

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe Universität  
Frankfurt am Main  
Institut für Medizinische Virologie  
Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Doerr

**Antivirale Wirksamkeit von Polyphenolen aus Rheum-Extrakten  
gegen Herpes Simplex Virus Typ-1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt a. M.

vorgelegt von Vera Jütte  
aus Offenbach

Frankfurt am Main, 2007

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. H. W. Doerr  
Koreferent: Prof. Dr. S. Harder  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2008

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Rheus sp. ....	9
1.1.1 Familie und Vorkommen .....	9
1.1.2 Inhaltsstoffe.....	10
1.1.3 Anwendung .....	11
1.2 Flavonoide.....	11
1.2.1 Vorkommen und chemische Struktur .....	11
1.2.2 Resorption.....	14
1.2.3 Wirkungen von Flavonoiden.....	14
1.3 Tannine (Gerbstoffe) .....	18
1.3.1 Vorkommen und chemische Struktur .....	18
1.3.2 Anwendung von Tanninen .....	20
1.4 Potential pflanzlicher Arzneistoffe .....	20
1.5 Antivirale Therapie .....	21
1.5.1 Vakzination.....	22
1.5.2 Virale Enzyminhibitoren .....	22
1.5.3 Interferone.....	23
1.5.4 Gen-Therapie .....	23
1.5.5 RNA-Interferenz .....	23
1.6 Herpes Simplex Virus Typ 1.....	24
1.6.1 Aufbau und Replikation von HSV .....	24
1.6.2 Latenz und Klinik von HSV-1.....	25
1.6.3 Immunevasion.....	26
1.6.4 Therapie.....	27
1.7 Ziel dieser Arbeit .....	27
2.1 Material .....	29
2.1.1 Zelllinien.....	29
2.1.2 Virusstamm .....	29
2.1.3. Rheumextrakte.....	29
2.1.4 Medien und Reagenzien .....	30
2.1.5 Verbrauchsmaterial .....	32
2.1.6 Geräte .....	33

2.2	Methoden .....	34
2.2.1	Zytopathischer Effekt .....	34
2.2.1.1	Ursachen.....	34
2.2.1.2	Manifestationen.....	34
2.2.2	Virus-Quantifizierung.....	35
2.2.2.1	Infektiositäts-Assay .....	35
2.2.2.2	Plaque Assay .....	37
2.2.2.3	Infektionen von Zellkulturen mit Virus .....	37
2.2.3	Antivirale Testung .....	37
2.2.3.1	Zytopathischer Endpunkt-Assay .....	38
2.2.4	Toxizitätstests .....	39
2.2.4.1	MTT-Assay.....	39
2.2.4.2	Mikroskopischer Toxizitätstest .....	39
2.2.5.	Arbeiten mit Zellkulturen.....	39
2.2.6	Auflösen der Rheum-Extrakte .....	41
2.2.7	Antivirale Testung bei simultaner Inkubation von Virus und Extrakt....	41
2.2.7.1	Vorbereitung der Antiviralen Testung und der Toxizitätsprüfung .	41
2.2.7.2	Beimpfung der Platten mit Virus und zu testendem Extrakt .....	43
2.2.7.3	AbleSEN der Ergebnisse .....	44
2.2.7.4	Berechnung von IC 50, TC 50, und TI mit CalcuSyn®.....	45
2.2.8	Toxizitätsprüfung mittels MTT-Assay .....	46
2.2.9	Test mit viraler Vorinkubation.....	47
3.1	Antivirale Testung bei simultaner Inkubation von Virus und Extrakt.....	48
3.2	MTT-Assay .....	51
3.3	IC <sub>50</sub> , TC <sub>50</sub> und Therapeutischer Index .....	60
3.4	Virale Vorinkubation .....	61
3.4.5	IC <sub>50</sub> nach viraler Vorinkubation .....	65
4.	Diskussion .....	67
4.1	Fehlerquellen.....	67
4.1.1	Fehlerhafte Auswahl der Zellkulturen.....	67
4.1.1.1	Veränderte kontinuierliche Zelllinien .....	67
4.1.1.2	Infektion mit Mykoplasmen.....	68
4.1.2	Fehlerhafte Auswahl und Bearbeitung des Virusstammes.....	68
4.1.2.1	Veränderte Infektiosität .....	68

4.1.2.2	Fehlerhafte Quantifizierung.....	68
4.1.3	Rheum Extrakte .....	69
4.1.3.1	Verunreinigte Rheum-Extrakte.....	69
4.1.3.2	Eigenfärbung und Löslichkeit der Extrakte.....	69
4.1.3.3	Reproduzierbarkeit.....	70
4.1.4	Fehler bei der Bewertung des zytopathischen Effektes .....	70
4.1.5	Probleme bei der Interpretation.....	71
4.2	Ist diese virale Testung sinnvoll?.....	71
4.3	Übertragung der <i>in vitro</i> Ergebnisse auf <i>in vivo</i> Verhältnisse .....	72
4.4	Inhaltsstoffe von Rheum Extrakten.....	72
4.5	Wirkmechanismus .....	73
4.6	Bisherige Erkenntnisse.....	74
4.7	Aussichten.....	75
4.8	Zusammenfassung.....	75
4.9	Summary .....	77

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1)	Rheum palmatum.....	7
Abb. 2)	Strukturformeln einiger Flavonoide.....	10
Abb. 3)	Strukturformeln von Beispielen für Tannine.....	17
Abb. 4)	Schematische Darstellung des zytopathischen Effektes.....	32
Abb. 5)	Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Extrakte.....	49
Abb. 6)	Vergleich der Zytotoxizität der Rheum-Extrakte bei einer Konzentration von 500µl/ml bestimmt durch MTT-Assay.....	57
Abb. 7.1)	Dosis-Wirkungs-Kurve bei viraler Vorinkubation von 1 Stunde.....	63
Abb. 7.2)	Dosis-Wirkungs-Kurve bei viraler Vorinkubation von 6 Stunden.....	64
Abb. 7.3)	Dosis-Wirkungs-Kurve bei viraler Vorinkubation von 24 Stunden.....	64

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1)	Inhaltsstoffe von Rheum sp.....	8
Tab. 2)	Nomenklatur und Vorkommen von Flavonoiden in der Flora.....	11
Tab. 3)	Potentielle Wirkungen von Flavonoiden.....	13
Tab. 4)	Verdünnungsreihe der Rheumextrakt-Konzentrationen.....	40
Tab. 5)	Pipettier-Schema der antiviralen Testung.....	42
Tab. 6)	Pipettier-Schema des Toxizitätstests.....	42
Tab. 7)	Pipettier-Schema der antiviralen Testung mit Vorinkubation.....	45
Tab. 8)	Auswertung der antiviralen Testung.....	46
Tab. 9)	Bestimmung des Blank-Wertes.....	50
Tab. 10.1)	Auswertung plate 1 des MTT-Assays.....	50
Tab. 10.2)	Auswertung plate 2 des MTT-Assays.....	50
Tab. 10.3)	Auswertung plate 3 des MTT-Assays.....	51
Tab. 10.4)	Auswertung plate 4 des MTT-Assays.....	51
Tab. 10.5)	Auswertung plate 5 des MTT-Assays.....	51
Tab. 10.6)	Auswertung plate 6 des MTT-Assays.....	52
Tab. 10.7)	Auswertung plate 7 des MTT-Assays.....	52
Tab. 10.8)	Auswertung plate 8 des MTT-Assays.....	52
Tab. 10.9)	Auswertung plate 9 des MTT-Assays.....	53
Tab. 10.10)	Auswertung plate 10 des MTT-Assays.....	53
Tab. 10.11)	Auswertung plate 11 des MTT-Assays.....	53
Tab. 10.12)	Auswertung plate 12 des MTT-Assays.....	54
Tab. 10.13)	Auswertung plate 13 des MTT-Assays.....	54
Tab. 10.14)	Auswertung plate 14 des MTT-Assays.....	54
Tab. 10.15)	Auswertung plate 15 des MTT-Assays.....	55
Tab. 10.16)	Auswertung plate 16 des MTT-Assays.....	55
Tab. 10.17)	Auswertung plate 17 des MTT-Assays.....	55
Tab. 10.18)	Auswertung plate 18 des MTT-Assays.....	56
Tab. 10.19)	Auswertung plate 19 des MTT-Assays.....	56
Tab. 11)	Zusammenfassung der IC50-und TC50-Werte und des therapeutischen Index.....	58
Tab. 12.1)	Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 1h .....	60

Tab. 12.2)	Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 6 h.....	61
Tab. 12.3)	Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 24 h.....	62
Tab. 13)	IC50 nach viraler Vorinkubation.....	63
Tab. 14)	Probleme bei der Übertragung von <i>in vitro</i> Ergebnissen auf <i>in vivo</i> Verhältnisse .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACG	Acycloguanosine
AP-1	Activation Protein-1
Aq. dest.	Aqua destillata
CC <sub>50</sub>	50% Cytotoxic Concentration
CD	Cluster of differentiation
CMV	Zytomegalie Virus
CoV	Corona Virus
CPE	Zytopathischer Effekt
CyD <sub>50</sub>	50% Cytotoxic Dose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNA
EBV	Eppstein Barr Virus
EC <sub>50</sub>	50% Effective Concentration
ED <sub>50</sub>	50% Effective Dose
EGCG	Epigallocatechingallat
E-Gene	Early-Gene
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
GABA	Gammaaminobuttersäure
gp	Glycoprotein
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV I	Herpes Simplex Virus Typ 1
IC50	50% Inhibiting Concentration
IE-Gene	Intermediate early-Gene
LAT-Gen	Latenz assoziiertes Transkript-Gen
LDL	Low density lipoproteins

L-Gene	Late-Gene
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
MEM	Minimum Erhaltungsmedium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Medium of Infection
mRNA	Messenger RNA
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
MW	Mittelwert
NFκB	Nuclear Factor κB
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SARS	Severe acut respiratory syndrom
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERMs	Selective estrogen receptor modulators
SGLT-1	Sodium/ Glucose Cotransporter-1
siRNA	small interfering RNA
Subst.	Substanz
Tab.	Tabelle
TC <sub>50</sub>	50% Toxic Concentration
TCID <sub>50</sub>	50% Tissue Culture Infective Dose
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TI	Therapeutischer Index
tox.	toxisch
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
vhs	viral host shut off factor
VK	Viruskontrolle
VZV	Varizella Zoster Virus
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkontrolle

## 1. Einleitung

### 1.1 Rheus sp.

#### 1.1.1 Familie und Vorkommen

Rhabarber gehört zu der Familie der Polygonacea, der Knöterichgewächse und ist ursprünglich in den bergigen Gebieten von Tibet, Burma und China beheimatet. Da die Pflanze aus dem „barbarischen“ Osten jenseits der Wolga (alter Name „Rha“) importiert wurde erhielt sie ihren Namen (Uchibayashi, 2001). Der Gebrauch als medizinische Droge geht schon bis auf das 3. Jahrtausend vor Christus zurück, wo in China der legendäre Kaiser Shen nung den *Rhabarber* in seinem Heilkräuter-Buch „Shen nung pen t’sao king“ erwähnte. Als Droge werden die ausgegrabenen Wurzeln (Rhei radix) beziehungsweise die unterirdischen Sprosse (Rhizome) von 4-7 jährigen Pflanzen verwendet. Es existieren verschiedene Arten, wobei der Gemüserhabarber (*Rheum rhabarbum*) und der Sibirische Rhabarber (*Rheum rhaponticum*) bei uns als Speisepflanzen kultiviert sind. Der Chinesische Rhabarber (*Rheum officinale* Baillon) und der Medizinalrhabarber (*Rheum palmatum* Linné) finden als Heilpflanzen Verwendung. Schon die Namensgebung sorgte in Europa im 18. Jahrhundert für Verwirrung. Um von der chinesischen Lieferung der Heilpflanze unabhängig zu sein wurden verschiedene Kultivierungsversuche unternommen, wobei Linné in St. Petersburg und Baillon in Paris zur selben Zeit verschiedene Rhabarber-Pflanzen kultiviert hatten und beide Parteien überzeugt waren, die „echte“ Stammpflanze gefunden zu haben. Heute ist bekannt, dass durch die hohe Bastardisierungstendenz der Polygonacea viele Unterarten existieren.



Abb. 1) *Rheum palmatum*, © Thomas Schöpke

Rhabarber enthält besonders in den Blättern viel Oxalsäure, weshalb diese giftig sind, da die Oxalsäure mit freiem Calcium im Blut Komplexe eingeht und das auf diesem Weg gebildete Calciumoxalat zu Nierenschäden führen kann. Auch die hierzulande verwendeten Stängel können nur bis Ende Juni konsumiert werden, da danach der Oxalsäure-Spiegel toxische Konzentrationen erreicht.

### 1.1.2 Inhaltsstoffe

Medizinalrhabarber besitzt einen hohen Anteil an Anthranoiden, die eine motilitätssteigernde und hydragoge Wirkung auf die Kolonschleimhaut ausüben, weshalb Rhabarber hauptsächlich als Laxans verwendet wird. Weiterhin ist Rhabarber reich an polyphenolischen Verbindungen:

<b>Anthranoide</b>	Aloe-Emodin, Chrysaphonol, Emodin, Hyperin, Physcion, Rhein, Rheosmin, Chrysophanin
<b>Phenolsäuren</b>	Zimtsäure, Gallussäure, Ferulasäure
<b>Flavonoide</b>	Isoquercitrin, Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Procyanidine, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Quercetin
<b>Gerbstoffe</b>	Gallotannine

Tab. 1) Inhaltsstoffe von Rheum sp.

