluR 2 zu über 99% editiert vorliegt (Sommer et al., 1991; Swanson et al., 1997), wird diese Aussage von anderen Forschern insoweit spezifiziert, als dies nur für gewisse Gehirnregionen korrekt sei. So wird die Editierungs-Effizienz der Q/R-Position der GluR 2 mRNA in der präfrontalen weißen Substanz insoweit beschrieben, dass nur 94% aller GluR 2 Q/R-Positionen editiert sind (Akbarian et al., 1995; Takuma et al., 1999). Dass der Grad der Editierung einer bestimmten Position innerhalb verschiedener Gehirnregionen variieren kann, wird auch in anderen Berichten erläutert (Burns et al., 1997; Niswender et al., 1999).

AMPA-Rezeptoren stellen aufgrund ihrer Bedeutung bei der Regulierung der Ca^{2+} -Permeabilität der Kanäle wichtige Mediatoren der Exzitotoxizität dar (Choi, 1992; Rothman und Oley, 1995; Rump et al., 1996). Exzitotoxizität kann an Prozessen sowohl akuter, als auch chronischer neurologischer Erkrankungen beteiligt sein (Beal, 1992). Inwieweit die Editierung der Q/R-Position in GluR 2 jedoch in direkter Beziehung mit neurologischen Erkrankungen steht, wird noch diskutiert.

Bei Untersuchungen der Editierungs-Effizienz der Q/R-Position von GluR 2 mRNA in neuronalen Zellen des ZNS von Gesunden gegenüber an ALS (*amyotrophic lateral sclerosis*) erkrankten Personen variierte die Editierungs-Effizienz von 0% bis hin zu 100% innerhalb der Gruppe der an ALS erkrankten Individuen. Die Q/R-Position war in dieser Gruppe zu 56% nicht vollständig editiert, während in der Kontrollgruppe eine 100%-ige Editierung nachgewiesen wurde (Kwak und Kawahara, 2005).

In anderen Studien konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen Ischämie und der Modifizierung der Q/R-Position der AMPA-Rezeptoren gefunden werden (Rump et al., 1996).

Zunächst wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Epilepsie und Veränderungen im Editierungsprozess der Q/R-Position in GluR 2 vermutet. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bis auf zwei Ausnahmen lagen alle untersuchten GluR 2-Transkripte aus dem Hippocampus der an Epilepsie erkrankten Patienten mit vollständig editierter Q/R-Position vor (Grigorenko et al., 1998).

Die funktionale Relevanz von uneditierten GluR 2-Untereinheiten wurde mittels Studien an Mäusen, welche ein GluR 2-Allel mit Arginin-Codon besitzen, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass ein erhöhter Calcium-Einfluß durch AMPA-Rezeptoren keine pathophysiologischen Konsequenzen bewirken muss (Kask et al., 1998).

Davon abgesehen wurde eine Beeinflussung von Gliazellen durch die mittels Editierung veränderte Ca^{2+} -Permeabilität der Rezeptoren aufgezeigt. Untersuchungen zeigten, dass eine reduzierte Ca^{2+} -Permeabilität von GluR 2-Rezeptoren im Kleinhirn zu morphologischen Veränderung in benachbarten Gliazellen und schließlich zum Verlust synaptischer Verbindungen führen kann (Iino et al., 2001).

Der Editierungs-reduzierende Effekt von Scutellarein und die dadurch erhöhte Ca^{2+} -Permeabilität der GluR 2-Rezeptoren stellt in diesem Zusammenhang, neben z.B. den antioxidativen Effekten von Flavonoiden, einen weiteren möglichen Mechanismus für die neuroprotektiven Eigenschaften dieser Stoffgruppe dar.

Kwak und Kawahara zeigten kürzlich, dass die Editierungs-Effizienz von GluR 2 in Zusammenhang mit der Aktivität von Proteinen der RNA-spezifischen Adenosin Deaminase steht (Kwak und Kawahara, 2005). Analog hierzu konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Verringerung der ADAR-Expression unter Scutellarein-Einfluß sowohl auf RNA- (*ADAR1* und *ADAR2*) als auch auf Proteinebene (*ADAR1*) nachgewiesen und eine Reduzierung der Editierungseffizienz der Q/R-Position in

GluR 2 nach Scutellarein-Exposition im Modell der dendritischen HL-60-Zellen gezeigt werden.

3.5 Untersuchung antiviraler Effekte anhand des Hepatitis B Virus

Die Aktivitäten von Flavonoiden in Bezug auf die Immunantwort bleiben nicht nur auf wirtsspezifische Effekte beschränkt, sondern beinhalten auch direkte Wirkungen auf humanpathogene Erreger.

Antivirale Effekte von Flavonoiden sind in der Literatur vielfältig beschrieben worden (Vlietinck et al., 1998; Middleton et al., 2000). Für das Flavonol Quercetin wurden bereits 1985 antivirale Effekte gegen Herpes-simplex-Viren Typ 1, Polio-Viren Typ 1, Parainfluenza-Viren Typ 3 und RS-Viren (*Respiratory-Syncytial-Viren*) gezeigt (Kaul et al., 1985). Auch eine Beeinflussung der Replikation von HIV durch Flavonoide hat man nachgewiesen (Fesen et al., 1993; Brinkworth et al., 1992; Hu et al., 1994; Middleton et al., 2000). Für Quercetin und Baicalein beobachtete man anti-HIV-Effekte durch Inhibierung der HIV-1 reversen Transkriptase (Tao, 1992; Ono et al., 1990). Für Wogonin wurde über anti-Hepatitis B Virus Effekte in einer humanen Zelllinie berichtet (Huang et al., 2000).

Für Untersuchungen antiviraler Effekte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde das Flavon Scutellarein verwendet. Eventuelle antivirale Effekte dieses Flavons sollten anhand des Hepatitis B Virus am Modell der primären humanen Hepatocyten nachgewiesen werden.

3.5.1 HBV-Experimente

Primäre humane Hepatocyten wurden mit dem Serum von an chronischer Hepatitis B erkrankten Patienten infiziert und bei täglichem Mediumwechsel für 21 Tage mit bzw. ohne Scutellarein (100 μ M) kultiviert (Experimente V1 und V2). Um Aussagen über den jeweiligen Infektionsgrad machen zu können, wurden die Virus-DNA-Konzentration, die HBsAg- und die HBeAg-Konzentrationen gemessen. Alle Bestimmungen wurden in den Zellüberständen jeweils an den Tagen 1, 2, 3 und dann jeden

zweiten Tag, d.h. an Tag 5, 7, 9 usw. bis zum Tag 21 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Scutellarein (100 μM) die HBV-Replikation der Hepatomzellen deutlich inhibieren konnte. Die antiviralen Effekte von Scutellarein waren sowohl anhand der Virus-DNA-Konzentration, als auch bei der HBs- und HBe-Antigenproduktion zu beobachten.

Im Detail ergaben sich die folgenden Ergebnisse.

3.5.1.1 HBV-DNA-Konzentration

Die Virusreplikation wurde vom Flavon Scutellarein (100 μM) inhibiert. Die DNA-Konzentration der Hepatitis B Viren verringerte sich hierbei um nahezu zwei Zehnerpotenzen im ersten Experiment (V1) bzw. um eine Zehnerpotenz in einem zweiten Versuch (V2).

Am Tag 0 wurde das infektiöse Serum auf die primären Hepatocyten gegeben. Hieraus resultierte eine hohe HBV-DNA-Konzentration im Zellüberstand am Tag 1. Durch nachfolgendes 10-maliges Waschen mit Zellkulturmedium innerhalb der folgenden zwei Tage wurden ungebundene Hepatitis B Viren entfernt, wodurch die Virus-DNA-Konzentration sowohl in den behandelten, als auch in den unbehandelten Zellen deutlich absank. Erst zwischen dem dritten und dem fünften Tag nach Infektion der Zellen kommt die Replikation von HBV in Gang, d.h. die Synthese von Hepatitis B Viren in den primären Hepatocyten wird gestartet. Folglich stieg die Konzentration an HBV-DNA ab diesem Zeitpunkt wieder an. Die mit Scutellarein (100 μM) inkubierten Zellen zeigten hierbei in zwei durchgeführten Experimenten einen sehr viel geringeren Anstieg der HBV-DNA-Kurve als die unbehandelten „Kontroll-Zellen“ (Abb. 3.43).

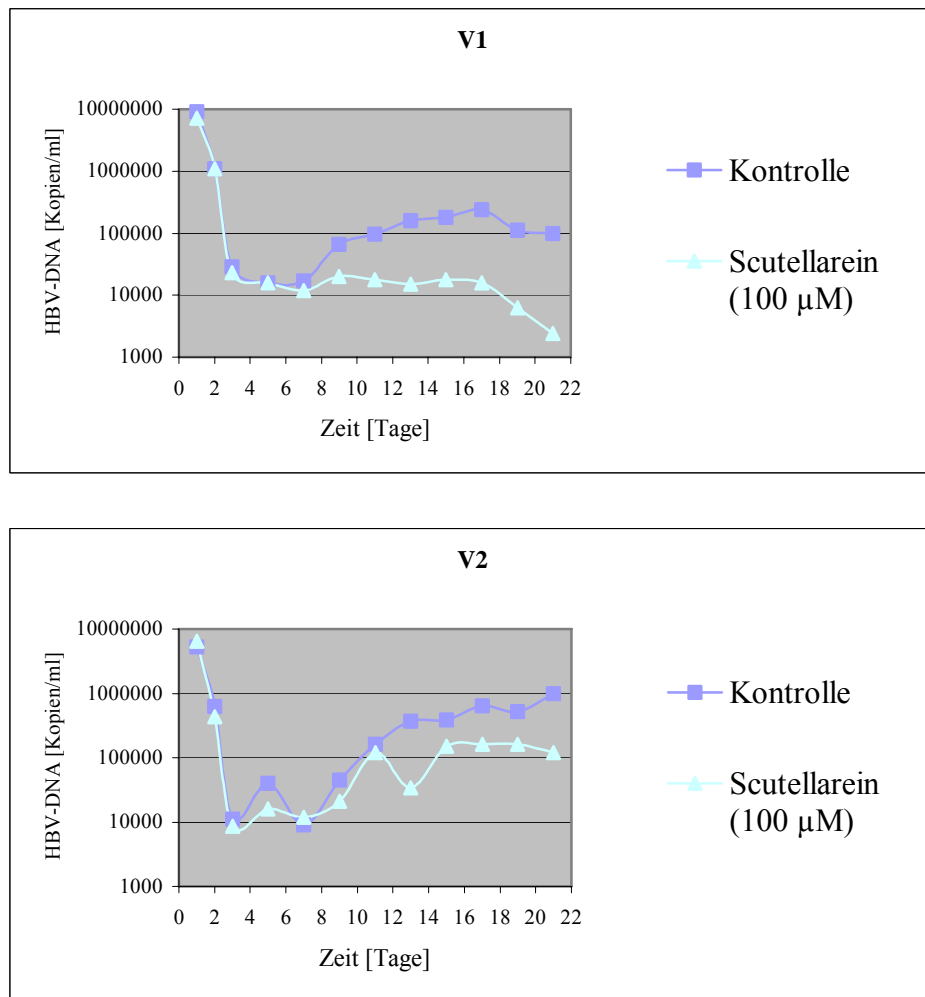


Abb. 3.43: Verlauf der Hepatitis B Virus Infektion von mit Scutellarein 100 μ M inkubierten Zellen (türkis) im Vergleich zur Kontrollkurve (blau) dargestellt anhand der Konzentration an HBV-DNA in Kopien je ml über einen Zeitverlauf von 21 Tagen nach Infektion der primären humanen Hepatocyten mit infektiösem Serum. Oben ist das Experiment V1, unten das Experiment V2 dargestellt.

3.5.1.2 HBs- und HBe-Antigenkonzentrationen

Die Antigene HBs und HBe stellen leicht nachweisbare serologische Marker dar, mittels derer Aussagen über den Verlauf einer HBV-Infektion gemacht werden können.

Sowohl die Konzentration des Oberflächenantigens HBs, als auch die Konzentration an HBe wurden in beiden Versuchsreihen (V1 und V2) von Scutellarein (100 μ M)

verringert. Beide Antigene zeigten den gleichen Kurvenverlauf wie in den DNA-Konzentrations-Graphen (Abb. 3.44 und 3.45).

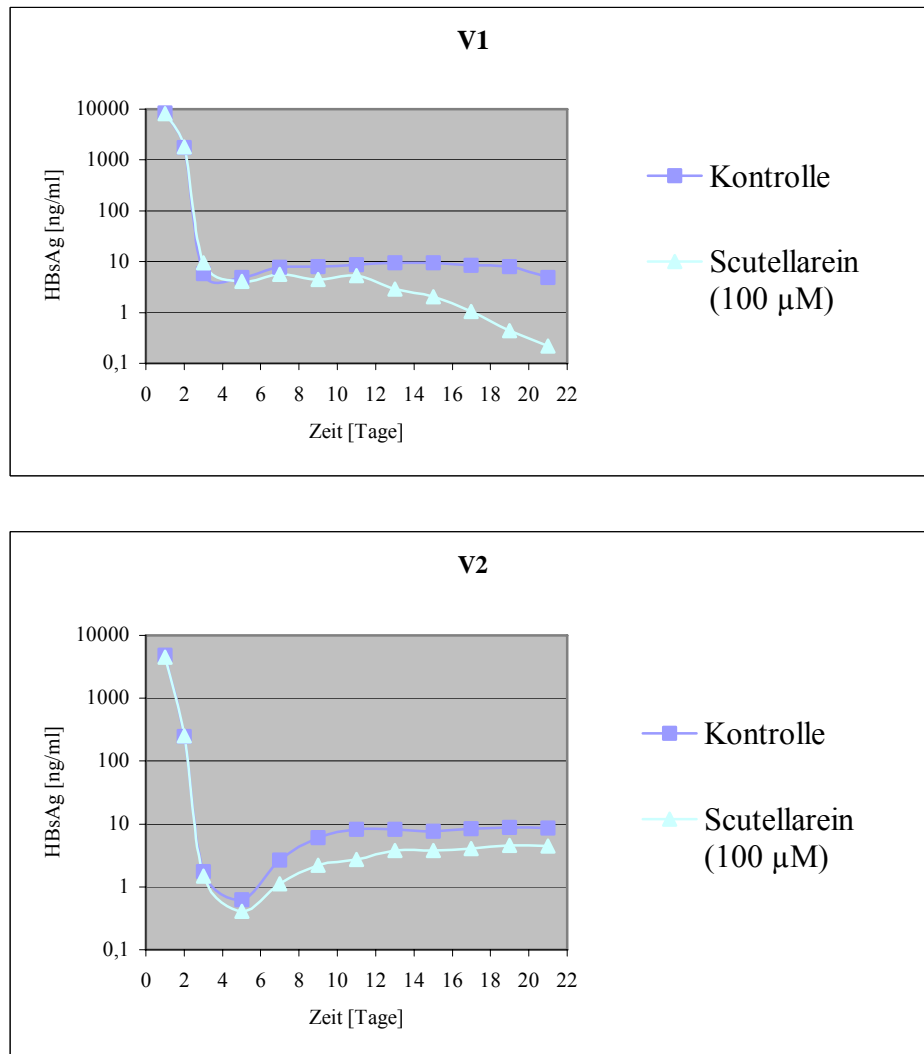


Abb. 3.44: Verlauf der Hepatitis B Virus Infektion von mit Scutellarein 100 µM inkubierten Zellen (türkis) im Vergleich zur Kontrollkurve (blau) dargestellt anhand der Konzentration an HBsAg in ng/ml über einen Zeitverlauf von 21 Tagen nach Infektion der primären humanen Hepatocyten mit infektiösem Serum. Oben ist Experiment V1, unten Experiment V2 dargestellt.

Zu Beginn der Versuchsreihen war eine hohe Antigenkonzentration aufgrund der Zugabe des infektiösen Serums zu beobachten. Es folgte eine Abnahme der Antigenkonzentrationen bis zum Start der Virusreplikation und anschließendem erneutem Anstieg der Antigenkonzentrationen. Scutellarein (100 µM) konnte hierbei die

Konzentration an Oberflächenantigen HBsAg um 40% im ersten Versuch (V1), bzw. um 48% in einem zweiten Experiment (V2) (im Vergleich zu den unbehandelten Zellen) verringern (Vergleich der maximalen HBsAg-Werte von mit Scutellarein-behandelten und unbehandelten PHH in beiden Infektionsversuchen) (Abb. 3.44).

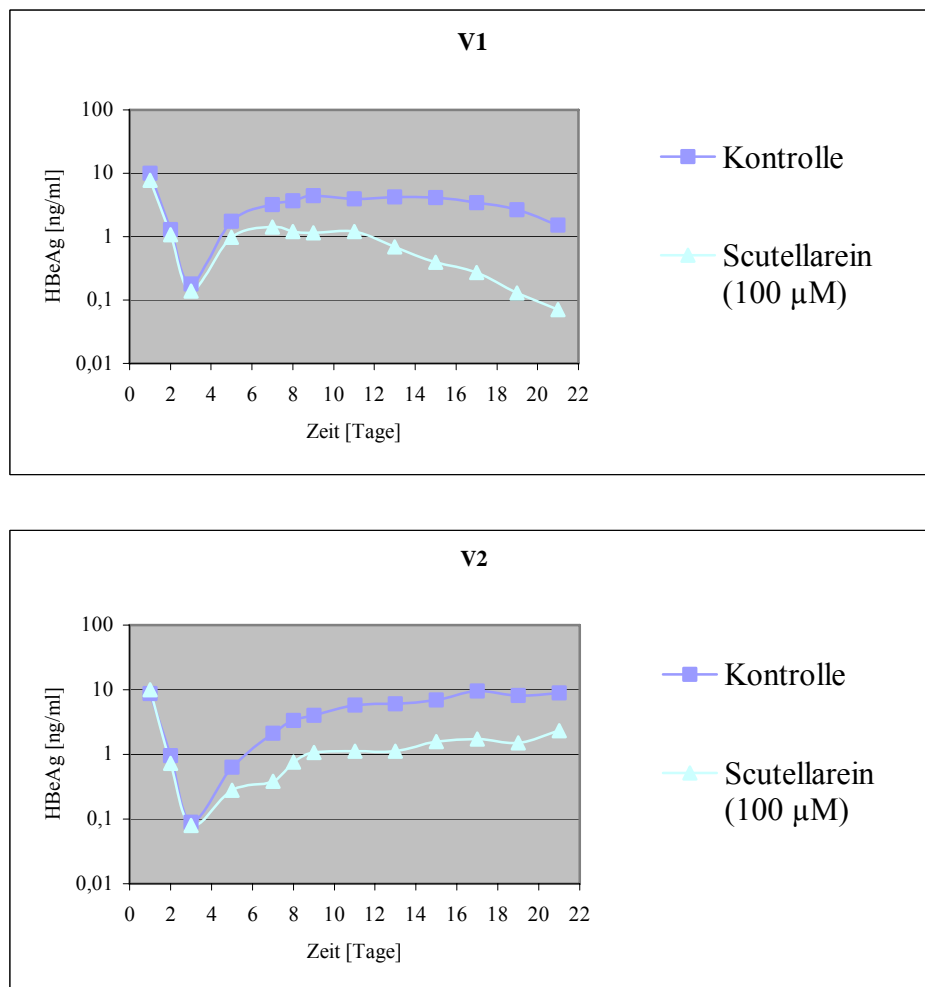


Abb. 3.45: Verlauf der Hepatitis B Virus Infektion von mit Scutellarein 100 µM inkubierten Zellen (türkis) im Vergleich zur Kontrollkurve (blau) dargestellt anhand der Konzentration an HBsAg in ng/ml über einen Zeitverlauf von 21 Tagen nach Infektion der primären humanen Hepatocyten mit infektiösem Serum. Oben ist Experiment V1, unten Experiment V2 dargestellt.

Das HBe-Antigen stellt den stabilsten Parameter bei der Analyse des Verlaufs einer Hepatitis B Infektion im verwendeten Versuchsmodell dar. Das HBeAg befindet sich, im Gegensatz zu HBsAg, weder in den infektiösen Viruspartikeln, noch in den nicht-infektiösen subviralen Partikeln des zur Infektion der Hepatocyten verwendeten Serums. Die somit zu Beginn des Infektionsversuchs im Vergleich zu HBsAg geringe Konzentration an HBeAg, kann durch die Waschschriffe an Tag 1 und 2 nach Infektion der Zellen aufgrund der geringen Größe von HBeAg und der sehr guten Löslichkeit dieses Antigens auf Werte bis zu 0,1 ng/ml gesenkt werden. Erst nach Start der Replikation der Hepatitis B Viren in den primären Hepatocyten steigt die HBeAg-Konzentration wieder deutlich an. Dabei kann bei HBeAg, im Gegensatz zu HBsAg, in den unbehandelten „Kontroll-Zellen“ auch meist die Anfangskonzentration an Antigen wieder erreicht werden.

Scutellarein (100 μ M) verringerte die HBe-Antigenkonzentration im Modell der primären humanen Hepatocyten um 68% im ersten Versuch (V1), bzw. um 82% in einem zweiten Experiment (V2) im Vergleich zur Kontrollbedingung. (Vergleich der maximalen HBeAg-Werte von mit Scutellarein-behandelten und unbehandelten PHH in beiden Infektionsversuchen) (Abb. 3.45).

Die unterschiedlichen Inhibitionseffekte von Scutellarein, gemessen anhand der beiden Antigene HBsAg und HBeAg, in beiden Experimenten (V1 und V2) kommen aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Zellchargen sowie unterschiedlicher Seren mit verschiedenen Virusisolaten zur Infektion der humanen primären Hepatocyten und hieraus resultierenden unterschiedlichen Infektionseffizienzen im verwendeten Zellmodell zu stande.

Die Ergebnisse beider Infektionsversuche V1 und V2 wurden (mittels jeweils anbei durchgeführter Standardkurve) normalisiert und der mittlere HBeAg-Inhibitionswert auf Signifikanz überprüft. Hierbei zeigte sich für Scutellarein (100 μ M) (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) eine signifikante (t-test; non-parametric test; Mann-Whitney Test; $p < 0,0001$) Reduzierung der HBe-Antigenproduktion im verwendeten Versuchsmodell der primären humanen Hepatocyten.

3.5.2 Cytotoxizitätsstudien von Scutellarein an primären humanen Hepatocysten

Um einen toxischen Effekt von Scutellarein in der Konzentration 100 μM als Ursache für eine inhibierende Wirkung auf die HBV-Replikation ausschließen zu können, wurden Cytotoxizitätsstudien im Verlauf beider Versuchsreihen (V1 und V2) durchgeführt. Die Vitalität der Zellen wurde dabei sowohl anhand morphologischer Parameter (Mikroskop), als auch auf Ebene der Stoffwechselaktivität (Umsetzung von AlamarBlue) kontrolliert.

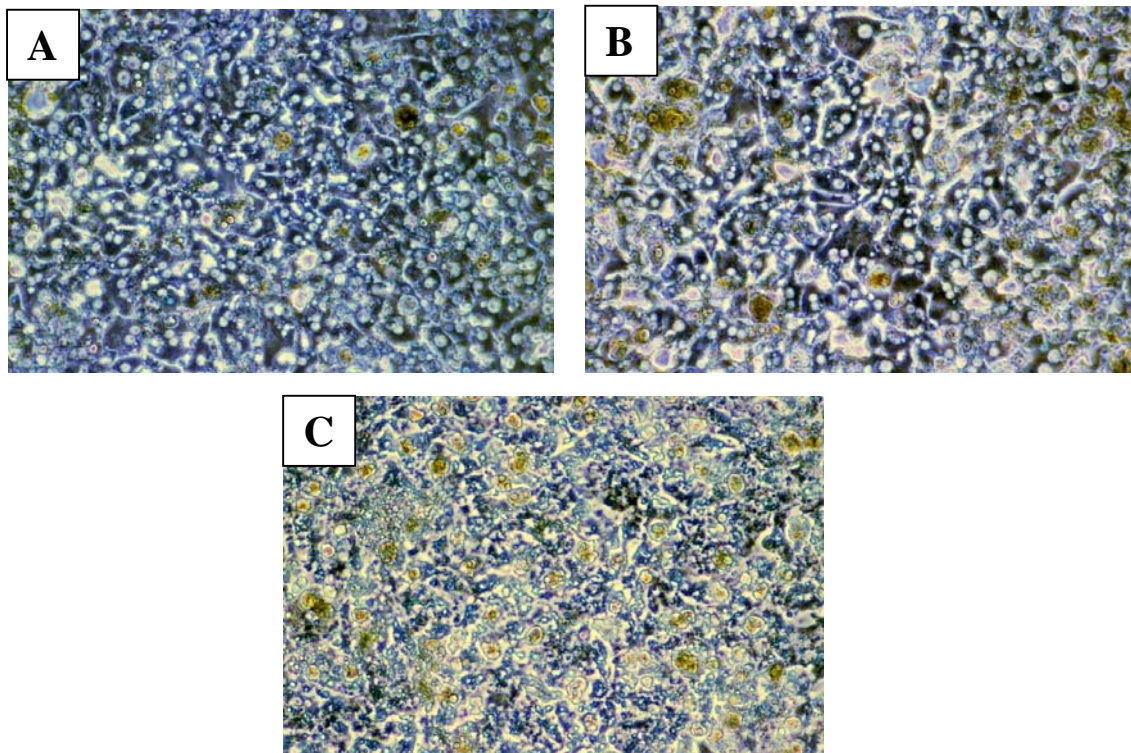


Abb. 3.46: Mikroskopische Aufnahmen der PHH der Versuchsreihe 1 (V1) am Tag 8 p.i.. **A)** Positivkontrolle (unbehandelte Zellen); **B)** Scutellarein (100 μM)-behandelte Zellen; **C)** Negativkontrolle (Zellen nach Antiseptikum-Exposition). Deutlich ist der toxische Effekt des Antiseptikums zu erkennen. Die mit Scutellarein-behandelten PHH zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine morphologischen Veränderungen, die auf einen toxischen Effekt von Scutellarein auf die Zellen hinweisen würden.

Am Tag 8 nach Infektion der Zellen zeigten sich in beiden Versuchsreihen (V1 und V2) keine morphologischen Veränderungen in den mit Scutellarein (100 μM) behandelten Hepatocysten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 3.46 und 3.47).

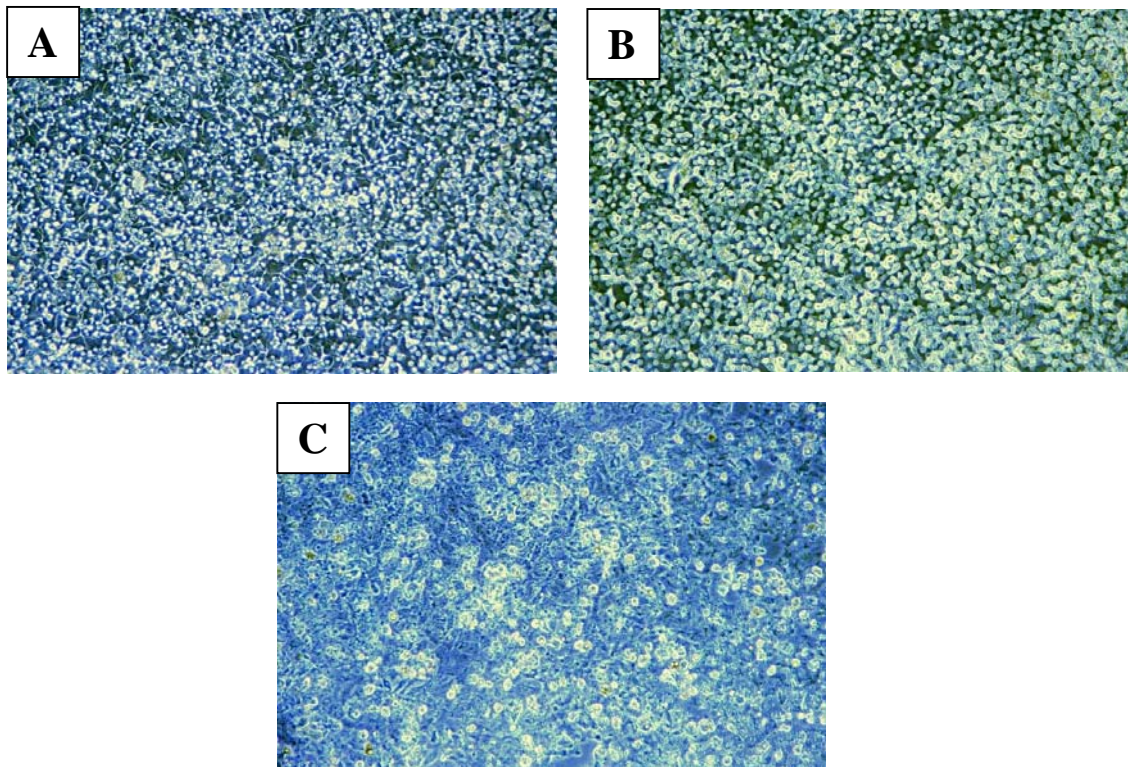


Abb. 3.47: Mikroskopische Aufnahmen der PHH der Versuchsreihe 2 (V2) am Tag 8 p.i.. **A)** Positivkontrolle (unbehandelte Zellen); **B)** Scutellarein (100 µM)-behandelte Zellen; **C)** Negativkontrolle (Zellen nach Antiseptikum-Exposition). Deutlich ist der toxische Effekt des Antiseptikums zu erkennen. Die mit Scutellarein-behandelten PHH zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine morphologischen Veränderungen, die auf einen toxischen Effekt von Scutellarein auf die Zellen hinweisen würden.