Anthranoide sind Anthrachinonderivate, die in Pflanzen als Bitterstoffe vorkommen. Auch die Anthranoide sind momentan Gegenstand der Forschung. Ihnen werden pro- und antikanzerogene Wirkungen, antientzündliche, antibakterielle und antivirale Effekte unterstellt (Andersen et al., 1991). Die im Rhabarber enthaltenen Substanzen Emodin und Aloe-Emodin führen nachweislich in Tumorzellen zu Apoptose (Su et al., 2005) und DNA-Fragmentierung (Shi et al., 2001). Weiterhin behindern sie die Tumorinvasion, indem Signalwege von den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB gehemmt werden und damit die Genexpression von der für das Tumorstadium wichtigen Matrix-Metalloproteinase inhibiert wird (Huang et al., 2004).

Die möglichen therapeutischen Eigenschaften der enthaltenen Flavonoide und Gerbstoffe werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

### 1.1.3 Anwendung

Im asiatischen Raum werden *Rheum officinale* und *palmatum* häufig in der medizinischen Therapie eingesetzt. Sie sind ein fester Bestandteil der traditionellen Chinesischen Medizin. Zur Anwendung kommen sie nicht nur als Laxans, sondern auch bei viralen (Hsiang et al., 2001) und bakteriellen (Yang et al., 2005) Erkrankungen, sowie zum Schutz vor Nierenversagen (Peng et al., 2005) und in Kombinationspräparaten zur Stärkung der Immunabwehr. Die genauen Wirkmechanismen sind noch nicht hinreichend bekannt. Um das therapeutische Potential dieser Heilpflanze besser verstehen und nutzen zu können, muss man gezielt die einzelnen Inhaltsstoffe der *Rheum sp.* auf ihre Wirkungen hin untersuchen.

## 1.2 Flavonoide

### 1.2.1 Vorkommen und chemische Struktur

Auszüge aus bestimmten Pflanzen, zum Beispiel die Rinde der Färbereiche (*Quercus tinctoria*), verwendete man früher zum Gelbfärben von Stoffen. Als man später die chemische Struktur dieser Substanzen entschlüsselt hatte und ihr Vorkommen in vielen anderen Pflanzen nachweisen konnte, wurde diese Gruppe als Flavonoide bezeichnet (aus dem lateinischen Wort *flavus* „gelb“) (Hänsel et al., 2004). Bisher sind mehr als 5000 verschiedene Strukturen bekannt (Yao et al., 2004). Flavonoide zählen zusammen mit den Phenolsäuren zu den Polyphenolen und werden von der Pflanze durch die Kondensation von Pflanzensäuren zu einer C6-C3-C6 Verbindung gebildet. Sie können nicht von Menschen oder Tieren synthetisiert werden. Ausgangsprodukt für die Synthese von Flavonoiden ist das Chalkon (2-Hydroxyphenyl-styrylketon). Durch die Chalcon-Isomerase kommt es zu einem Ringschluss mit Sechsering, dem Flavanon (2-Phenylchroman), welches die Ausgangssubstanz für eine Vielfalt von weiteren Flavonoiden ist. Je nach Oxidierungsgrad des sauerstoffhaltigen Rings ergeben sich weitere Grundverbindungen (Heldt, 1999) Die sechs wichtigsten Untergruppen werden als Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone, Anthocyanidine und Flavanole (Catechine und Proanthocyanidine) bezeichnet.

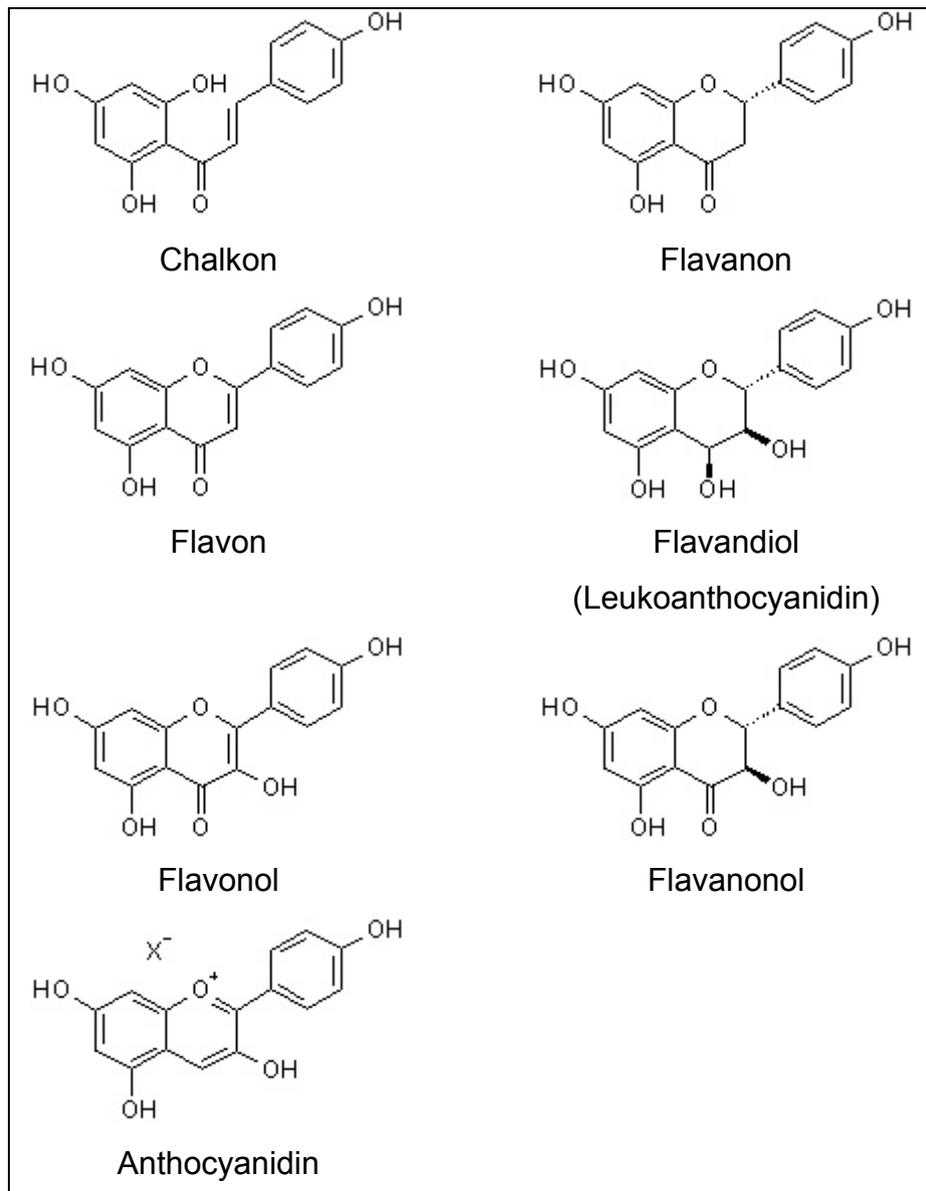


Abb. 2) Strukturformeln einiger Flavonoide (Altersberger, Kurz, 2005)

Flavonoide sind die in höheren Pflanzen am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und besitzen eine große Strukturevielfalt. Sie liegen meist als lösliche Glykoside, das heißt gebunden an Zuckermoleküle, vor. Zuckerfreie Strukturen werden als Aglyka bezeichnet. Flavonoide kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor.

Grundstruktur	Aglykon	Flavonoid	Beispiele	
Flavonole	Quercetin	Spiraeosid	Zwiebel	
		Isoquercitrin	Holunderblüten	
		Flavonolignane	Mariendistel	
		kein Trivialname	Tomate	
		kein Trivialname	Ruhrkrautblüten	
		kein Trivialname	Preiselbeere	
		kein Trivialname	Schnittlauch	
		Rutosid	Weinrautenkraut	
		Rutosid	Weißdorn	
		Hyperosid	Birke	
		Hyperosid	Weißdorn	
		Hyperosid	Stiefmütterchen	
		kein Trivialname	Schachtelhalm	
		Kämpferol	kein Trivialname	Grünkohl
		kein Trivialname	kein Trivialname	Endivie
kein Trivialname	kein Trivialname	Schachtelhalm		
Flavanole	Catechin	Catechingerbstoffe	Odermenning	
		Catechingerbstoffe	Heidelbeeren	
		kein Trivialname	Pfirsich	
		kein Trivialname	Rotwein	
		kein Trivialname	Äpfel	
		Epicatechin	kein Trivialname	Aprikose
		Epicatechingallat	Grüner Tee	
		Procyanidine	Procyanidin B-2	Weißdorn
Procyanidin B-2	Procyanidin B-2	Mossbeeren		
Flavanone	Hesperetin	Hesperidin	Orange	
		Hesperidin	Zitrone	
		Naringenin	Naringin	Grapefruit
Flavone	Apigenin	Vitexin	Stiefmütterchen	
		Isovitexin	Orthosiphon	
		Biflavone	Ginkgo	
		kein Trivialname	Sellerie	
		Luteolin	Orientin	Passionsblume
		kein Trivialname	kein Trivialname	Grüne Olive
kein Trivialname	kein Trivialname	Paprika		
Anthocyanidine	Malvidin	kein Trivialname	Blaue Trauben	
		kein Trivialname	Heidelbeeren	
		Delphinidin	kein Trivialname	Johannisbeere
Dihydrochalcone	Phloretin	kein Trivialname	Äpfel	
Isoflavonoide	Genistein	Genistin	Sojabohnen	
		Formonetin	Ononin	Hauhechel

Tab. 2) Nomenklatur und Vorkommen von Flavonoiden in der Flora (Altersberger, Kurz, 2005)

Die vielfältige Verbreitung von Flavonoiden in der Pflanzenwelt ist nicht zufällig. Sie geben Pflanzen nicht nur ihre rote, gelbe oder blaue Färbung, sondern sie fungieren auch als Enzym-Inhibitoren; sie schützen vor schädlichen Einflüssen wie ultravioletter Strahlung (Bieza, Lois, 2001), Parasiten oder toxischen Substanzen (Harborne, Williams, 2000). Weiterhin spielen Flavonoide eine Rolle bei Wachstum, Genexpression, Energiehaushalt, Photosynthese und Geschlechtsdetermination (Cody et al., 1986).

### 1.2.2 Resorption

Über die Nahrungskette werden Bioflavonoide von Mensch und Tier aufgenommen. Unklar ist bisher wie hoch die Bioverfügbarkeit ist und über welchen Mechanismus die Resorption der Bioflavonoide im menschlichen Gastrointestinaltrakt funktioniert. Durch ihre  $\beta$ -Glykolisierung können sie aufgrund ihrer Hydrophilie die Darmwand nicht durch passive Diffusion penetrieren. Nur als freie Aglyka ist eine effektive Resorption möglich. Es konnte aber gezeigt werden, dass die im menschlichen Verdauungstrakt vorhandenen Mikroorganismen die Bindung mit den Zuckermolekülen hydrolysieren und so die Aufnahme erfolgen kann (Blaut et al., 2003). Hierbei werden die Flavonoide jedoch zum Teil degradiert. Weiterhin wird die Teilnahme an einem enterohepatischen Kreislauf diskutiert, was die Verweildauer der Flavonoide im menschlichen Körper verlängern würde (Manach et al., 2005). Am Beispiel von Quercetin einem Flavonol vorkommend in Zwiebeln, konnte gezeigt werden, dass die Zuckerbindung hier unter Umständen für eine verbesserte Aufnahme sorgt, indem der Glucose-Rezeptor SGLT-1 an diesem Prozess beteiligt ist (Hollman et al., 1995). Andere Untersuchungen demonstrieren, dass die Enterozyten des Dünndarms selbst eine Glucosidase-Aktivität besitzen (Day et al., 1998) oder dass das lumenständige Enzym Lactase Phlorizin Hydrolase an der Aufspaltung der Glykoside in freie Aglyka beteiligt ist (Day et al., 2000).

### 1.2.3 Wirkungen von Flavonoiden

In den letzten Jahren wurden viele Daten über mögliche Wirkungen von Flavonoiden *in vitro* und *in vivo* veröffentlicht. Epidemiologisch konnte nachgewiesen werden,

dass sich mit einer hohen Aufnahme von Bioflavonoiden in der Nahrung das Risiko für bestimmte Erkrankungen vermindert. Folgende potentielle Wirkungen werden in der Literatur diskutiert:

- Radikalfängereigenschaften/ antioxidative Wirkung
- Antikanzerogene Wirkung
- Antivirale/ antibakterielle Wirkung
- Kardioprotektive/ antiatherosklerotische Wirkung
- Antidiabetogene Wirkung
- Antiinflammatorische Wirkung
- Immunmodulatorische Wirkungen
- Antiallergene Wirkung
- Wirkung an GABA-Rezeptoren
- Antihepatotoxische Wirkung

Tab. 3) Potentielle Wirkungen von Flavonoiden

Flavonoide können möglicherweise vor Neoplasien und DNA-Schäden schützen, indem sie oxidativen Stress in Zellen reduzieren. Experimentell konnte ihnen Radikalfängereigenschaften und antioxidative Wirkung nachgewiesen werden. Sie besitzen konjugierte Ringstrukturen und Hydroxyl-Gruppen (Fukumoto, Mazza, 2000), welche die Fähigkeit besitzen freie Radikale zu stabilisieren (Duthie, Dobson, 1999) und Chelatkomplexe mit Übergangs-Metallen wie Eisen oder Kupfer zu bilden (Mira et al., 2002).