Auch auf Ebene der Stoffwechselaktivität wurde die Vitalität der Zellen am Tag 12 und am Tag 14 nach Infektion der Zellen (in der Versuchsreihe V2) bestimmt. Hierbei ergab sich in beiden Analysen kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit Scutellarein (100 µM) behandelten Zellen. Lediglich im Vergleich zu den nicht infizierten PHH ist ein Vitalitätsverlust durch die Infektion der Zellen mit Hepatitis B erkennbar (Abb. 3.48).

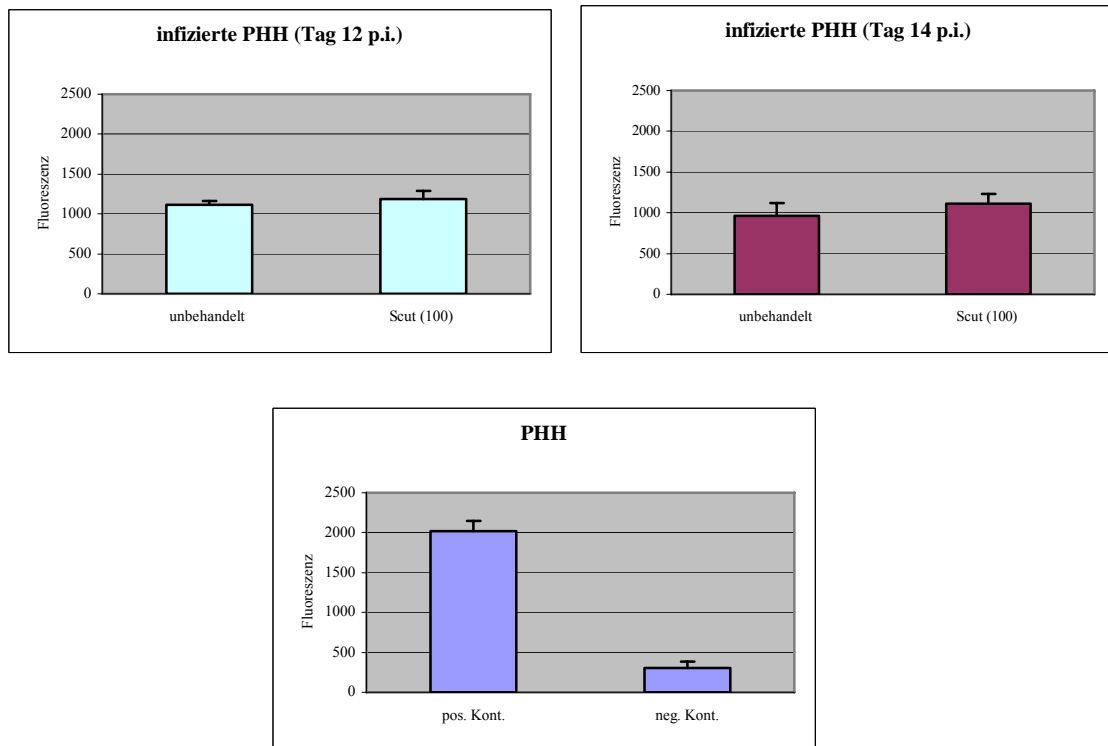


Abb. 3.48: AlamarBlue-Cytotoxizitätstest. Dargestellt ist die Fluoreszenz (als Parameter für die Vitalität der Zellen) der unbehandelten sowie mit Scutellarein (Scut) (100 μ M) behandelten HBV-infizierten PHH am Tag 12 (türkis), bzw. Tag 14 (violett) nach Infektion der Zellen (p.i.) der Versuchsreihe V1. Zum Vergleich ist die Fluoreszenz unbehandelter (pos. Kont.) sowie mit 70%-Ethanol für 15 min. inkubierter (neg. Kont.) nicht-infizierter PHH (blau) mit angegeben.

Somit kann ein toxischer Effekt von Scutellarein (100 μ M) auf primäre humane Hepatocyten als Ursache für eine inhibierende Wirkung auf die HBV-Infektion dieser Zellen ausgeschlossen werden.

3.5.3 Wirkmechanismus

In einem nächsten Schritt wurde versucht, den Scutellarein-Wirkmechanismus gegenüber Hepatitis B Viren zu ermitteln.

3.5.3.1 RNA Editierung als möglicher antiviraler Mechanismus

Antivirale Agentien können in unterschiedlichen Stufen des HBV-Replikationszyklus eingreifen und damit eine Senkung der Viruslast hervorrufen (Fields und Green, 1982; Weiß, 1995).

In der Literatur wird über RNA Editierung berichtet, einem posttranskriptionalem Mechanismus, dessen Modifikationen bei verschiedenen antiviralen Effekten von Bedeutung sein kann. RNA Editierung beinhaltet sowohl einzelne, als auch mehrere Basen umfassende Insertionen oder Deletionen, als auch Substitutionen. Dies kann oftmals entscheidende Auswirkungen auf die jeweilige Proteinfunktionalität haben. Der gezielte Austausch einzelner Basen wird durch die sog. „RNA editing-Gene“ kontrolliert. Je nach Expressionsstärke dieser Gene wird eine RNA Editierung veranlasst. RNA Editierung und seine Folgen sind vor allem für neuronale Rezeptoren, z.B. den Glutamatrezeptoren (vgl. 2.3.4.3) bekannt, werden aber in jüngster Zeit auch mit antiviralen Effekten in Verbindung gebracht (vgl. 2.3.5.8).

Aus den Genexpressionsstudien mit HL-60-Zellen (vgl. 3.3) war bekannt, dass Scutellarein die Expression verschiedener „RNA editing-Gene“ beeinflusst. So verringerte es die Expression von *ADAR1* und *ADAR2*, aber auch von Mitgliedern der *APOBEC3*-Familie, wie z.B. von *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G*. In diesem Zusammenhang erschien eine mögliche Beteiligung von „RNA editing“ am antiviralen Wirkmechanismus von Scutellarein gegenüber Hepatitis B plausibel.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten RNA Editierungen nachzuweisen. Zum einen kann diese posttranskriptionale Modifizierung auf Enzymebene, wie in den Genexpressionsstudien sog. „RNA editing-Gene“ in HL-60-Zellen durchgeführt, analysiert werden. Eine weitere, hier in den humanen primären Hepatocyten verwendete Option, bietet sich auf Sequenzebene an.

Zur Darstellung von RNA Editierungen wurde das HBV-Infektionsmodell der PHH mit 8-tägiger Versuchsdauer wiederholt, wobei an den Tagen 1, 4 und 8 jeweils Zellen mit

und ohne Scutellarein (100 μM)-Behandlung geerntet wurden (Experimente V3 und V4).

Spezielle Regionen im HBV-Genom wurden mittels Klonierungen und anschließenden Sequenzierungen überprüft.

Hierzu wurden zwei Regionen im HBV-Genom ausgewählt (Abb. 3.49):

- eine Region mit bisher unbekannter Funktionalität, im Polymerase (P)-Gen zwischen C- und S-Gen, ins prä-S1-hineinreichend (Region I). Für diese Region sind in der Literatur bereits „RNA editing-Stellen“ beschrieben worden (Rösler et al., 2005);
- eine weitere Region im Bereich zwischen X- und C-Gen, die den Basic Core Promotor (BCP) und das ϵ -Signal beinhaltet (Region II). Der BCP ist eines der funktionalen Elemente des Core Promotors (CP) des Hepatitis B Virus. Der BCP ist verantwortlich für die richtige Initiation der Transkription sowohl von prägenomischer (pg) RNA, als auch von prä-core (pre-C) RNA (Kramvis und Kew, 1999). Der zweite bekannte funktionelle Bereich innerhalb der ausgewählten Region ist das ϵ -Signal. Das ϵ -Signal besitzt eine entscheidende Rolle für die Verpackung der viralen RNA ins Nukleokapsid (Junker-Niepmann et al., 1990; Pollack und Ganem, 1993; Knaus und Nassal, 1993) und ist somit für den gesamten HBV-Replikationszyklus von Bedeutung (vgl. 2.3.5.5).

Aus einem der unter 3.5.1 beschriebenen Infektionsversuche (Experiment V1) wurde die HBV-DNA der Viruspartikel aus den Zellüberständen (ohne bzw. mit Scutellarein-Behandlung), bzw. die HBV-RNA aus den Hepatocyten (Experiment V3) isoliert und für die Sequenzierungsexperimente verwendet. Dabei wurden, um auch den zeitlichen Verlauf beobachten zu können, beide Regionen in der HBV-DNA aus den Zellüberständen an den Tagen 1, 9 und 21, und in der HBV-RNA jeweils an den Tagen 4 und 8, aus sowohl mit Scutellarein (100 μM)-behandelten, als auch unbehandelten Proben untersucht.

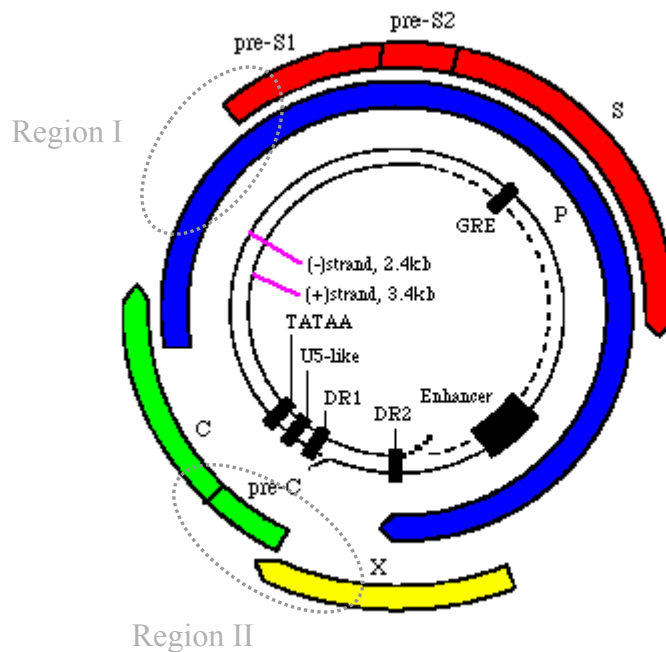


Abb. 3.49: Die sequenzierten Regionen des HBV-Genoms: Region I und Region II.

Jeweils 451 bp (Region I) bzw. 324 bp (Region II) lange Bereiche in den beiden zu untersuchenden Regionen wurden mittels flankierender Primer (HBV-2+/HBV-2- für Region I bzw. HBV-E1+/HBV-E1- für Region II) in der PCR amplifiziert und anschließend kloniert. Pro Zeitpunkt (Tag) und „Behandlung“ wurden mindestens 10 Klone für Region I bzw. II von RNA und DNA sequenziert.

3.5.3.1.1 Region I

Insgesamt wurden 213 Klone von RNA bzw. DNA in der Region I untersucht (Tabelle 3.5). Trotz der großen Anzahl an untersuchten Klonen konnten nur sporadische Einzelbasenaustausche beobachtet werden (Abb. 3.50).

Tabelle 3.5: Untersuchte Klone in RNA bzw. DNA der Region I.

RNA			
unbehandelt		Scutellarein (100 µM)	
Tag 4	Tag 8	Tag 4	Tag 8
13	17	12	15

DNA					
unbehandelt			Scutellarein (100 µM)		
Tag 1	Tag 9	Tag 21	Tag 1	Tag 9	Tag 21
25	23	25	29	27	27

Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht einiger Aminosäureaustausche in Klonen der DNA. Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Scutellarein (100 µM) behandelten Zellen ergaben sich dabei nicht.

Tabelle 3.6: Übersicht einiger Einzelbasenaustausche in den untersuchten Klonen der DNA der Region I (unbehandelt bzw. mit Scutellarein (100 µM) behandelt an den Tagen 1, 9 und 21 nach Infektion der Zellen).

Aminosäureposition im Klon	DNA					
	unbehandelt			Scutellarein (100 µM)		
	Tag 1	Tag 9	Tag 21	Tag 1	Tag 9	Tag 21
384	22 × G 3 × A	20 × G 3 × A	25 × G	28 × G 1 × A	26 × G 1 × A	27 × G
178	25 × T	22 × T 1 × C	22 × T 3 × C	29 × T	27 × T	27 × T
69	19 × T 6 × C	18 × T 5 × C	18 × T 7 × C	27 × T 2 × C	24 × T 3 × C	22 × T 5 × C
54	24 × T 1 × C	23 × T	21 × T 4 × C	21 × T 8 × C	22 × T 5 × C	24 × T 3 × C

3.5.3.1.2 Region II

Auch in der Region II fanden sich, wie schon in der Region I, nur sporadische Einzelbasenaustausche sowohl in der RNA, als auch in der DNA in den hier insgesamt 127 untersuchten Klonen (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Untersuchte Klone in RNA bzw. DNA der Region II.

RNA			
unbehandelt		Scutellarein (100 µM)	
Tag 4	Tag 8	Tag 4	Tag 8
15	17	12	14

DNA					
unbehandelt			Scutellarein (100 µM)		
Tag 1	Tag 9	Tag 21	Tag 1	Tag 9	Tag 21
12	12	10	15	10	10

3.5.3.1.3 Region I nach Zugabe von PNA

Da RNA Editierungen, wenn überhaupt, nur in einem sehr geringen Prozentsatz vorkommen würde (Noguchi et al., 2005), könnte es sein, dass die Anzahl der untersuchten Klone noch zu gering ist, um eine realistische Wahrscheinlichkeit zu haben, überhaupt eine solche spezifische Variante finden zu können.

Um diese Wahrscheinlichkeit zu erhöhen wurde versucht, analog zu Literaturangaben durch Zugabe eines spezifisch modifizierten Oligos, PNA (*peptide nucleic acid*), die Anzahl an editierten Varianten im PCR-Amplifikat anzureichern (Noguchi et al., 2005; Kirishima et al., 2002). Eine quantitative Aussage ist nach dieser Modifikation allerdings nicht mehr möglich.

Eine PCR mit PNA (PNA-2) wurde nur für die Region I durchgeführt. Hier wurden pro Zeitpunkt (Tag 1/9/21 für DNA und Tag 4/8 für RNA) und „Behandlung“ (mit Scutellarein (100 µM) bzw. unbehandelt) jeweils mindestens 7 Klone für RNA und DNA untersucht (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Untersuchte Klone in RNA bzw. DNA der Region I nach Zugabe von PNA (PNA-2) zur PCR.

RNA			
unbehandelt		Scutellarein (100 μM)	
Tag 4	Tag 8	Tag 4	Tag 8
15	8	8	8

DNA					
unbehandelt			Scutellarein (100 μM)		
Tag 1	Tag 9	Tag 21	Tag 1	Tag 9	Tag 21
7	8	8	8	7	16

Nach Zugabe von PNA zur PCR konnten erneut nur sporadische Einzelbasenaustausche beobachtet werden (Tabelle 3.9 und 3.10). Im Vergleich zur PCR ohne Zugabe von PNA war kein erhöhter Austausch an Basen zu erkennen (Abb. 3.50 und 3.53). Lediglich an der direkten PNA-Bindungsstelle (Aminosäurepositionen 365-382 nt der Region I) war eine erhöhte Basen-Austausch-Häufigkeit sowohl in den RNA-, als auch in den DNA-Proben zu finden (Abb. 3.51 und 3.52).

Tabelle 3.9: Übersicht einiger Einzelbasenaustausche in den untersuchten Klonen der RNA der Region I nach Zugabe von PNA zur PCR (unbehandelt bzw. mit Scutellarein (100 μ M) behandelt an den Tagen 1, 9 und 21 nach Infektion der Zellen).

Aminosäureposition im Klon	RNA			
	unbehandelt		Scutellarein (100 μ M)	
	Tag 4	Tag 8	Tag 4	Tag 8
378	13 \times G 1 \times A 1 \times T	5 \times G 3 \times A	8 \times G	8 \times G
376	13 \times A 1 \times G 1 \times C	8 \times A	8 \times G	3 \times A 5 \times G
374	14 \times G 1 \times A	8 \times G	8 \times G	5 \times G 3 \times A
145	15 \times A	6 \times G 2 \times A	8 \times G	4 \times G 4 \times A

Tabelle 3.10: Übersicht einiger Einzelbasenaustausche in den untersuchten Klonen der DNA der Region I nach Zugabe von PNA zur PCR (unbehandelt bzw. mit Scutellarein (100 μ M) behandelt an den Tagen 1, 9 und 21 nach Infektion der Zellen).

Aminosäureposition im Klon	DNA					
	unbehandelt			Scutellarein (100 μ M)		
	Tag 1	Tag 9	Tag 21	Tag 1	Tag 9	Tag 21
378	6 \times G 1 \times T	8 \times G	6 \times G 2 \times A	8 \times G	6 \times G 1 \times A	14 \times G 2 \times T
376	3 \times A 4 \times G	3 \times A 5 \times G	3 \times A 5 \times G	4 \times A 4 \times G	5 \times A 2 \times G	8 \times A 8 \times G
374	7 \times G	7 \times G 1 \times A	8 \times G	8 \times G	7 \times G	16 \times G
145	7 \times G	7 \times G 1 \times A	6 \times G 2 \times A	7 \times G 1 \times A	5 \times G 2 \times A	16 \times G

Bei der Untersuchung antiviraler Effekte von APOBEC3G in infizierten HepG2-Zellen, hat man RNA-Editierungsstellen in der untersuchten Region I beschrieben. Es handelt sich hierbei unter anderem um Substitutionen an den Positionen 342, 358, 359, 366, 378 sowie 379 im untersuchten Sequenzbereich (Rösler und Köck, 2004). Diese RNA-Editierungsstellen wurden von Scutellarein (100 μ M) im hier verwendeten Modell der primären humanen Hepatocyten nicht signifikant editiert.

	330	340	350	360	370	380	390	400
Translate	GTAGCGCATCATTTTGGGGTCA	CCCATATTTCTTGGGAACAAGAG	TACAGGTTGGAG	TTGGTCA	CAAAAACCTTGC	CAAAAGG		
unbehandelt; Tag 4	GTAGCGCATCATTTTGGGGTCA	CCCATATTTCTTGGGAACAAGAG	TACAGGTTGGAG	TTGGTCA	CAAAAACCTTGC	CAAAAGG		
unbehandelt; Tag 8	GTAGCGCATCATTTTGGGGTCA	CCCATATTTCTTGGGAACAAGAG	TACAGGTTGGAG	TTGGTCA	CAAAAACCTTGC	CAAAAGG		
Scutellarein (100 µM); Tag 4	GTAGCGCATCATTTTGGGGTCA	CCCATATTTCTTGGGAACAAGAG	TACAGGTTGGAG	TTGGTCA	CAAAAACCTTGC	CAAAAGG		
Scutellarein (100 µM); Tag 8	GTAGCGCATCATTTTGGGGTCA	CCCATATTTCTTGGGAACAAGAG	TACAGGTTGGAG	TTGGTCA	CAAAAACCTTGC	CAAAAGG		

AGAGCTACAGCATGGAG
 PNA-2

Abb. 3.51: Region I nach Zugabe von PNA. Pro Behandlung und Zeitpunkt sind je 5 repräsentative Klone aus der RNA dargestellt. PNA-Bindungssequenz im Nukleotidbereich 365-382. In rot sind ausgetauschte Basen gekennzeichnet.

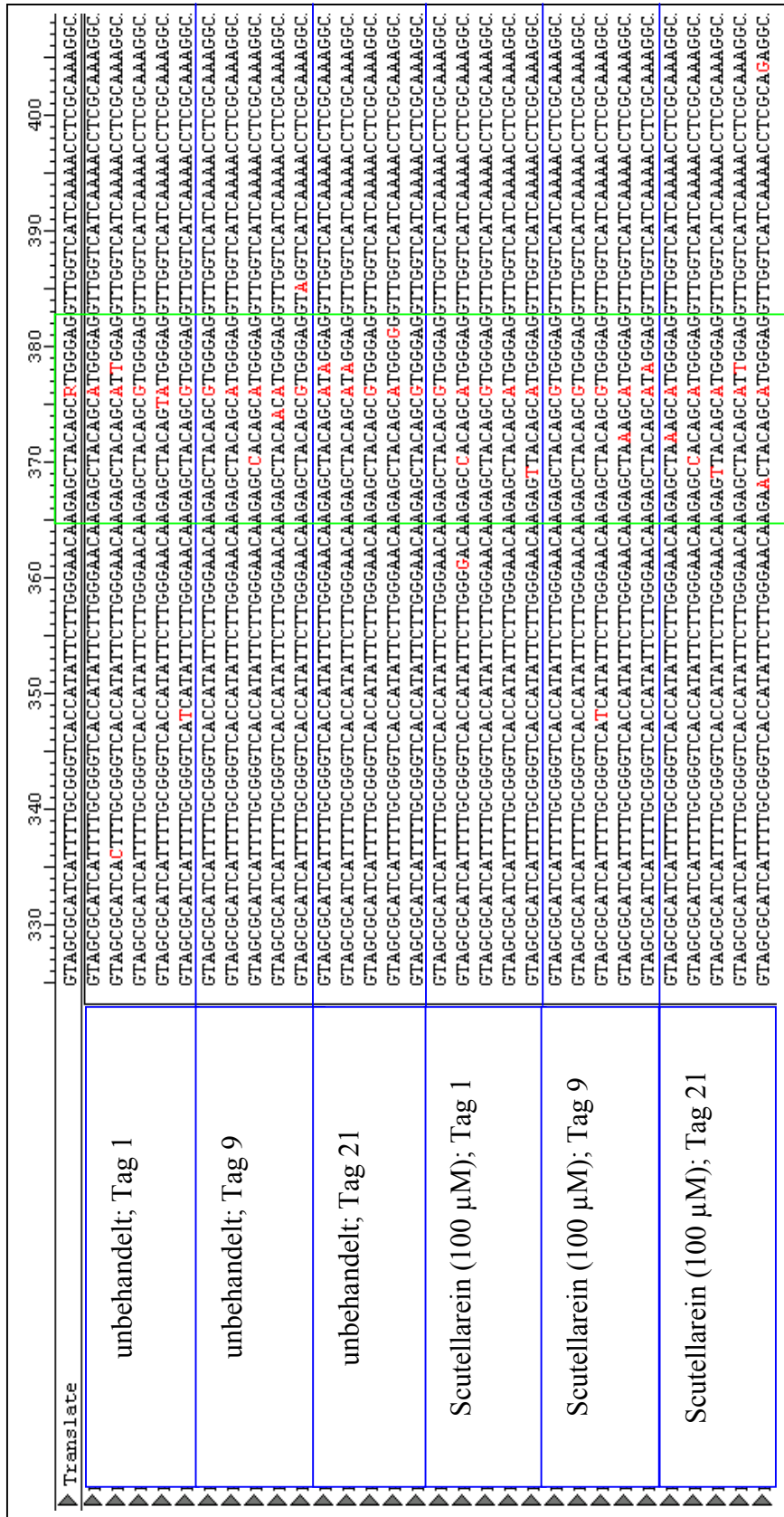


Abb. 3.52: Region I nach Zugabe von PNA. Pro Behandlung und Zeitpunkt sind je 5 repräsentative Klone aus der DNA dargestellt. PNA-Sequenz im Nukleotidbereich 365-382. In rot sind ausgetauschte Basen gekennzeichnet.

Translate	230	240	250	260	270	280	290	300
unbehandelt; Tag 1
unbehandelt; Tag 9
unbehandelt; Tag 21
Scutellarein (100 µM); Tag 1
Scutellarein (100 µM); Tag 9
Scutellarein (100 µM); Tag 21

Abb. 3.53: Region I nach Zugabe von PNA. Pro Behandlung und Zeitpunkt sind je 5 repräsentative Klone aus der DNA angegeben. Dargestellt ist ein Bereich außerhalb der PNA-Bindungssequenz (PNA-Bindungssequenz: 365-382 nt der Region I). In rot sind ausgetauschte Basen gekennzeichnet.

3.5.3.2 Alternativ mögliche Wirkmechanismen

Auf der Suche nach dem Scutellarein-Wirkmechanismus wurde zunächst aufgrund von Literaturangaben und der Ergebnisse in den Genexpressionsstudien an HL-60-Zellen vermutet, dass RNA Editierung von Bedeutung sein könnte. Trotz der großen Anzahl an untersuchten Klonen in RNA und DNA in zwei bedeutenden Regionen ließ sich diese Annahme experimentell nicht bestätigen. In beiden untersuchten Bereichen fanden sich im Vergleich zur Kontrollbedingung keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der RNA Editierungen. Auch nach Anreicherung mutierter Varianten mittels einer spezifischen PCR war keine RNA Editierung zu beobachten.

Ein inhibierender Effekt von Flavonoiden, darunter auch von Scutellarein und Quercetin, auf die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) verschiedener Viren, wie z.B. AMV (*avian myeloblastosis virus*) RT, RAV-2 (*Rous-associated virus-2*) RT und MMLV (*Maloney murine leukemia virus*) RT, wurde bereits 1989 beschrieben (Spedding et al., 1989). Dabei wurde ein Modell eines möglichen Wirkmechanismus der Flavonoide auf die RT-Aktivität postuliert (Spedding et al., 1989). Auch die Inhibierung der HIV-1 Reversen Transkriptase-Aktivität durch diese Stoffgruppe ist bekannt (Tan et al., 1992; Ono et al., 1989; Ono et al., 1990).

So wurde über die Inhibition der HIV-1 RT durch Catechin-Derivate, aber auch über die starken inhibitorischen Effekte von Quercetin und Baicalein gegenüber der Reversen Transkriptase von HIV (*human immunodeficiency virus*) berichtet (Tao, 1992; Ono et al., 1990).

Das Hepatitis B Virus gehört zur Klasse der DNA-Viren. HBV besitzt jedoch zusätzlich eine Reverse Transkriptase. Die Reverse Transkriptase des Hepatitis B Virus ist der des HI-Virus sehr ähnlich (Noguchi et al., 2005).

In diesem Zusammenhang könnte ein möglicher Effekt von Scutellarein auf die Reverse Transkriptase dessen antivirale Aktivität gegenüber HBV erklären. Dies stellt eine mögliche Hypothese eines antiviralen Scutellarein-Wirkmechanismus dar.

Darüber hinaus wurde in Genexpressionsversuchen in Hepatitis B-infizierten humanen Hepatocyten untersucht, inwieweit Scutellarein Einfluß auf die Gene *CYPD*, *ARA9*, *GCSI*, *GAA*, *API4*, *HPN*, *DDB1* und *HSP60* ausübt (Tabelle 3.11). All diese Gene

können, wie im folgenden erläutert, für antivirale Effekt gegenüber HBV von Bedeutung sein.

Tabelle 3.11: Genexpressionsstudien verschiedener Gene, welche für antivirale Effekte gegenüber HBV von Bedeutung sein können. Angabe der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Ratios der Expressionswerte der jeweiligen Gene bei Exposition mit Scutellarein (100 μ M) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Analyse erfolgte in der RNA von primären humanen HBV-infizierten Hepatocysten mittels effizienz-korrigierter relativer Quantifizierung von Realtime PCR-Bestimmungen an den Tagen 1, 4 und 8 nach Infektion der Zellen.

Gen	Ratio		
	Scut (100) – Tag 1	Scut (100) – Tag 4	Scut (100) – Tag 8
<i>CYPD</i>	0,111 \pm 0,098	0,486 \pm 0,671	0,744 \pm 0,440
<i>ARA9</i>	0,162 \pm 0,101	1,205 \pm 0,793	0,515 \pm 0,291
<i>GCSI</i>	1,097 \pm 1,190	0,165 \pm 0,217	0,293 \pm 0,381
<i>GAA</i>	0,343 \pm 0,190	0,721 \pm 0,987	0,376 \pm 0,435
<i>API4</i>	0,095 \pm 0,078	0,001 \pm 0,001	0,005 \pm 0,006
<i>HPN</i>	0,087 \pm 0,054	0,128 \pm 0,150	0,150 \pm 0,110
<i>DDB1</i>	0,144 \pm 0,057	0,007 \pm 0,005	0,029 \pm 0,028
<i>HSP60</i>	0,127 \pm 0,053	0,033 \pm 0,014	0,038 \pm 0,042

CYPD (Cyclophilin D) greift in den Zellenergiestoffwechsel ein indem es die Permeabilität der Mitochondrien verändert. Es wird für die Hemmung der HBV-Vermehrung durch bestimmte Immunsuppressiva verantwortlich gemacht (Bouchard et al., 2003; Xia et al., 2005). Scutellarein zeigte keine signifikante Beeinflussung dieses Gens.

ARA9 (Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein) ist ein Transkriptionsfaktor und spezifischer zellulärer Inhibitor der HBV-Vermehrung (Kuzhandaivelu, 1996). Unter

Einfluß von Scutellarein (100 µM) zeigte sich eine geringfügige Verstärkung der Expression dieses Genes in primären humanen HBV-infizierten Hepatocyten am vierten Tag nach Infektion der Zellen. Dieser Effekt kehrte sich allerdings am achten Tag nach der Infektion ins Gegenteil um.

GCSI (Glucosidase 1) und *GAA* (ACID Alpha-Glucosidase) sind Glucosidasen im endoplasmatischem Reticulum. Sie kontrollieren die Virusvermehrung über den Prozeß der Freisetzung aus infizierten Zellen (Lu et al., 2001). Inhibierung von Glucosidasen bremst die Virusvermehrung (Simsek et al., 2006). Scutellarein (100 µM) zeigte eine verringerte Expression beider Gene in primären humanen HBV-infizierten Hepatocyten.

API4 (Survivin) wird durch HBV hochreguliert und beeinflusst den Zellzyklus (Zhang et al., 2005c). Die Expression von *API4* wurde von Scutellarein (100 µM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sehr stark, d.h. auf das 10^{-3} -fache verringert.

HPN (Hepsin) interagiert mit dem HBV-X-Protein und fördert die Virusvermehrung über eine Einflussnahme auf den Zellzyklus (Zhang et al., 2005b). Die Expression des *HPN*-Gens wird bereits am ersten Tag nach Infektion der Zellen unter Scutellarein (100 µM)-Einfluß verringert.

DDB1 (DNA damage-binding Protein 1) steuert den Zellzyklus und ist für die HBV-Replikation über das X-Protein erforderlich. *HSP60* (Chaperonin) ist ebenfalls für die HBV-Replikation erforderlich. Es aktiviert die HBV Polymerase. Ein Knockdown beider Gene bremst jeweils die Virusvermehrung (Leupin et al., 2005; Park et al., 2003). Die Expression beider Gene wurde durch Scutellarein (100 µM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in HBV-infizierten primären humanen Hepatocyten stark, d.h. auf 10^{-2} -fache Expressionswerte verringert.

Für den eindeutigen Nachweis einer Beteiligung dieser bzw. einer dieser Gene am Wirkmechanismus von Scutellarein gegenüber Hepatitis B Viren sind jedoch weitere Analysen notwendig.

Zusammenfassend ist festzuhalten:

Für Untersuchungen antiviraler Effekte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde das Flavon Scutellarein sowie das Hepatitis B Virus am Modell der primären Hepatocyten verwendet. Im oberen Modell zeigte Scutellarein starke antivirale Effekte. Eine toxische Wirkung von Scutellarein (100 μM) auf primäre humane Hepatocyten als Ursache einer Beeinflussung des HBV-Infektionsverlaufs war aufgrund der von uns durchgeführten Cytotoxizitätsstudien auszuschließen.

Zunächst wurde RNA Editierung als möglicher Wirkmechanismus von Scutellarein gegenüber Hepatitis B Viren aufgrund der Ergebnisse der Genexpressionsstudien und Literaturangaben vermutet. Dies ließ sich anhand von Klonierungen und Sequenzierungen in zwei ausgewählten Regionen des HBV-Genoms nicht bestätigen. Eine Hemmung der Reversen Transkriptase durch Scutellarein scheint als Wirkmechanismus gegenüber Hepatitis B Viren aufgrund ähnlicher Ergebnisse für die RT von HIV sehr wahrscheinlich.

Weitere Experimente sind notwendig um den antiviralen Wirkmechanismus von Scutellarein, und damit vielleicht auch anderer Substanzen aus der Stoffgruppe pflanzlicher Polyphenole, eindeutig identifizieren zu können.

4 Experimentaltteil

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Schwalbach, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Bioline (Luckenwalde, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Bachem (Weil am Rhein, Deutschland), Immunotech (Prag, Tschechische Republik) und Extrasynthese (Lyon, Frankreich) bezogen. Hispidulin wurde nach Kavvadias et al. (2004) und EMD 21388 (3',5'-Dibrom-6,4'-dihydroxy-3-methylflavon) nach Köhrle et al. (1989) synthetisiert. Xanthohumol wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Becker (Universität Saarbrücken) zur Verfügung gestellt.

Reinstwasser wurde über Millipore-Kartuschen gefiltert (MilliQ biocel, Millipore, Schwalbach, Deutschland).

Die eingesetzten Zellkulturmedien, Seren, Antibiotika und sonstige für die Zellkultur benötigten Chemikalien wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), PAA (Cölbe, Deutschland), PAN (Aidenbach, Deutschland) und Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Chemikalien wurden bereits sterilisiert angeliefert.

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fisher-Scientific (Ulm, Deutschland) Hartenstein (Würzburg, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Nalgene (Hamburg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Falcon (Heidelberg, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Biozym (Oldendorf, Deutschland), VWR (Nürnberg, Deutschland), Greiner (Bio-one, Solingen, Deutschland), Falcon

(Heidelberg, Deutschland) und Millipore (Schwalbach, Deutschland) erworben. Das Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde bereits sterilisiert angeliefert.

4.1.3 Zellen

Die Zelllinien SK-N-SH und Jurkat E6-1 wurden freundlicherweise von PD Dr. E. Koutsilieri und PD Dr. C. Scheller (Institut für Virologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie HL-60 (*human acute myeloid leukemia*; ACC3) wurde über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die Zelllysate von primären humanen Hepatocyten stammten aus dem Zentrum für Leberzellforschung am Klinikum der Universität Regensburg und wurden von den Kooperationspartnern PD Dr. Thomas Weiss (Klinik und Poliklinik für Chirurgie) und Dr. Stephan Böhm (Virologie) zur Verfügung gestellt.

4.1.4 Kits

Mykoplasmentest: Mycoplasmen Detection Kit Venor[®] GeM; Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

Laktatdehydrogenase-Cytotoxizitätstest: Cytotoxicity Detection Kit (LDH); Boehringer, Mannheim, Deutschland

ATP-abhängiger Cytotoxizitätstest: Via Light[™] HS Kit; Cambrex, Rockland, USA

ATP-abhängiger Nekrose/Apoptose-Cytotoxizitätstest: Apo Glow[™] Kit; Cambrex, Rockland, USA

AlamarBlue-Test: AlamarBlue[™] Assay; Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Lipidperoxidation: Lipidperoxidation Assay Kit; Calbiochem[®], Darmstadt, Deutschland

Superoxidanionen Detektion Kit: Lumi-Max-Superoxide-Anion-Detection-Kit; Stratagene, Amsterdam, Niederlande

RNA-Extraktion: Nucleo Spin[®] RNA and Virus Purification Kit; BD Clontech, Heidelberg, Deutschland

Poly-A⁺-Aufreinigung: Oligotex[™] Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland

cDNA-Synthese (Reverse Transkription): Advantage[™] RT-for-PCR Kit; BD Clontech, Heidelberg, Deutschland

Gelextraktion: Nucleo Spin[®] Extract II; Macherey-Nagel (MN), Düren, Deutschland

cDNA-Array: GEArray S Series Human Dendritic & Antigen Presenting Cell Gene Array; Superarray, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

Array-Labeling: Ampo Labeling-LPR-Kit; Superarray, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

Array-Detektion: Chemiluminescent Detection Kit; upstate, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

Klonierung: TOPO TA Cloning[®] Kit; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Minipräparation von Plasmid-DNA: QIAprep[®] Miniprep-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Immundetektion immobilisierter Proteine: Visualizer[™] Western Blot Detection Kit; upstate, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

Quantifizierung der viralen Antigene: Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assay (MEIA); Axsym HBsAg V2, Axsym HBe 2.0, Abbott Diagnostic Division, Wiesbaden, Deutschland

4.1.5 Oligonukleotide, Längenstandards, Antikörper und Enzyme

Oligonukleotide:

Primer für die Gene *STK4*, *ADAR1*, *ADAR2 (ADARB1)*, *IL16*, *SOD2*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*, *CYPD*, *ARA9*, *GCSI*, *GAA*, *API4*, *HPN*, *DDB1* und *HSP60* wurden von der Firma Superarray (BIOMOL, Hamburg, Deutschland) bezogen. Der 18S-Primer stammte von Ambion (*Applied Biosystems*, Foster City, USA).

Alle weiteren verwendeten Primer wurden mittels eines spezifischen Programms (Primer 3; Krawetz und Misener, 2000) ausgewählt und von *MWG Biotech* (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 4.1: Primer für den Nachweis der Exons 2a bzw. 11a in *ADAR1*-Transkripten.

Primer		
Exon 2a	Vorwärtsprimer ADAR2a+	5'-CAC TCC AGC CTG ATT GCA G-3'
	Rückwärtsprimer ADAR2a-	5'-GAC ACC CCT GAT GTC CAC TT-3'
Exon 11a	Vorwärtsprimer ADAR11a+	5'-TGC TCT CCT GGC CTG TAA AT-3'
	Rückwärtsprimer ADAR11a-	5'-GAG ATA AAT GGG CTG CAG GA-3'

Tabelle 4.2: Primer für die Spleißvarianten-PCR in GluR 2.

Primer		
Spleißvarianten	Vorwärtsprimer R/G-V48+	5'-CAA AGG GAA ATA TGC CTA CTT GTT-3'
	Rückwärtsprimer flip/flop-	5'-ACT TTC GAT GCC ATA TAC GTT G-3'

Tabelle 4.3: Primer für Quantifizierung der Editing-Effizienz der „Q/R editing“-Position in GluR 2.

Primer		
„Q/R editing“- Position	Vorwärtsprimer Q/R-V13+	5'-TGG ATG TGC ATT GTT TTT GC-3'
	Rückwärtsprimer Q/R-V24-	5'-TCC ATA AGC AAT TTC TGT TTG CT-3'

Tabelle 4.4: HBV-Primer für Sequenzierungen zweier Regionen im HBV-Genom.

HBV-Primer		
Region I	Vorwärtsprimer HBV-E1+	5'-CAT AAG AGG ACT CTT GGA CTC C-3'
	Rückwärtsprimer HBV-E1-	5'-GAA GGA AAG AAG TCA GAA GGC-3'
Region II	Vorwärtsprimer HBV-2+	5'-TGG GAA ACT TTA CTG GGC TTT-3'
	Rückwärtsprimer HBV-2-	5'-GAA AGA ATC CCA GAG GAT TGG-3'

Das modifizierte Oligonukleotid PNA-2 stammte von *Applied Biosystems* (Foster City; USA).

Tabelle 4.5: Sequenz des *peptide nucleic acid* PNA-2.

Peptide nucleic acid	
PNA-2	5'-CTC CCA TGC TGT AGC TCT-3'

DNA- bzw. Protein-Längenstandards:

100 bp DNA Ladder: HyperLadder IV Bioline, Luckenwalde, Deutschland

low range molecular weight marker BioRad, München, Deutschland

Antikörper:

Rabbit anti-ADAR1 ZYMED, San Francisco, California, USA

Goat-anti-rabbit-IgG upstate, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

GAPDH Imgenex, San Diego, California, USA

Goat-anti-mouse-IgG upstate, BIOMOL, Hamburg, Deutschland

Enzyme:

Die Enzyme *Stu* I und *Hga* I wurden von *New England Biolabs* (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

Tabelle 4.6: Enzyme zur Charakterisierung der „flip“-/„flop“-Spleißvarianten in *GluR 2*.

„flip“-/„flop“-Spleißvarianten in <i>GluR 2</i>				
Primer: R/G-V48+ / flip/flop-				
Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Reaktionstemperatur	Reaktionszeit
<i>Stu</i> I	5'... AGG [▼] CCT ...3' 3'... TCC [▲] GGA ...5'	NEB 2	37 °C	16 h
<i>Hga</i> I	5'... GACGC(N) ₅ [▼] ...3' 3'... CTGCG(N) ₁₀ [▲] ...5'	NEB 1	37 °C	16 h

4.2 Sonstige Hilfsmittel

Autoklav:	Varioklav Dampfsterilisatoren (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland)
Brutschrank:	Hera cell bzw. Heraeus Incubator 6000 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
CCD-Optik:	Hitachi (Deutschland)
Entwickler-Automat:	KODAK M35 X-Omat Processor (KODAK, Deutschland)
FACS:	BD FacScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer:	PeqLab Modell 40-1214 (PeqLab, Erlangen, Deutschland)
Hybridisierungssofen:	Hybrid 2000 (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland)
Luminometer:	Anthos lucy 1 microplate luminometer (Anthos, Wals/ Salzburg, Österreich)

Mikroskop:	Olympus IX70 bzw. Olympus BX51 (Olympus, Hamburg, Deutschland) Leitz-Fluovert (Leitz-Leica, Wetzlar, Deutschland)
PCR-Cycler:	Genius Techne (Thermo-DUX, Wertheim/Main, Deutschland) Trio Thermoblock Biometra (Biometra, Göttingen, Deutschland)
pH-Meter:	WTW pH 540 GLP (WTW, Weilheim, Deutschland)
Photometer:	Molecular Devices Emax precision microplate reader (MDS, Ismaning, Deutschland) Pharmacia Biotech Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) Multiscan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Realtime-PCR-Cycler:	Corbett Research Rotorgene 2000 Real-Time Cycler (LTF-Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, USA)
Spannungsgeräte:	Biometra Power Pack P25 (Biometra, Göttingen, Deutschland) BioRad Power Pac 200 (BioRad, München, Deutschland)
Speedvac:	Savant SC110 (GMI, Ramsey, USA)
Sterile Werkbank:	Hera safe Type HS9 (Heraeus, Hanau, Deutschland) Gelaire (Flow, Meckenheim, Deutschland) Antair BSK (Heraus, Hanau, Deutschland)
Tischzentrifuge:	Biofuge pico bzw. Biofuge fresco (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Trockenschrank:	WTB binder (Binder, Tuttlingen, Deutschland)
UV-Durchlichtgerät:	MWG-Biotech (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)
Waagen:	Sartorius BL 1500 bzw. Sartorius BP 221S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
WB-Blotter:	BioRad Trans Blot SD Semidry Transfer Cell (BioRad, München, Deutschland)
Zentrifuge:	Heraeus Megafuge 2.0R bzw. Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

4.3 Methoden

4.3.1 Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

4.3.1.1 Zelllinien

Es wurden ausschließlich humane Zelllinien verwendet:

Die leukämische Zelllinie Jurkat Clone E6-1, die Neuroblastomzelllinie SK-N-SH sowie die dendritischen HL-60.

4.3.1.1.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem N₂ aufbewahrten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in eisgekühlten 5 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert und bei 1200 Umdrehungen pro min (rpm) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 10 ml warmem (37 °C) Medium gewaschen und nach erneutem zentrifugieren in 12 ml warmem Medium aufgenommen und für die Kultivierung in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

4.3.1.1.2 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem 5 %-igen Anteil an CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Jurkat E6-1 wurden in modifiziertem RPMI, SK-N-SH in modifiziertem MEM und HL-60 in modifiziertem DMEM kultiviert. Alle Medien waren mit je 10% Hitzeinaktiviertem Serum (Fötales Kälberserum; fetal calf serum; FCS), sowie 1% Glutamin und 1% Pen-/Strep-Lösung supplementiert. Für den LDH-Test wurde dem Medium 1% FCS zugesetzt.

Je nach Teilungsrate wurden die Zellkulturen alle 4-5 Tage passagiert.

a) Passagieren von Suspensionszellen

Bei den beiden Suspensionszelllinien Jurkat E6-1 und HL-60 wurden hierzu je 2 ml Zellsuspensionslösung in der Zellkulturflasche belassen und je 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes Medium hinzugegeben.

b) Passagieren von adhärenen Zellen

Die verbrauchte Mediumlösung wurde bei den adhärenen SK-N-SH-Zellen über dem Zellmonolayer abgesaugt. Um EDTA vollständig zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4 ml ATV (Tabelle 4.7) trypsinisiert und für 2 min unter Kulturbedingungen inkubiert.

Dann wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden abgelöst und die Trypsinierung durch Zugabe von 6 ml Medium beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und erneut in 10 ml Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspensionslösung wurden 2 ml in eine neue Zellkulturflasche (75 cm²) überführt, 10 ml Medium zugegeben und bei den unter Punkt 4.3.1.1.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung der ATV-Lösung.

ATV	
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
D-Glucose	1 g
NaHCO ₃	0,58 g
Trypsin	0,5 g
Versen	2 g
H ₂ O	auf 1 l auffüllen

4.3.1.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wird die Kryokonservierung genutzt. Dabei werden Zellen in flüssigem Stickstoff, bei einer Temperatur von -196 °C eingefroren.

Es wurden ca. 1×10^7 Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren.

Die Zellen wurden geerntet, zentrifugiert (1200 rpm; 5 min), der Überstand verworfen, und das Zellpellet in eisgekühltem Zellkulturmedium aufgenommen. Dabei wurden pro einzufrierendem Röhrchen jeweils 500 µl Medium zugegeben. Anschließend wurde das gleiche Volumen an eisgekühltem Einfriermedium (2×) hinzugefügt und die Zellen gut darin resuspendiert.

Einfriermedium (2×): FCS (Serum) : DMSO = 9 : 1

Die Zellsuspension wurde zunächst auf die Kryoröhrchen verteilt (pro Röhrchen 1ml). Das Einfrieren selbst erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurden die Röhrchen für 24 h in einer Kryobox bei -80 °C gelagert um ein regelmäßiges, langsames (1 °C pro Stunde) und somit für die Zellen schonendes Absinken der Temperatur zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in den Stickstofftank überführt.

4.3.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl sowie der Vitalität der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Hierzu wurden 50 µl Zellsuspensionslösung und 50 µl Trypanblau-Lösung (0,5%; w/v) mit 100 µl PBS gemischt und die Zählkammer damit beschickt.

Das Farbstoffmolekül Trypanblau kann durch geschädigte Zellmembranen, wie sie bei toten Zellen auftreten, in die Zellen eindringen und sich in deren DNA einlagern. Somit werden tote Zellen durch die Trypanblau-Lösung blau angefärbt. Lebende Zellen mit intakten Membranen nehmen diesen Farbstoff aufgrund der Molekülgröße nicht auf und können so unter dem Lichtmikroskop deutlich von den toten Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle vier Quadranten (bestehend aus je 16 Kleinquadraten) ausgezählt.

Berechnung der Zellzahl pro ml Kultur:

Jedes Kleinquadrat weist eine Fläche von 0,25 mm × 0,25 mm auf. Bei einem Abstand zwischen Deckglas und Zählkammer von 0,1 mm ergibt sich für ein Großquadrat (Quadrant) ein Volumen von 0,1 mm³ (bzw. 0,1 µl). Die mittlere Zellzahl pro ml bzw. pro cm³ Kultur berechnet sich wie folgt:

$$Z = n \cdot \frac{V}{G} \cdot 10^4$$

Z – Zellzahl/ml (Kultur)

n – gezählte Zellen

V – Verdünnungsfaktor

G – Anzahl der ausgezählten Quadranten

10⁴ – Volumenfaktor

4.3.1.1.5 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind parasitär, intra- oder extrazellulär lebende Bakterien. Sie zählen zu den kleinsten selbständig vermehrungsfähigen Organismen.

Mykoplasmen können als Kontamination von Zellkulturen auftreten. Als Infektionsquelle kommen hierbei vor allem das Laborpersonal, aber auch das Kulturmediensupplement Kälberserum, sowie der Kontakt zu bereits kontaminierten Chargen in Betracht.

Viele Mykoplasmenarten wachsen nur langsam und ohne ihre Wirtszellen zu zerstören. Die Anwesenheit von Mykoplasmen kann jedoch die Physiologie der Zellen verändern. Genprodukte der Mykoplasmen (Enzyme, Toxine) können zu pH-Wert-Veränderungen führen und so wichtige Rahmenbedingungen für Metabolismus und Wachstum der Zellen beeinflussen. Dies kann sich in Veränderungen der Morphologie, der Vitalität, sowie DNA-, RNA- und Proteinsynthese der Zellen zeigen. Eine mögliche Folge hieraus stellen nicht-reproduzierbare Ergebnisse dar. Um eine mögliche Infektion auszuschließen, wurden die verwendeten Zellen in regelmäßigen Abständen (monatlich) mittels eines „*Mycoplasma Detection Kit Venor[®] GeM[™]*“ (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) untersucht. Dies ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Neben Mykoplasmenarten wie *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis*, können auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene Ureaplasma-Spezies detektiert werden.

Die Primer binden in der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms, da in der 16S rRNA besonders häufig Spezies-spezifische Polymorphismen auftreten (Spielbauer und Stahl, 2005). Es wird ein PCR-Produkt mit 270 bp amplifiziert, welches anschließend in der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann.

Für den Test wurden die Zellen jeweils für den Zeitraum zwischen zwei Passagen in Antibiotika-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurde der Mykoplasmen-Nachweis nach Anleitung des Herstellers unter Einschluß sowohl einer Positiv-, als auch einer Negativkontrolle durchgeführt.

Hierzu wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben, dicht verschlossen und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation (12000 rpm; 30 sec) wurde 1 µl des Überstandes für den PCR-Test eingesetzt.

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt.

Pro Probe wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Substanz	Volumen [µl]
10 × Reaktionspuffer	2,5
Primer/Nukleotid Mix	2,5
Interne Kontroll-DNA	1
Polymerase (5 U/µl)	0,1
dH ₂ O	18

Je 24 µl des Reaktionsansatzes wurden auf die PCR-Gefäße verteilt und mit 1 µl deionisiertem Wasser als Negativkontrolle, bzw. 1 µl Probe oder 1µl Positivkontrolle versetzt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (*Biometra, Trio Thermoblock*) bei folgendem Programm durchgeführt:

- PCR-Programm:

	94 °C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung:	94 °C	30 sec	
Annealing:	55 °C	30 sec	
Elongation:	72 °C	30 sec	

Im Anschluß an die PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.3.1.2 Primäre Zellen

Für die Hepatitis B Virus-Untersuchungen wurden primäre humane Hepatocyten (PHH) verwendet (vgl. 4.3.5)

Die Zelllysate von primären humanen Hepatocyten stammten aus dem Zentrum für Leberzellforschung am Klinikum der Universität Regensburg und wurden von den Kooperationspartnern PD Dr. Thomas Weiss (Klinik und Poliklinik für Chirurgie) und Dr. Stephan Böhm (Virologie) zur Verfügung gestellt.

4.3.1.3 Toxizitäts-Analyse-Methoden

Um die Cytotoxizitätseffekte der ausgewählten Flavonoide auf mehreren Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen anhand verschiedener Methoden analysiert.

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose.

Die Apoptose ist ein ATP-konsumierender, regulierter Vorgang, bei dem die einzelnen Schritte genetisch festgelegt sind. Sie ist durch Abrundung der Zellen und Chromatinkondensation entlang der nukleären Membran, begleitet von einer Schrumpfung der Zellen, charakterisiert. Eine spezifische, internukleosomale DNA-Fragmentation, Auflösen der Zellen in einzelne, membranumhüllte Fragmente, sog. „*apoptotic bodies*“, sowie Phagozytose durch Makrophagen und andere umliegende Zellen kennzeichnen den weiteren Verlauf der Apoptose. Die Zellmembran wie auch die Membranen der Organellen bleiben während des gesamten Prozesses intakt. Die Exposition von Phosphatidylserin, welches normalerweise nur auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran vorhanden ist, auf die Zelloberfläche führt zur Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und andere benachbarte Zellen (Savill, 1996; Sutter, 2003).

Im Gegensatz zur Apoptose verläuft die Nekrose passiv. Als typisches Merkmal der Nekrose kommt es gleich anfangs zur Zellschwellung, gefolgt vom Verlust der Zellmembranintegrität. Die daraus resultierende Enzymfreisetzung führt zu

inflammatorischen Reaktionen und dadurch zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998; Buja et al., 1993).

In der Zellkultur ist eine Differenzierung zwischen nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen erschwert, da es dort aufgrund fehlender Phagozytose zur sekundären Nekrose der apoptotischen Körperchen kommt (Bredesen, 1995; Mronga, 2003). In letzter Zeit zeigte sich, dass auch zahlreiche Zwischenstufen zwischen Apoptose und Nekrose auftreten können (Leist und Jäätelä, 2001; Martin, 2001; Mronga, 2003; Doppke, 2001). Die Differenzierung wird zusätzlich erschwert durch Auftreten atypischer Apoptosen, bei denen ein oder mehrere Charakteristika fehlen können. Um also *in vitro* die Spezifität des Apoptosenachweises zu erhöhen, müssen mehrerer Nachweismethoden kombiniert werden.

Die hier verwendeten Methoden ergänzen sich gegenseitig durch den Nachweis unterschiedlicher Charakteristika von Apoptose bzw. Nekrose.

4.3.1.3.1 Laktatdehydrogenase (LDH)-Test

Der Laktatdehydrogenase-Cytotoxizitätstest (*Boehringer*, Mannheim, Deutschland) bestimmt Cytotoxizität anhand der Messung von Laktatdehydrogenase (LDH). Dies ist ein stabiles cytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen präsent ist, jedoch nur in geschädigten oder toten Zellen freigesetzt wird. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen ist anhand dieser Methode nicht möglich.

Die Aktivität von Laktatdehydrogenase wird anhand der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat gemessen. Bei dieser Reaktion wird NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Mittels $\text{NADH} + \text{H}^+$ und dem Katalysator Diaphorase wird in einem zweiten Schritt ein gelbes Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazansalz reduziert, dessen Menge schließlich quantifiziert wird (Abb. 4.1).

Für den „*Cytotoxicity Detection Kit*“ (LDH) wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer 96-well-Platte (in Medium supplementiert mit 1% FCS) ausgesät und mit den jeweiligen Testsubstanzen für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Test nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

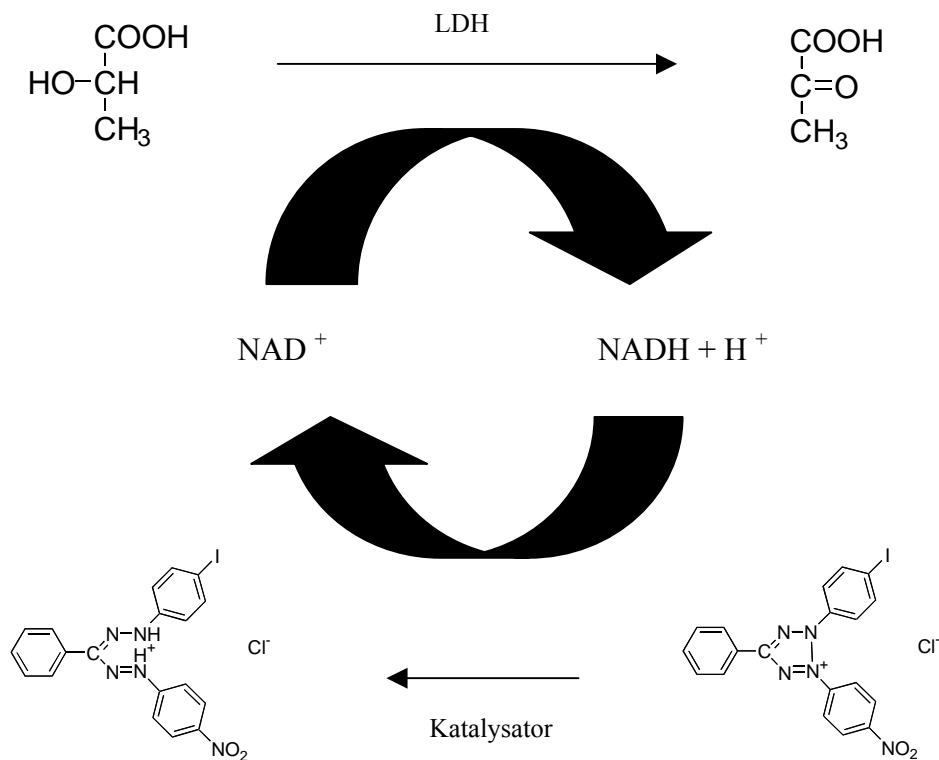


Abb. 4.1: Versuchsprinzip des Laktatdehydrogenase-Cytotoxizitäts-Tests: Im ersten Schritt reduziert die freigesetzte Laktatdehydrogenase NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$, bei gleichzeitiger Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt werden mittels des Katalysators Diaphorase 2 H von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf ein Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch ein Formazansalz gebildet wird.

Dabei wurden jeweils 100 μl des Zellkulturüberstandes abgenommen und mit 100 μl einer Lösung versetzt, die NAD^+ , Diaphorase und Iodtetrazoliumchlorid (INT) enthielt. Nach 30-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei RT wurde die Absorption der Proben schließlich bei 490 nm (Referenz-Wellenlänge 650 nm) gemessen. Als Positivkontrolle diente das Medium von Zellen, die mit Triton X-100[®] (Endkonzentration von Triton X-100 im Medium: 2%) behandelt worden waren. Triton X-100 bewirkt eine nahezu 100%-ige Freisetzung der gesamten LDH der Zellen.

4.3.1.3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie wird auch als FACS bezeichnet. FACS steht für *fluorescence activated cell sorting*. Anhand dieses Verfahrens kann jedoch nicht nur eine Sortierung der Zellen vorgenommen werden. Meist wird es zur Analyse bestimmter physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen verwendet.

Die FACS-Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen. Hierzu werden die Zellen einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nach dem Laserpuls unter Abgabe von Energie, in Form von Photonen, auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration ist proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Aus dem von der Zelle emittierten Streulicht erhält man Informationen über die Größe und die Struktur der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht SSC (*Sideward Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität der Zellen (Radbruch, 1992; Shapiro, 1995; Mc Lean Grogan et al., 1990; Ormerod, 1994).

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden pro Probe jeweils 10 000 Zellen mittels eines FACScan Flow Cytometers (*Becton Dickinson*, Deutschland) analysiert.

4.3.1.3.2.1 Annexin-V-FITC/7-AAD-Doppelfärbung

Für eine weitere Charakterisierung des Zelltods in Apoptose oder Nekrose, wurde eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin-V-FITC und 7-AAD und anschließende Durchflusszytometrie durchgeführt.

Annexin-V bindet (in Gegenwart von Calcium-Ionen) an Phosphatidylserin (PS). 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 zu einem „PS-flip“, einer Umlagerung von

Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Zellmembran, wo eine Bindung mit Annexin-V-FITC möglich wird.

Beim zweiten, für die Doppelfärbung der Zellen verwendeten Farbstoff handelt es sich um 7-Amino-actinomycin-D (7-AAD), einer Substanz, welche nach Assoziation mit DNA-Molekülen ihre Fluoreszenzeigenschaften ändert (Gill et al., 1975; Rojewski, 2002). 7-AAD interkaliert mit hoher Selektivität zwischen den Desoxyribonukleotiden Guanin und Cytosin (Chen Chiao et al., 1979; Philpott et al., 1996; Rojewski, 2002). Die in vitalen Zellen bestehende Permeabilitätsschranke durch die Zellmembran bleibt auch während der Apoptose bis hin zu den späten Phasen der Apoptose intakt. Wohingegen es bei nekrotischem Zelltod zum Verlust der Membranintegrität kommt, so dass 7-AAD in die Zelle gelangen und dort mit der DNA interagieren kann (Schmid, 1994a; Schmid, 1994b; Rojewski, 2002).

Tabelle 4.8: Färbevariationen der Annexin-V-/7-AAD-Färbungen.