Weiterhin scheinen Flavonoide antikanzerogene Eigenschaften zu besitzen. In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte die protektive Wirksamkeit gegen Neoplasien, beziehungsweise einen inversen Zusammenhang von Flavonoid-Aufnahme über die Nahrung und Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken, belegt werden. Sie wirken präventiv indem sie Karzinogene und Antioxidantien inaktivieren. In Abhängigkeit von ihrer Struktur können Flavonoide die Kanzerogenese in der Initiations- und Promotionsphase beeinflussen, indem sie die Phase I-Enzyme hemmen, Phase II-Enzyme induzieren, oder direkt mit der DNA in Wechselwirkung treten. Hou et al. konnten zeigen, dass die Inhibition der Tumorgenese über eine Blockade der Aktivierung der MAP-Kinase- (mitogen-activated protein kinase)

Kaskade funktioniert (Hou et al., 2004). Weiterhin induzieren Flavonoide Apoptose in Tumorzellen (Hou et al., 2003; Lee et al., 2005; Yu et al., 2005), wirken antiproliferativ und hemmen die Angiogenese (Ren et al., 2003). Besonders gut erforscht wurde die kanzeroprotektive Wirkung bei Steroidhormon-abhängigen Tumoren (Rosenberg Zand et al., 2002), wie Mamma- (Murrill et al., 1996), Prostata- (Kato et al., 2000) oder Kolonkarzinomen (Thiagarajan et al., 1998).

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte für einige Flavonoide eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden. Die genauen Wirkmechanismen sind dabei zum Teil noch nicht genau belegt. Evers et al. untersuchten die Wirkung von Baicalein und Genistein auf Zytomegalieviren. Es fanden sich eine Blockade des Eintrittsprozesses der Viren in die Wirtszelle, sowie Interaktionen mit der Funktion von frühen, für die Infektion essentiellen, Proteinen (Evers et al., 2005). Weiterhin konnte auch ein inhibitorischer Einfluss auf verschiedene Influenza-Viren, inklusive der Typen A/H1N1, A/H3N2 und B, gezeigt werden. Die untersuchten Catechine zeigten eine Fähigkeit zur Hemmung der Hämagglutination, wobei ihre 3-Galloyl-Gruppe eine Rolle spielt. In hohen Konzentrationen war auch eine Unterdrückung der viralen RNA-Synthese detektierbar (Song et al., 2005). Mit großem Interesse wurde der Einfluss von Flavonoiden auf das Humane Immundefizienz Virus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Baicalin die Fähigkeit besitzt, mit Chemokinen Komplexe einzugehen und diese so daran zu hindern, an Zellrezeptoren zu binden und zu aktivieren. Der Eintritt von HIV in die Wirtszelle konnte behindert werden, indem Baicalin, in nicht toxischen Konzentrationen, die über den Envelope gesteuerte Fusion mit den Wirtszellrezeptoren, CXCR4 und CCR5 hemmt (Li et al., 2000). Weitere Ansätze demonstrieren, dass Catechine die virale Aufnahme behindern, indem sie mit dem viralen Hüll-Protein gp41 interagieren (Liu et al., 2005) oder dass sie die Oberfläche von CD-4 positiven Zellen so verändern, dass die Bindung von viralem gp120 behindert wird (Kawai et al., 2003). Weitere Untersuchungen zeigen Wirksamkeiten gegen HSV-1 (Hayashi et al., 1997), Adenoviren (Weber et al., 2003), Parainfluenzaviren-3, RS-Viren (Wyde et al., 1993), Polio-Viren (Sandoval, Carrasco, 1997) und Andere.

Andere Studien belegen antibakterielle Eigenschaften der Flavonoide gegen gramnegative und grampositive Bakterien, sowie gegen Pilze.

Ein möglicher Grund für die angenommenen kardioprotektiven Effekte von Flavonoiden (Muldoon, Kritchevsky, 1996), ist deren Fähigkeit die Lipoperoxidation von LDL-Proteinen (low density lipoproteins) in ihre atherogene Form zu verhindern (Chen et al., 2000;Naderi et al., 2003). Weiterhin werden vasodilatierende Eigenschaften (Woodman, Chan, 2004) und eine Hemmung der Thrombozytenaggregation (Szewczuk, Penning, 2004;Tzeng et al., 1991) beschrieben, wonach die Aufnahme von Flavonoiden das Risiko für eine koronare Herzkrankheit zu reduzieren vermag. In Ländern mit hohem Konsum an flavonoidreicher Kost herrscht in der Bevölkerung eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate durch Herzinfarkte und Schlaganfälle (Hertog et al., 1995). Machha et al. konnten im Tierversuch eine blutdrucksenkende Wirkung von Flavonoiden an der Aorta nachweisen (Machha, Mustafa, 2005).

Antihyperglykämie und antihyperlipidämie Wirkung von Myricetin, einem Bioflavonoid, konnte tierexperimentell nachgewiesen werden (Iwu et al., 1990). Der blutzuckersenkende Effekt wird wahrscheinlich über einen Angriff am Glykogen-Stoffwechsel vermittelt (Ong, Khoo, 2000). Andere Flavonoide scheinen sich bei diabetischer Nephropathie günstig auf die Nierenfunktion auszuwirken (Yokozawa et al., 2005).

Weitere erforschte Wirkungen von Flavonoiden sind antiinflammatorische (Middleton E Jr, 1998), antiallergische und immunmodulatorische Fähigkeiten. Die genauen Prozesse sind noch nicht ermittelt, aber eine Reihe von Mechanismen scheinen daran beteiligt zu sein. Einer der Wichtigsten ist die Hemmung von Enzymen des Eicosanoid-Stoffwechsels inklusive Phospholipase A2, Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen, und somit Reduzierung der Konzentration von Entzündungsmediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen (Kim et al., 2004). Es existieren Hinweise, dass bestimmte Flavon-Derivate ihre antiinflammatorische Wirkung zum Teil über eine Modulation der Gen-Expression von proinflammatorischen Genen ausüben. Zum Beispiel über die Hemmung der MAP-Kinase vermittelten Expression der Cyclooxygenase-2 (Hou et al., 2005). Weiterhin zeigte EGCG (Epigallocatechingallat) die Fähigkeit eine provozierte Histaminfreisetzung aus Zellen zu inhibieren (Matsuo et al., 1997). Im Tierexperiment konnte durch Flavonoide aus Oolong-Tee bei Ratten eine allergische Typ-1 Reaktion

(Anaphylaxie), die durch Fremdeiweiße induziert war, verhindert werden (Sano et al., 1999).

Einige natürliche und synthetische Flavonoide binden mit hoher Affinität an die Benzodiazepin Bindungsstelle der zentralen GABA A-Rezeptoren und besitzen so eine selektive anxiolytische Wirkung (Marder, Paladini, 2002).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die durch das Pilzgift Aflatoxin B1 ausgelöste Hepatotoxizität durch Bioflavonoide teilweise reversibel ist. Über eine Induktion von entgiftenden Enzymen der Leber wie Cytochrom P450 3A4 und verschiedene Gluthation-S-Transferasen lösen die Flavonoide eine positive Wirkung auf die Hepatozyten aus (Nwankwo et al., 2000)

Zusätzlich werden den Flavonoiden weitere Wirkungen zugeschrieben, z.B. als so genannte Phytoöstrogene, die als SERMs (selective estrogen receptor modulators) klimakterische Beschwerden lindern sollen und antiosteooporotisch wirken.

Viele Ergebnisse von oben beschriebenen Studien werden kontrovers diskutiert, da die genauen Prozesse und Mechanismen noch nicht erforscht sind. Es gibt viel versprechende Ansätze, aber weitere Untersuchungen sind notwendig um exakte Informationen über den möglichen therapeutischen Einsatzbereich von Flavonoiden zu erhalten.

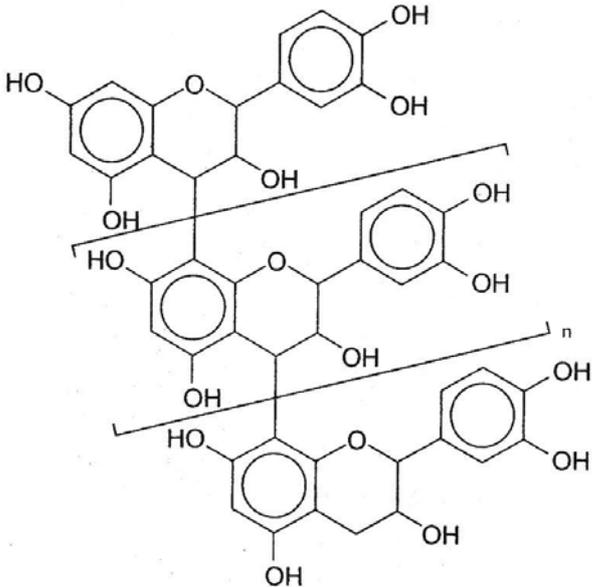
### 1.3 Tannine (Gerbstoffe)

#### 1.3.1 Vorkommen und chemische Struktur

Pflanzliche Polyphenole, die als Gerbstoffe verwendet werden bezeichnet man als Tannine (aus dem englischen Wort *to tan* „gerben“). Tannine kommen in der Flora vielfältig vor, besonders in den Rinden bestimmter Bäume und in Gallen, rundlichen Auswachsungen an der Unterseite von Blättern, welche zum Schutz vor Insekten (Gallwespen) gebildet werden. Pflanzliche Gerbstoffe sind höhermolekulare Polyhydroxyphenole mit einem Molekulargewicht von ca. 500-3000 Dalton. Es wird

hierbei zwischen kondensierten und hydrolysierbaren, also wasserlöslichen, Tanninen unterschieden.

Kondensiertes Tannin



hydrolysierbares Tannin

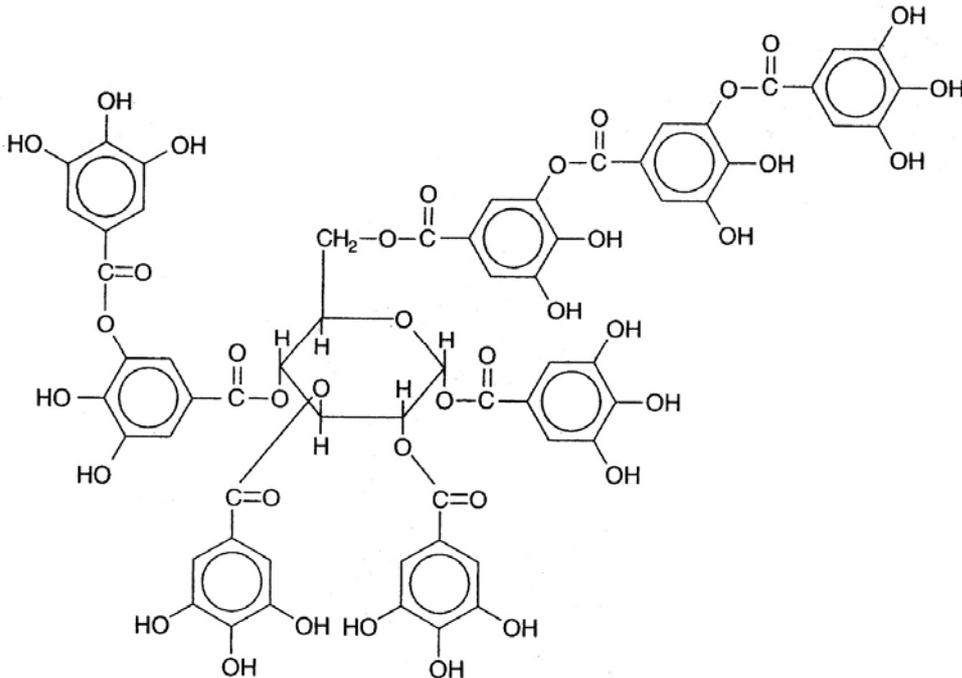


Abb. 3) Strukturformeln von Beispielen für Tannine(Heldt, 1999)

Die kondensierten Tannine (Proanthocyanidine) sind Polymerisate der Flavonoide Catechin und Epicatechin und die hydrolysierbaren Tannine bestehen aus glykosilierten Gallussäuren, die meist an ein Hexose-Molekül gebunden vorliegen.

Im Rhabarber kommen sowohl hydrolysierbare (Galloyl-Glucose) und kondensierbare (Epi-catechine), als auch gemischte Formen (Epicatechin-3-Gallat) von Gerbstoffe vor.

### 1.3.2 Anwendung von Tanninen

Tannine binden über ihre phenolischen Wasserstoffbrücken so fest an peptidischen NH-Gruppen, dass die Proteinbindung nicht mehr enzymatisch getrennt werden kann. Beim Gerbungsprozess entsteht so über die Bindung der Tannine am Kollagen der Tierhäute haltbares Leder (Heldt, 1999). Tannine besitzen ein bitteres Aroma und wirken bei Kontakt zu Proteinen der Mundschleimhaut adstringierend. Dies schützt die Pflanzen erfolgreich vor Fraß. In der Medizinischen Behandlung werden hydrolysierbare Tannine (Gallotannine) vor Allem als Adstringentien eingesetzt, d.h. meist als topische oder orale Lösungen bei Entzündungen, Ulcerationen oder bei Diarrhoe. Die kondensierten Tannine stehen genau wie ihre Grundbausteine die Flavonoide in Diskussion wirksame Antioxidantien zu sein.

### 1.4 Potential pflanzlicher Arzneistoffe

Durch weiter fortschreitendes Verständnis der viralen Molekular-Biologie, den Interaktionen mit der Wirtszelle und den an der Infektion beteiligten Prozessen, können Therapien immer spezifischer ausgerichtet werden. Doch die Entwicklung und Etablierung neuer Arzneistoffe ist ein kostenintensives und aufwendiges Verfahren.