Beobachtete Färbung	Interpretation
Annexin-V-neg. + 7-AAD-neg.	vitale Zellen
Annexin-V-pos. + 7-AAD-neg.	früh-apoptotische Zellen
Annexin-V-neg. + 7-AAD-pos.	nekrotische Zellen
Annexin-V-pos. + 7-AAD-pos.	spät-apoptotische Zellen

Somit bietet eine Doppelfärbung der Zellen mittels Annexin-V-FITC und 7-AAD nicht nur die Möglichkeit einer Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen, sondern darüber hinaus eine Differenzierung von früh- und spät-apoptotischen Zellen (Philpott, 1996; Lecoer, 1998; Rojewski, 2002). Damit ist eine Unterscheidung aller vier Populationen – vitale, früh-apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zellen – möglich (Tabelle 4.8).

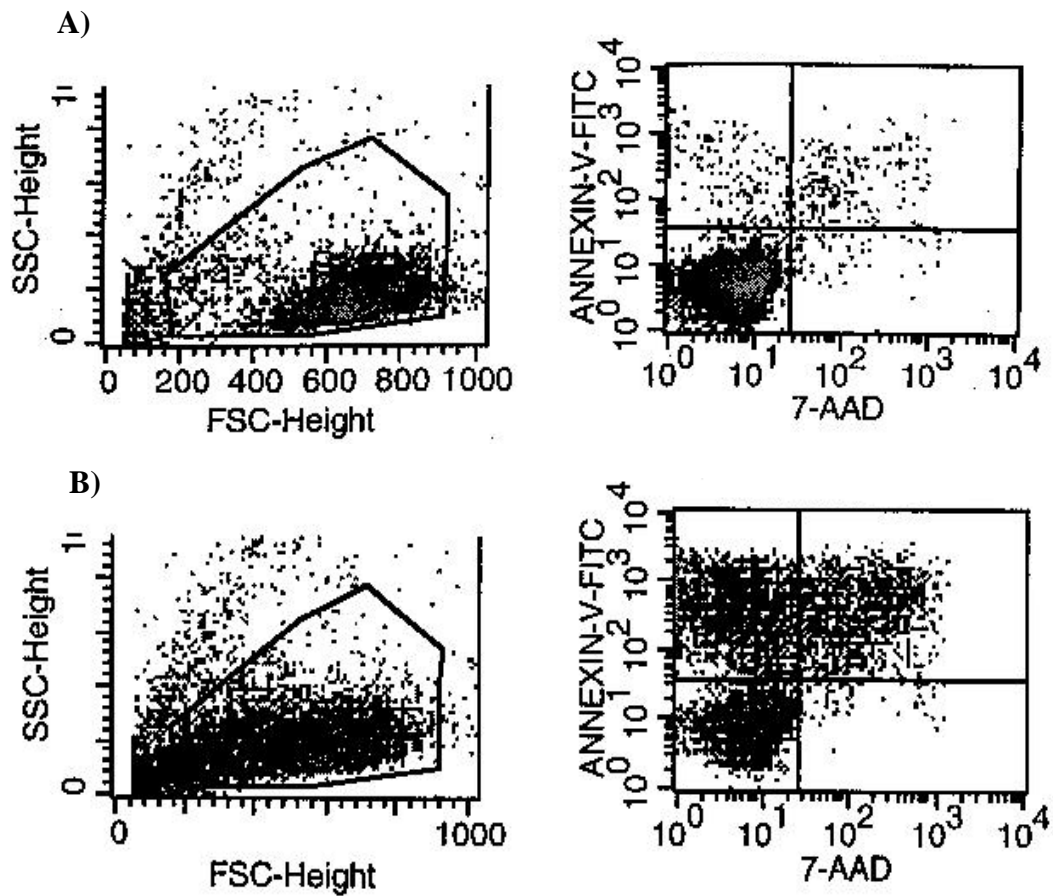


Abb. 4.2: Durchflusszytometry-Analysen: **A)** unbehandelte Jurkat-Zellen (Kontrolle), **B)** mit Quercetin (100 µM) für 24 h inkubierte Jurkat-Zellen.
 Links: Auftragung des von den Zellen emittierten Streulichts: Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) (x-Achse) gegen Seitwärtsstreulicht SSC (*Sideward Scatter*) (y-Achse). Durch das Setzen von Gates wurden für die Auswertung extrem niedrige Werte und extrem hohe Werte ausgeklammert.
 Rechts: Logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität von 7-AAD (x-Achse) gegenüber der Fluoreszenzintensität von Annexin-V-FITC (y-Achse). Durch die Bildung von vier Quadranten kommt es zur Unterscheidung folgender Populationen: Quadrant unten links: vitale Zellen; unten rechts: nekrotische Zellen; oben links: früh-apoptotische Zellen; oben rechts: spät-apoptotische Zellen.

Für die FACS-Analysen wurden Jurkat E6-1-Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in 96-well-Platten ausgesät und mit den jeweiligen Flavonoidlösungen für 24 h inkubiert. SK-N-SH-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in 24-well-Platten ausgesät und zunächst über

Nacht kultiviert, bevor sie mit den entsprechenden Substanzen für 24 h inkubiert wurden.

Zur anschließenden Analyse wurden je 100 µl resuspendierte Zelllösung in ein FACS-Röhrchen gegeben, mit 25 µl einer 4%-igen Annexin-V-Lösung versetzt und für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl einer 4%-igen 7-AAD-Lösung wurden die Zellen nach 10 sec am Durchflusszytometer vermessen. Die Messung wurde auf einem FACScan (*Becton Dickinson*) mit Anregung durch Laserlicht durchgeführt.

4.3.1.3.2.2 Auswertung

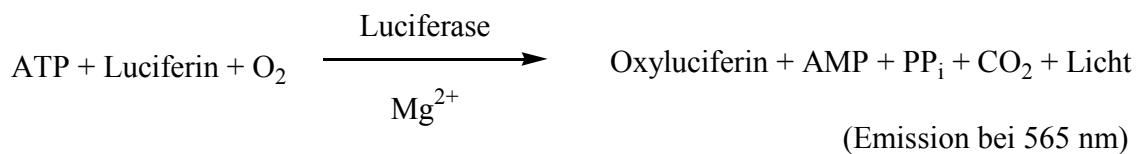
Die Auswertung erfolgte anhand von „*Cell Quest Pro Software*“ (BD) auf einem Apple Macintosh.

Die Zellpopulation wurde in einem FSC (*Forward Scatter*)-SSC (*Sideward Scatter*)-DotPlot bestimmt (Abb. 4.2). Die Annexin V-FITC markierten Zellen wurden über die Fluoreszenz des gekoppelten FITC auf Kanal FL-1 (530 ± 30 nm) gezählt, die mit 7-AAD markierten Zellen über Kanal FL-3 (675 ± 22 nm). FL-1 wurde logarithmisch auf der Ordinate, FL-3 logarithmisch auf der Abszisse abgebildet (Abb. 4.2). Für die Auswertung wurden extrem niedrige Werte (verursacht durch Zellfragmente), ebenso wie extrem hohe Werte (verursacht durch Verklumpen von Zellen) durch das Setzen von Gates ausgeklammert (Abb. 4.2). Dabei wurden die Auswertungsmarker anhand der Messungen der unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil der jeweiligen markierten Zellen an der Gesamtpopulation angegeben.

4.3.1.3.3 ATP (Adenosin Triphosphat)-abhängige Cytotoxizitätstests

Adenosin Triphosphat (ATP) ist in allen metabolisch aktiven Zellen präsent. Da alle Zellen ATP für das Überleben benötigen, ist es gut als messbarer Parameter für eine Bestimmung der Vitalität der Zellen geeignet. Jegliche Form von Zellschädigung führt zu einem rapiden Absinken des ATP-Gehalts im Cytoplasma (Crouch et al., 1993).

Der *Via LightTMHS* Kit (*Cambrex*, Rockland, USA) wurde verwendet, um die Cytotoxizitätseigenschaften verschiedener Substanzen auf HL-60-Zellen zu untersuchen. Der Test basiert auf einer luminometrischen Luciferin-Luciferase-Messung von ATP (Higashi et al, 1985; Stanley, 1986). Dabei wird ATP in Anwesenheit von Luciferin und dem Enzym Luciferase folgendermaßen umgesetzt:



Die dabei entstehenden Lichtquanten sind proportional zur ATP-Konzentration und werden mittels Luminometer gemessen. HL-60-Zellen sind gut für diese Art von Analyse geeignet (Crouch et al., 1993).

Die HL-60-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in einer 12-well-Platte ausgesät und mit den entsprechenden Substanzen für 24 h, bei den unter 4.3.1.1.2 beschriebenen Zellkulturbedingungen, kultiviert. Anschließend wurden pro Probe je 100 μl in Lumineszenz-kompatible 96-well-Platten überführt und die Proben nach Zugabe aller Testreagenzien, laut Protokoll des Herstellers, bei 565 nm im Luminometer vermessen.

Ein *Apo GlowTM* Kit (*Cambrex*, Rockland, USA) wurde zusätzlich verwendet, um Cytotoxizitätseffekte als Apoptose bzw. Nekrose charakterisieren zu können.

Der Test beruht auf einer luminometrischen Messung von ATP und ADP (Adenosin Diphosphat). Eine Veränderung des ADP:ATP-Quotienten im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) lässt dabei Aussagen bezüglich Apoptose-, Nekrose- und Proliferations-Effekten zu (Bradbury et al., 2000).

Hierzu wurden HL-60-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in einer 12-well-Platte ausgesät und mit den entsprechenden Substanzen für 24 h

kultiviert. Anschließend wurden pro Probe je 100 µl in Lumineszenz-kompatible 96-well-Platten überführt und die Proben nach Zugabe aller Testreagenzien, laut Protokoll des Herstellers, bei 565 nm im Luminometer vermessen.

4.3.1.3.4 AlamarBlue-Test

Der *AlamarBlueTM Assay* (Serotec, Düsseldorf, Deutschland) wurde verwendet, um die Cytotoxizitätseigenschaften von Scutellarein auf primäre humane Hepatocyten (PHH) zu untersuchen.

Er beinhaltet einen Redoxindikator, der seine Fluoreszenz bezogen auf die jeweilige zelluläre metabolische Aktivität verändert. Die metabolische Aktivität der vitalen Zellen führt zu einer chemischen Reduktion der oxidierten Form von AlamarBlue (nicht-fluoreszent, blau) zur reduzierten Form (fluoreszent, rot). In Folge dessen kann die Vitalität der Zellen anhand spektrofluorometrischer Detektion (Extinktion: 530-560 nm; Emission: 590 nm) der reduzierten Form von AlamarBlue von mit Scutellarein (100 µM) behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt werden.

Die Cytotoxizität von Scutellarein (100 µM) auf HBV-infizierte primäre humane Hepatocyten wurde innerhalb des HBV-Infektionsexperiments V1 bestimmt. Hierzu wurden an Tag 12 bzw. 14 p.i. (*post infection*) das Medium je einer Vertiefung der unbehandelten, bzw. mit Scutellarein (100 µM)-behandelten infizierten PHH gewechselt und die Zellen für 4 bzw. 2 h mit 100 µl AlamarBlue-Lösung (10% des Zellkulturvolumens) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium geerntet und in Vierfachbestimmungen (je 50 µl) bei 37 °C die Vitalität der Zellen anhand der Fluoreszenz der Proben bestimmt (Extinktion: 560 nm; Emission: 590 nm). Als Kontrollen wurde die Fluoreszenz unbehandelter (Positivkontrolle), sowie mit 70%-igem Ethanol (15 min) inkubierter nicht-infizierter PHH (Negativkontrolle) detektiert.

4.3.1.3.5 DNA-Fragmentierung (DNA-Laddering)

Die DNA einer Zelle wird während der Apoptose durch Endonukleasen fragmentiert. Dabei entstehen primär sehr große DNA-Bruchstücke, später dann Fragmente zwischen

140 und 220 bp und deren Vielfache. Diese Größe ergibt sich aus „Histon-assoziiertes DNA“ (etwa 140 bp) + „Linker-DNA“ (etwa 20-80 bp) und deren Vielfachen (Arends et al., 1990; Cohen und Duke, 1984; Mc Conkey et al., 1989). Mittels Agarosegelelektrophorese lässt sich die Fragmentierung der DNA nachweisen, wobei sich das typische „Leitermuster“ ergibt. Dabei ist eine sehr gute Unterscheidung zur Nekrose möglich, da im Gegensatz zur Fragmentierung bei der Apoptose, die bei der Nekrose aktivierten DNAsen an jeder Stelle der DNA schneiden können, die Größe der DNA-Stücke damit zufällig ist und sich somit kein regelmäßiges Muster ausbildet. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass hiermit keine Quantifizierung der Apoptose erfolgen kann.

Zum Nachweis der Apoptose mittels „DNA-Laddering“ wurden je 1×10^6 Zellen in 24-well-Platten für 24 h mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde mAb7C11 (0,2 µg/ml) für 7 h mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (12000 rpm; 5 min) und mit je 1ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Tabelle 4.9) für 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation (13000 rpm) wurden die Überstände in neue Röhrchen überführt. Es wurden 600 µl Isopropanol zugegeben und die Röhrchen wiederum für 10 min (13000 rpm) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet mittels Speed-vac getrocknet. Das trockene Zellpellet wurde in 30 µl Ladepuffer (Tabelle 4.10) aufgenommen und mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%-igem Agarosegel für 45 min bei 120 V in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8) auf DNA-Fragmentierung untersucht.

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des Lysis-Puffers für die DNA-Fragmentierung.

Lysis-Puffer	
Triton X-100	1%
EDTA	20 mM
NaCl	200 mM
PBS (- MgCl ₂ /- CaCl ₂)	

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Ladepuffers.

Ladepuffer	
Tris (pH 7,5)	10 mM
Na-EDTA	16 mM
Glycerin	5%
Bromphenolblau	0,01% (w/v)
H ₂ O	

4.3.1.4 Freie Radikale und Oxidativer Stress

Oxidativer Stress stellt die Folge von übermäßig auftretenden Oxidantien in der Zelle dar (Sies, 1991). Zu den Auslösern von Oxidativem Stress zählen die sog. „reaktiven Sauerstoffspezies“ („*reactive oxygen species*“, ROS). Hierzu werden sowohl Sauerstoffradikale, als auch reaktive Nicht-Radikale zusammengefasst. Zu den wichtigsten zählen dabei Peroxyl-Radikale, Stickstoffmonoxid-Radikale, Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Ozon (O₃), Superoxidanionen-Radikale (O₂^{-•}), sowie Hydroxyl-Radikale (OH[•]) (Schwarzer, 2004).

Bei unzureichender antioxidativer Abwehr können die Radikale Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten, z.B. Lipidperoxidation (LPO) in den Zellmembranen verursachen.

Ein Übermaß an Oxidantien wird als ein gemeinsames Element in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson und M. Alzheimer angesehen (Simonian und Coyle, 1996).

Daher kommt der Quantifizierung von Parametern des Oxidativen Stress zentrale Bedeutung zu.

4.3.1.4.1 Glutathionspiegelmessungen in der Zelle

Glutathion ist seit langem als Antioxidans bekannt. Es kann in den Zellen in reduzierter (GSH) oder in oxidiertem (GSSG) Form vorliegen. Das intrazelluläre Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG) beeinflusst den Redoxzustand der Zelle. Dieser wird mit einer Reihe von Zellaktivitäten in Verbindung gebracht, wie der Stimulierung der Zellproliferation, der Aktivierung des Ubiquitin-Proteosomen-Stoffwechselweges und des Transkriptionsfaktors NFκB (Nuclear Factor kappa B), sowie Veränderung des Apoptoseverhaltens der Zellen (Kalder, 1999; Weisel, 2006).

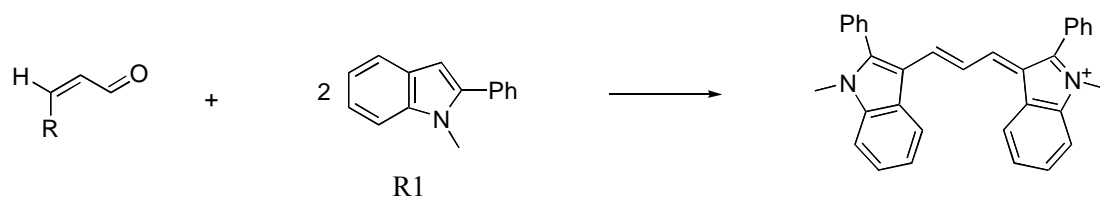
Um zu überprüfen inwieweit die Toxizitätsmechanismen von Quercetin und Xanthohumol oxidativen Stress in der Zelle mit beeinflussen, wurde der Glutathiongehalt von Jurkat- und SK-N-SH-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Quercetin (100 µM) bzw. Xanthohumol (50/100 µM) im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) bestimmt und auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen.

Die Glutathionspiegelmessungen mittels HPLC wurden im Labor der Psychiatrie Würzburg nach Protokoll durchgeführt (Blum-Degen et al., 1998).

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels des Bradford-Assays (vgl. 4.3.4.1) bestimmt.

4.3.1.4.2 Lipidperoxidation (LPO)

Radikale können Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten anrichten. Als Maß für die Zellschädigung dient z.B. die Bildung von Lipidperoxiden mit nachfolgendem Verlust von Zellmembranfunktionen und Zellmembranintegrität. Durch die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren und deren Estern kommt es mittels radikalischer Kettenreaktionen zur Bildung von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenale (HAE). Der *Lipidperoxidation Assay Kit* (Calbiochem[®], Darmstadt, Deutschland) basiert auf der Messung dieser beiden Endprodukte als Parameter für die Lipidperoxidation (LPO). MDA bzw. HAE reagieren jeweils mit zwei Äquivalenten des chromogenen Testreagenz R1 bei 45 °C zu einem stabilen Chromophor (mit einem Absorptionsmaximum bei 586 nm), welches spektrophotometrisch nachgewiesen werden kann (Abb. 4.3).



MDA: R = OH

4-Hydroxyalkenal: R = Hydroxyalkyl

Abb. 4.3: Reaktionsgleichung des Lipidperoxidations (LPO)-Nachweises. MDA bzw. HAE reagieren mit zwei Äquivalenten des Testreagenz R1 zu einem stabilen Chromophor.

Für den Test wurden die Zellen zunächst für 24 h mit den entsprechenden Substanzen (in 6-well-Platten) kultiviert, anschließend geerntet und zu einer „Konzentration“ von 20×10^6 Zellen pro Probe vereinigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (ohne $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$) wurden die Zellpellets in je 55 μl BHT/ H_2O -Lösung (0,5 μl einer 0,5 M BHT-Stocklösung in Acetonitril + 55 μl H_2O) aufgenommen. Die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, sowie mittels eines Eppendorf-Potters lysiert. Anschließend wurde der Lipidperoxidationstest nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurden die lysierten Zelllösungen zu den Reaktionslösungen des Kits gegeben und für 40 min bei 45 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis unterbrochen und die Proben anschließend bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (12000 rpm). Je 180 µl der Zellüberstände wurden in die Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben und die Absorption der Proben bei 586 nm gemessen.

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels des Bradford-Assays (vgl. 4.3.4.1) bestimmt und die gemessenen MDA- und HAE-Werte auf den ermittelten Proteingehalt der Proben normalisiert.

4.3.1.4.3 Lumi-Max-Superoxide-Anionen-Detection-Kit

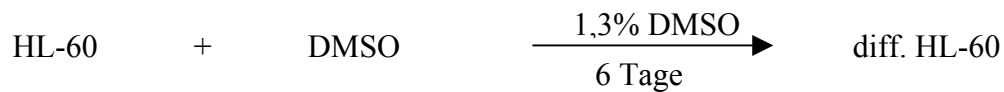
Superoxidanionen-Radikale sind kurzlebige Radikale molekularen Sauerstoffs. Sie zählen neben anderen zu den sog. „reaktiven Sauerstoffspezies“, den Auslösern von Oxidativem Stress.

Mittels des *Lumi-Max-Superoxide-Anionen-Detection-Kit* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurde untersucht, inwieweit die verwendeten Substanzen freie Superoxidanionen-Radikale abfangen können.

Abbildung 4.4 fasst die Durchführung des Experiments zusammen.

HL-60-Zellen wurden zunächst für 6 Tage mit 1,3% DMSO kultiviert. DMSO diente hierbei zum Differenzieren der Zellen (Bokoch und Prossnitz, 1992; Feuk-Lagerstedt, 1999). Dann wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen für 24 h inkubiert und anschließend nach einem Mediumwechsel mit PMA (200 ng/ml) zur Superoxidanionen-Produktion stimuliert (Prä-Inkubation), oder mit den entsprechenden Substanzen lediglich für 5 min inkubiert und anschließend (ohne Mediumwechsel) mit PMA (200 ng/ml) stimuliert (Co-Inkubation). Nach Zugabe von Luminol (200 µM) und Enhancer-Lösung (250 µM) bilden sich in Anwesenheit von Superoxidanionen-Radikalen chemilumineszente Signale, welche luminometrisch detektiert werden können.

- Differenzierung:



- Stimulierung:



- Detektion:

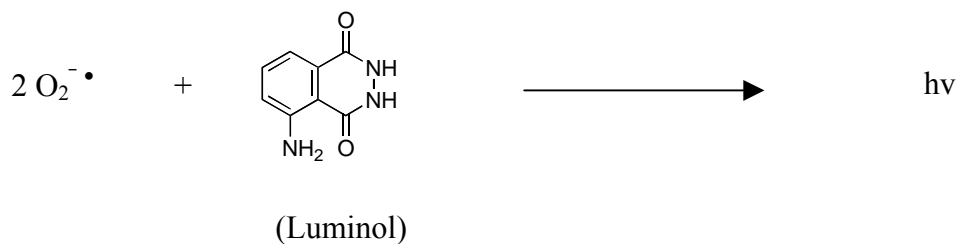


Abb. 4.4: Aufbau eines Experimentes mittels des *Lumi-Max-Superoxide-Anionen-Detection-Kit* zur Messung von Superoxidanionen-Radikalen: Zunächst wurden HL-60-Zellen für 6 Tage mit 1,3% DMSO kultiviert (Differenzierung). Dann wurden die Zellen mit PMA (200 ng/ml) zur Superoxidanionen-Produktion stimuliert (Stimulierung). Luminol wird in Anwesenheit von Superoxidanionen-Radikalen oxidiert, hierbei bilden sich chemilumineszente Signale, welche luminometrisch detektiert werden können (Detektion).

4.3.1.5 Mikroskopische Aufnahmen der SK-N-SH-Zellen und der primären humanen Hepatocyten

SK-N-SH-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in 24-well-Platten ausgesät und zunächst über Nacht kultiviert, bevor sie mit den entsprechenden Testsubstanzen für 24 h inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen unter einem Mikroskop nach Zelltodcharakteristika untersucht.

Auch die Vitalität der mit Hepatitis B infizierten primären humanen Hepatocyten wurde während der Versuchsreihen V1 und V2 (vgl. 4.3.5) anhand morphologischer Parameter unter dem Mikroskop kontrolliert.

4.3.2 RNA

4.3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung der RNA wurde der *Nucleo Spin[®] RNA and Virus Purification Kit* (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die RNA wurde dabei aus je 1×10^6 Zellen pro Probe nach dem Protokoll *F. BD AtlasTM Arrays RNA Isolation Protocol for Cultured Cells* des Herstellers isoliert.

Hierbei wurden die Zellen zunächst durch Zugabe von Lyse-Puffer und β -Mercaptoethanol (β -ME) lysiert und nach Zugabe von 95%-igem Ethanol in Säulen (*Nucleo Spin RNA Spin Columns*) überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde DNase I sowie DNase I-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe mit zwei Waschpuffern. Schließlich wurde die RNA mittels RNase-freiem Wasser aus den Säulen eluiert.

4.3.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration und -Qualität wurden photometrisch bestimmt (*Pharmacia Biotech, Gene Quant II; RNA/DNA Calculator*). Zur Messung wurde eine sterile UV-Lichtdurchlässige Küvette (*UV-ette; Eppendorf, Hamburg, Deutschland*) eingesetzt. Das eingesetzte Volumen betrug jeweils 50 μ l. Als Leerwert diente RNase freies Wasser.

Die Qualität der RNA und somit die Reinheit der RNA wurde anhand des Quotienten aus Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieser Quotient ($OD_{260/280}$) liegt bei reinen Nukleinsäure-Lösungen zwischen 1,75 und 2,0. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigungen z.B. durch Proteine an.

4.3.2.3 Aufreinigung viraler RNA

Da in der viralen RNA keine Introns vorhanden sind, würde eine Differenzierung zwischen Zielprodukt und Kontamination nicht über die Länge der PCR-Produkte gelingen. Daher war es wichtig die virale RNA vor der RT-PCR nochmals von Verunreinigungen mit genomischer DNA zu reinigen, um eindeutige quantitative Aussagen nach der RT-PCR treffen zu können.

Hierzu wurde die virale RNA vor der RT-PCR mittels des *OligotexTM* Kit (*Purification of poly A⁺ RNA from total RNA*; Qiagen, Hilden, Deutschland), nach Protokoll des Herstellers gereinigt.

Hierzu wurden 5 µl virale RNA, die Oligotex-Suspensionslösung, sowie Pufferlösungen in ein Reaktionsgefäß gegeben und zunächst für 3 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in Pufferlösung resuspendiert und auf eine Säule gegeben. Es folgten zwei Waschschrte bevor die gereinigte RNA mittels Puffer von der Säule eluiert wurde.

4.3.3 DNA

4.3.3.1 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription (RT) wird die aus der Zelle isolierte RNA (bzw. die darin enthaltene mRNA) mittels eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, sowie eines Primers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Für die cDNA-Synthese wurde der *AdvantageTM RT-for-PCR Kit* (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Zu 1 µg der aus den Zellen isolierten RNA wurde der Random Hexamer Primer zugegeben, die Lösung für 2 min auf 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach weiterer Zugabe von Reaktionspuffer, dNTP-Mix, rekombinantem RNase-Inhibitor und des Enzyms MMLV Reverse Transkriptase wurde die Reaktionslösung für 1 h bei 42 °C inkubiert. Ein fünfminütiges Erhitzen auf 94 °C schließt die cDNA-Synthese ab. Die gewonnene cDNA wurde danach direkt als Matrize für die PCR eingesetzt, oder bei -20 °C gelagert.

4.3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt, der 1993 dafür den Nobelpreis erhielt (Mullis und Faloona, 1987).

Die PCR dient zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Dabei erfolgt die Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnittes mittels zwei flankierender

hybridisierender Oligonukleotide (Primer) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion besteht im wesentlichen aus drei sich wiederholenden Schritten.

Ein Zyklus eines PCR-Programmes beinhaltet:

- 1.) Denaturierung: Die doppelsträngige DNA-Matrize wird in ihre beiden Einzelstränge getrennt.
- 2.) Annealing: Die beiden Primer hybridisieren an die einzelnen DNA-Stränge.
- 3.) Elongation: Im Elongationsschritt werden die zuvor an die Matrize hybridisierten Oligodesoxynukleotide durch die DNA-Polymerase verlängert (DNA-Polymerisation).

Bei optimalen Bedingungen verdoppelt sich bei der PCR theoretisch mit jedem Zyklus die Menge der Zielsequenz.

Die Spezifität der PCR beruht zu einem großen Teil an den spezifischen Primern. Um die Bildung von Primerdimer-Formationen und ungünstiger Sekundärstrukturen zu minimieren, wurden die Primer mit Hilfe eines spezifischen Programms (Primer 3; Krawetz und Misener, 2000) ausgewählt.

4.3.3.2.1 Amplifizierung von DNA durch PCR

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt.

Pro Probe wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Substanz	Volumen [μl]
cDNA (Template)	1
10 \times PCR-Puffer (15 mM MgCl_2)	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (je 10 μM)	je 0,5
Taq-Polymerase	0,5
dH ₂ O	19,5

Die PCR wurde in einem Thermocycler (*Genius*, *Techne* oder *Trio Thermoblock*, *Biometra*) bei folgendem Programm durchgeführt:

- PCR-Programm:

	94 °C	7 min	
Denaturierung:	94 °C	30 sec	} 40 Zyklen
Annealing:	58 °C	30 sec	
Elongation:	72 °C	60 sec	
	72 °C	7 min	

Im Anschluß an die PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.3.3.2.2 Quantitative PCR (Realtime-PCR)

Neben dem qualitativen Nachweis eines Transkriptes durch die PCR wurden auch quantitative Bestimmungen der Genexpression mittels Realtime-PCR durchgeführt.

4.3.3.2.2.1 Prinzip

Die Technologie der Realtime-PCR kombiniert die DNA-Amplifikation (PCR) mit der Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß vom Ansatz bis zur Auswertung. Bei der Entwicklung dieser Technik war die Grundidee der Versuch, die Amplifikation des PCR-Produktes in Echtzeit zu beobachten. Realtime-PCR Systeme stellen eine Kombination zweier Geräte dar: zum einen einen Thermocycler zum Durchführen der eigentlichen PCR, zum anderen ein optisches Detektionsmodul zum Messen der entstehenden Fluoreszenz (Bustin 2002; Bente, 2003). Die während des Amplifikationsprozesses emittierte Fluoreszenz wird während jedes PCR-Zyklus gemessen und ermöglicht so eine graphische Darstellung der Amplifikation, die es dem Anwender erlaubt, die Reaktion in Echtzeit (engl.: *real time*) zu beobachten.

Die Visualisierung des PCR-Amplikons ist grundsätzlich mit zwei verschiedenen Fluoreszenzdetektionssystemen möglich: einem nicht-spezifischem Detektionssystem, welches auf der Markierung des Amplikons durch interkalierende Farbstoffe basiert, und einem spezifischem Detektionssystem, welches fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. Beide Detektionsmethoden beruhen auf der Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Visualisierung des PCR-Amplikons erstere Methode, mittels interkalierender Farbstoffe durchgeführt. Dabei wurde als Farbstoff SYBR GreenTM verwendet. Interkalierende Farbstoffe emittieren, nach Anregung durch energiereiches UV-Licht, Licht im sichtbaren energieärmeren Wellenlängenbereich (Fluoreszenz). SYBR Green besitzt eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm (Higuchi et al., 1992). Liegt der Farbstoff frei vor, ist die Emission sehr gering. Erst durch die Interkalierung des Farbstoffes in die kleine Windung der doppelsträngigen DNA wird die Lichtemission verstärkt (Higuchi et al.,

1993). Die Fähigkeit des Farbstoffes zur Einlagerung in die kleinen Windungen der DNA ist auf seinen planaren Molekülaufbau zurückzuführen.

Den Vorteilen interkalierender Farbstoffe, wie z.B. ihre universelle Verwendbarkeit, oder ihre hohe Signalstärke auf der einen Seite, stehen auf der anderen Seite Nachteile, wie keine prinzipielle Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakten (z.B. Primerdimere) gegenüber.

Eine klare Differenzierung zwischen Primerdimeren bzw. Artefakten und Zielfragment ist daher notwendig (Vandesompele et al., 2002; Bente, 2003) und kann z.B. mittels einer Schmelzpunktanalyse am Ende der eigentlichen PCR erfolgen (Ririe et al., 1997). Hierfür wurde das Reaktionsgemisch in 1 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Punkt, an dem doppelsträngige DNA schmilzt, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der einzelsträngigen DNA dissoziiert. Diejenige Temperatur, bei welcher die Signalabnahme maximal ist, wird definitionsgemäß als Schmelztemperatur bezeichnet. Zur besseren Identifizierbarkeit der maximalen Intensitätsänderungen werden die Schmelzkurven als Peakkurven dargestellt. Bei den Peakkurven handelt es sich um die negative erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur. Die einfach zu erkennende Lage der Peakmaxima entspricht dann der Schmelztemperatur des Produkts (Abb. 4.5). Unterschiedlich große Produkte und Produkte mit unterschiedlichen Sequenzen haben unterschiedliche Schmelzpunkte. Damit gewinnt dieses System an Spezifität und erlaubt es, ein spezifisches Produkt von Artefakten zu unterscheiden (Ririe et al., 1997; Bente, 2003).

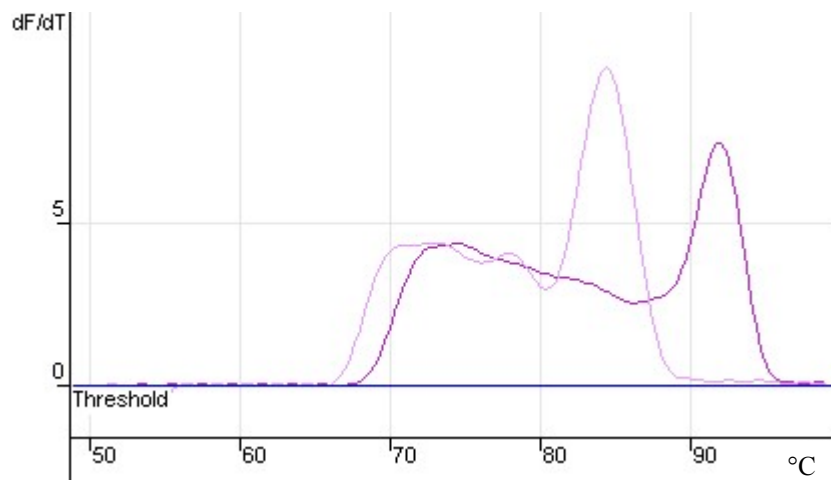


Abb. 4.5: Darstellung der Schmelzpunktanalyse. Nach der eigentlichen PCR wurde das Produkt von 50 °C an in 1 °C-Temperaturschritten bis zu einer Endtemperatur von 95 °C erhitzt. Bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur denaturiert der Doppelstrang. Bei der Schmelztemperatur der Produkte zeigen die gemessenen Signalkurven ein lokales Maximum in der Abnahme der Fluoreszenzintensität. Zur besseren Identifizierbarkeit der maximalen Intensitätsänderungen werden die Schmelzkurven als Peakkurven dargestellt. Dabei handelt es sich um die negative erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur.

4.3.3.2.2 Durchführung

Die Realtime-PCR wurde jeweils in einem Volumen von 25 µl durchgeführt.

Pro Probe wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Substanz	Volumen [μl]
cDNA (Template)	1
10 \times PCR-Puffer (20 mM MgCl_2)	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (je 10 μM)	je 0,5
Taq-Polymerase	0,5
SYBR-Green (100 \times)	0,71
dH ₂ O	19,29

Die Realtime-PCR wurde in einem *Rotorgene 2000 Real-Time Cycler* (Corbett Research) bei folgendem Programm durchgeführt:

- PCR-Programm:

	94 °C	7 min	
Denaturierung:	94 °C	30 sec	} 40-50 Zyklen
Annealing:	58 °C	30 sec	
Elongation:	72 °C	60 sec	
	72 °C	7 min	

Anschließend wurde der Lauf mittels der Methode der Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung ausgewertet (Pfaffl, 2001).

4.3.3.2.3 Auswertung

Bei der Realtime-PCR erfolgt die Messung der emittierten Fluoreszenz eines Farbstoffes während jedes einzelnen Zyklus. Emittierte Fluoreszenz und entstehendes Amplifikat sind linear proportional. Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden zum Zweck der Auswertung in einer graphischen Darstellung gegen die Zyklenzahl aufgetragen (Abb. 4.6).

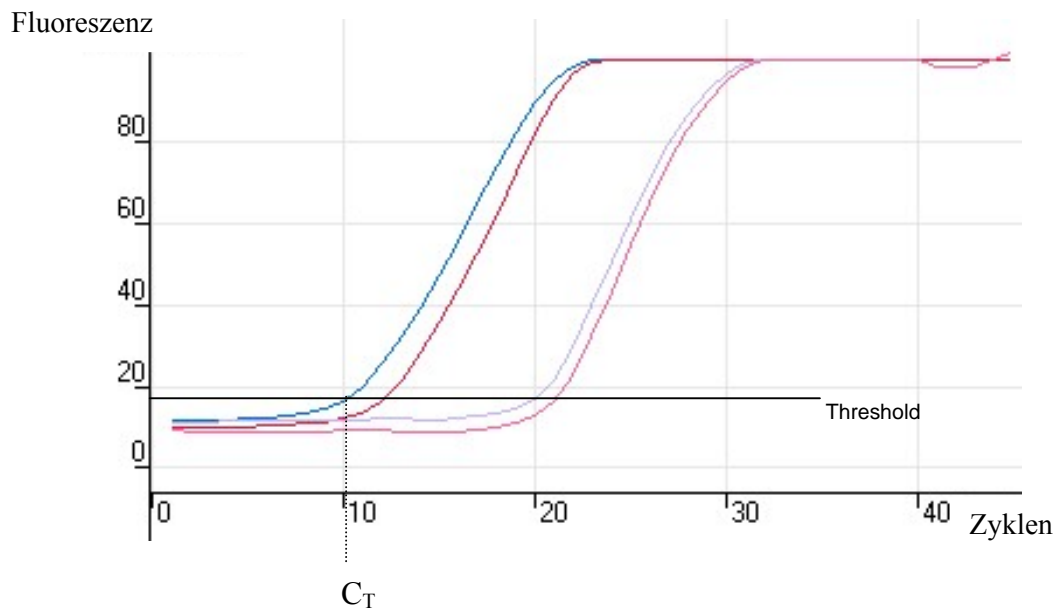


Abb. 4.6: Darstellung einer Amplifikationsgraphik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Der Schwellenwert (*Threshold*) stellt eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und Hintergrundfluoreszenz dar. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als *Cycle-Threshold* (C_T) bezeichnet. Er markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

Vor dem Anstieg der Fluoreszenz bleibt die gemessene Fluoreszenz für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert und verläuft als gerade Linie parallel zur Abszisse. Dieser Bereich wird als Basislinie bezeichnet. Um einen Punkt zu definieren, ab dem die gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hintergrundfluoreszenz zu

unterscheiden ist, wird ein Schwellenwert (*Threshold*) gesetzt. Er stellt eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz dar. Der Schnittpunkt zwischen der Fluoreszenz und dem Schwellenwert auf die Abszisse projiziert, wird als *Cycle-Threshold* (C_T) bezeichnet. Er gibt die Zyklenzahl an, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals den Schwellenwert erreicht. Der C_T -Wert steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA und dient als Grundlage für die Quantifizierung des Reaktionsproduktes (Bustin, 2000; Bente, 2003).

Die Quantifizierung kann relativ oder absolut erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung verwendet, da sie für Genexpressionsstudien eine adäquate Quantifizierungsmethode darstellt (Bente, 2003). Dabei wird das Verhältnis der Menge an RNA in der zu untersuchenden Probe zu der Menge RNA in einer anderen Probe (Kontrolle) bestimmt. Neben der eigentlichen Zielsequenz wird zusätzlich eine „endogene Kontrolle“, ein sog. Referenzgen mit amplifiziert. Dabei handelt es sich um ein ubiquitär und in einer konstanten Menge in den verwendeten Zellen vorkommendes, unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen weitgehend konstant exprimiertes sog. „*Housekeeping Gene*“ („Haushaltsgen“). Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde das Gen 18S dafür verwendet.

Die Berechnung selbst kann nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erfolgen (Pfaffl, 2001):

$$\Delta C_T(\text{Probe}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta C_T(\text{Kontrolle}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Ratio gibt dabei den normalisierten Expressionswert des Zielgens in der untersuchten Probe an.

Um die $\Delta\Delta C_T$ -Methode anwenden zu können, müssen die Effizienzen der PCR-Zielsequenz und die der Referenzreaktion nahezu identisch sein. Da dies in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war, wurde zur Auswertung der Realtime-PCR-Läufe eine Sonderform der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung gewählt (Pfaffl, 2001):

$$Ratio = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{T\text{Zielgen}} (Kontrolle-Probe)}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{T\text{Referenzgen}} (Kontrolle-Probe)}}$$

Dabei wurde die PCR-Effizienz (E) des Ziel- und des Referenzgens aus der Steigung der Standardkurven einer Verdünnungsreihe der Proben für jeweils beide Gene ermittelt.

4.3.3.2.3 PNA-angereicherte PCR

PNA steht für „*peptide nucleic acid*“. Ursprünglich wurde PNA von Nielsen et al. (1991) als DNA Bindungs-Reagenz entwickelt, um den Mechanismus der Doppelhelix-Invasion zu untersuchen (Nielsen et al., 1991). Inzwischen wird die hohe Bindungsaffinität von PNA zur Detektion von Einzelbasenpaaraustauschen mittels PCR genutzt.

PNA ist ein modifiziertes Oligomer. Es bildet PNA-DNA-Hybride aus, welche thermisch stabiler und spezifischer sind als die entsprechenden DNA-DNA-Hybride. In Folge einer Einzelbasen-Fehlanpassung („Einzelbasen-Mismatch“) sinkt jedoch die Stabilität der PNA-DNA-Hybride unter die Stabilität der entsprechenden DNA-DNA-

Hybride. Aus diesem Grund ist eine PNA-angereicherte PCR gut zum Nachweis von Einzelbasenaustauschen geeignet (Kirishima et al., 2002).

Die PCR wurde wie unter 4.3.3.2.1 beschrieben, unter Zugabe von zusätzlich je 0,5 µl PNA-2-Lösung (10 µM) zum PCR-Master-Mix und unter Verwendung des unten angegebenen PCR-Programmes durchgeführt.

- PCR-Programm:

	95 °C	5 min	
Denaturierung:	95 °C	30 sec	} 40 Zyklen
PNA-Annealing:	72 °C	60 sec	
Annealing der Primer und Elongation:	58 °C	30 sec	
	63 °C	7 min	

4.3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Produkte können mittels Gelelektrophorese im Agarosegel detektiert werden. Agarose, ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, ist ein lineares Polymer aus alternierenden 1,3-verknüpften β-D-Galaktopyranose- und 1,4-verknüpften 3,6-Anhydro-α-L-Galactopyranose-Resten. Agarose löst sich beim Erhitzen in Wasser und bildet beim Abkühlen ein Gel mit einer netzwerkartigen, dreidimensionalen Struktur (mittlerer Porendurchmesser 150 nm). Je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% bzw. 3% verwendet. Der Nachweis der DNA im Agarosegel erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid (10 mg/ml - hiervon 9 µl auf 500 ml) zur Agarosegellösung. Ethidiumbromid ist ein roter Farbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und in diesem Zustand sehr stark, in der Lösung hingegen nur sehr schwach fluoresziert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch nahes UV-Licht, die Fluoreszenzemission ist im orange-roten Bereich des sichtbaren Lichtes (509 nm) wahrnehmbar.

Die Elektrophorese der DNA beruht auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren im homogenen elektrischen Feld durch die Agarose-Trägermatrix. Dabei wandern kleinere Fragmente schneller als größere. Verschieden große Fragmente können so voneinander getrennt werden.

Die amplifizierten PCR-Produkte der zu untersuchenden DNA-Proben wurden auf das Gel aufgetragen und bei 120 V für 30 min in $1 \times$ TAE-Puffer aufgetrennt.

Zur Bestimmung der Länge des entstandenen Produktes wurde ein 100 bp-Standard mit auf das Gel aufgetragen. Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele auf einem UV-Durchlichtgerät (*MWG-Biotech*) mit Hilfe einer CCD-Optik (*Hitachi*) aufgenommen und digitalisiert.

Bei der präparativen Agarosegelelektrophorese wurden nach der Elektrophorese die gesuchten DNA-Banden der gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht aus der Gelmatrix ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA durch Extraktion wiedergewonnen.

4.3.3.4 Gelextraktion

Zur Wiedergewinnung der DNA wurden die gesuchten Banden der amplifizierten PCR-Produkte nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des Gelextraktionskits *Nucleo Spin[®] Extract II* (*Macherey-Nagel*; MN, Düren, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers die DNA isoliert.

Hierbei wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in Lysepuffer bei 50 °C (5-10 min) aufgelöst, anschließend die Lösungen auf Säulen aufgetragen und nach mehreren Waschschritten die DNA mittels Puffer von den Säulen eluiert.

4.3.3.5 Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Um die beiden GluR 2-Spleißvarianten „flip“ und „flop“ unterscheiden zu können wurde ein enzymatischer Assay durchgeführt (Kortenbruck et al., 2001). Dabei wird das PCR-Amplifikat mit Restriktionsenzymen, welche die zu untersuchenden Stellen spezifisch schneiden, inkubiert und die hieraus entstehenden Produkte mittels

Gelelektrophorese ausgewertet. Anhand der Länge der erhaltenen Fragmente ist dann eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Varianten möglich.

Für den Test wurde zuerst ein PCR-Produkt der zu untersuchenden Region mittels flankierender Primer amplifiziert. Das Amplifikat wurde zusammen mit 0,5 µl BSA, 0,5 µl (1000 U/ml) spezifischem Enzym und 1,5 µl eines auf das jeweilige Enzym abgestimmten Puffers bei der optimalen Enzymreaktionstemperatur über Nacht inkubiert. Die hieraus erhaltenen Produkte wurden mittels Gelelektrophorese ausgewertet.

4.3.3.6 Genexpressionsstudien mittels cDNA-Array

4.3.3.6.1 Prinzip

Mit Hilfe von Arrays kann innerhalb eines Experiments die Expression vieler Gene parallel analysiert werden.

Der *GEArray S Series Human Dendritic & Antigen Presenting Cell Gene Array* (*Superarray*, BIOMOL, Hamburg, Deutschland) ist ein cDNA-Array. Er enthält die auf Nylonmembranen immobilisierte cDNA von 171 ausgewählten Genen, die einerseits ein breites Spektrum der immunrelevanten Gene abdecken; darüber hinaus sind aber auch einige ubiquitär exprimierte Gene (*Housekeeping Gene*; Haushaltsgene) zur Normalisierung der Signale, sowie Positiv- und Negativkontrollen vorhanden.

Abbildung 4.7 zeigt eine vollständige Liste aller Gene, sowie deren Platzierung auf der Membran.

GUSB	GUSB	ACPP	ADAM19	ADAMDEC 1	ADAR	AIM2	ARHGDJB	ATF4	ATM	B3GALT2	B7H2	PPIA	PPIA
GUSB	BASP1	CCL16	CCL17	CCL18	CCL19	CCL20	CCL21	CCL22	CCL3	CCL5	CCR1	CCR3	PPIA
CCR5	CCR6	CCT6A	CD1A	CD1B	CD1C	CD1D	CD209	CD36	CD44	CD47	CD58	CD74	CD80
CD38	CD86	CDKN1A	CDW52	CEBPA	CFLAR	CHD4	CLEC-6	CLECSF12	CLECSF6	CRF	CSF1R	CST7	CX3CL1
CXCL16	CXCR4	DCSTAMP	DCTN2	EBI3	ECGF1	F13A1	FCAR	FCER1A	FCER1G	FCER2	FCGR1A	FCGR2B	FSCN3
GIP2	GIP3	GBP3	GPX4	HLA-DMA	HLA-DMB	ICAM1	ICAM2	ICOS	IFI16	IFI27	IFI30	IFI44	IFIT1
IFIT2	IFIT4	IFNA1	IFNB1	IFNG	IFNGR1	IGSF6	IL10	IL12A	IL12B	IL15	IL16	IL18	IL1A
IL1B	IL2	IL6	IL8RA	ISG20	ITGAM	ITGB2	LAMP3	LANGERIN	LILRB4	LIPA	LOC286272	LY75	MAP4K3
MARCKS	MGC27165	MLP	MRF-1	MT2A	MX1	NFKB1	NFKB2	NR3C2	PFN1	PIM2	PLAUR	POR	PRG1
B2M	PRKRA	RAC1	RELA	RELB	RNASE6	S100A4	S100B	SOD2	STK4	TAP1	TAP2	TLR2	TLR3
B2M	TLR4	TLR6	TLR9	TNF	TNFRSF5	TNFRSF6	PUC18	PUC18	PUC18	PUC18	Blank	Blank	Blank
B2M	TNFSF11	TNFSF14	TNFSF4	TNFSF9	TRAI	VCL	ZNF398	ACTB	ACTB	ACTB	GAPD	GAPD	GAPD

Abb. 4.7: Gentabelle des cDNA-Arrays *GEArray S Series Human Dendritic & Antigen Presenting Cell Gene Array (Superarray)*. In blau sind die Haushaltsgene, nach welchen normalisiert wurde und in rot die Blanks gekennzeichnet.

4.3.3.6.2 Durchführung

Als Ausgangsmaterial wurde die RNA aus den zu vergleichenden Proben isoliert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des *Ampo Labeling-LPR-Kit* (*Superarray*, *BIOMOL*, Hamburg, Deutschland) in cDNA umgeschrieben und mit Biotin-16-dUTP (*Roche*, Mannheim, Deutschland) markiert und anschließend die Hybridisierungsversuche durchgeführt:

Die Membranen wurden mit Lachssperma-DNA (*genaxxon bioscience*, Stafflangen, Deutschland) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, und dann über Nacht mit den mit Biotin markierten cDNA-Proben hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mehrmals mit Waschpuffer gewaschen.

Für die folgende chemilumineszente Detektion (*Chemiluminescent Detection Kit*, *upstate*, *BIOMOL*, Hamburg, Deutschland) wurden die Membranen für 40 min bei RT mit *GEA blocking Solution Q* blockiert, anschließend 10 min mit *Binding Buffer* inkubiert (RT) und nach mehreren Waschschritten schließlich in CDP-Star chemilumineszentem Substrat für 5 min (RT) geschwenkt. Zur Detektion wurden die Membranen zunächst laminiert und anschließend mit Röntgenfilmen für verschiedene Zeiträume (1-5 min) exponiert. Die entwickelten Röntgenfilme wurden zur weiteren Auswertung digitalisiert.

4.3.3.6.3 Auswertung

Für die Auswertung der cDNA-Arrays wurden die Signalintensitäten der einzelnen cDNA-„Spots“ auf den Röntgenfilmen zwischen den „behandelten“ und den „unbehandelten“ Proben verglichen. Zur Bearbeitung wurde die Auswertungs-Software der Firma Superarray verwendet.

Hierbei wurde die Schwärzung der einzelnen Punkte ermittelt (mittlere optische Dichte; OD/mm²) und hiervon der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf die Expression ausgewählter sog. Haushaltsgene, wie GUSB (Beta-Glucuronidase), PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A), B2M (Beta-2-microglobulin), ACTB (Beta Actin) und GAPD (Glyceraldehyd-3-

phosphat-dehydrogenase) normalisiert und die stärker oder schwächer exprimierten Gene identifiziert.

Zur Ermittlung der differentiell exprimierten Gene wurden die Quotienten aus der normalisierten Expression im Versuchs- und im Kontrollansatz gebildet. Dabei wurden Veränderungen um mehr als das zweifache relativ zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) bzw. um weniger als den Faktor 0,5 als signifikant gewertet.

4.3.3.7 Klonierung

Die benötigten PCR-Produkte wurden über Plasmide in kompetente *E. coli*-Stämme überführt und dort vermehrt.

4.3.3.7.1 Prinzip

Plasmide sind extrachromosomal vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle. Das Klonieren eines PCR-Produktes in einen vorgegebenen Klonierungsvektor (Insertion), im vorliegenden Fall *pCR 2.1-TOPO*-Vektor, und das anschließende Einbringen dieses Plasmids in das Zytoplasma kompetenter *E. coli*-Zellen (Transformation), hier *E. coli TOP 10*, ermöglicht die Vermehrung der Zielsequenz. Dabei erfolgt eine zweifache Selektion der Bakterienkolonien. Der Klonierungsvektor enthält die Gensequenz für die Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und Kanamycin. Da die Agarmedien für die Bakterienkolonien eines dieser beiden Antibiotika enthalten (in der vorliegenden Arbeit Ampicillin), können sich nur diejenigen *E. coli*-Stämme vermehren, die das Plasmid enthalten und damit antibiotikaresistent sind. Um Bakterienkolonien die einen leeren Vektor enthalten, von denjenigen unterscheiden zu können, die einen mit dem zu klonierenden DNA-Produkt haben, enthält der Vektor die genetische Information der ersten 146 Aminosäuren des Galaktosidasegens. In dieser Sequenz liegt die Insertionsstelle für das zu klonierende DNA-Produkt (*multiple cloning site*). Solche Vektoren werden für Wirtszellen benutzt, welche für das carboxy-terminale Ende der Galaktosidase kodieren. In einem Prozess, der als Komplementierung bezeichnet wird, ergeben die Proteinfragmente des Galaktosidasegens sowie die der Wirtszelle ein enzymatisch aktives Enzym, welches in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-

D-galaktosidase zur Blaufärbung der Bakterienkolonien führt. Kommt es jedoch zu einer Insertion des zu klonierenden DNA-Produktes, so verhindert dies die Komplementierung und die Bakterienkolonien erscheinen weiß („Blau-Weiß-Screening“).

4.3.3.7.2 Durchführung

Die Klonierung erfolgte mittels des *TOPO TA Cloning*[®] Kits unter Verwendung von *pCR 2.1 TOPO-Vektoren* und kompetenten *E. coli*-Zellen (*TOP 10 Chemically Competent E. coli*) der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

Genotyp (TOP 10):

F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139
D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

Abb. 4.8: Genotyp der TOP 10 *E. coli*-Zellen.

Die Ligation zwischen dem Vektor und dem Insert wird durch die Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase vermittelt. Die Taq-Polymerase besitzt eine Template unabhängige Aktivität, mit der einzelne Desoxyadenosin-(A)-Überhänge an das 3'-Ende des synthetisierten PCR-Produktes angehängt werden können. Diese cDNA-Fragmente können dann in die vorbereiteten Vektoren inkloniert werden. Dabei binden die am 3'-Ende des linearisierten Vektors befindlichen Desoxythymidin-(T)-Reste kovalent mit den Desoxyadenosin-(A)-Überhängen. Dadurch wird erreicht, dass Vektor und Insert mit hoher Frequenz ligiert werden können.

Der verwendete *pCR 2.1 TOPO-Vektor* besitzt eine *ColE1* origin zur Replikation von *E. coli*, einen versatilen Polylinker, Gene für die Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz und ein *lac-Z*-alpha-Komplement zur blau-weiß-Selektion der Transformanten (Abb. 4.9).

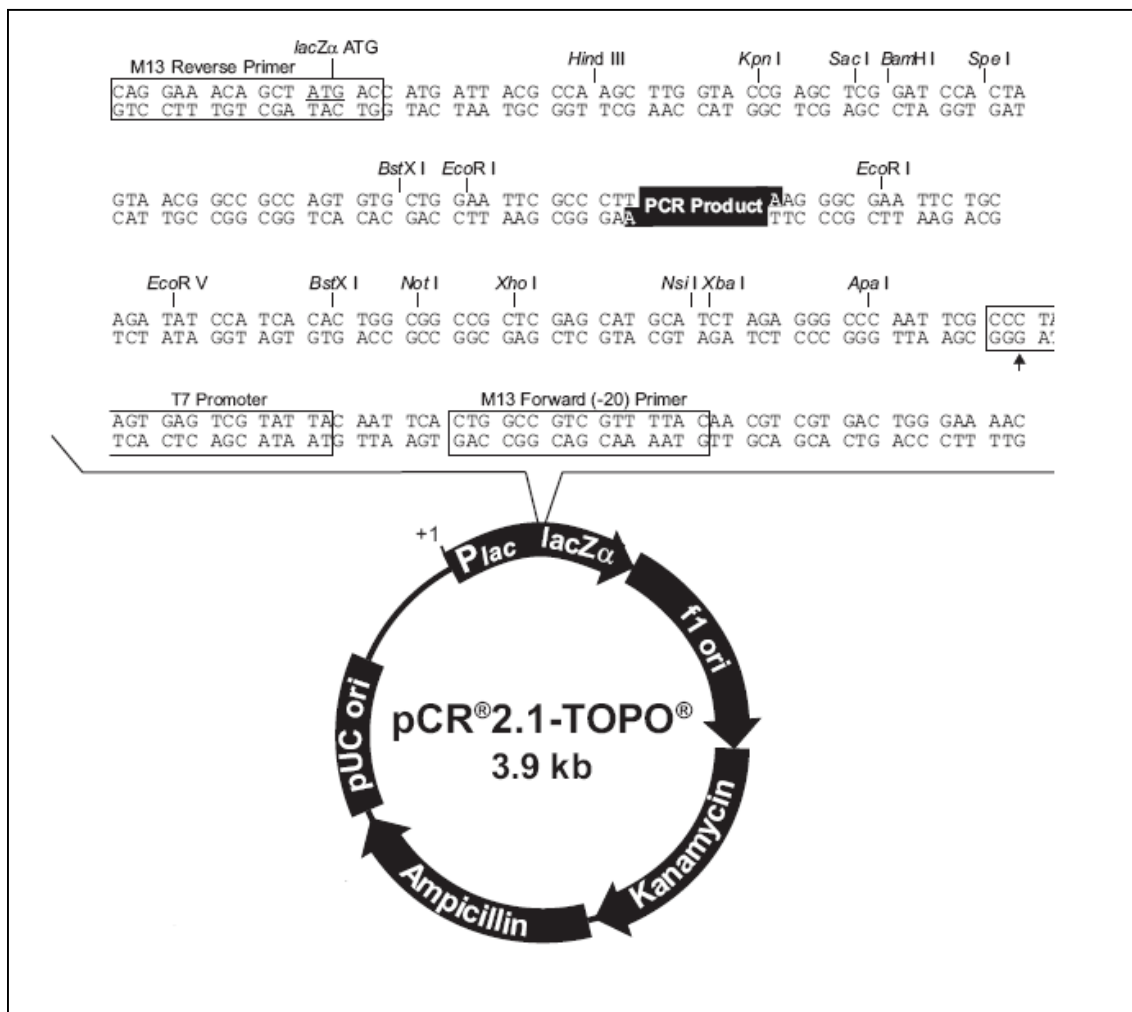


Abb. 4.9: Vektorskizze des *pCR 2.1 TOPO*-Vektor (nach Kothe, 2003). Eingezeichnet ist u.a. die Position der Vektorprimer (M13 Reverse Primer, M13 Forward Primer), die Schnittstelle für das Einfügen des PCR-Produktes, sowie Enzymschnittstellen.

Nach der Ligation des PCR-Produktes in den Vektor erfolgte die Transformation in *E. coli*-Zellen.

Um Fremd-DNA in Bakterien einführen zu können, müssen die Zellen in den Zustand der Kompetenz überführt werden. Die Kompetenz, d.h. die Fähigkeit von *E. coli*-Zellen zur Aufnahme fremder DNA, ist abhängig vom Wachstumsstatus und der Vorbehandlung der Zellen (Hanahan, 1983; Schreck, 1995). Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli TOP 10*-Bakterien der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe, Deutschland) verwendet (Abb. 4.8).

Die TOP 10 E. coli-Aliquote wurden auf Eis aufgetaut, je 3 µl des Ligationsproduktes wurden zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 sec bei 42 °C und sofortige Abkühlung auf Eis. Auf diese Weise wird die Aufnahme von DNA in die Zelle durch die nun poröse Zellmembran erleichtert. Zu jedem Ansatz wurden 500 µl LB-Medium (Tabelle 4.11) pipettiert und bei 37 °C für 1 h bei 600 rpm im Thermoblock geschüttelt. Anschließend fand die Selektion der so transformierten Zellen auf Agarplatten, die zuvor mit Ampicillin versetzt worden waren, statt.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung des LB-Mediums.

LB-Medium	
Bacto-Tryptone	10 g
Bacto-Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

Die transformierten E. coli-Bakterien wurden in verschiedenen Konzentrationen (1:2-, 1:10-Verdünnungen) auf die vorbereiteten Nährböden (Zusammensetzung des LB-Agars vgl. Tabelle 4.12) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 4.12: Zusammensetzung des LB-Agars.