Eine sinnvolle Alternative stellt die gezielte Untersuchung von ungenutztem Potential pflanzlicher Inhaltstoffe dar. Alle Naturvölker besitzen ein breites Spektrum an pflanzlichen Arzneien, die seit Generationen erfolgreich verwendet werden, wobei aber die exakten Wirkmechanismen bislang meist ungeklärt sind.

In China herrscht eine Koexistenz von Schulmedizin und der so genannten traditionellen Chinesischen Medizin (TCM), deren Arzneipflanzen in verschiedenen

Darreichungsformen gegen sämtliche Erkrankungen und Befindlichkeitsstörungen eingesetzt werden. Auch in Europa steigt das Interesse an diesen Therapien, sowie an alter deutscher und europäischer Volksmedizin, wie sie zum Beispiel von Hildegard von Bingen im 12. Jahrhundert praktiziert wurde.

Etwa 60% der in Deutschland verwendeten Medikamente sind pflanzlichen Ursprungs. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Präparat Aspirin<sup>®</sup>, dessen Wirkstoff Acetylsalicylsäure in abgewandelter Form ursprünglich aus Weidenrinde isoliert worden ist; oder die Herzglykoside Digitoxin und Digoxin, zur Therapie der Herzinsuffizienz, aus *Digitalis* sp..

Auch in der antiviralen Therapie hat man sich die Wirkung einiger Pflanzen zu Nutze gemacht, so wird zum Beispiel ein Extrakt aus Melisse zur Behandlung von Herpes Simplex Viren eingesetzt (Allahverdiyev et al., 2004).

Die Lehre, die sich mit der Aufschlüsselung von pflanzlichen Inhaltsstoffen und deren Wirkungen beschäftigt, nennt man Pharmakognosie. Durch verschiedene chemische Methoden wie zum Beispiel der Chromatographie werden die einzelnen Stoffe der pflanzlichen Droge aufgetrennt und lassen sich so gezielt untersuchen. Die auf diesem Weg gewonnenen Erkenntnisse über die verschiedenen Stoffgruppen bieten möglicherweise Aufschlüsse über neue Therapie-Optionen. Auch vorhandene Wechsel- und Nebenwirkungen pflanzlicher Pharmaka können so besser kontrolliert werden (Kinghorn, 2002).

## 1.5 Antivirale Therapie

Eine zentrale Aufgabe der virologischen Forschung stellt die Entwicklung und Etablierung neuer Angriffspunkte antiviraler Therapie-Konzepte dar. Trotz großer Fortschritte bei der Behandlung und Prävention verschiedener viraler Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten muss sich die Klinik immer neuen Herausforderungen stellen. Zum Einen sind es „neue“ Erreger wie beispielsweise das SARS-Virus, für das bislang noch keine erfolgreiche Therapiemöglichkeit existiert (Lai, 2005), zum Anderen die vermehrte Resistenzentwicklung bestimmter Viren gegen herkömmliche Medikamente, hier sei zum Beispiel die Aciclovir-Resistenz einiger Herpesviren besonders bei immuninkompetenten Patienten genannt (Frobert et al., 2005).

Bei der antiviralen Therapie steht man besonderen Schwierigkeiten gegenüber, die sich aus der besonderen Biologie der Erreger ergibt. Da es sich bei Viren um intrazelluläre Parasiten handelt, die den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle für die eigene Replikation verwenden, muss die Therapie so selektiv ausgerichtet sein, dass körpereigene Zellen dabei möglichst wenig Schaden nehmen.

### 1.5.1 Vakzination

Die effektivste und kostengünstigste Möglichkeit zur Prävention viraler Infektionen stellt mit Sicherheit die Schutzimpfung dar. Durch attenuierte Lebendviren oder virale Oberflächenproteine werden Plasmazellen zur Bildung von Antikörpern angeregt, welche bei späterem Kontakt zur Inaktivierung der Erreger führen. Bei der Gruppe der Herpesviren gestaltete sich die Entwicklung eines Impfstoffes bisher problematisch. Einzig gegen Varizella Zoster Viren als Verursacher der Windpocken und der Gürtelrose konnte ein potenter Impfstoff entwickelt werden (Arvin, Greenberg, 2006). Verschiedene Impfstoffe gegen Herpes Simplex Typ 1 und II sind in der klinischen Erprobung. In den Siebziger Jahren wurde das sog. Lipidon H bzw. G® als hitzeinaktivierter Impfstoff gegen HSV I bzw. II zugelassen (Nasemann, Wassilew, 1979). Aufgrund von fehlendem Wirksamkeitsnachweis aus randomisierten Studien wurde der Wirkstoff jedoch wieder vom Markt genommen. Aussichtsreich erscheinen verschiedene entwickelte Vakzinen, die aus einer viralen Glykoprotein D Untereinheit bestehen und sich gerade in Phase III der klinischen Testung befinden (Koelle, 2006). Es konnte jedoch bislang lediglich eine Wirksamkeit bei Frauen gezeigt werden, die zum Zeitpunkt der Applikation seronegativ für HSV-1 und HSV-2 waren. Bei Männern oder zuvor schon HSV-1 positiven Frauen zeigte sich keine Wirksamkeit (Stanberry et al., 2002).

### 1.5.2 Virale Enzyminhibitoren

Ein Großteil der antiviralen Therapien richtet sich mehr oder weniger selektiv gegen virale Enzyme. Als Beispiele seien hier die in der HIV-Therapie verwendeten Nukleosidanaloga, die sich als „falsche Metaboliten“ gegen die Reverse Transkriptase richten oder Protease-Inhibitoren genannt. Auch hier stellt die

Resistenzentwicklung die größte Therapielimitierung dar, wobei versucht wird dies durch Mehrfachkombinationen hinauszuzögern. Hinzu kommen meist beträchtliche Nebenwirkungen, welche auf die Interferenz mit dem zelleigenen Proteinsyntheseapparat zurückzuführen sind (Lee et al., 2003).

### 1.5.3 Interferone

Eine weitere Option stellt die Therapie mit Interferonen dar, welche besonders bei der Behandlung der chronisch aktiven Hepatitis B und C zum Einsatz kommt. Interferone sind kleine Glykoproteine, die von infizierten Zellen gebildet werden und vielfältige immunmodulatorische Funktionen ausüben, wie zum Beispiel eine verstärkte Exprimierung von MHC-Antigenen oder die Stimulation von natürlichen Killer-Zellen. Pharmakologisch hergestelltes Interferon imitiert also die körpereigenen Abwehrmechanismen. Aber auch hier limitieren Nebenwirkungen und das Versagen der Therapie bei einigen Patienten den Behandlungserfolg (Kim, Saab, 2005), sodass nach Alternativen gesucht werden muss.

### 1.5.4 Gen-Therapie

Gerade bei der Therapie gegen HIV ist in den letzten Jahren mit viel Einsatz daran geforscht worden, neue Strategien zu entwickeln. Viel versprechende Ansätze sind beispielsweise die Gen-Therapie oder Versuche mit siRNA und Antisense-DNA (Joshi et al., 2003).

Die Idee der Gen-Therapie beinhaltet eine so genannte „intrazelluläre Immunisierung“, bei der CD-4 positive T-Zellen extrakorporal genetisch so verändert werden, dass sie einen Schutz gegen die HIV Infizierung vorweisen. Nach abgeschlossener Kultivierung werden die T-Zellen dann reinfundiert (Mitsuyasu et al., 2000). Der Nachteil dieser Methode ist die mögliche Antigenität der so veränderten T-Zellen.

### 1.5.5 RNA-Interferenz

Bei der Therapie mit siRNA (short interfering RNA) möchte man das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) ausnutzen, welches bei Pflanzen, Pilzen und einigen

Insekten einen Schutzmechanismus gegen Viren darstellt. RNA-Interferenz bedeutet, dass doppelsträngige RNA Moleküle in der Zelle zur Degradation von homologer einzelsträngiger mRNA führt und somit die Synthese eines bestimmten Proteines inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass siRNA, die gegen das HIV-Genom gerichtet ist, die Virusproduktion in Zellkulturen effektiv hemmt (Surabhi, Gaynor, 2002). Ein Problem stellt allerdings die Aufnahme der therapeutischen siRNA in die Wirtszelle dar (Nesterova, Cho-Chung, 2004).

Der hier gegebene kurze Überblick über antivirale Therapien demonstriert den immensen Fortschritt, obgleich auch die Notwendigkeit für weitergehende Forschung nach möglichen Alternativen.

## 1.6 Herpes Simplex Virus Typ 1

HSV gehört zu der Familie der Herpes-Viren, einer Gruppe von über 90 Viren mit gleicher Morphogenese, von denen 9 humanpathogen sind:

- Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2)
- Varizella-Zoster-Virus (VZV)
- Zytomegalie-Virus (CMV)
- Epstein-Barr-Virus (EBV)
- Humanes Herpesvirus 6 (HHV 6)
- Humanes Herpesvirus 7 (HHV 7)
- Karposi-Sarkom assoziiertes Humanes Herpesvirus 8 (HHV 8)

Additiv sei das Herpes B-Virus von Rhesusaffen genannt, das in seltenen Fällen beim Mensch eine Enzephalitis verursacht (Doerr, Preiser, 2005).

### 1.6.1 Aufbau und Replikation von HSV

Das Genom der Herpes-Viren besteht aus einer linearen doppelsträngigen (ds) DNA mit einer Größe von 124-235 kB und kodiert für über 72 Gene (Jenkins et al., 1985). Es befindet sich im ikosaedrischen Kapsid, welches ca. 100 nm misst. Das Nukleokapsid wird von einer Doppellipidmembran (Envelope) umhüllt, die durch Budding an der Kernmembran entstanden ist. Dazwischen liegt als amorphe,

asymmetrische Schicht das sog. Tegument. In der Virus-Hülle befinden sich verankerte Glykoproteine (Spikes), die beim Infektionsvorgang an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran binden und so für die Fusion des Virus mit der Wirtszelle sorgen. Das virale Capsid und das Tegument werden dann entlang des Zytoskeletts retrograd zum Zellkern transportiert, wo die Tegument-Proteine und die virale DNA dann über Kernporen ins Innere gelangen.

Die Tegument-Proteine vhs (viral host shut off factor) und VP 16 interferieren mit der Wirtszellproteinsynthese und induzieren die virale Transkription, die mit der Genexpression der IE-(immediate early)-Gene beginnt. Diese frühen Genprodukte aktivieren und kontrollieren dann die später transkribierten E-(early)- und L-(late)-Gene. Die E-Genprodukte sind Enzyme, die primär für die virale DNA-Synthese verantwortlich sind, wobei die L-Gene für virale Strukturproteine kodieren. Die komplette virale Replikation findet also im Zellkern statt, von wo die fertigen Capside dann über den Vorgang des Budding noch ihre Doppellipid-Hülle erhalten. Hiernach schleusen sie sich ins Endoplasmatische Retikulum der Zelle ein und verlassen diese durch Lyse. Dieser gesamte lytische Zyklus dauert in etwa 10 Stunden (Günzburg, 2005).

### 1.6.2 Latenz und Klinik von HSV-1

HSV-1 gehört zur Untergruppe der Alphaherpesvirinae, welche sich durch einen kurzen Replikationszyklus auszeichnen. Sie kommen meist initial mit Zellen der Haut oder Schleimhaut in Kontakt. Klassischerweise kommt es bereits in der Kindheit zu einer Primärinfektion des Mund-Rachenraumes. Diese Primärinfektion mit einer kurzen Phase der Virämie verläuft meist inapparent oder macht sich nur durch eine leichte Stomatitis bemerkbar. Über die Hautrezeptoren der lokalen Nerven gelangen die Viren dann über retrograden axonalen Transport in die Nervenzellen, in den sie dann lebenslänglich latent persistieren. Die häufigste Lokalisation von HSV-1 ist im Ganglion trigeminale (Ganglion Gasseri). Während dieser Latenz-Phase findet kaum Virusreplikation statt, d.h. es kann nur ein oder gar kein RNA-Transkript detektiert werden. Man fand ein sog. Latenz-assoziiertes-Transkript-(LAT)-Gen, das man u.a. für die Fähigkeit der Viren zur latenten Infektion verantwortlich macht (Günzburg, 2005).

Über bestimmte Reaktivierungsmechanismen, wie beispielsweise Immundefizienz, Fieber, UV-Strahlung oder hormonelle Disbalancen kommt es zur erneuten Virusvermehrung und zur Rekurrenz an der durch die Latenz bestimmten Ort (Doerr, Rabenau, 1996).

Demnach ist die Infektion mit Herpes Simplex Typ 1 eine, wenn auch meist nicht schwerwiegende, wohl aber sehr häufige virale Infektion.

Komplikationen ergeben sich bei immuninkompetenten Patienten, bei denen eine systemische Infektion vorkommt und die oft von Resistenzen betroffen sind. Auch die gefürchtete Herpes-Simplex-Enzephalitis kommt sporadisch vor und erfordert sofortige intravenöse Therapie. Weitere Komplikationen sind das Ekzema herpeticum bei Patienten mit vorgeschädigter Haut bei atopischem Ekzem oder die intrapartale Herpesinfektion des Neugeborenen, der fulminant verlaufende Herpes neonatorum.