LB-Agar	
Bacto Tryptone	5,0 g
Bacto Yeast extract	2,5 g
NaCl	5,0 g
Bacto Agar	7,5 g
H ₂ O	auf 500 ml auffüllen
Ampicillin (100 mg/ml)	500 µl (= 0,05 g)
<u>für Blau-Weiß-Screening zusätzlich:</u>	
IPTG (200 mM)	90 µl
X-Gal (40 mg/ml)	500 µl

4.3.3.8 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden die weißen Klone der LB-Agarplatten gepickt und LB-Kulturen, bestehend aus je 2 ml LB-Medium mit 2 µl Ampicillin (100 mg/ml), mit diesen Kolonien angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht bei 37 °C wurde die Plasmid-DNA (*QIAprep*[®] *Miniprep-Kit*, *Qiagen*, Hilden, Deutschland) gewonnen.

Dazu wurden die Übernachtskulturen zentrifugiert (4000 rpm; 5 min) und das Zellpellet in Puffern resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Säule (*QIAprep Spin Column*) aufgetragen und dort gebunden. Nach mehreren Waschschritten konnte die reine Plasmid-DNA mittels Elutionspuffer von der Säule eluiert werden.

4.3.3.9 Sequenzierung

Die unter 4.3.3.8 gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung zu *Geneart* (Regensburg, Deutschland) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit den Programmen *SeqMan* und *Macaw* ausgewertet.

4.3.3.10 Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Lagerung von (Plasmid-) DNA wurden Glycerinkulturen (Glycerolkulturen) angelegt. Hierzu wurden 2 ml einer Übernachtskultur für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 1,5 ml LB/Glycerin-Lösung (LB:Glycerin = 1:1) resuspendiert, zu je 750 µl auf zwei Cups verteilt und bei -80 °C gelagert.

4.3.4 Proteinchemische Methoden

4.3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

Das Prinzip des Tests beruht auf der Tatsache, dass die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an ein Protein eine Verschiebung des Absorptions-Maximums des Farbstoffes von 465 zu 595 nm verursacht. Dieser Absorptionsanstieg wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand von vergleichenden Standardkurven mit *Bovine serum albumin* (BSA) kann dann der entsprechende Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

4.3.4.2 Western Blots

4.3.4.2.1 Prinzip

Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik, Edwin Southern zurück, der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blotting eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von Proteinen als Western Blotting bezeichnet

Der Western Blot bietet die Möglichkeit ein spezifisches Protein in dem komplexen Proteingemisch einer Zelle zu identifizieren. Dazu werden die Zellproben zunächst in SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen und auf 100 °C erhitzt. Dabei kommt es zu einer Reduktion der Disulfidbrücken und einer vollständigen Denaturierung der Proteine.

Anschließend folgt die Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE). In der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid), das als Molekularsieb fungiert. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine aufgrund ihrer Masse trennen. Die Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Lösung nicht-kovalenter Bindungen in nativen Proteinen. Die SDS-Anionen binden sich an die Hauptketten der Proteine, und der gebildete Komplex aus SDS und denaturiertem Protein wird dann der Elektrophorese unterworfen. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine wird ein konstantes Verhältnis zwischen der Nettoladung und dem Molekulargewicht der Proteine erreicht. Damit ist die Laufstrecke eines Proteins im elektrischen Feld indirekt proportional zu dessen Molekulargewicht.

Die Proteine durchwandern zunächst ein Sammelgel, um in einer scharfen Bande konzentriert zu werden, und werden erst im anschließenden Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Innerhalb eines Gels wäre die Detektion von Proteinen mit Antikörpern nur unter Verlust der Auflösung, oder meist gar nicht zu erreichen. Daher werden die im SDS-

PAGE aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine PVDF- (Polyvinyliden-fluorid) Membran transferiert (geblottet). Der Transfer wurde mittels des Semidry-Blot-Verfahrens durchgeführt (Abb. 4.10).

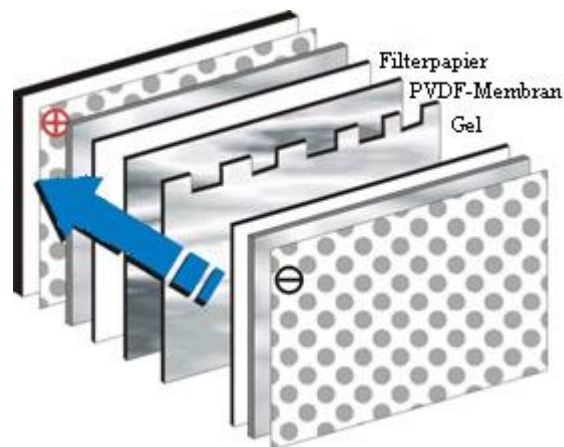


Abb. 4.10: Semidry-Blot-Verfahrenen ².

Hierbei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Das an den Proteinen angelagerte SDS wird ausgewaschen und die Proteine können renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, jedoch nicht ihre Quartärstruktur wieder einnehmen. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden und können dort von Antikörpern erkannt werden. Hierzu müssen zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Dies erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein, wie z.B. BSA (*bovine serum albumine*) oder Milchpulver. Anschließend können Primärantikörper spezifisch an zelluläre Proteine binden. Von den Zielproteinen gebundene Primärantikörper wiederum werden von spezies-spezifischen

² Nach: <http://www.cultek.com/index.asp?p=EET-productos&id=36>.

sekundären Antikörpern gebunden, die mit HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt sind. Nach abgeschlossener Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt die Detektion des nachzuweisenden Proteins mit Hilfe eines chemilumineszenten Substrates. Luminol wird dabei in Gegenwart von H₂O₂ und Meerrettichperoxidase oxidiert. Das so angeregte Luminol emittiert bei Rückkehr in seinen Grundzustand Lichtquanten. Diese Chemilumineszenz kann durch Exposition auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

4.3.4.2.2 Durchführung

Die Western Blots wurden zur Verifizierung der Genexpressionsergebnisse für ADAR1 auf Proteinebene durchgeführt.

4.3.4.2.2.1 Puffer und Lösungen

Laemmli-Probenpuffer	
Tris/HCl	50 mM; pH 6,8
SDS	4% (w/v)
Glycerin	12% (w/v)
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)
H ₂ O	

Gelpuffer (pH 8,45)	
Tris/HCl	3 M
SDS	0,3% (w/v)
H ₂ O	

Trenngele (12%)	
Gelpuffer	13,2 ml
Glycerin	4,4 ml
Aa/Bis Aa (30/0,8)	16 ml
H ₂ O	6,7 ml
TEMED	40 µl
APS (10%)	300 µl

(APS = Ammoniumpersulfat)

Sammelgele (4%)	
Gelpuffer	10 ml
Aa/Bis Aa (30/0,8)	5,2 ml
H ₂ O	24,8 ml
TEMED	40 µl
APS (10%)	300 µl

Laufpuffer (pH 8,3)	
Tris	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)
H ₂ O	

Transferpuffer (pH 8,0)	
Tris	25 mM
Glycin	40 mM
Methanol	3% (v/v)
H ₂ O	

Waschpuffer (pH 7,5)	
Tris	10 mM
NaCl	500 mM
Tween-20	0,1% (v/v)
H ₂ O	

Blockierlösung I (ADAR1)	
Magermilchpulver	3% (w/v)
Tween-20	0,5% (v/v)
Waschpuffer	

Blockierlösung II (GAPDH)	
Magermilchpulver	3% (w/v)
Tween-20	1,5% (v/v)
Waschpuffer	

4.3.4.2.2.2 Probenvorbereitung und SDS-PAGE

Pro Ansatz wurden jeweils 4×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in einer 12-well-Platte für jeweils 24 h mit den entsprechenden Substanzen inkubiert, danach geerntet, zentrifugiert und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen und für 10-15 min im Thermoblock bei 100 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 7000 rpm zentrifugiert und sofern nicht gleich benötigt bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Von den Überständen wurden je 20 μ l (ADAR1) bzw. 10 μ l (GAPDH) auf ein Polyacrylamidgel (bestehend aus einem 4%-igem Sammelgel und einem 12%-igem Trenngel) aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde in einer Spur ein Proteinstandard mitgeführt (Größenstandard: *low range molecular weight marker*, BioRad, München, Deutschland). Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgte bei 120 V für 2 h.

4.3.4.2.2.3 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches im SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Semidry-Blot-Verfahren bei 20 V, 66 mA für 75 min auf eine PVDF-Membran (*ImmobilonTM-P*, Millipore, Schwalbach, Deutschland) geblottet. (Zuvor waren Filterpapiere, Membran und Gel in Transferpuffer equilibriert worden.)

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran anschließend zunächst in 20 ml Blockierlösung I für 1 h bei RT

(ADAR1) bzw. in 20 ml Blockierlösung II über Nacht bei 4 °C (GAPDH) geschwenkt. Danach wurde die Membran mit dem in 10 ml Blockierlösung I 1:1000 (ADAR1), bzw. in 10 ml Blockierlösung II 1:5000 (GAPDH) verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4 °C (ADAR1), bzw. für 1 h bei RT (GAPDH) unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran viermal für je 10 min gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der sekundäre an Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gekoppelte Antikörper ist spezifisch für den F_c-Teil des ersten Antikörpers und wurde 1:1000 (ADAR1), bzw. 1:2500 (GAPDH) in 10 ml Blockierlösung I bzw. II verdünnt. Die Membran wurde für 1 h bei RT unter Schütteln darin inkubiert und anschließend viermal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen (Tabellen 4.13 und 4.14).

Tabelle 4.13: Durchführung des Nachweis von ADAR1.

ADAR1			
	Konzentration	Zeit	Temperatur
Blockierlösung I:		1 h	RT
1. AK: Rabbit anti-ADAR1	1:1000	über Nacht	4 °C
2. AK: Goat-anti-rabbit-IgG (HRP-conjugates)	1:1000	1 h	RT

Tabelle 4.14: Durchführung des Nachweis von GAPDH.

GAPDH			
	Konzentration	Zeit	Temperatur
Blockierlösung II		über Nacht	4 °C
1. AK: GAPDH	1:5000	1 h	RT
2. AK: Goat-anti-mouse- IgG (HRP-conjugates)	1:2500	1 h	RT

4.3.4.2.2.4 Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion kann die Detektion des nachzuweisenden Proteins mit Hilfe eines chemilumineszenten Substrates durchgeführt werden.

Die Membran wurde hierzu für 5 min im *VisualizerTM Working Solution* (des *VisualizerTM Western Blot Detection Kit*, upstate, BIOMOL, Hamburg, Deutschland) geschwenkt und anschließend in einer Röntgenkassette zusammen mit Hyperfilm ECL-Röntgenfilmen (*Agfafilm*) für verschiedene Zeiträume (10 sec-2 min) exponiert.

4.3.5 Hepatitis B Virus

Es wurde untersucht inwieweit Scutellarein (100 µM) antivirale Wirkung gegenüber Hepatitis B Virusinfektionen ausüben kann. Hierzu wurden HBV-Experimente am Modell der primären humanen Hepatocyten in einer Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Chirurgie (Klinikum der Universität Regensburg), PD Dr. Thomas Weiss, und der Virologie (Klinikum der Universität Regensburg), Dr. Stephan Böhm, durchgeführt.

4.3.5.1 Kultivierung der primären humanen Hepatocyten

Zelllysate von primären humanen Hepatocyten stammten aus dem Zentrum für Leberzellforschung am Klinikum der Universität Regensburg.

Die Zellvitalität wurde mittels der *Trypan Blue exclusion* bestimmt und Präparationen mit einer Vitalität > 85% für Kultivierungen verwendet. Die Zellen wurden auf Collagen-beschichteten 6-well-Platten (*rat tail collagen type I*, Roche, Mannheim) mit einer Dichte von 150000-200000 Zellen/cm² in 2 ml Zellkulturmedium (DMEM supplementiert mit 10% FCS, 0,5 IU/ml Penicillin, 0,5 µg/ml Streptomycin, 24 µg/ml Insulin, 7,45 ng/ml Glucagon, 8,0 µg/ml Hydrocortison) pro Vertiefung ausgesät und bei 37 °C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem 5%-igem Anteil an CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 12 h wurde das Medium mit den ungebundenen Zellen abgesaugt und durch 1 ml neues Zellkulturmedium ersetzt. In der nachfolgenden Kultivierungsperiode wurde das Medium alle 24 h gewechselt. Nachdem die Zellen konfluent waren und ihre typische Morphologie erreicht hatten (typischerweise zwischen Tag 2 und Tag 5 nach Aussaat der Zellen), wurde das Zellkulturmedium für die weitere Kultivierung der Zellen zusätzlich mit 1% Dimethylsulfoxid (DMSO) supplementiert.

4.3.5.2 HBV infektiöse Serum-Proben

Infektiöse Serum-Proben kamen von zwei chronischen HBV-Trägern. Je nach Experiment wurden verschiedene Seren zur Infektion verwendet. Bei den Versuchen V2, V3 und V4 wurden die PHH mit dem Serum Zachoval 1 infiziert. Dieses Serum stellt eine Probe eines chronischen HBV-Trägers mit einer Viruslast von $1,2 \times 10^9$ ge (*genome equivalent*) pro ml dar. Bei Versuch V1 wurden die PHH mit dem Serum Pool 2 infiziert. Pool 2 ist eine, aus 9 Proben eines chronischen HBV-Trägers gepoolte Serum-Lösung. Die Viruslast von Pool 2 betrug 2×10^9 ge/ml.

4.3.5.3 *In vitro* HBV Infektion

Für die *in vitro* Infektion wurden die primären humanen Hepatocyten (PHH) nach 4-18 Tagen nach der Aussaat mit den jeweiligen infektiösen Serum-Proben verdünnt auf ein Gesamtvolumen von 1 ml pro Vertiefung in Zellkulturmedium supplementiert mit 1%

DMSO und 5% Polyethylenglycol (PEG, MW 6.000) beimpft (Tabelle 4.15). Gleichzeitig wurde dem Zellkulturmedium einer Vertiefung (V1 und V2), bzw. dreier Vertiefungen (V3 und V4) ab Infektion der Zellen jeweils Scutellarein in der Konzentration 100 μ M zugesetzt.

Tabelle 4.15: HBV-Infektion der primären humanen Hepatocyten.

Experiment	Infektion der PHH (Tage nach Aussaat)	Verwendetes Serum	Volumen an eingesetztem Serum pro Vertiefung (μ l)	Viruslast (ge/PHH)
V1	7	Pool 2	25	50
V2	4	Zachoval 1	50	60
V3	10	Zachoval 1	10	12
V4	18	Zachoval 1	10	12

Die Verdünnungen der Seren, welche für die *in vitro* Infektionen verwendet wurden reichten von 1:20 bis 1:100, dies entspricht einer Viruslast von 12 bis 60 ge pro Hepatocyt bei einer Zelldichte von durchschnittlich $1,0 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung (Tabelle 4.13). Nach einer Inkubation von 12-16 h wurde das virale Inoculum am Tag 1 nach der Infektion (*post-infection*; p.i.) entfernt und Zellen während der nächsten 2 Tage 10 mal mit Zellkulturmedium gewaschen. Die Kulturen wurden für 21 (V1 und V2) bzw. 8 Tage (V3 und V4) (nach Infektion der Zellen) bei jeweils täglichem Wechsel des Zellkulturmediums gehalten. Beim 21-tägigen Versuchsverlauf wurden die Zellkulturüberstände an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach der Infektion, und ab Tag 4 p.i. jeden zweiten Tag gesammelt und bis zur quantitativen Analyse der viralen Antigene (HBsAg und HBeAg), sowie der Virus-DNA bei -20 °C gelagert.

Beim 8-tägigen Versuchsverlauf wurden die primären Hepatocyten jeweils einer Vertiefung (mit Scutellarein (100 μ M)-behandelt bzw. unbehandelt) an den Tagen 1, 4 und 8 geerntet und die RNA der Zellen isoliert.

4.3.5.4 Quantifizierung der viralen Antigene (HBsAg und HBeAg) und der Virus-DNA

Um Aussagen über den Infektionsverlauf treffen zu können, wurden die Virus-DNA-Konzentration, sowie die HBsAg- und die HBeAg-Konzentrationen gemessen.

Die *in vitro* Produktion von HBsAg und HBeAg (in V1 und V2) wurde mittels automatischer kommerzieller *Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assays* (MEIA; *AxSYM HBsAg V2*, *AxSYM HBe 2.0*, Abbott Diagnostic Division, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Dabei wurden die absoluten Antigenkonzentrationen mittels eines Vergleichs zu Verdünnungsreihen von Standard-HBsAg- und Standard-HBeAg-Präparationen mit bekanntem Antigengehalt ermittelt.

Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgte, unter Einsatz von Plasmidverdünnungen für die Kalibrierung, anhand eines Realtime-PCR-Tests, welcher auf einem kinetischen Fluoreszenz-Detektionssystem (TaqMan PCR) basiert (Weinberger et al., 2000).

4.3.6 Statistik

Die Versuche wurden, sofern keine abweichenden Angaben gemacht werden, jeweils mindestens als Triplikate durchgeführt.

- Cytotoxizitätsanalysen mittels FACS und Laktatdehydrogenase-Test:

EC₅₀ -Werte (effektive Konzentration, bei der 50% der Zellen tot sind) wurden mittels Regressionsanalysen ermittelt.

Für die Bestimmung der Signifikanz wurde darüber hinaus ein students-t-test, non-parametric test gewählt.

Alle Versuchsansätze waren voneinander unabhängig und wurden daher mit dem ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney-Test verglichen.

Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05/Anzahl der untersuchten Konzentrationen des jeweiligen Flavonoids waren (Bonferroni-korrigiert).

- Cytotoxizitätsstudien mit Co-Inkubationen:

Für die Bestimmung der Signifikanz wurde ein Multiples Regressionsmodell gewählt. Alle Versuchsansätze wurden mit dem SPSS-Statistik-Test (allgemeines lineares Modell, univariat; MANOVA) verglichen. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.

- ATP-abhängiger Cytotoxizitätstest und Realtime-PCR-Bestimmungen:

Für die Bestimmung der Signifikanz wurde das One-way-Anova-Modell gewählt. Alle Versuchsansätze wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, non-parametric Test verglichen. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.

- Editierungs-Effizienz der Q/R-Position in GluR 2:

Für die Bestimmung der Signifikanz wurden Kontingenztafeln erstellt. Alle Versuchsansätze wurden mit dem Chi-square test for trend verglichen. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.

- HBeAg-Konzentrationsverlauf:

Für die Bestimmung der Signifikanz wurde ein students-t-test, non-parametric test gewählt. Die Versuchsansätze wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney-Test verglichen.

Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.

Literaturverzeichnis

- Adayev, T., Estephan, R., Meserole, S., Mazza, B., Yurkow, E. J., Banerjee, P., 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.* **1998**, *71*, 1854-1864.
- Afanas`ev V. N., Korol B. A., Mantsygin Yu. A., Nelipovich P. A., Pechatnikov V. A., Umansky S. R., Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett.* **1986**, *194*, 347-350.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Rémésy, C., Chap, H., Payraastre, B., Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase; a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1649-1657.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content and Metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75-81.
- Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Köhler, H., Kuhlmann, M. K., Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation* **2006**, *81*, 231-239.
- Akbarian, S., Smith, M. A., Jones, E. G., Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res.* **1995**, *699*, 297-304.
- Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **1990**, *136*, 539-608.
- Arguin, P. M., Kozarsky, P. E., Reed, C. (Eds.), Centers for disease control and prevention. *Health Information for International Travel 2008*. US Department of health and human services, Public Health Service, Atlanta **2007**.
- Ariga, T., Koshiyama, I., Fukushima, D., Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from *Azuki Beans* in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2717-2722.

- Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H., Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1752-1757.
- Auer, R., Kalimo, H., Olsson, Y., Wieloch, T., The dentate gyrus in hypoglycemia: pathology implicating excitotoxin-mediated neuronal necrosis. *Acta Neuropathol.* **1985**, *67*, 279-288.
- Babior, B. M., Phagocytes and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* **2000**, *109*, 33-44.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Tran, M. X., Stohs, S. J., Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1997**, *95*, 179-189.
- Baier, M., Kurth, R., Interleukin-16 for the gene therapy of HIV infection. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **1997**, *6*, 1879-1881.
- Banati, R. B., Gehrmann, J., Schubert, P., Kreutzberg, G. W., Cytotoxicity of Microglia. *Glia* **1993**, *7*, 111-118.
- Banchereau, J., Steinman, R. M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, *392*, 245-252.
- Barbon, A., Vallini, I., La Via, L., Marchina, E., Barlati, S., Glutamate receptor RNA editing: a molecular analysis of GluR2, GluR5 and GluR6 in human brain tissues and in NT2 cells following *in vitro* neural differentiation. *Mol. Brain Res.* **2003**, *117*, 168-178.
- Barnes, J. N., Henley, J. M., Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. *Prog. Neurobiol.* **1992**, *39*, 113-133.
- Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M., Schaller, H., The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5324-5332.
- Bartholomeusz, A., Locarnini, S., Hepatitis B Virus Mutants and Fulminant Hepatitis B: Fitness Plus Phenotype, *Hepatology* **2001**, *34*, 432-435.
- Bass, B. L., RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 157-162.
- Beal, M. F., Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* **1992**, *6*, 3338-3344.

- Bennett, M. R., Gibson, D. F., Schwartz, S. M., Tait, J. F., Binding and phagocytosis of Apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated by exposure of Phosphatidylserine. *Circ. Res.* **1995**, *77*, 1136-1142.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L., GenBank. *Nucleic Acid. Res.* **2007**, *35*, D21-D25.
- Bente, D. A., Evaluierung konventioneller und *real-time* RT-PCR-Protokolle für die spezifische Diagnose des Virus der Klassischen Schweinepest. *Dissertation*, Universität Hannover **2003**.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, N. H., Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **1984**, *43*, 1369-1374.
- Berg, A. U., Baron, D. P., Berg, P. A., Immunoenhancing properties of cyanidanol on responsiveness and function of human peripheral blood T-cells and K-cells. *Int. J. Immunopharmacol.* **1988**, *10*, 387-394.
- Berg, P. A., Daniel, P. T., *Effects of flavonoid compounds on the immune response*. In: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Beretz, A. (Eds.), *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular, and medicine properties*. Alan R. Liss, Inc., New York **1998**, 157-171.
- Bestwick, C. S., Milne, Lesley, Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 49-59.
- Bindereif, A., Mehr Information aus wenigen Genen. *GenomXPRESS* **2004**, *3*, 10-12.
- Bird, T. A., Schule, H. D., Delaney, P. B., Sims, J. E., Thoma, B., Dower, S. K., Evidence that MAP (mitogen-activated protein) kinase activation may be a necessary but not sufficient signal for a restricted subset of responses in IL-1-treated epidermoid cells. *Cytokine* **1992**, *4*, 429-440.
- Blanc, E., Goldschneider, D., Ferrandis, E., Barrois, M., Le Roux, G., Leonce, S., Douc-Rasy, S., Bénard, J., Raguénez, G., MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 321-331.

- Blaschke, M., Charakterisierung des neuronalen und rekombinanten AMPA/Kainat-Rezeptors und Identifizierung zweier Untereinheiten-spezifischer Antagonisten des Rezeptors. *Dissertation*, Universität Göttingen **1993**.
- Blöck, M., Untersuchungen zur Interaktion von Quercetin-Glukosiden mit dem intestinalen Glukose-Carrier (SGLT1). *Dissertation*, Universität Berlin **2002**.
- Blumberg, B. S., Alter, H. J., Visnich, S., A „new“ antigen in leukemia sera. *JAMA* **1965**, *191*, 541-546.
- Blum-Degen, D., Haas, M., Pohli, S., Harth, R., Römer, W., Oettel, M., Riederer, P., Götz, M. E., Scavestrogens protect IMR 32 cells from oxidative stress-induced cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *152*, 49-55.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Krokr, A., Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss.* **1998**, *37*, 147-163.
- Bokoch, G. M., Prossnitz, V., Isoprenoid metabolism is required for stimulation of the respiratory burst oxidase of HL-60 cells. *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 402-408.
- Bongiovanni, G. A., Soria, E. A., Eynard, A. R., Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 971-976.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1990**, *264*, 165-170.
- Bouchard, M. J., Puro, R., J., Wang, L., Schneider, R., J., Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J. Virol.* **2003**, *77*, 7713-7719.
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S., Molecular cloning and functional expression of the glutamate receptor subunit genes. *Science* **1990**, *249*, 1033.
- Bowie, A., O'Neill, L. A., Oxidative stress and nuclear factor-kappa B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 13-23.

- Bradbury, D. A., Simmons, T. D., Slater, K. J., Crouch, S. P. M., Measurement of the ADP : ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 79-92.
- Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- Brattig, N. W., Diao, G. J., Berg, P. A., Immunoenhancing effect of flavonoid compounds on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Int. J. Immunopharmacol.* **1984**, *6*, 205-215.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., Vingron, M., Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 365-371.
- Bredesen, D. E., Neural apoptosis. *Ann. Neurol.* **1995**, *38*, 839-851.
- Brinkworth, R. T., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P., Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *2*, 631-637.
- Bruno, V., Scapagnini, U., Canonico, P. L., Excitatory amino acids and neurotoxicity. *Funct. Neurol.* **1993**, *84*, 279-292.
- Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D.-S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P. H., Sprengel, R., Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* **1995**, *270*, 1677-1680.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J. V., Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5636-5645.
- Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L., Eigenbrodt, E. H., Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1993**, *117*, 1208-1214.
- Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., Sakmann, B., Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* **1992**, *8*, 189-198.

- Burns, C. M., Chu, H., Rueter, S. M., Hutchinson, L. K., Canton, H., Sanders-Bush, E., Emeson, R. B., Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* **1997**, 387, 303-308.
- Buschmann, P., Eine Recherche anhand von Publikationen zwischen 1995 und 2002 unter besonderer Berücksichtigung der Wirkungen und Wirksamkeiten der Flavonoide. *Dissertation*, Universität Graz **2002**.
- Bustin, S. A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **2002**, 29, 23-39.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L., Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 22, 749-760.
- Carlson, N. G., Howard, J., Gahring, L. C., Rogers, S. W., RNA editing (Q/R site) and flop/flip splicing of AMPA receptor transcripts in young and old brains. *Neurobiol. Aging* **2000**, 21, 599-606.
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G., Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* **1996**, 157, 512-521.
- Castillo, M. R., Babson, J. R., Ca(2+)-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. *Neuroscience* **1998**, 86 4, 1133-1144.
- Cattaneo, R., Will, H., Schaller, H., Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* **1984**, 3, 2191-2196.
- Chang, H. Y., Yang, X., Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 821-846.
- Chang, W. H., Chen, C. H., Gau, R. J., Lin, C. C. et al., Effect of baicalein on apoptosis of the human Hep G2 cell line was induced by mitochondrial dysfunction. *Planta Med.* **2002a**, 68, 302-306.
- Chang, W. H., Chen, C. H., Lu, F. J., Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Med.* **2002b**, 68, 128-132.
- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Wenig, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* **1987**, 238, 363-366.

- Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J., Ju, Y., Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 19-21.
- Chen, J., Ou, Y. X., Da, W. M., Kang, J. H., Coadjustment of quercetin and hydrogen peroxide: the role of ROS in the cytotoxicity of quercetin. *Pharmazie* **2004**, *59*, 155-158.
- Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piowar, K. R., Dou, Q. P., Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1421-1432.
- Chen Chiao, Y. C., Gurudath Rao, K., Hook, J. W., Krugh, T. R., Sengupta, S. K., 7-Amino-actinomycin D complexes with deoxynucleotides as models for the binding of the drug to DNA. *Biopolymers* **1979**, *18*, 1749-1762.
- Chittajallu, R., Braithwaite, S. P., Clarke, V. R., Henley, J. M., Kainate receptors : Subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 26-35.
- Chiu, Y.-L., Greene, W. C., Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol.* **2006**, *27*, 291-297.
- Choi, D. W., Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous systems. *Neuron* **1988**, *1*, 623-634.
- Choi, D. W., Rothman, S. M., The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **1990**, *13*, 171-176.
- Choi, D. W., Bench to bedside: The glutamate connection. *Science* **1992**, *258*, 241-243.
- Choi, E. M., Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Pharmazie* **2007**, *62*, 216-220.
- Chow, J.-M., Shen, S.-C., Huan, S. K., Lin, H.-Y., Chen, Y.-C., Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1839-1851.
- Chulasiri, M., Bunyapraphatsara, N., Moongkarndi, P., Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L. *Environ. Mol. Mutagenesis* **1992**, *279*, 9233-9247.

- Clark, J. A., Black, A. R., Leontieva, O. V., Frey, M. R., Pysz, M. A., Kunneva, L., Woloszynska-Read, A., Roy, D., Black, J. D., Involvement of the ERK signaling cascade in protein kinase C-mediated cell cycle arrest in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9233-9247.
- Clarkson, M. R., Murphy, M., Gupta, S., Lambe, T., Mackenzie, H. S., Godson, C., Martin, F., Brady, H., R., High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9707-9712.
- Cohen, J. J., Duke, R. C., Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **1984**, *132*, 38-42.
- Colgate, E. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Bray, T. M., Ho, E., Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.* **2007**, *246*, 201-209.
- Conn, P. J., Pin, J. P., Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 205-237.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D., Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 71-76.
- Cos, P., Calomme, M., Sindambiwu, J. B., De Bruyne, T., Cimanga, K., et al., Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med.* **2001**, *67*, 515-519.
- Coyle, J. T., Schwarcz, R., Lesions of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* **1976**, *263*, 244-246.
- Croft, L., Schandorff, S., Clark, F., Burrage, K., Arctander, P., Mattik, J. S., ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 340-341.
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., Fletcher, J., The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **1993**, *160*, 81-88.
- Cui, B., Lee, Y. H., Chai, H., Tucker, J. C., Fairchild, C. R., et al., Cytotoxic sesquiterpenoids from *Ratibida columnifera*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1545-1550.

- Cunningham, B. D. M., Threadgill, M. D., Groundwater, P. W., Dale, I. L., Hickman, J. A., Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anti-Cancer Drug Res.* **1992**, *7*, 365-384.
- Curutchet, P., Bocher, P., Decarvalho, L. P., et al., In the GluR 1 glutamate receptor subunit a glutamine to histidine point mutation suppresses inward rectification but not calcium permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *182*, 1089-1093.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., Brigges, H., Virus like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1970**, *1*, 695-698.
- Delius, H., Gough, N. M., Cameron, C. H., Murray, K., Structure of hepatitis B virus genome. *J. Virol.* **1983**, *47*, 337-344.
- Deng, J.-M., Shi, H.-Z., Medical progress: Interleukin-16 in asthma. *Chin. Med. J.* **2006**, *119*, 1017-1025.
- Denk, H., *Zell- und Gewebereaktionen, Zelltod*. In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. (Eds.); *Pathologie*, Urban & Schwarzenberg, München **1997**, 52-53.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., Gregory, C. D., Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **1998**, *392*, 505-509.
- DeWhalley, C. V., Rankin, S. M., Hoult, J. R. S., Jessup, W., Leake, D. S., Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1743-1750.
- Dhiman, R. K., Chawla, Y. K., Herbal medicines for liver diseases. *Dig. Dis. Sci.* **2005**, *50*, 1807-1812.
- Di Figlia M., Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington`s disease. *Trends Neurosci.* **1991**, *13*, 286-293.
- Dingledine, R., Hume, R. I., Heinemann, S. F., Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4080-4087.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F., The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 7-61.

- Djahansouzi, S., Hanstein, B., Bender, H., Dall, G., Wachstumsfördernde Signalübertragungswege. Rezeptorblockaden als Therapieprinzip. *Gynäkologie* **2004**, *37*, 215-220.
- Dobbelsteen van den, D. J., Nobel, C. S., Schlegel, J., Cotgreave, I. A., Orrenius, S., Slater, A. F., Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15420-15427.
- Dong, Q. H., Zheng, S., Xu, R. Z., Lu, Q. H., Baicalein selectively induce apoptosis in human leukemia K562 cells. *Yao Xue Xue Bao* **2003**, *38*, 817-820.
- Doo, E., Liang, T. J., Molecular Anatomy and Pathophysiologic Implications of Drug Resistance in Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1000-1008.
- Doppke, J., Die Rolle der Apoptose in *in vitro* Modellen neuronaler Degeneration. *Dissertation*, Universität Bochum **2001**.
- Dorta, D. J., Pigoso, A. A., Mingatto, F. E., Rodrigues, T., Prado, I. M., Helena, A. F., Uyenura, S. A., Santos, A. C., Curti, C., The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *152*, 67-78.
- Duke, R. C., Ojcius, D. M., Young, J. D., *Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord*, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1997**.
- Duthie, S. J., Johnson, W., Dobson, V. L., The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat. Res.* **1997**, *390*, 141-151.
- Egebjerg, J., Heinemann, S. F., Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of kainate selective glutamate receptor GluR 6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 755-759.
- End, D. W., Look, R. A., Shaffer, N. L., Balles, E. A., Persico, F. J., Non-selective inhibition of mammalian protein kinases by flavonoids *in vitro*. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **1987**, *56*, 75-86.
- Engeland van, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., Reutelingsperger, C., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1-9.
- Erk van, M. J., Roepman, P., van der Lende, T. R., Stierum, R. H., Aarts, J. M. M. J. G., van Bladeren, P. J., van Ommen, B., Integrated assessment by multiple gene expression

- analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 143-156.
- Erlund, I., Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* **2004**, *24*, 851-874.
- Estany, S., Palacio, J. R., Barnadas, R., Sabes, M., Iborra, A., Martinez, P., Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture. *J. Reprod. Immunol.* **2007**, in press.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., Henson, P.M., A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **2000**, *405*, 85-90.
- Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., Bratton, D. L., Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1071-1077.
- Faktor, O., De-Medina, T., Shaul, Y., Regulation of hepatitis B virus S promoter in transfected cell lines. *Virology* **1988**, *162*, 362-368.
- Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H. C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Neurological dysfunctions in mice different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 57-64.
- Ferriola, P. C., Cody, V., Middleton, E., Protein kinase C inhibition by plant flavonoids kinetic mechanism and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1617-1624.
- Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteurtre, F., Pommier, Y., Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2399-2403.
- Feuk-Lagerstedt, E., Jordan, E. T., Leffler, H., Dahlgren, C., Karlsson, A., Identification of CD66a and CD66b as the major Galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 5592-5598.
- Fichtner, N., Freisetzung von zytoplasmatischem GABA ($[^3\text{H}]$ -GABA) und Glutamat (D- $[^3\text{H}]$ -Aspartat) durch Transportumkehr (Heteroexchange) im Striatum von Ratte und Kaninchen. *Dissertation*, Universität Freiburg **2001**.

- Fields, B. N., Greene, M. I., Genetic and molecular mechanism of viral pathogenesis: implications for prevention and treatment. *Nature* **1982**, *300*, 19-23.
- Formica, J. V., Regelson, W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxic.* **1995**, *33*, 1061-1080.
- Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S. et al., Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2916-2921.
- Franca, R., Spadari, S., Maga, G., APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: A novel natural host defense mechanism. *Med. Sci. Monit.* **2006**, *12*, 92-98.
- Freilinger, T. M., Wirkung von Typ I - Interferonen auf die Enhancer I, II und core promoter-regulierte Transkription des Hepatitis B Virus. *Dissertation*, Universität München **2004**.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., Nicoll, R. A., Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* **2000**, *21*, 342-351.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y., Anti- and pro-oxidant effects of oxidized quercetin, curcumin or curcumin-related compounds with thiols or ascorbate as measured by the induction period method. *In Vivo* **2006**, *20*, 39-44.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M. P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B., Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.* **1999**, *32*, 279-286.
- Ganem, D., *Hepadnaviridae and their replication*. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (Eds.). *Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven-Verlag, Philadelphia **1996**, 2703-2737.
- Gasic, G. P., Hollmann, M., Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 507-510.
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., van der Kuip, D. A. M., Hofman, A., Witterman, J. C. M., Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 880-886.
- Gerelsaikhon, T., Reifungsabhängige Umhüllung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids. *Dissertation*, Universität Göttingen **1998**.

- Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., Liu, G.-Y., Sitthimonchai, S., Frank, N., Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mut. Res.* **2003**, 523-524, 163-172.
- Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H., Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 959-969.
- Gerin, J. L., Ford, E. C., Purcell, R. H., Biochemical characterization of Australian antigen. Evidence for defective particles of hepatitis B virus. *Am. J. Pathol.* **1975**, 81, 651-668.
- Gerlich, W. H., Robinson, W. S., Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **1980**, 21, 801-809.
- Gerlich, W. H., Goldmann, U., Muller, R., Stibbe, W., Wolff, W., Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J. Virol.* **1982**, 42, 761-766.
- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B., NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, 16, 225-260.
- Gill, J. E., Jotz, M. M., Young, S. G., Modest, E.J., Sengupta, S. K., 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. *J. Histochem. Cytochem.* **1975**, 23, 793-799.
- Glass, W. G., Sarisky, R. T., Vecchio, A. M., Not-so-sweet sixteen: the role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases. *J. Interferon Cytokine Res.* **2006**, 26, 511-520.
- Golstein, P., Ojcius, D. M., Young, J.D., Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* **1991**, 121, 29-65.
- Gomes, A. Q., Ali, B. R., Ramalho, J. S., Godfrey, R. F., Barral, D. C., Hume, A. N., Seabra, M. C., Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol. Biol. Cell* **2003**, 14, 1882-1899.
- Gong, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 314-319.
- Goto, K., Asai, T., Hara, S., Namatame, I., Tomoda, H., Ikemoto, M., Oku, N., Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Lett.* **2005**, 219, 215-222.

- Graziani, Y., Chayoth, R., Karny, N., Feldman, B., Levy, J., Regulation of protein kinase activity by quercetin in Ehrlich Ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 714, 415-421.
- Greenamyre, J. T., Young, A. B., Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **1989**, 10, 593-601.
- Grigorenko, E., Bell, W., Glazier, S., Pons, T., Deadwyler, S., Editing status at the Q/R site of the GluR2 and GluR6 glutamate receptor subunits in the surgically excised hippocampus of patients with refractory epilepsy. *Neuroreport* **1998**, 9, 2219-2224.
- Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W., Marks, F., Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 117, 444-447.
- Guo, W., Bell, K. D., Ou, J. H., Characterization of the hepatitis B virus Enh I enhancer and X-promoter complex. *J. Virol.* **1991**, 65, 6686-6692.
- Habgood, M. D., Begley, D. J., Abbott, N. J., Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell Mol. Neurobiol.* **2000**, 20, 231-253.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R., Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2274-2279.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L., High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1887-1892.
- Hagiwara, M., Inous, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M., Hidaka, H., Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 2987-2990.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.* **1992**, 307, 108-112.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*. Third edition, Oxford University Press, Oxford-New York **1999**.
- Hallwachs, R., Untersuchungen zur Bedeutung von Rotweininhaltsstoffen bei der Regulation intrazellulärer Signalwege in humanen Endothelzellen *in vitro*. *Dissertation*, Universität München **2005**.

- Hammond, C. L., Marchan, R., Krance, S. M., Ballatori, N., Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14337-14347.
- Hanahan, T., Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557-580.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 845-850.
- Harborne, J. B., *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London **1994**.
- Harborne, J. B., Williams, C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **2000**, *55*, 481-505.
- Hart, D. N. J., Dendritic Cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **1997**, *90*, 3245-3287.
- Hashimoto, M., Hossain, M. S., Shimada, T., Yamasaki, H., Fujii, Y., Shido, O., Effects of docosahexaenoic acid on annular lipid fluidity of the rat bile canalicular plasma membrane. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1160-1168.
- Hendrich, A. B., Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 27-40.
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *184*, 69-91.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., Fadok, V. A., Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 795-805.
- Heo, H. J., Lee, C. Y., Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7514-7517.
- Heo, H. J., Lee, C. Y., Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid β protein induced apoptosis. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*, 1445-1448.
- Herrmann, K., Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbsobstbau.* **1990**, *32*, 31-37.

- Hertog M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. **1993**, *342*, 1007-1011.
- Hetts, S. W., To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **1998**, *279*, 300-307.
- Hibasami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T., Komiya, T., Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer. Res.* **1996**, *16*, 1943-1946.
- Hide, W. A., Babenko, V. N., van Heusden, P. A., Seoighe, C., Kelso, J. F., The contribution of exon-skipping events on chromosome 22 to protein coding diversity. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1848-1853.
- Higashi, T., Isomoto, A., Tyuma, E., Kakishita, E., Uomoto, M., Nagai, K., Quantitative and continuous analysis of ATP release from blood platelets with firefly luciferase luminescence. *Thromb. Haemost.* **1985**, *53*, 65.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R., Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **1992**, *10*, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dolinger, G., Watson, R., Kinetik PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **1993**, *11*, 1026-1030.
- Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **2000**, *406*, 78-81.
- Hirano, T., Abe, K., Gotoh, M., Oka, K., Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br. J. Cancer.* **1995**, *72*, 1380-1388.
- Hirsch, R., Lafine, J., Chang, L., Varmus, H., Ganem, D., Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **1990**, *344*, 522-525.
- Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Ovaskainen, M. L., Häkkinen, S., Albanes, D., Virtamo, J., Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* **2001**, *12*, 62-67.

- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. F., Ca^{2+} permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **1991**, 252, 851-853.
- Honigwachs, J., Faktor, O., Dikstein, R., Shaul, Y., Laub, O., Liver-specific expression of the hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J. Virol.* **1989**, 63, 919-924.
- Hu, C. Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., Lee, K. H., Anti-Aids agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 42-51.
- Hu, J., Seeger, C., Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1060-1064.
- Huang, C.-K., Protein kinases in neutrophils. A review. *Membr. Biochem.* **1989**, 8, 61-79.
- Huang, R. L., Chen, C. C., Huang, H. L., Chang, C. G., Chen, C. F., Chang, C., Hsieh, M. T., Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med.* **2000**, 66, 694-698.
- Huang, Y., Tsang, S. Y., Yao, X., Chen, Z. Y., Biological properties of baicalein in cardiovascular system. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **2005**, 5, 177-184.
- Hume, R. I., Dingleline, R., Heinemann, S. F., Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* **1991**, 253, 8-1031.
- Hunter, T., Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **1995**, 80, 225-236.
- Iino, M., Goto, K., Kakegawa, W., Okado, H., Sudo, M., Ishiuchi, S., Miwa, A., Takayasu, Y., Salto, I., Tsuzuki, K., Ozawa, S., Glia-synapse interaction through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in Bergmann Glia. *Science* **2001**, 292, 926-929.
- Jacobasch, G., Florian, S., Pforte, H., Hempel, J., Schmehl, K., Schmiedl, D., *Inhibition of hereditary intestinal carcinoma development by flavonoide*. In: Johnson, I. T., Fenwick, G. R. (Eds.), *Dietary Anticarcinogens and antimutagens. Chemical and biological aspects*, Royal Soc. Chem., Cambridge **2000**, 312-323.
- Jameel, S., Siddiqui, A., The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factor(s) for activity. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, 710-715.

- Jiang, J., Kini, V., Belikova, N., Serinkan, B. F., Borinsenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Kagan, V. E., Cytochrome c release is required for phosphatidylserine peroxidation during fas-triggered apoptosis in lung epithelial A549 cells. *Lipids* **2004**, *39*, 1133-1142.
- Jobmann, M., Apoptose bei strukturellen Herzmuskelerkrankungen. *Dissertation*, Universität Marburg **2002**.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Simic, M. G., Hara, Y., *Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals*. In: *Flavonoids in Health and Disease*; Rice-Evans, C. A., Packer, L. (Eds.), M. Dekker Inc., New York **1998**, 137-161.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., Schaller, H., A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* **1990**, *9*, 3389-3396.
- Kalder, F., Untersuchungen der kardioprotektiven Wirkung von Reduktionsmitteln (Glutathion, Ascorbinsäure) an experimentell geschädigten Herzpräparaten. *Dissertation*, Universität Halle **1999**.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., *Principles of Neural Science*, Elsevier, New York **1985**.
- Kan, Z., Rouchka, E. C., Gish, W. R., States, D. J., Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res.* **2001**, *11*, 889-900.
- Kandaswami, C., Middleton, E., Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**, *366*, 351-376.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H., Helenius, A., Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* **1999**, *145*, 45-55.
- Karawajczyk, A., Drgan, V., Medic, N., Oboh, G., Passamonti, S., Novič, M., Properties of flavonoids influencing the binding to bilitranslocase investigated by neural network modelling. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 308-320.
- Kask, K., Zamanillo, D., Rozov, A., Burnashev, N., Sprengel, R., Seeburg, P. H., The AMPA receptor subunit GluR-B in its Q/R site-unedited form is not essential for brain development and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 13777-13782.
- Kaul, T. M., Middleton, E., Ogra, P. L., Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **1985**, *15*, 71-79.

- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Sigel, E., Rausch, W. D., Riederer, P., Schreier, P., The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positiv allosteric properties, travers the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Brit. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 811-820.
- Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B., Seeburg, P. H., A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* **1990**, *249*, 556.
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., Levin, E. D., Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106*, 375-384.
- Kermer, P., Bähr, M., Prävention neuronaler Apoptose: Implikationen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. *Neuroforum* **2002**, *2*, 193-198.
- Kern, M., Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen. *Dissertation*, Universität Kaiserslautern **2006**.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239-257.
- Kim, S. O., Han, J., Pan-caspase inhibitor zVAD enhances cell death in RAW 246.7 macrophages. *J. Endotoxin Res.* **2001**, *7*, 292-296.
- Kimmich, G. A., Randles, J., Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. *Memb. Biochem.* **1978**, *1*, 221-237.
- Kirishima, T., Okanou, T., Daimon, Y., Itoh, Y., Nakamura, H., Morita, A., Toyama, T., Minami, M., Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *Hepatology* **2002**, *37*, 259-265.
- Kitagawa, S., Nabekura, T., Takahasi, T., Nakamura, Y., Sakamoto, H., Tano, H., Hirai, M., Tsukahara, G., Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on p-glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 2274-2278.

- Knaus, T., Nassal, M., The encapsidation signal of the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acid. Res.* **1993**, *21*, 3967-3975.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* **1996**, *312*, 478-481.
- Köhrle, J., Fang, S. L., Yang, Y., Irmscher, K., Hesch, R. D., Pino, S., Alex, S., Braverman, L. E., Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat. *Endocrinology* **1989**, *125*, 532-537.
- Koller, G., Quantitative Bestimmung der Hepatitis B-Virus-DNA. *Dissertation*, Universität Regensburg **2005**.
- Konig, S., Beterams, G., Nassal, M., Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4997-5005.
- Kono, H., Asakawa, M., Fujii, H., Maki, A., Amemiya, H., Yamamoto, M., Matsuda, M., Matsumoto, Y., Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents liver injury and mortality in rats administered endotoxin. *JPET* **2003**, *307*, 74-82.
- Koopman, G., Reutlingsperger, C., Kuitjen, G. A., Pals, S. T., van Oers, M. H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **1994**, *84*, 1415-1420.
- Kortenbruck, G., Berger, E., Speckmann, E.-J., Musshoff, U., RNA Editing at the Q/R Site for the Glutamate Receptor Subunits GLUR 2, GLUR 5, and GLUR 6 in Hippocampus and Temporal Cortex from Epileptic Patients. *Neurobiol. Dis.* **2001**, *8*, 459-568.
- Kortenbruck, G., Analyse der RNA Editierung an der Q/R-Stelle der Glutamat-Rezeptoruntereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im chronisch epileptischen Hirngewebe des Menschen. *Dissertation*, Universität Vreden **2003**.
- Kothapalli, R., Yoder, S. J., Mane, S., Loughran Jr., T. P., Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics* **2002**, *3*, 22-31.
- Kothe, B., Nachweis von TEL – Genrekombinationen mittels Southern Blot bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie. *Dissertation*, Universität Berlin **2003**.
- Kotra, G., Daniel, H., Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in xenopus laevis oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 829-835.

- Kramvis, A., Kew, M. C., Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae. *J. Viral. Hepat.* **1998**, *5*, 357-367.
- Kraus, J., Untersuchungen zum „mRNA-editing“ in der „Q/R site“ der AMPA- und Kainat-Rezeptor-Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6. *Dissertation*, Universität Köln **1999**.
- Krawetz, S., Misener, S., *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Human Press, Totowa, N J, **2000**, 365-386.
- Kristián, T., Siesjö, B. K., Calcium in ischemic cell death. *Stroke* **1998**, *29*, 705-718.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J.-L., Mignotte, B., The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1277-1287.
- Kroemer, G., Dallaporta B., Resche-Rigon, M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 619-642.
- Kühn, H., Römisch, I., Belkner, J., The role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1014-1029.
- Kullmann, D. M., Asztely, F., Walker, M. C., The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1551-1561.
- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y.-S., Inouye, C., Yang, W.-M., Seto, E., XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acid. Res.* **1996**, *24*, 4741-4750.
- Kwak, S., Kawahara, Y., Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 110-120.
- Landers, T. A., Greenberg, H. B., Robinson, W. S., Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* **1977**, *23*, 368-376.
- Lecoeur, H., Ledru, E., Gougeon, M. L., A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J. Immunol. Methods* **1998**, *217*, 11-26.
- Lee, T.-P., Matteliano, M. L., Middleton, E., Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci.* **1982**, *31*, 2765-2774.

- Leist, M., Jäättelä, M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 589-598.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P., Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2052-2057.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P., Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 11-15.
- Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C., Strubin, M., Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J. Virol.* **2005**, *79*, 4238-4245.
- Levanon, E. Y., Eisenberg, E., Yelin, R., Nemzer, S., Halleger, M., Shemesh, R., Fligelman, Z. Y., Shoshan, A., Pollock, S. R., Szybel, D., Olshansky, M., Rechavi, G., Jantsch, M. F., Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1001-1005.
- Li, Y., Sarkar, F. H., Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3623-3631.
- Li, Y. C., Tyan, Y. S., Kuo, H. M., Chang, W. C., et al., Baicalein induced in vitro apoptosis undergo caspases activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 37-43.
- Limasset, B., Le Doucen, C., Dore, J.-C., Ojasoo, T., Damon, M., De Paulet, A. C., Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1257-1271.
- Lin, J. K., Chen, Y. C., Huang, Y. T., Lin-Shiau, S. Y., Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanism of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1997**, *28-29*, 39-48.
- Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G., Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie. *Z. Ernährungswiss.* **1997**, *36*, 403-412.
- Liu, J., Li, X., Yue, Y., Li, J., He, T., He, Y., The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.* **2005**, *2*, 455-460.

- Locarnini, S., Mc Millan, J., Bartholomeusz, A., The Hepatitis B Virus and Common Mutants. *Semin. Liver Dis.* **2003**, *23*, 5-20.
- Locarnini, S., Molecular Virology and the Development of Resistant Mutants: Implications for Therapy. *Semin. Liver Dis.* **2005**, *25*, 9-19.
- Lomeli, H., Mosbacher, J., Melcher, T., Hoyer, T., Geiger, J. R., Kuner, T., Monyer, H., Higuchi, M., Bach, A., Seeburg, P. H., Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* **1994**, *266*, 1709-1713.
- Lu, X., Lu, Y., Gschwindt, R., Dwek, R. A., Block, T. M., Hepatitis B virus MHBs antigen is selectively sensitive to glucosidase-mediated processing in the endoplasmic reticulum. *DNA Cell. Biol.* **2001**, *20*, 647-656.
- Lust, S., Vanhoecke, B., Janssens, A., Philippe, J., Bracke, M., Offner, F., Xanthohumol kills B-chronic lymphocytic leukemia cells by an apoptotic mechanism. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 844-850.
- Lung, H. L., Ip, W. K., Chen, Z. Y., Mak, N. K., Leung, K. N., 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.* **2004**, *13*, 465-471.
- Maas, S., Melcher, T., Seeburg, P. H., Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1997**, *9*, 343-349.
- Maas, S., Rich, A., Changing genetic information through RNA editing, *Bio. Essays* **2000**, *22*, 790-802.
- Mabit, H., Vons, C., Dubanchet, S., Capel, F., Franco, D., Petit, M. A., Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies. *J. Hepatol.* **1996**, *24*, 403-412.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- Maragos, W. F., Greenamyre, J. T., Penny J. B., Young, A. B., Glutamate dysfunction in Alzheimer`s disease: A hypothesis. *Trends Neurosci.* **1987**, *10*, 65-68.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Medina J. H., Paladini A. C., 6, 3'-Dinitroflavone, a novel high affinity ligand for the benzodiazepine receptors with potent anxiolytic properties. *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2717-2720.

- Markert, M., Andrews, P. C., Babior, B. M., Measurement of O₂⁻ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 358-365.
- Markovits, J., Linassier, C., Fossem, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J.-M., le Pecq, J.-B., Larsen, A. K., Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5111-5117.
- Martin, S. J., Green, D. R., Cotter, T. G., Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trend Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 26-30.
- Martin, S. J., Reutlingsperger, C. P., Mc Gahan, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., La Face, D. M., Green, D. R., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545-1556.
- Martin, L. J., Neuronal death in nervous system development, disease, and injury. *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *7*, 455-478.
- Martinez-Solano, L., Nombela, C., Molero, G., Gil, C., Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*. *Proteomics* **2006**, *6*, 133-144.
- Matzuzaki, Y., Kurokawa, N., Terni, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N., Okita, K., Cell death induced by Baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jap. J. Cancer Res.* **1996**, *87*, 170-177.
- Maynard, M., Parvaz, P., Durantel, S., Chevallier, M., Chevallier, P., Lot, M., Trepo, C., Zoulim, F., Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J. Hepatol.* **2005**, *42*, 279-281.
- Mc Conkey, D. J., Hartzell, P., Nicotera, P., Orrenius, S., Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *Faseb J.* **1989**, *3*, 1843-1849.
- Mc Lean Grogan, W., Collins, J. M., Dekker, M., *Guide to Flow Cytometry Methods*. Inc., New York **1990**.
- Meltzer, H. M., Malterud, K. E., Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scand. J. Nutr.* **1997**, *41*, 50-57.

- Mercer, L. D., Kelly, B. L., Horne, M. K., Beart, P. M., Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 339-345.
- Mi, Y., Zhang, C., Taya, K., Quercetin protects spermatogonial cells from 2,4-D-induced oxidative damage in embryonic chickens. Oder: Effects of quercetin on spermatogonial cells. *J. Reprod. Dev.* **2007**, in press.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1167-1179.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673-651.
- Miksa, M., N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten induzieren apoptotische Zelluntergänge im Gehirn junger Ratten. *Dissertation*, Universität Berlin **2004**.
- Millman, I., Loeb, L. A., Bayer, M. E., Blumberg, B. S., Australia antigen (a hepatitis-associated antigen): purification and physical properties. *J. Exp. Med.* **1970**, *131*, 1190-1199.
- Miranda, C. L., Stevens, J. F., Helmrich, A., Henderson, M. C., et al., Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 271-285.
- Miroššay, A., Onderková, H., Mirossay, L., Šarišský, M., Mojžiš, J., The effect of quercetin on light-induced cytotoxicity of hypericin. *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 635-637.
- Mizushima, Y., Kashii, T., Tokimitsu, Y., Kobayashi, M., Cytotoxic effect of herbal medicine Sho-saiko.to on human lung cancer cell lines *in vitro*. *Oncology Reports* **1995**, *2*, 91-94.
- Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., Lee, C., Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2850-2859.
- Mohamadzadeh, M. und Luftig, R., Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development – A review. *J. Immune Based Ther. Vaccines* **2004**, *2*, 1-11.
- Molnar-Kimber, K. L., Jarocki-Witek, V., Dheer, S. K., Vernon, S. K., Conley, A. J., Davis, A. R., Hung, P. P., Distinctive properties of the hepatitis B virus envelope proteins. *J. Virol.* **1988**, *62*, 407-416.

- Monyer, H., Seeburg, P. H., Wisden, W., Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* **1991**, *6*, 799-810.
- Moody, J. C., Whitham, G. H., *Reaktive Zwischenstufen*, Oxford Chemistry Primers, VCH-Verlag, Weinheim **1995**.
- Moon, Y. J., Zhang, S., Brazeau, D. A., Morris, M. E., Effects of the flavonoid biochanin A on gene expression in primary human hepatocytes and human intestinal cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 317-323.
- Motoo, Y., Sawabu, N., Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Lett.* **1994**, *86*, 91-95.
- Mronga, T., Zellschädigungen und Mechanismen des Zelltodes in Oligodendrozyten nach oxidativem Stress. *Dissertation*, Universität Oldenburg **2003**.
- Müller, G., Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung von Glutamat-Rezeptorantagonisten an Ratten mit verminderter Expression der GluR 2(B)-Untereinheit des AMPA-Rezeptors. *Dissertation*, Universität Braunschweig **1998**.
- Müller, H.-J., Röder, T., *Der Experimentator. Microarrays*. Elsevier Spektrum Verlag, Heidelberg **2004**.
- Muller, D., Joly, M., Lynch, G., Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* **1988**, *242*, 1694-1697.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 335-350.
- Murtaza, I., Marra, G., Schlapbach, R., Patrignani, A., Künzli, M., Wagner U., Sabates, J., Dutt, A., A preliminary investigation demonstrating the effect of quercetin on the expression of genes related to cell-cycle arrest, apoptosis and xenobiotic metabolism in human CO115 colon-adenocarcinoma cells using DNA microarray. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2006**, *45*, 29-36.
- Muschen, M., Warskulat, U., Perniok, A., Even, J., Moers, C., Kismet, B., Temizkan, N., Simon, D., Schneider, M., Haussinger, D., Involvement of soluble CD95 in Churg-Strauss syndrome. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 915-925.
- Musonda, C. A., Chipman, J. K., Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1583-1589.

- Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J., Okabe, H., Antiproliferative constituents in plants. 10 flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 875-879.
- Nakamura, Y., Regulating factors for microglia activation. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 945-953.
- Nakamura, I., Koike, K., Identification of a binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* **1993**, *195*, 305-314.
- Nakanishi, S., Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science* **1992**, *258*, 597-603.
- Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin. Cancer Res.* **2005a**, *11*, 6040-6049.
- Nakazato, T., Ito, K., Miyakawa, Y., Kinjo, K., Yamada, T., Hozumi, N., Ikeda, Y., Kizaki, M., 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* **2005b**, *90*, 317-325.
- Nassal, M., Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* **1999**, *42*, 100-116.
- Nguyen, T. T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T., et al., The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 647-659.
- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., Buchardt, O., Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- Niranjan, T. G., Krishnakantha, T. P., Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding. *Mol. Cell Biochem.* **2000**, *204*, 57-63.
- Nishizuka, Y., Studies and perspective of protein kinase C. *Science* **1986**, *233*, 305-312.
- Nishizuka, Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **1988**, *334*, 661-665.

- Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**, *258*, 607-612.
- Nishizuka, Y., Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **1995**, *9*, 484-496.
- Niswender, C. M., Copeland, S. C., Herrick-Davis, K., Emeson, R. B., Sanders-Bush, E., RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9472-9278.
- Noguchi, C., Ishino, H., Tsuge, M., Fujimoto, Y., Imamura, M., Takahashi, S., Chayama, K., G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* **2005**, *41*, 626-633.
- Oberitter, H., Bericht zur DGE-Arbeitstagung 1998, Sekundäre Pflanzenstoffe. DGE-Info, 1998.
- Ogawa, A., Arai, H., Tanizawa, H., Miyahara, T., Toyo'oka, T., On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *383*, 221-230.
- Okamoto, T., Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16*, 275-278.
- Oldendorf, W. H., Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1974**, *147*, 813-815.
- Olney, J., Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **1969**, *164*, 719-721.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.-C., Barre-Sinoussi, F., Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-Trihydroxflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 982-987.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.-C., Barre-Sinoussi, F., Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *190*, 469-476.
- Onodera, S., Ohori, H., Yamaki, M., Ishida, N., Electron microscopy of human hepatitis B virus cores by negative staining-carbon film technique. *J. Med. Virol.* **1982**, *10*, 147-155.
- Op de Kamp, J. A., Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47-71.

- Ormerod, M. G., *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Second Edition, IRL Press at Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo **1994**.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Fraga, C. G., Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* **2005**, *12*, 19-25.
- Ott, B. R., Owens, N. J., Complementary and alternative medicines for Alzheimer's disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **1998**, *11*, 163-173.
- Ou, J.-H., Bao, H., Shih, C., Tahara, S. M., Preferred translation of human hepatitis B virus polymerase from core protein but not from precore protein-specific transcripts. *J. Virol.* **1990**, *64*, 4578-4581.
- Pahl, H. L., Activators and target genes of Rel / NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* **1999**, *18*, 6853-6866.
- Pan, L., Becker, H., Gerhäuser, C., Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor - and mitochondrial pathway. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2005**, *49*, 837-843.
- Paran, N., Cooper, A., Shaul, Y., Interaction of hepatitis B virus with cells. *Rev. Med. Virol.* **2003**, *13*, 137-143.
- Park, S. G., Lee, S. M., Jung, G., Antisense oligodeoxynucleotides targeted against molecular chaperonin Hsp60 block human hepatitis B virus replication. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39851-39857.
- Parr, A. J., Bolwell, G. P., 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.
- Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid. Res.* **2001**, *29*, 2002-2007.
- Philpott, N. J., Turner, A. J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C., Gordon-Smith, E. C., Dalglish, A. G., Gibson, F. M., The use of 7-amino-actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* **1996**, *87*, 2244-2251.
- Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Suliman, H. B., Carbon monoxide, oxidative stress, and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1332-1339.

- Piao, M., Mori, D., Satoh, T., Sugita, Y., Tokunaga, O., Inhibition of endothelial cell proliferation, in vitro angiogenesis, and the down-regulation of cell adhesion-related genes by genistein. Combined with a cDNA microarray analysis. *Endothelium* **2006**, *13*, 249-266.
- Picq, M., Dubois, M., Munari-Silem, Y., Prigent, A.-F., Pacheco, H., Flavonoid modulation of protein kinase C activation. *Life Sci.* **1989**, *44*, 1563-1571.
- Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Plaitakis, A., Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: A hypothesis. *Ann. Neurol.* **1990**, *28*, 3-8.
- 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. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *460*, 1-9.
- Plumb, G. W., de Pasqual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G., Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effects of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Rad. Res.* **1998**, *29*, 351-358.
- Pohl, C., Flavonoide des Apfels: Transport in Caco-2-Kolonzellen und Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus. *Dissertation*, Universität Kaiserslautern **2005**.
- Pollack, J. R., Ganem, D., A RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* **1993**, *67*, 3254-3263.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., Scott, J., A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* **1987**, *50*, 831-840.
- Preuss, R., *Hepatitis*. In: Renz-Polster, H., Braun, J. (Eds.), *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier Spektrum Verlag, München **2000**, 623-632.
- Pruzanski, W., Vadas, P., Phospholipase A₂-A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol. Today* **1991**, *12*, 143-144.
- Qian, D., Weiss, A., T cell antigen receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 205-212.

- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., Kann, M., Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *519*, 9849-9854.
- Radbruch, A., *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong- Barcelona-Budapest **1992**.
- Radziwill, G., Tucker, W., Schaller, H., Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product domain structure and RnaseH activity. *J. Virol.* **1990**, *64*, 613-620.
- Rajendran, M., Manisankar, P., Gandhidasan, R., Murugesan, R., Free Radical Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7389-7394.
- Ramanathan, R., Das, N. P., Tan, C. H., Effects of γ -linolenic acid, flavonoids, and vitamins on cytotoxicity and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 43-48.
- Renner, E. L., Hepatitis B: Wann Lamivudin? *Schweiz. Med. Wochenschr.* **2000**, *130*, 39-41.
- Rice-Evans, C., Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797-807.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152-159.
- Riesenhuber, A., Kasper, D. C., Vargha, R., Endemann, M., Aufrecht, C., Quercetin protects human mesothelial cells against exposure to peritoneal dialysis fluid. *Pediatr. Nephrol.* **2007**, *22*, 1205-1208.
- Rigg, R. J., Schaller, H., Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH. *J. Virol.* **1992**, *66*, 2829-2836.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T., Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Annal. Biochem.* **1997**, *245*, 154-160.
- Robak, J. und Gryglewski, R. J., Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 837-841.
- Robinson, W. S., Greenman, R. L., DNA polymerase in the *core* of the human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* **1974**, *13*, 1231-1236.

- Robinson, W. S., *Hepadnaviridae and their replication*. In: Fields B. N., Knipe, D. M. (Eds.). *Fundamental Virology*. Second Edition, Raven Press, New York **1991**, 989-1014.
- Römer, K. D., Bleich, S., Kornhuber, J., Glutamat – Ein Transmitter im Spannungsfeld zwischen Toxin und Trophin. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* **2003**, *71*, S3-S9.
- Rösler, C., Köck, J., Comment on „Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G“. *Science* **2004**, *305*, 1403
- Rösler, C., Köck, J., Kann, M., Malim, M. H., Blum, H. E., Baumert, T. F., von Weizsäcker, F., APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology* **2005**, *42*, 301-309.
- Rojewski, M. T., Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Arsentrioxid in malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades: CD95-unabhängige, Caspasen- und Mitochondrien-abhängige Apoptose-Induktion, Apoptose-unabhängige Proliferationsinhibition. *Dissertation*, Universität Berlin **2002**.
- Rosen, H. N., Murrell, J. R., Liepnieks, J. J., Benson, M. D., Cody, V., Moses, A. C., Threonine for alanine substitution at position 109 of transthyretin differentially alters human transthyretin's affinity for iodothyronines. *Endocrinology* **1994**, *134*, 27-34.
- Rothman, S. M., Olney, J. W., Excitotoxicity and the NMDA receptor-still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 57-58.
- Rueter, S. M., Burns, C. M., Coode, S. A., Mookherjee, P., Emeson, R. B., Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosin to inosine. *Science* **1995**, *267*, 1491-1494.
- Rueter, S. M., Emeson, R. B., *Adenosine-to-inosine conversion in mRNA*. In: Grosjean, H., Benne, R. (Eds.), *Modification and Editing of RNA*. American Society Microbiology Press, Washington DC **1998**, 343-361.
- Rump, A., Sommer, C., Gass, P., Bele, S., Meissner, D., Kiessling, M., Editing of GluR 2 RNA in the gerbil hippocampus after global cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1996**, *16*, 1362-1365.
- Rusznayk, S., Szent-Györgyi, A., Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* **1936**, *138*, 27.
- Sailer, A., Swanson, G. T., Perez-Otano, I., O'Leary, L., Malkmus, S. A., Dyck, R. H., Dickinson-Anson, H., Schiffer, H. H., Maron, C., Yaksh, T. L., et al., Generation and

- analysis of GluR 5 (Q636R) kainate receptor mutant mice. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8757-8764.
- Salgueiro, J. B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M. B. C., Izquierdo, I., Medina, J. H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *58*, 887-891.
- Sathasivam, S., Ince, P. G., Shaw, P. J., Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2001**, *27*, 257-274.
- Sattler, F., Robinson, W. F., Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J. Virol.* **1979**, *32*, 226-232.
- Savill, J., Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 1065-1069.
- Scaglioni, P. P., Melegari, M., Wands, J. R., Recent advances in the molecular biology of hepatitis B virus. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* **1996**, *10*, 207-225.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh M., Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S-217S.
- Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073-2085.
- Schewe, T., Kuhn, H., Sies, H., Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1825-1829.
- Schmauss, C., Howe, J. R., RNA editing of neurotransmitter receptors in the mammalian brain. *Science's stke* **2002**, *133*, 26-30.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., Giorgi, J. V., Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* **1994a**, *15*, 12-20.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., Keld, B., Giorgi, J. V., A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol.* **1994b**, *170*, 145-157.
- Schmitz, D., Frerking, M., Nicoll, R. A., Synaptic Activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **2000**, *27*, 327-338.

- Schreck, S., Heterologe Expression und Charakterisierung des Polymerase-Gen-Produktes des humanen Hepatitis-B-Virus. *Dissertation*, Universität Göttingen **1995**.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J. P. E., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., Williams, R. J., (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1596-1606.
- Schulze, A.; Downward, J., Analysis of gene expression by microarrays: cell biologist's gold mine or minefield? *J. Cell Sci.* **2000**, *23*, 4151-4156.
- Schuppan, D., Jia, J.-D., Brinkhaus, B., Hahn, E. G., Herbal Products for Liver Diseases: A Therapeutic Challenge for the New Millennium. *Hepatology* **1999**, *30*, 1099-1104.
- Schwarzer, J., Einfluss probiotischer Substanzen auf den antioxidativen Status von neugeborenen Hundwelpen. *Dissertation*, Universität München **2004**.
- Searle, J., Kerr, J. F., Bishop, C. J., Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* **1982**, *17*, 229-259.
- Seeger, C., Hu, J., Why are hepadnaviruses DNA and not RNA viruses? *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 447-450.
- Segal, A. W., The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol. Med. Today* **1996**, *2*, 129-135.
- Selloum, L., Reichl, S., Müller, M., Sebihi, L., Arnhold, J., Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *395*, 49-56.
- Shapiro, H. M., *Practical Flow Cytometry*. Third Edition, Wiley-Liss, New York **1995**.
- Shen, S.-C., Chen, Y.-C., Hsu, F.-L., Lee, W.-R., et al., Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of caspase 3 cascade. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *89*, 1044-1055.
- Shih, C.-M., Lin, H., Liang, Y.-C., Lee, W.-S., Bi, W.-F., Juan, S.-H., Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.* **2004**, *496*, 41-48.

- Shih, P. H., Yeh, C. T., Yen, G. C., Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1557-1566.
- Shin, J. W., Chung, Y.-H., Choi, M. H., Kim, J. A., Ryu, S. H., Jang, M. K., Kim, I. S., Park, N. H., Lee, H. C., Lee, Y., S., Suh, D. J., Precore stop codon mutation of hepatitis B virus is associated with low breakthrough rate following long-term lamivudine therapy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *20*, 844-849.
- Simonian, N. A., Coyle, J. T., Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 83-106.
- Simsek, E., Lu, X., Ouzounov, S., Block, T. M., Mehta, A. S., Alpha-glucosidase inhibitors have a prolonged antiviral effect against hepatitis B virus through the sustained inhibition of the large and middle envelope glycoproteins. *Antivir. Chem. Chemother.* **2006**, *17*, 259-267.
- Sies, H., *Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action*. Academic Press, London-New York **1991**.
- Singh, B., Bhat, T. K., Singh, B., Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5579-5597.
- Skibola, C. F., Smith, M. T., Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 375-383.
- Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelen, D. J., Orrenius, S., Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82-83*, 149-153.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., Seeburg, P. H., RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **1991**, *67*, 11-19.
- Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E., Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* **1989**, *12*, 99-110.
- Spencer, P. S., Nunn, P. B., Hugon, J., Ludolph, A. C., Ross, S. M., Roy, D. N., Robertson, R. C., Guam Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* **1987**, *237*, 517-522.
- Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., Williams, R. J., Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34783-34793.

- Spielbauer, B., Stahl, F., Impact of microarray technology in nutrition and food research. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 908-917.
- Srinivasan, R., Mager, G. M., Ward, R. M., Mayer, J., Svaren, J., NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NURD) complex. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 15129-15137.
- Stanley, P. E., Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods Enzymol.* **1986**, *133*, 14.
- Stibbe, W., Gerlich, W. H., Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* **1983**, *46*, 626-628.
- Stuyver, L. J., Locarnini, S. A., Lok, A., Richman, D. D., Carman, W. F., Dienstag, J. L., Schinazi, R. F., Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* **2001**, *33*, 751-757.
- Su, T. S., Lui, W.-J., Lin, L. H., Han, S. H., Peng, F. K., Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers. *Hepatology* **1989**, *9*, 180-185.
- Su, H., Yee, J. K., Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2708-2712.
- Summers, J., O'Connell, A., Millman, I., Genome of hepatitis B virus: Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4597-4601.
- Sutter A., Bedeutung des Peripheren Benzodiazepinrezeptors für Proliferation und Apoptose von humanen Speiseröhrenkarzinomen. *Dissertation*, Universität Berlin **2003**.
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., Cull-Candy, S. G., Effect of RNA editing and subunit coassembly on single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* **1996**, *492*, 129-142.
- Swanson, G. T., Kamboj, S., K., Cull-Candy, S. G., Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 58-69.
- Takahashi, Y., Lavigne, J. A., Hursting, S. D., Chandramouli, G. V. R., Perkins, S. N., Barrett, J. C., Wang, T. T. Y., Using DNA microarray analyses to elucidate the effects of genistein in androgen-responsive prostate cancer cells: Identification of novel target. *Mol. Carcinog.* **2004**, *41*, 108-119.

- Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T., Kanazawa, I., Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 806-815.
- Tan, G. T., Miller, J. F., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H., Pezzuto, J. M., HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases: a comparative study of sensitivity to inhibition by selected natural products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *185*, 370-378.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishida, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S., A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **1992**, *8*, 169-179.
- Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, Y., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Hatakeyama, M., Liu, Z. J., IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann. NY Acad. Sci.* **1995**, *766*, 235-244.
- Tao, P., The inhibitory effects of catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and DNA polymerase. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **1992**, *14*, 334-338.
- Tausch, U., Etablierung eines Modellsystems zur Infektion primärer humaner Hepatozyten mit dem Hepatitis B-Virus, *Dissertation*, Universität Regensburg **2005**.
- Taylor, D. R., Puig, M., Darnell, M. E. R., Mihalik, K., Feinstone, S. M., New Antiviral Pathway That Mediates Hepatitis C Virus Replicon Interferon Sensitivity through ADAR1. *J. Virol.* **2005**, *79*, 6291-6298.
- Thibault, C., Wang, L., Zhang, L., Miles, M. F., DNA arrays and functional genomics in neurobiology. *Int. Rev. Neurobiol.* **2001**, *48*, 219-253.
- Thiel, G., Rössler, O., Rezeptor-Tyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden: Signaltransduktion. *Biol. Unserer Zeit* **2005**, *5*, 312-319.
- Thompson, C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **1995**, *267*, 1456-1462.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y., Caspases: enemies within. *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.
- Tilly, J. L., Billig, H., Kowalski, K. I., Hsueh, A. J., Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1642-1950.

- Tomassoni, M. L., Amori, D., Magni, M. V., Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biophys. Res. Commun.* **1999**, 258, 476-481.
- Tourniaire, F., Hassan, M., André, M., Ghiringhelli, O., Alquier, C., Amiot, M.-J., Molecular mechanisms of the naringin low uptake by intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 957-962.
- Traganos, F., Ardelt, B., Halko, M., Bruno, S., Darzynkiewicz, Z., 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.* **1992**, 52, 6200-6208.
- Tsuda, T., Ueno, Y., Yoshikawa, T., Kojo, H., Osawa, T., Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1184-1197.
- Turelli, P., Trono, D., Editing at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity. *Science* **2005**, 307, 1061-1065.
- Turski, L., Bressler, K., Rettig, K. J., Löschmann, P. A., Wachtel, H., Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* **1991**, 349, 414-418.
- Tur-Kaspa, R., Burk, R. D., Shaul, Y., Shafritz, D. A., Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 43, 1627-1631.
- Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., et al., Baicalein induced in vitro apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol. Immunol.* **2001**, 38, 781-791.
- Untergasser, A., Rekombinante Hepatitis B Viren-Vektoren als Werkzeuge für Molekularbiologie und Therapie: Optimierung eines Systems. *Dissertation*, Universität Heidelberg, **2002**.
- Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. D., Gotoh, Y., Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *PNAS* **2001**, 98, 10148-10153.
- Vaidyanathan, J. B., Walle, T., Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* **2001**, 18, 1420-1425.
- Valerio, L. G., Jr., Kepa, J. K., Pickwell, G. V., Quattrochi, L. C., Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol. Lett.* **2001**, 119, 49-57.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, 1-12.
- Vanhoecke, B., Derycke, L., Van Marck, V., Depypere, H., De Keukeleire, D., Bracke, M., Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*, 889-895.
- Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., Sakmann, B., Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **1991**, *252*, 1715-1718.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39-51.
- Victor, A., Klug, S. J., Blettner, M., cDNA-Microarrays-Strategien zur Bewältigung der Datenflut. *Deutsches Ärzteblatt* **2005**, *102*, 293-299.
- Vissel, B., Royle, G. A., Christie, B. R., Schiffer, H. H., Ghetti, A., Tritto, T., Perez-Otano, I., Radcliffe, R. A., Seamans, J., Sejnowski, T., Wehner, J. M., Collins, A. C., O'Gorman, S., Heinemann, S. F., The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures. *Neuron* **2001**, *29*, 217-227.
- Vlietinck, A. J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L. A., Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* **1998**, *64*, 97-109.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., Girkontaite, I., Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **1997**, *390*, 350-351.
- Vollmar, W., Gloger, J., Berger, E., Kortenbruck, G., Köhling, R., Speckmann, E.-J., Musshoff, U., RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *15*, 371-379.
- Wagner, H., *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. Pharmazeutische Biologie Band 2.* 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **1999**.
- Walle, T., Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol. Med.* **2004**, *36*, 829-837.

- Walle, U. K., Galijatovic, A., Walle, T., Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 431-438.
- Walgren, R. A., Lin, J.-T., Kinne, R., K.-H., Walle, T., Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin-4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 837-843.
- Wang, Y., Chen, P., Wu, X., Sun, A. L., Wang, H., Zhu, Y. A., Li, Z. P., A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* **1990**, *64*, 3977-3981.
- Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y., Lin, J.-K., Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 1517-1525.
- Washburn, M. S., Numberger, M., Zhang, S., Dingledine, R., Differential dependence on GluR 2 expression of three characteristic features of AMPA receptors. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 9393-9406.
- Watzl, B., Leitzmann, C., *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart **1995**.
- Watzl, B., Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 2. Auflage, Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart **1999**.
- Watzl, B., Rechkemmer, G., Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* **2001**, *48*, 498-502.
- Weber, G., Shen, F., Prajda, N., Yang, H., Li, W., Yeh, A., Csokay, B., Olah, E., Look, K. Y., Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv. Enzyme Regul.* **1997**, *37*, 35-55.
- Wei, Y. O., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K., Uchida, A., Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4952-4957.
- Weiland, U., Untersuchung der Apoptose in kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen: Bedeutung von Stickstoffmonoxid. *Dissertation*, Universität Giessen **1999**.

- Weinberger, K. M., Wiedenmann, E., Böhm, S., Jilg, W., Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J. Virol. Methods* **2000**, *85*, 75-82.
- Weisel, T., Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsäften bei Probanden. *Dissertation*, Universität Kaiserslautern **2006**.
- Weiß, L., Etablierung eines *in vitro* Modellsystems zur Untersuchung der HBV-Replikation und Entwicklung neuer Strategien zur HBV-Therapie. *Dissertation*, Universität München **1995**.
- Welton, A. F., Hurley, J., Will, P., Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *280*, 301-312.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D., Daniel, H., Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3823-3831.
- Wieloch, T., Engelsen, B., Westerberg, E., Auer, R., Lesions of the glutamergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum. *Neurosci. Lett.* **1986**, *58*, 25-27.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., Schaller, H., Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **1987**, *61*, 904-911.
- Wippich, N., Nachweismöglichkeiten reaktiver Sauerstoffspezies am Beispiel der Xanthin- und der NAD(P)H-Oxidase. *Dissertation*, Universität Halle-Wittenberg **2003**.
- Wo, Z. G., Oswald, R. E., Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 161-168.
- Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquierdo, I., Paladini, A., Medina, J. H., Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a highaffinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *318*, 23-30.
- Wollersen, H., Bestimmung und Identifizierung von Flavonoiden in Gerste mit HPLC-DAD-MS/MS. *Dissertation*, Universität Paderborn **2004**.
- Xia, W.-L., Shen, Y., Zheng, S.-S., Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication *in vitro* and its possible mechanisms. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2005**, *4*, 18-22.

- Xiao, D., Zhu, S. P., Gu, Z. L., Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **1997**, *18*, 280-283.
- Yang, H. M., Shin, H. R., Cho, S. H., Bang, S. C., Song, G. Y., Ju, J. H., Kim, M. K., Lee, S. H., Ryu, J. C., Kim, Y., Jung, S. H., Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 104-111.
- Yang, J.-H., Nie, Y., Zhao, Q., Su, Y., Pypaer, M., Su, H., Rabinovici, R., Intracellular localization of differentially regulated RNA-specific adenosine deaminase isoforms in inflammation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45833-45842.
- Yano, S., Umeda, D., Yamashita, T., Ninomiya, Y., Sumida, M., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H., Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur. J. Nutr.* **2007**, in press.
- Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., Folsom, A. R., Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.* **1999**, *149*, 943-949.
- Yokusuka, O., Omata, M., Imazeki, F., Ito, Y., Okuda, K., Hepatitis B virus RNA transcripts and DNA in chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 1187-1192.
- Yoon, M.-S., Lee, J. S., Choi, B.-M., Jeong, Y.-I., Lee, C.-M., Park, J.-H., Moon, Y., Sung, S.-C., Lee, S. K., Chang, Y. H., Chung, H. Y., Park, Y.-M., Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1033-1044.
- Youdim, K. A., Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Rice-Evans, C., Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol. Chem.* **2002**, *333*, 503-519.
- Yu, B. P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **1994**, *74*, 139-162.
- Zachowski, A., Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 1-14.
- Zhang, G.-H., Wangm Q., Chen, J.-J., Zhang, X.-M., Tam, S.-C., Zheng, Y.-T., The anti-HIV-1 effect of scutellarein. *Biochem. Biophys. Research Com.* **2005a**, *334*, 812-816.
- Zhang, J. L., Zhao, W. G., Wu, K. L., Wang, K., Zhang, X., Gu, C. F., Li, Y., Zhu, Y., Wu, J. G., Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell

- apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch. Virol.* **2005b**, *150*, 721-741.
- Zhang, X., Dong, N., Yin, L., Cai, N., Ma, H., You, J., Zhang, H., Wang, H., He, R., Ye, L., Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues. *J. Med. Virol.* **2005c**, *77*, 374-381.
- Zhang, J., Stanley, R. A., Adaim, A., Melton, L. D., Skinner, M. A., Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 996-1005.
- Zhou, Q.-Q., Imbe, H., Zou, S., Dubner, R., Ren, K., Selective upregulation of the flip-flop splice variants of AMPA receptor subunits in the rat spinal cord after hindpaw inflammation. *Mol. Brain Res.* **2001**, *88*, 186-193.
- Zielińska, M., Kostrzewa, A., Ignatowicz, E., Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2000**, *38*, 25-30.
- Zielińska, M., Kostrzewa, A., Ignatowicz, E., Jaromir, B., The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, *48*, 183-189.
- Zilka, N., Ferencik, M., Hulin, I., Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? *Bratisl. Lek. Listy.* **2006**, *107*, 374-383.
- Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., Evan, G., Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1551*, 1-37.
- Zoulim, F., Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *J. Clin. Virol.* **2001**, *21*, 243-253.

Lebenslauf

Name : Korte
Vorname : Gabriele Susanne
Geburtsdatum : 23.04.1978
Geburtsort: Kelheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Bekenntnis: römisch-katholisch

Anschrift: Hauptstraße 61
93346 Ihrlerstein

Vater: Heinz Korte
Mutter: Barbara Korte, geb. Mayrhofer
Geschwister: Michael Korte
Klaus Korte

Schulbildung:

September 1984 – Juli 1988: Grundschule Ihrlerstein
September 1988 – Juni 1997: Donau-Gymnasium Kelheim
Juni 1997: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

- November 1988 – Januar 2003: Studium Diplom Chemie an der Universität Regensburg
- 1999: Vordiplom
- 2002: Diplomprüfung
- Mai 2002 – Januar 2003: Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik an der Universität Regensburg
(Thema: „Impedanzspektroskopische Untersuchung der Wechselwirkungen von Vesikeln mit Aminoalkanthiol- und Lipopolymerschichten“)
- 2003: Diplom

Promotion:

- ab März 2003: Promotion am Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg
- dabei seit November 2004: tätig im molekulargenetischen Labor der Psychiatrischen Klinik der Universität Regensburg (Arbeitskreis Herr Dr. Sand)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2003 bis Dezember 2006 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und am Institut für Virologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, sowie an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der Universität Regensburg unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Schreier durchgeführt.

Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und die gewährten Freiräume auch innerhalb des Themengebietes. Besonderer Dank gilt für die durch ihn zustande gekommenen Kooperationen zum Institut für Virologie (Würzburg) und den Kliniken und Polikliniken für Psychiatrie (Würzburg, Regensburg).

Der DFG danke ich für die finanzielle Förderung dieses Projekts im Rahmen des FlavoNet.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Rethwilm für die Möglichkeit im Arbeitskreis von Herrn PD Dr. C. Scheller am Institut für Virologie (Würzburg) Zellversuche durchzuführen.

Allen Kolleginnen und Kollegen dieses Arbeitskreises sei herzlich für ihre freundliche Aufnahme dort, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft gedankt. Namentlich erwähnen möchte ich dabei Herrn PD Dr. S. Sopper, dem ich für die hilfreichen Tips im Umgang mit der FACS danken möchte und Frau Ingeborg Euler-König, die mir nicht nur Anregungen und Unterstützung im Umgang mit den Zellen zuteil kommen ließ, sondern auch ansonsten durch Ratschläge in allen Lebenslagen eine besondere Arbeitsatmosphäre im Labor geschaffen hat. Darüber hinaus danke ich ihr für Einladungen und Ausflüge, bei denen sie uns die fränkische Lebensweise näherzubringen versuchte.

Frau PD Dr. Eleni Koutsilieri und Herrn PD Dr. Carsten Scheller gilt mein besonderer Dank für das Bereitstellen der Zelllinien, das Erlernen der molekularbiologischen

Methoden und die Einführung in die FACS, sowie für die engagierte fachliche Betreuung der Arbeit und viele wertvolle Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. P. Riederer möchte ich für die Möglichkeit zur Nutzung des Labors der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie in Würzburg danken. Den Mitarbeitern des Arbeitskreises sei für ihre Hilfsbereitschaft, sowie für die Bestimmung der Glutathion-Spiegel gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Hajak für die Möglichkeit, dass ich im Arbeitskreis von Herrn Dr. Philipp Sand im Molekulargenetischen Labor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Regensburg unter hervorragenden Arbeitsbedingungen arbeiten konnte und für die hilfreichen Diskussionen.

Herrn Dr. Philipp Sand gilt mein besonderer Dank für die engagierte fachliche Betreuung der Arbeit, die wertvollen Diskussionen, das entgegengebrachte Vertrauen, sowie für die Unterstützung, die er mir stets in jeglicher Hinsicht gewährt hat. Des Weiteren möchte ich mich für die von ihm durchgeführte äußerst sorgfältige Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis von Herrn Dr. Sand - Carola, Petra, Martina, Andrea und Chris - danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die freundliche Zusammenarbeit und stetig große Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn PD Dr. Thomas Weiss sowie dem Zentrum für Leberzellforschung am Klinikum der Universität Regensburg für die Bereitstellung der Zelllysate von primären humanen Hepatocyten.

Herrn Dr. Stephan Böhm möchte ich recht herzlich für die Kooperation im Rahmen des Hepatitis B Forschungsprojekts und für die Durchführung der Infektionsversuche danken. Des Weiteren danke ich ihm für die kompetente Einführung bzgl. Hepatitis B-Viren, seinem Engagement innerhalb des Projekts und für viele wertvolle Diskussionen.

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen im Familien- und Freundeskreis bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise persönlich unterstützt und ermutigt haben. Dabei sei auch all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die hier nicht namentlich Erwähnung finden, aber zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Michael Philipczyk für seine schnelle und kompetente Hilfe bei Computerproblemen jeglicher Art.

Mein besonderer Dank gilt Familie Bauer, insbesondere Silvia, aber auch Birgit und Tante Thea, für ihre moralische Unterstützung während meiner Promotion.

Ganz herzlich möchte ich an dieser Stelle meinem Freund Reinhold danken, der mir die Endphase erleichterte. Danke für Deine Unterstützung, Dein Verständnis, Deine Ausdauer und Geduld mit mir! Danke dass Du immer für mich da bist!

Des Weiteren möchte ich Michael, Waltraud, Johanna, Andreas, Philipp, Eva und Senta ein ganz großes Dankeschön aussprechen. Auch Ihr ward jederzeit für mich da, habt mich nicht nur in allen Bereichen tatkräftig unterstützt, sondern mir mit vielen tollen Bergausflügen immer wieder zu neuer Motivation verholfen. Klaus danke ich für seine Hilfe bei „Mobilitätsschwierigkeiten“.

Nicht zuletzt möchte ich einen besonderen Dank meinen Eltern aussprechen. Ich habe von jeher und in jeder Hinsicht sehr große liebevolle und tatkräftige Unterstützung, Rückhalt und Ermutigung durch Euch erfahren.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Flavonoid-induzierte Cytotoxizität, Neuroprotektion und Immunmodulation im
Zellmodell“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und
Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form
bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden
keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Gabriele Korte