### 1.6.3 Immunevasion

Die Fähigkeit der Umgehung und Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem durch verschiedene virale Mechanismen wird als Immunevasion bezeichnet. Über verschiedene bislang noch nicht vollständig bekannte Mechanismen haben Herpesviren die Fähigkeit sich der Abwehrfunktion von angeborener und erworbener Immunität zu entziehen. Dies geschieht beispielsweise über die Inhibierung des Interferonsystems, indem die Phosphorylierung von Interferon alpha induzierten Proteinen blockiert wird. Hierfür werden das virale vhs Protein und das Genprodukt des  $\gamma_1$  34,5 Gens verantwortlich gemacht (Mogensen et al., 2004). Weiterhin können Herpes simplex Viren über bislang nicht vollständig verstandene Mechanismen die Fähigkeit der Antigenpräsentation der MHC-I-Komplexe von dendritischen Zellen inhibieren (Raftery et al., 2006). Im Gegensatz hierzu wird die Antigenpräsentation bei infizierten T-Zellen nicht verhindert, was bei diesen zur Induktion von Apoptose führt. Dieser Mechanismus wird als Fratrizid bezeichnet (Raftery et al., 1999). Über verschiedene virale Proteine findet eine Interaktion mit dem Komplementsystem statt (Lubinski et al., 2002). So bindet Glykoprotein C an die Komplementkomponente C3. Auch das humorale Immunsystem wird beeinflusst. Ein Komplex aus viralem Glykoprotein E und I bindet an der Fc Domäne von IgG-Antikörpern (Lin et al., 2004). Zur Entwicklung neuer Therapie-Strategien ist das genauere Verständnis der

Wechselwirkungen von Herpes Simplex Viren auf das menschliche Immunsystem von großer Bedeutung.

#### 1.6.4 Therapie

Zur antiviralen Therapie gegen Herpes Simplex Typ-1 stehen derzeit Aciclovir (Zovirax<sup>®</sup>), Valaciclovir (Valtrex<sup>®</sup>), als Pro-drug von Aciclovir und Famciclovir (Famvir<sup>®</sup>), als Pro-drug von Penciclovir und Brivudin (Zostex<sup>®</sup>) zur Verfügung. Als sog. Nukleosidanaloga werden sie von dem viralen Enzym Thymidinkinase phosphoryliert und dann zum Triphosphat umgewandelt, in welcher Form sie nun als falsche Metaboliten fungieren und die virale DNA-Synthese inhibieren (Doerr, Preiser, 2005). Durch die Entwicklung von den o.g. Pro-drugs konnte eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit erreicht werden. Besonders bei immuninkompetenten Patienten entwickeln sich jedoch zunehmend resistente Herpesvirusstämme. Das Versagen der Aciclovir-Therapie beruht meist auf einer Mutation der viralen Thymidinkinase, die zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der Nukleosidanaloga in aktive Triphosphate notwendig ist. Bei gefährdeten Patientengruppen werden deshalb routinemäßig Resistenztestungen vorgenommen (Rabenau et al., 1996). Als Reservemedikamente stehen die intravenöse Gabe von Foscarnet oder Cidofovir mit dem Risiko von gravierenden Nebenwirkungen, sowie die topische Applikation von Trifluridin ggf. in Kombination mit Interferon alpha zur Verfügung (Weber, Cinatl, 1996). Ziel der antiviralen Forschung ist es gezielt Therapien zu entwickeln, die eine signifikante Hemmung der Virusreplikation erreichen, ohne den Wirtsorganismus dabei zu stark zu schädigen. Hier kommt immer mehr gezieltes „Drug Design“ zur Anwendung (Preiser, Doerr, 2003).

#### 1.7 Ziel dieser Arbeit

An Voruntersuchungen anschließend, standen verschiedene Extrakte aus *Rheum sp.* zur Verfügung. Das Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der antiviralen Aktivität dieser Extrakte gegen Herpes Simplex Typ 1. In einem Vero Zellkultur-Modell sollen Herpes Simplex I Viren mit verschiedenen *Rheum* Extraktkonzentrationen inkubiert werden. Über die mögliche Verminderung des Zytopathischen Effektes soll deren

antivirales Potential beurteilt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Detektion einer möglichen Zelltoxizität der gleichen Rheum-Extrakte mittels MTT-Assay. Die Berechnung des Therapeutischen Index erlaubt eine Aussage über antivirale Eigenschaften der zu testenden Substanzen, die potentielle Therapie-Alternativen darstellen.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Firma</b>
Vero-Zellen (Affennieren-Zellen) CCL-81	ATCC (American Type Culture Collection) 10801 University Boulevard Manassas (VA) 20110-2209 USA

#### 2.1.2 Virusstamm

<b>Virusstamm</b>	<b>Firma</b>
Herpes Simplex Virus Typ 1 (Stamm MacIntyre, VR 539)	ATCC (American Type Culture Collection) 10801 University Boulevard Manassas (VA) 20110-2209 USA

#### 2.1.3. Rheumextrakte

<b>Nummer</b>	<b>Extrakt</b>	<b>Herkunft</b>
No. 1	GT 25 H <sub>2</sub> O II	Prof. Dr. Ingo Schellenberg Hochschule Anhalt (FH) Fachbereich 1 Strenzfelder Allee 28 D-06406 Bernburg
No. 2	GT 25 H <sub>2</sub> O III	
No. 3	GT 25 H <sub>2</sub> O IV	
No. 4	GT 25 H <sub>2</sub> O V	
No. 5	GT 25 Eto Ac I	
No. 6	GT 25 Eto Ac II	
No. 7	GT 25 Eto Ac III	

No. 8	GT 25 Eto Ac IV	
No. 9	GT 25 Eto Ac V	
No. 10	GT 25 Eto Ac VI	
No. 11	GT 25 Eto Ac VII	
No. 12	GT 25 Eto Ac VIII	
No. 13	GT 25 Eto Ac IX	
No. 14	GT 25 Eto Ac X	
No. 15	GT 25 Eto Ac XI	
No. 16	GT 25 Eto Ac XII	
No. 17	GT 25 Eto Ac XIII	
No. 18	GT 25 Eto Ac XIV	

#### 2.1.4 Medien und Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Charge</b>	<b>Firma</b>
FKS (Fötales Kälberserum)	34K3396 / 121005	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen
Minimal Essential Medium (MEM)	0983G / 191005	Biochrom AG Leonorenstr. 2-6 12247 Berlin
Penicillin (10M) / Streptomycin (10g)	878605 / 119H1376 / 310105	Grünenthal GmbH Zieglerstraße 6 52078 Aachen /  Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen

Phosphat Buffered Saline (PBS)		Biochrom AG Leonorenstr. 2-6 12247 Berlin
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	113K0251 / 140905	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen
Hepes	50468130 / 240805	AppliChem GmbH Ottoweg 4 D-64291 Darmstadt /  Carl Roth GmbH & Co. KG Schoemperlenstr. 3-5 76185 Karlsruhe
Trypsin/ EDTA Lösung		Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen
SDS		MP Biomedicals, Qbiogene Waldhofer Strasse 102 69123 Heidelberg
(MTT) 3-4,5-Dimethyl- 2thiazolyl-diphenyl-2H- tetrazolium Bromid		SERVA Electrophoresis GmbH Carl-Benz-Str. 7 69115 Heidelberg
Ethanol		Merck KGaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt
100% Essigsäure (Eisessig)		Merck KGaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt
N-N-Dimethylformamid		Merck KGaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt
Acycloguanosine (Aciclovir)	Best. Nr.:A-4669	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen

## 2.1.5 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Flachboden-Mikrotiterplatten für Zellkultur mit Deckel, steril; 96-Loch	Greiner Bio-One GmbH Maybachstraße 2 D-72636 Frickenhausen
1,5 ml safe lock Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße 51582 Nümbrecht
Module (19ml Kapazität)	Beckman Coulter GmbH - Diagnostics Europark Fichtenhain B13 47807 Krefeld
Pipettenspitzen	Gilson, Inc. 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH Maybachstraße 2 D-72636 Frickenhausen
Millex HA	Millipore GmbH Am Kronberger Hang 5 65824 Schwalbach
Abklebefolie für Mikrotiterplatten	ratiolab® GmbH Am Siebenstein 5 63303 Dreieich-Buchsschlag

## 2.1.6 Geräte

Laminar Airflow Cabinet	Holten Thermo Electron Corporation Im-Steingrund 4-6 63303 Dreieich
Auflichtmikroskop (Model CK2)	Olympus Deutschland GmbH Wendenstrasse 14 - 18 20097 Hamburg
Photometer	Dade Behring Holding GmbH Höchster Strasse 70 65835 Liederbach
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Zapf Instruments Emmy-Noether-Straße 5 31157 Sarstedt
Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Heinrichstraße 3-4 12207 Berlin
Vortex-Gerät	Gilson, Inc. 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA
Absaugung	INTEGRA Biosciences GmbH Tecnomara Ruhberg 4 35463 Fernwald
Pipettierhilfe	Gilson, Inc. 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA
Pipetten	Gilson, Inc. 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zytopathischer Effekt

Als zytopathischer Effekt (CPE) wird die lichtmikroskopisch sichtbare morphologische Veränderung von virusinfizierten Zellen, verursacht durch die Zytopathogenität von Viren bezeichnet.

#### 2.2.1.1 Ursachen

- Verbrauch von lebenswichtigen Ausgangsstoffen für den Zellstoffwechsel
- Blockade des Zellstoffwechsels, Virus-host-shutoff
- Virale Proteasen
- Veränderung von Signaltransduktionswegen

#### 2.2.1.2 Manifestationen

- Lyse der Zellen
- Zytoplasmatische bzw. nukleäre Einschlusskörperchen
- Formveränderung wie Entrundung oder Ballonierung
- Ablösung vom Untergrund
- Apoptose
- Bildung von Synzytien
- Transformation

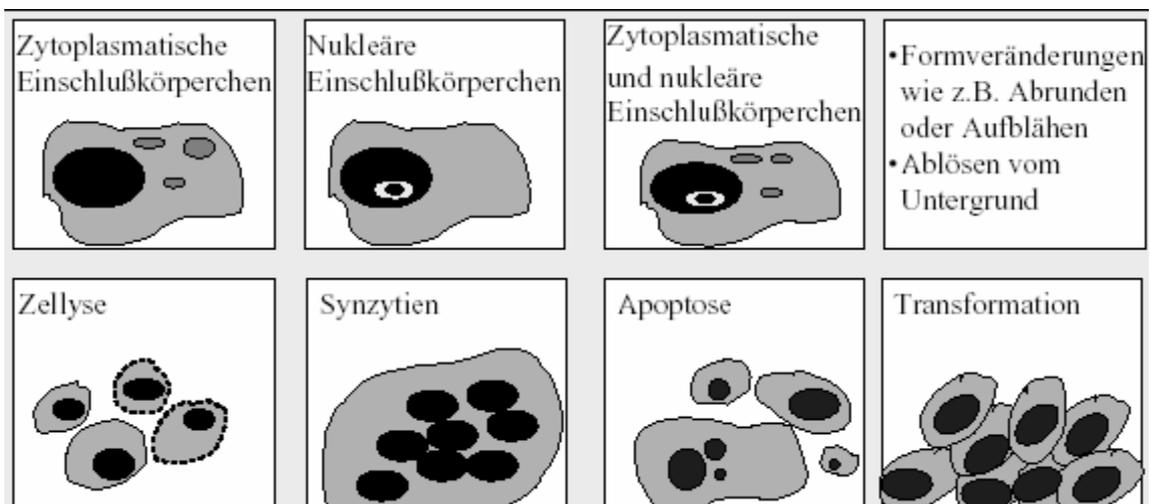


Abb. 4) Schematische Darstellung des zytopathischen Effektes aus Schmidtke/Patho 2002

Durch diesen zytopathischen Effekt kann das virale Wachstum in Zellkulturen nachgewiesen werden. Bei einer mikroskopischen Vergrößerung von 40-100x oder im Detail bei 200-400x können die Veränderungen beobachtet werden. Die exakte Manifestation des CPE und die Dauer bis zu dessen Auftreten können schon Hinweise auf die Gruppe des infizierenden Virus geben.

HSV-1 verursacht in Zellkultur schon nach ein bis zwei Tagen eine Vergrößerung und Ballonierung der Zellen mit granuliertem Zytoplasma, die in Synzytien (Clustern) zusammenlagern.

### 2.2.2 Virus-Quantifizierung

Für die meisten Experimente mit Viren ist es essentiell zu wissen, wie hoch die Konzentration von infektiösen viralen Partikeln in einer Suspension ist. Diese Quantifizierung stellt die Basis für das Erstellen von Wachstumskurven, für das Untersuchen der Pathogenität des Virus, für die Testung der Effektivität von antiviralen Substanzen oder als Kontrolle einer viralen Aufreinigung dar.

Die Quantifizierung von Viren erfolgt entweder über einen Infektiositäts-Assay, über einen Plaque-Assay, über andere biologische oder chemische Assays (z.B. Hämagglutinations-, Hämadsorptions-, oder Protein-Assays) oder direkt über die Auszählung viraler Partikel mit Hilfe eines Elektronen-Mikroskopes bzw. mittels realtime PCR zur direkten Quantifizierung der DNA oder RNA-Kopien.

#### 2.2.2.1 Infektiositäts-Assay

Die Haupteigenschaft von Viren besteht in ihrer Fähigkeit Wirtszellen zu infizieren und sich unter Nutzung ihres Proteinsyntheseapparates zu replizieren. Der Zyklus der viralen Replikation ist mit einer Reihe von biochemischen und morphologischen Veränderungen in der Zelle verbunden und endet meist mit deren Absterben. Diese Veränderungen, die oben als CPE beschrieben werden, werden sich bei einem Infektiositäts-Assay zu Nutze gemacht. Dieser Assay erlaubt die Kalkulation eines Virus-Titers. Die reziproke Verdünnung des Ausgangsmaterials, bei der noch eine Infektion auftaucht, wird Infektionstiter genannt. Dieser Titer besagt, wie viele infektiöse Einheiten im unverdünnten Ausgangsmaterial vorhanden sind. Als

infektiöse Einheit wird die kleinste Virusmenge bezeichnet, die eine Infektion auslösen kann. Virus-Titer werden über eine akkurate Verdünnungsreihe der virushaltigen Suspension bestimmt (Hierholzer, Killington, 1996). Dabei sind verschiedene Verdünnungsfaktoren z.B. auf der Basis 2 oder 10 möglich.

Die Endpunkt Verdünnung einer viralen Suspension, die bei Inkubation mit einer Zellkultur 50% der Zellen infiziert, d.h. einen CPE hervorruft, wird als TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) bezeichnet. Die Berechnung des TCID<sub>50</sub> Wertes wird durch Anwendung von Gleichungen, entweder nach der Methode von Reed-Muench oder nach Spearman und Kärber, möglich. Der reziproke Wert dieser TCID<sub>50</sub> Verdünnung führt zum Virus-Titer im Sinne von infektiösen Einheiten pro Volumeneinheit.

Reed-Muench(Reed, Muench, 1938):

$$\frac{(\% \text{ Positive über } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ Positive über } 50\%) - (\% \text{ Positive unter } 50\%)}$$
 = proportionaler Abstand

$$(\log \text{ der Virusverdünnung über } \%) + (\text{proportionaler Abstand} \times \log \text{ des Verdünnungsfaktors}) = \log \text{ TCID}_{50}$$

Der reziproke Wert dieser Zahl ergibt den Virus-Titer.

Spearman(Spearman, 1908) und Kärber(Kärber, 1938):

$$\text{Höchste Verdünnung mit } 100\% \text{ CPE} + \frac{1}{2} - \frac{\text{Gesamte Anzahl der Proben mit CPE}}{\text{Anzahl der Proben pro Verdünnung}} = \text{TCID}_{50}$$

Auch hier ergibt die Reziproke des TCID<sub>50</sub> Wertes den Virus-Titer.

#### 2.2.2.2 Plaque Assay

Der Plaque Assay ist ein Infektiositäts-Assay, der die Anzahl der infektiösen Partikel in einer Virus-Suspension quantifiziert (Hierholzer, Killington, 1996). Als Plaques werden lokalisierte Infektions-Herde, detektierbar durch Lyse oder CPE in einer sonst intakten Zellkulturschicht bezeichnet. Jede Plaque entspricht einem infektiösen Partikel, d.h. einem Virion. Nachdem die Absorption der zu quantifizierende Virus-Suspension mit der Zellkultur abgeschlossen ist, wird eine Schicht aus Agarose oder Methylcellulose als Überzug auf den Zellrasen gegeben, der verhindert, dass sich freigesetzte Viren in der Kultur ausbreiten. Diese können so nur benachbarte Zellen infizieren und es kommt zur Bildung von Plaques. Der Infektions-Titer wird über die Anzahl der Plaques und über die Verdünnung der Virus-Suspension mit der Einheit  $\text{pfu ml}^{-1}$  (plaque forming units pro ml) berechnet:

Anzahl der Plaques x Reziproke der Verdünnung x Reziproke des Volumens in ml =  $\text{pfu ml}^{-1}$

#### 2.2.2.3 Infektionen von Zellkulturen mit Virus

Die Infektionsdosis wird als multiplicity of infection (MOI) ausgedrückt (Viruspartikel/Zelle). Eine MOI von 1 bedeutet aber nicht, dass alle Zellen infiziert sind. Es werden schätzungsweise etwa 30% der Zellen infiziert, da auch Mehrfachinfektionen pro Zelle vorkommen. 95% der Zellen erreicht man mit einer MOI von 5. Im Verlauf der Infektion bilden sich auf permissiven Zellen für das jeweilige Virus typische zytopathische Effekte aus (CPE).

#### 2.2.3 Antivirale Testung

Eine antivirale Empfindlichkeits-Testung eines bestimmten pharmakologischen Stoffes wird vorgenommen, um dessen potentielle antivirale Wirksamkeit zu testen. Durch sog. Screening-Assays kann die Effektivität *in vitro* geprüft und sogleich die Toxizität auf die verwendeten Zellkulturen beobachtet werden. Dies sind wichtige präklinische Schritte bei der Entwicklung neuer Therapeutika. Durch die vielfältigen Eigenschaften der zu testenden Viren in verschiedenen Zellkultursystemen existieren

auch multiple Assays mit jeweils unterschiedlichen Testverfahren. Da das Resultat über die getestete Effektivität des antiviralen Agens stark abhängig ist von der Infektiosität des Virus, von der verwendeten Zellkultur, von der Sensitivität des Assays und von der Dauer der Inkubation, variieren die Ergebnisse von einem Labor zum anderen.

Diese Testverfahren erlauben eine Aussage über antivirales Potential und geschätzte zelluläre Toxizität, nicht aber über Mechanismen der Inhibition (Oxford et al., 1999).

#### 2.2.3.1 Zytopathischer Endpunkt-Assay

Der zytopathischer Endpunkt-Assay wird beispielsweise bei Herpes-Viren und einer niedrigen Anzahl zu testender Substanzen verwendet.

Zellkulturen mit intaktem Monolayer werden mit der zu testenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und dann mit 100 TCID<sub>50</sub> des Virus kontaminiert. Als Kontrollen fungieren jeweils Proben ohne Virus bzw. antivirale Substanz. Nach Inkubation im Brutschrank werden die Proben täglich unter dem Mikroskop auf das Auftreten von einem CPE hin untersucht.

Als 50% inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) wird die Konzentration der antiviralen Substanz bezeichnet, die den zytopathischen Effekt in 50% der kontaminierten Zellkulturen verhindert (Hu, Hsiung, 1989). Von manchen Autoren wird dieser Wert auch als 50% effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) oder Dosis (ED<sub>50</sub>) beschrieben.

Die Konzentration der zu testenden Substanz, die die Zell-Lebensfähigkeit um 50% reduziert wird als toxische Konzentration (TC<sub>50</sub>) beziehungsweise zytotoxische Konzentration oder Dosis (CyD<sub>50</sub> oder CC<sub>50</sub>) bezeichnet.

Die Ratio aus TC<sub>50</sub> und IC<sub>50</sub> ergibt den sog. Therapeutischen Index oder auch Selektivitäts-Index.

## 2.2.4 Toxizitätstests

### 2.2.4.1 MTT-Assay

Dieses Verfahren wurde entwickelt, um die Toxizität bestimmter zu testenden Substanzen auf Zellkulturen zu überprüfen. Der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]-Assay (Mosmann, 1983) basiert auf der Fähigkeit der Succinat-dehydrogenase, einer mitochondrialen Dehydrogenase, vitaler Zellen, die Tetrazolium-Ringe des blassgelben MTT aufzuspalten und daraus dunkelblaue Formazan-Kristalle zu bilden, die die Zellmembran nicht durchdringen können und so in gesunden Zellen akkumulieren. Nach Auflösung der Zellen durch einen Detergenten und der Freisetzung der Kristalle kann die Farbe der Probe durch einen ELISA-Spektrophotometer ermittelt werden, deren Intensität direkt proportional zur Anzahl der überlebenden Zellen ist.

### 2.2.4.2 Mikroskopischer Toxizitätstest

Eine weitere Möglichkeit der Beschreibung von Toxizität einer Substanz ist die direkte mikroskopische Beurteilung deren Auswirkung auf die Zellkultur. Der Zytopathische Effekt, der durch Herpes Simplex Viren ausgelöst wird ist nicht identisch mit dem CPE verursacht durch hohe Konzentrationen der zu testenden Rheum-Extrakten. So kann während der Inkubation durch mikroskopische Beurteilung unterschieden werden, welches Agens für die Auslösung eines CPE verantwortlich ist. Es wurde festgestellt, dass bestimmte Rheum-Extrakte in Vero-Zellen zu Veränderungen im Sinne von Abrundung und Vakuolenbildung führen, was als Zeichen für Zell-Toxizität gedeutet wird. Dies erfordert genaue Beobachtung und Erfahrung, sodass die Auswertung durch mindestens zwei Personen erfolgte, um einen Mittelwert zu bestimmen.

## 2.2.5. Arbeiten mit Zellkulturen

Für die vorliegende antivirale Testung mit Herpes Simplex Typ 1 Viren wurden Vero-Zellen verwendet. Vero-Zellen sind Affennieren-Zellen, die relativ anspruchslos und schnell wachsen, und welche sich gut zur Anzucht von HSV eignen. Damit die

Gefahr der Fremdkontamination auf ein minimales Maß reduziert wird, erfolgt die Arbeit grundsätzlich unter einer Überdruck-Flow und mit sterilen Materialien. Regelmäßig wird eine PCR zur Detektion von Mykoplasmen-Kontamination durchgeführt.

Der erste Schritt ist die Anzucht und die Vermehrung der Vero-Zellen. Hierzu werden Zellen verwendet, die als intakter Monolayer in einer Vorratskulturflasche wachsen. Es muss darauf geachtet werden, dass die Passagen-Zahl zwanzig nicht überschreitet, da alte Zellen möglicherweise inadäquat reagieren.

Vor der Verwendung werden die Zellen unter dem Auflichtmikroskop auf eventuelle Veränderungen oder CPE hin untersucht.

Als nächsten Schritt wird das alte Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit dem Waschpuffer PBS gereinigt, damit sich keine Reste von FKS mehr auf den Zellen befinden. Nun müssen die adhaerenten Zellen mittels Trypsinierung von ihrem Untergrund gelöst werden. Dazu werden sie mit Trypsin/ EDTA Lösung umspült und etwa 10 min inkubiert.

Nach der Ablösung werden die Zellen jetzt in frischem Medium im Verhältnis 1:10 aufgenommen. Als Medium dient MEM mit 4% FKS. Eine kleine Fraktion wird mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Hier kann auch die Vitalität der Zellen beurteilt werden.

Nach Bedarf werden 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatten mittels Multipipette mit Vero-Zellen und Medium befüllt, sodass sich pro Loch annäherungsweise  $1-2 \times 10^5$  Zellen befinden. Die fertigen Platten werden 2-3 Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert, bis sich wieder ein intakter Monolayer gebildet hat.

#### Herstellung von 1-fach Zellkulturmedium (Erhaltungsmedium):

- 1-fach MEM
- + 2% HEPES
- + 1% Pen/Strep (Antibiotikum)
- + 2% NaHCO<sub>3</sub>
- + 4% FKS (Fetales Kälber-Serum)

## 2.2.6 Auflösen der Rheum-Extrakte

Laut Protokoll von Prof. Schellenberg werden die Extrakte mit PBS/ Ethanol welches im Verhältnis (9:1) vorliegt, gelöst. Dazu werden 50mg Substanz zu 2ml PBS/ Ethanol gegeben und im Vortexer vermischt, bis die Substanz sich gelöst hat. Es entsteht eine Konzentration von 25mg/ml. Bei einer Probe waren nur 44mg vorhanden, so dass diese in 1,76ml PBS/ Ethanol gelöst wurde um ebenfalls eine Konzentration von 25mg/ml zu erhalten. Nach dem Lösungsvorgang erhält man eine trübe bis bräunliche Flüssigkeit, die nun durch ein Ultraschallbad von fünf Minuten Dauer noch geklärt wird. Anschließend werden die gelösten Extrakte mittels eines Millex HA 0,22µM Filters noch steril filtriert, damit sich keine Keime in der Lösung befinden, die das Experiment verfälschen könnten.

## 2.2.7 Antivirale Testung bei simultaner Inkubation von Virus und Extrakt

### 2.2.7.1 Vorbereitung der Antiviralen Testung und der Toxizitätsprüfung

Pro Substanz, die untersucht werden soll, müssen 2 Flachboden-Mikrotiterplatten wie oben beschrieben mit Vero-Zellen bewachsen werden. Die Platten müssen nun folgendermaßen beschriftet werden:

#### Platte 1

- 1. Reihe ZK (Zellkontrolle)
- 2. Reihe VK (Viruskontrolle)
- 3. – 10. Reihe Stoffkonzentrationen (Verdünnungsreihe)
- am Rand Stoffname und Datum

#### Platte 2

- 1. Reihe ZK (Zellkontrolle)
- 2. Reihe ZK (Zellkontrolle)
- 3. – 10. Reihe Stoffkonzentrationen (Verdünnungsreihe)
- am Rand Stoffname und Datum

Die zu testenden Extrakte, die nun fertig gelöst als Stammlösung vorliegen s.o., müssen jetzt absteigend im Verhältnis 1:2 verdünnt werden, damit eine Verdünnungsreihe entsteht. Beginnend mit einer Konzentration von 2% (500µg/ml) in 1:2 Verdünnungs-Schritten bis ~0,015% (~ 4µg/ml)

Zur Vorbereitung werden pro Substanz 8 Module (19ml Kapazität) beschriftet (Substanz und Verdünnung) und Medium vorgelegt. In Modul 1 wird jeweils 3ml Medium vorgelegt und in Module 2-7 jeweils 2ml Medium.

Die Konzentration der Stocklösung beträgt 2,5mg/ml und die Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe soll 500µg/ml betragen. Zu beachten ist, dass die erste Verdünnung doppelt konzentriert sein muss, da durch Zugabe von Virussuspension bzw. Medium später eine weitere Verdünnung von 1:2 erfolgt.

Wenn man nun von einer doppelten Konzentration ausgeht muss man zu einem Teil Stocklösung 1,5 Teile Medium hinzufügen, um eine Ausgangskonzentration von 1mg/ml zu erhalten. Also werden in Modul 1 2ml Stocklösung mit 3ml Medium gemischt um eine Konzentration von 1mg/ml zu erhalten.

Davon werden 2ml entnommen und mit den 2ml Medium des folgenden Moduls vermischt und erhält so eine 1:2 Verdünnung. In diesem Schema fährt man nun fort. Bei jedem Verdünnungsschritt muss ausreichend gemischt werden und jeweils eine neue Pipettenspitze verwendet werden.

### Verdünnungsreihe

Konzentration	Konzentration in [µg/ml]	Verdünnungseffekt
2%ig	500	1
1%ig	250	1:2
0,5%ig	125	1:4
0,25%ig	62,5	1:8
0,125%ig	31,25	1:16
0,0625%ig	15,625	1:32
0,03125%ig	7,8125	1:64
0,015625%ig	3,90625	1:128

Tab. 4) Verdünnungsreihe der Rheumextrakt-Konzentrationen

### 2.2.7.2 Beimpfung der Platten mit Virus und zu testendem Extrakt

Die antivirale Testung wird in diesem Schritt simultan durchgeführt. Das bedeutet, dass die Zellen gleichzeitig, ohne virale Vorinkubation, mit Virussuspension und den zu testenden Substanzen beimpft werden. Ein zügiges und korrektes Arbeiten verhindert die Austrocknung der Zellen und die Verfälschung der Ergebnisse.

Das Medium wird vorsichtig aus den Wells abgesaugt, ohne dabei den Zellrasen zu verletzen. Wie das nachfolgende Schema demonstriert, werden in den ersten 2 Reihen der Toxizitätsplatte und in die erste Reihe der Virusplatte, jeweils 100µl Medium pipettiert. In Reihe 2 der Virusplatte und ab Reihe drei der Toxizitätsplatte werden jeweils 50µl Medium pipettiert. Ab Reihe drei immer im achtfachen Ansatz von der höchsten Konzentration beginnend werden nun die Extrakt-Verdünnungen in beide Platte geben.

Als Kontrolle pipettiert man ausschließlich zwei Reihen mit Medium in eine separate Platte. Diese Kontrollplatte und die Toxizitätsplatte werden nun bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank für 2 Tage inkubiert.

Der verwendete Virusstamm Mc Intyre von HSV-1 liegt als Suspension in einer Konzentration von 3000 TCID<sub>50</sub>/ml vor. Pro Ansatz wird eine Virusmenge von ca. 150 TCID<sub>50</sub> eingesetzt, was einer MOI von 0,01 (1 Viruspartikel auf 100 Zellen) entspricht.

50µl Virussuspension werden in die Virusplatte jeweils ab Reihe 2 pipettiert. Nach Abkleben der Platte mit Folie wird sie ebenso wie die anderen im Brutschrank bei 37°C für 2 Tage inkubiert.

Die Reihen der Zellkontrolle ohne Viren oder Extrakte dienen der Beurteilung des Zellwachstums und werden bei der Auswertung als 0% CPE gesetzt. Die Reihe der Viruskontrolle ohne Extrakte dient der Beurteilung des zytopathischen Effektes verursacht durch HSV-1 und wird 100% CPE gesetzt.

Bei einem Kontroll-Ansatz wird anstelle von Extrakten ACG (Aciclovir) in der Konzentration 1:500 = 100µM (1:2 Verdünnung bis 0,75µM) verwendet. ACG fungiert bei bekannter antiviraler Aktivität ohne Toxizität in den verwendeten Konzentrationen als Positivkontrolle.

## Antivirale Testung

ZK VK 3.-10. Reihe Substanz (Verdünnungsreihe) im 8-fach Ansatz

100µl Med	50µl Med + 50µl Virus	50µl Subst. 2% + 50µl Virus	50µl Subst. 1% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,5% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,25% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,125% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,06% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,03% + 50µl Virus	50µl Subst. 0,015% + 50µl Virus	/	/

Tab. 5) Pipettier-Schema der Flachboden-Mikrotiterplatten

## Toxizitätstest

ZK ZK 3.-10. Reihe Substanz (Verdünnungsreihe) im 8-fach Ansatz

100µl Med	100µl Med	50µl Med + 50µl Subst 2%	50µl Med + 50µl Subst 1%	50µl Med + 50µl Subst 0,5%	50µl Med + 50µl Subst 0,25%	50µl Med + 50µl Subst 0,125%	50µl Med + 50µl Subst 0,06%	50µl Med + 50µl Subst 0,03%	50µl Med + 50µl Subst 0,015%	/	/

Tab. 6) Pipettier-Schema der Flachboden-Mikrotiterplatten

### 2.2.7.3 Ablesen der Ergebnisse

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden alle Platten unter dem Auflichtmikroskop untersucht. Der Zellrasen und die Zellbeschaffenheit werden zunächst nativ ohne weitere Färbung beurteilt. Die Vero-Zellen werden auf Ballonierung, granuliertes Zytoplasma und Synzytienbildung hin untersucht.

Vorausgesetzt wird, dass die Zellkontroll-Reihen einen intakten Monolayer bilden. Jetzt wird das Ausmaß des zytopathischen Effektes der antiviralen Platte mit dem der als 100% CPE gesetzten Viruskontrollen verglichen. Die Auswertung erfolgt durch

mindestens zwei Personen, um eine höhere Objektivität zu erreichen. Es werden Mittelwerte gebildet. Es wird beurteilt wie viel Prozent der Zellen zytopathische Veränderungen zeigen. Davon wird dann auf die Wirksamkeit der zu testenden Extrakte geschlossen, d.h. um wie viel Prozent vermag das potentielle Antiviral den CPE zu reduzieren.

Weiterhin werden die Zellen auf Zeichen von nicht durch HSV verursachten zytopathischen Effekt untersucht. Eine Abrundung und Vakuolenbildung im Zellrasen ist nicht typisch für HSV und wird demnach als Toxizität der Rheum-Extrakten bewertet.

#### 2.2.7.4 Berechnung von IC<sub>50</sub>, TC<sub>50</sub>, und TI mit CalcuSyn®

Aus den acht Einzelwerten der Kontrollen bzw. der Substanzbestimmungen in Prozent wird der jeweilige Mittelwert berechnet:

$$\text{Mittelwert} = \int(x_1-x_8) / 8$$

Das Computerprogramm CalcuSyn® erleichtert die Berechnung der IC<sub>50</sub>- bzw. TC<sub>50</sub>-Werte. Für die Berechnung ist es notwendig, dass mindestens ein Prozentwert kleiner oder gleich 50% ist und mindestens ein Prozentwert größer als 50% beträgt. Ist der Wert der höchsten Stoffkonzentration größer als 50%, so gilt der Stoff als unwirksam. Das Programm erstellt Dosis-Wirkungskurven und stellt die IC<sub>50</sub>- und TC<sub>50</sub>-Werte graphisch dar. Auf der entsprechenden Maske werden der Name der zu testenden Substanz, Zelllinie, Virus und die Ableseart eingegeben. Unter „units“ wird die Konzentrationseinheit festgelegt. Danach werden die einzelnen Extrakt-Konzentrationen jeweils in ein neues Feld „Drug“ und die dazugehörigen %-Werte in das Feld „Effect“ erfasst. Da das Programm die Werte 0 (0%) und 1 (100%) nicht zulässt, werden stattdessen 0,0001 und 0,9999 eingegeben. Mit „edit drug“ wird nun die Kurve berechnet. Unter „Dm“ ist der IC<sub>50</sub>- bzw. TC<sub>50</sub>-Wert des jeweiligen Stoffes abzulesen. „r“ gibt die Korrelation der einzelnen Werte untereinander an, d. h. je näher „r“ an 1 liegt, desto aussagekräftiger ist das Ergebnis. Kleiner als 0,09 darf „r“ nicht sein, sonst wird das Ergebnis als irrelevant betrachtet. Der Therapeutische Index errechnet sich aus dem Quotient von IC<sub>50</sub> und TC<sub>50</sub>:

$$TI = IC_{50} / TC_{50}$$

## 2.2.8 Toxizitätsprüfung mittels MTT-Assay

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit werden in alle Vertiefungen von Platte 2 (Toxizitätsplatte) 25µl MTT-Lösung pipettiert. Danach werden die Toxizitätsplatten über Nacht erneut bei 37°C zum inkubieren in den CO<sub>2</sub>-Brutschrank gelegt.

Im nächsten Schritt wird 100µl SDS-Lösung in alle Vertiefungen pipettiert und für mindestens 4 Stunden lang im Brutschrank inkubiert.

Jetzt werden die Platten bei 570 nm Wellenlänge und 630 nm Referenzfilter photometrisch ausgewertet und die Vitalität der Zellen beurteilt.

Herstellung von Lösungen für MTT-Assay:

- 1) MTT-Lösung  
1g MTT-Reagenz  
+ 500ml PBS  
(steril filtrieren)
  
- 2) SDS-Lösung  
200g SDS  
in 500ml Dimethylformamid lösen  
+ 500ml Aq. dest.  
mit Eisessig auf pH 4,7 einstellen  
vor Gebrauch evt. Kristalle bei 37°C auflösen

## 2.2.9 Test mit viraler Vorinkubation

Als Anschlussversuch werden ausgewählte Extrakte (TI  $\geq 10$  und TC  $> 500\mu\text{g/ml}$ ) weiter auf ihre Wirksamkeit bei viraler Vorinkubation von 1, 6 und 24 Stunden getestet.

Dazu werden pro Substanz und zusätzlicher ACG Kontrolle 3 Flachboden-Mikrotiterplatten mit Vero-Zellen bewachsen (siehe oben).

Reihe 1 dient als Zellkontrolle und Reihe 2 als Viruskontrolle. Reihen 3-10 werden mit 150 TCID<sub>50</sub> Herpes Simplex Virus I vom Stamm McIntyre (MOI entspricht 0,01) infiziert. Nach einer Stunde Virusinkubation wird jeweils aus Reihe 3-10 der Platten vorsichtig Medium abgesaugt, ohne den Zellrasen zu zerstören und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wird jeweils 50 $\mu\text{l}$  MEM dazugegeben.

Platte 1 wird nun 1 Stunde bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank vorinkubiert. Platten 2 und 3 respektive 6 und 24 Stunden. Nach der entsprechenden Vorinkubation werden jeweils 50 $\mu\text{l}$  der Stoffverdünnungen in der absteigenden 1:2 Verdünnungsreihe in Reihen 3-10 dazugegeben. Die so präparierten Platten werden nun für weitere 2 Tage im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wird unter einem Auflicht-Mikroskop das Ausmaß des zytopathischen Effektes beurteilt. Wie vorher beschrieben wird auch hier die Zellkontrolle als 0% CPE und die Viruskontrolle als 100% CPE gesetzt. Aus drei Ablesungen wird ein Mittelwert errechnet. Aus den ermittelten Werten wird dann der IC50 unter den Bedingungen der viralen Vorinkubation errechnet. Als Positiv-Kontrolle dient wiederum Aciclovir.

### Antivirale Testung mit Vorinkubation

ZK VK 3.-10. Reihe Substanz (Verdünnungsreihe) im 8-fach Ansatz

100 $\mu\text{l}$ Med	50 $\mu\text{l}$ Med + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 2% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 1% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,5% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,25% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,125% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,06% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,03% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	50 $\mu\text{l}$ Subst. 0,015% + 50 $\mu\text{l}$ Virus	/	/

Tab. 7) Pipettier-Schema der Flachboden-Mikrotiterplatten

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Antivirale Testung bei simultaner Inkubation von Virus und Extrakt

Die Tabelle verdeutlicht das Ausmaß des zytopathischen Effektes bei der jeweiligen Extrakt-Konzentration. Aus 2 Ableisungen wurde ein entsprechender Mittelwert errechnet. Zusätzlich gibt die Aufstellung einen Überblick über die ermittelte Zytotoxizität (Ausmaß des zytopathischen Effektes in %) verursacht durch die jeweilige Extrakt-Konzentration.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Konzentration</b>	<b>2%</b>	<b>1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,125%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,015%</b>
<b>Extrakt 1</b>	>50%	→						
<b>Extrakt 1</b>	70%	→						
<b>Mittelwert</b>	>50%	→						
<b>Extrakt 2</b>	10%	70%	100%					
<b>Extrakt 2</b>	0%	40%	100%					
<b>Mittelwert</b>	5%	50%	100%					
<b>Extrakt 3</b>	tox	tox	(tox)	(tox) <sup>1</sup> , 0%	(tox) <sup>1</sup> , 70%	100%		
<b>Extrakt 3</b>	tox	tox	tox	tox	>50%	100%		
<b>Mittelwert</b>	tox	tox	tox	0%	70%	100%		
<b>Extrakt 4</b>	(tox) <sup>1</sup>	0%	0%	20%	100%			
<b>Extrakt 4</b>	5%	0%	0%	5%	90%	100%		
<b>Mittelwert</b>	(tox)	0%	0%	10%	90%	100%		
<b>Extrakt 5</b>	tox	20%	70%	100%				
<b>Extrakt 5</b>	0%	10%	30%	90%	100%			
<b>Mittelwert</b>	0%	15%	55%	90%	100%			

<b>Extrakt 6</b>	(tox), 10%	70%	100%					
<b>Extrakt 6</b>	0%	25%	100%					
Mittelwert	(tox), 5%	50%	100%					
<b>Extrakt 7</b>	tox	(tox)	30%	70%	90%	100%		
<b>Extrakt 7</b>	0%	0%	5%	40%	80%	80%	100%	
Mittelwert	tox	(tox), 0%	20%	65%	80%	100%		
<b>Extrakt 8</b>	tox	tox, 5%	20%	60%	100%			
<b>Extrakt 8</b>	0%	5%	10- 15%	50%	70%	90%	100%	
Mittelwert	tox	5%	15%	55%	80%	100%		
<b>Extrakt 9</b>	0% <sup>2</sup>	0%	20%	60%	80%	100%		
<b>Extrakt 9</b>	0%	0%	30%	30- 50%	50%	80%	100%	
Mittelwert	0%	0%	25%	45%	60%	90%	100%	
<b>Extrakt 10</b>	0% <sup>2</sup>	0%	10%	40%	80%	100%		
<b>Extrakt 10</b>	0%	0%	0%	40%	70%	100%		
Mittelwert	0%	0%	5%	40%	75%	100%		
<b>Extrakt 11</b>	tox	tox	(tox)	30%	100%			
<b>Extrakt 11</b>	tox	tox	tox	15%	90%	100%		
Mittelwert	tox	tox	tox	20%	90%	100%		
<b>Extrakt 12</b>	tox	tox	tox	tox <sup>1</sup>	20% <sup>1</sup>	80%	100%	
<b>Extrakt 12</b>	tox	tox	tox	tox <sup>1</sup>	10% <sup>1</sup>	80%	100%	
Mittelwert	tox	tox	tox	tox	15%	80%	100%	
<b>Extrakt 13</b>	tox	(tox)	0% <sup>1</sup>	10% <sup>1</sup>	50%	100%		
<b>Extrakt 13</b>	tox	tox	0% <sup>1</sup>	5%	30%	90%	100%	
Mittelwert	tox	tox	0%	5%	40%	90%	100%	

<b>Extrakt 14</b>	tox	tox	0% <sup>2</sup>	5% <sup>1</sup>	40%	80%	100%	
<b>Extrakt 14</b>	tox	tox	tox	5% <sup>1</sup>	15%	50%	90%	100%
<b>Mittelwert</b>	tox	tox	tox	5%	25%	65%	90%	100%
<b>Extrakt 15</b>	tox	tox	0% <sup>1</sup>	0% <sup>1</sup>	40%	100%		
<b>Extrakt 15</b>	tox	tox	tox	0% <sup>1</sup>	15%	70%	100%	
<b>Mittelwert</b>	tox	tox	0%	0%	25%	85%	100%	
<b>Extrakt 16</b>	tox	tox	(tox)	0% <sup>1</sup>	30% <sup>1</sup>	90%	100%	
<b>Extrakt 16</b>	tox	tox	tox	0% <sup>1</sup>	20-30% <sup>1</sup>	90%	100%	
<b>Mittelwert</b>	tox	tox	tox	0%	30%	90%	100%	
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	0%	25%	65%	100%		
<b>Extrakt 17</b>	0% <sup>1</sup>	0%	0%	15%	50%	70%	100%	
<b>Mittelwert</b>	0%	0%	0%	15%	60%	85%	100%	
<b>Extrakt 18</b>	tox	tox	tox	tox	10% <sup>1</sup>	80%	100%	
<b>Extrakt 18</b>	tox	tox	tox	tox	5%	40%	90%	100%
<b>Mittelwert</b>	tox	tox	tox	tox	10%	60%	90%	100%
<b>Kontrolle</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Konzentration</b>	<b>100µM</b>	<b>50µM</b>	<b>25µM</b>	<b>12,5µM</b>	<b>6,25µM</b>	<b>3µM</b>	<b>1,5µM</b>	<b>0,75µM</b>
<b>ACG</b>	0%	1%	5%	20%	40%	60%	80%	100%
<b>ACG</b>	0%	0%	5%	10%	20%	40%	80%	100%
<b>Mittelwert</b>	0%	0%	5%	15%	30%	50%	80%	100%

Tab. 8) Auswertung der antiviralen Testung

- 1) Zellrasen voll Vakuolen (Zytotoxizität durch Rheum möglich)
  - 2) Zellen verändert, viele runde Zellen (Zytotoxizität nicht ausgeschlossen)
- Tox: Zellen deutlich verändert, Zytotoxizität ist anzunehmen

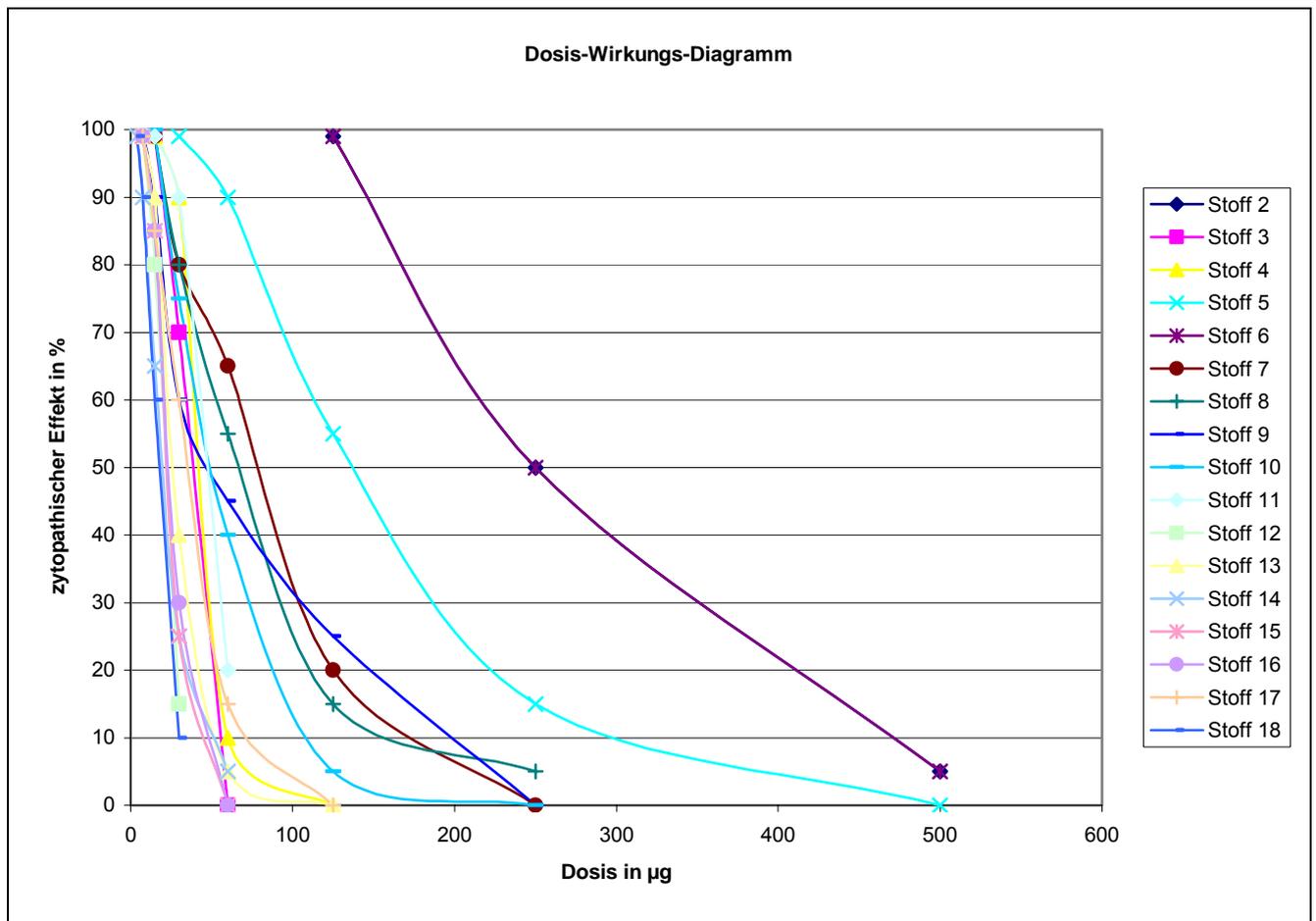


Abb. 5) Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung der verschiedenen Extrakte

### 3.2 MTT-Assay

Messwellenlänge: 570nm

Referenzwellenlänge: 630nm

Die mittels Photometer gemessene Optische Dichte wird jeweils mit dem Referenzwert der Zellkontrolle verglichen, der 100% gesetzt wird. So kann man mittels einfacher Dreisatz-Rechnung zu den prozentualen Mittelwerten der Extrakt-Proben gelangen und hieran den Prozentsatz der intakten Zellen ermitteln.

	Blank-Werte		Blank-Werte		
	0,014		0,013		
	0,013		0,012		
	0,014		0,012		
	0,013		0,011		
	0,014		0,013		
	0,014		0,012		
	0,014		0,014		
	0,013		0,012		
Mittelwert	0,013625	Mittelwert	0,012375	Mittelwert gesamt	0,013

Tab. 9) Bestimmung des Blank-Wertes

Der Blank-Wert ist ein Streu-Wert, der von jedem Wert der ermittelten optischen Dichte abgezogen werden muss. Hier wurde ein durchschnittlicher Blank-Wert von 0,013 bestimmt, der für die folgenden Berechnungen verwendet wurde.

#### Plate 1

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml
	0,888	0,856	0,876
	0,923	0,845	0,882
	0,91	0,855	0,876
	0,907	0,855	0,889
	0,868	0,838	0,876
	0,891	0,853	0,89
	0,868	0,841	0,87
	0,895	0,85	0,881
<b>Mittelwert</b>	0,89375	0,849125	0,88
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,88075	0,836125	0,867
<b>Prozent *</b>	100%	94,9332955	98,4388305

Tab. 10.1) Plate 1 MTT-Assay

#### Plate 2

	Zellkultur	500µg/ml
	0,956	0,957
	0,899	0,93
	0,838	0,942
	0,896	0,96
	0,9	0,935
	0,858	0,968
	0,852	0,929
	0,882	0,963
<b>Mittelwert</b>	0,885125	0,948
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,872125	0,935
<b>Prozent *</b>	100%	107,209402

Tab. 10.2) Plate 2 MTT-Assay

### Plate 3

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml	31,25µg/ml
	0,918	0,407	0,565	0,592	0,808	0,923
	0,877	0,42	0,557	0,578	0,764	0,92
	0,889	0,437	0,561	0,547	0,761	0,911
	0,858	0,404	0,562	0,577	0,792	0,914
	0,89	0,41	0,569	0,593	0,826	1,009
	0,886	0,397	0,516	0,562	0,748	0,91
	0,844	0,392	0,553	0,58	0,763	1,178
	0,86	0,406	0,517	0,561	0,767	0,925
<b>Mittelwert</b>	0,87775	0,409125	0,55	0,57375	0,778625	0,96125
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,86475	0,396125	0,537	0,56075	0,765625	0,94825
<b>Prozent *</b>	100%	45,808037	62,0988725	64,845331	88,5371495	109,65597

Tab. 10.3) Plate 3 MTT-Assay

### Plate 4

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml
	0,902	0,751	0,859	0,899
	0,878	0,738	0,857	0,907
	0,866	0,742	0,839	0,884
	0,907	0,697	0,848	0,897
	0,896	0,701	0,862	0,889
	0,888	0,745	0,829	0,895
	0,871	0,726	0,835	0,926
	0,898	0,766	0,874	0,913
<b>Mittelwert</b>	0,88825	0,73325	0,850375	0,90125
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,87525	0,72025	0,837375	0,88825
<b>Prozent *</b>	100%	82,2907741	95,672665	101,48529

Tab. 10.4) Plate 4 MTT-Assay

### Plate 5

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml	31,25µg/ml
	0,874	0,584	0,661	0,702	0,746	0,849
	0,833	0,617	0,638	0,693	0,738	0,843
	0,861	0,644	0,604	0,71	0,748	0,828
	0,89	0,618	0,635	0,729	0,769	0,879
	0,882	0,612	0,665	0,777	0,817	0,905
	0,904	0,608	0,647	0,756	0,73	0,906
	0,813	0,589	0,609	0,708	0,692	1,25
	0,873	0,617	0,657	0,72	0,765	0,885
<b>Mittelwert</b>	0,86625	0,611125	0,6395	0,724375	0,750625	0,918125
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,85325	0,598125	0,6265	0,711375	0,737625	0,905125
<b>Prozent *</b>	100%	70,0996191	73,4251392	83,3723996	86,448872	106,079695

Tab. 10.5) Plate 5 MTT-Assay

### Plate 6

	Zellkultur	500µg/ml
	0,922	0,927
	0,916	0,91
	0,888	0,953
	0,899	0,92
	0,879	0,902
	0,87	0,923
	0,853	0,923
	0,903	0,931
<b>Mittelwert</b>	0,89125	0,923625
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,87825	0,910625
<b>Prozent *</b>	100%	103,686308

Tab. 10.6) Plate 6 MTT-Assay

### Plate 7

	Zellkultur	500µg/ml
	0,896	0,996
	0,874	0,948
	0,889	0,969
	0,864	0,969
	0,892	0,974
	0,9	1,009
	0,83	0,997
	0,909	0,989
<b>Mittelwert</b>	0,88175	0,981375
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,86875	0,968375
<b>Prozent *</b>	100%	111,467626

Tab. 10.7) Plate 7 MTT-Assay

### Plate 8

	Zellkultur	500µg/ml
	0,915	0,942
	0,879	0,944
	0,883	0,983
	0,855	0,962
	0,861	0,947
	0,866	0,966
	0,899	0,969
	0,908	0,989
<b>Mittelwert</b>	0,88325	0,96275
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,87025	0,94975
<b>Prozent *</b>	100%	109,135306

Tab. 10.8) Plate 8 MTT-Assay

### Plate 9

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml
	0,991	0,91	0,924
	0,953	0,892	0,913
	0,933	0,911	0,907
	0,953	0,913	0,931
	0,923	0,898	0,911
	0,928	0,912	0,927
	0,911	0,898	0,908
	0,928	0,9	0,912
<b>Mittelwert</b>	0,94	0,90425	0,916625
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,927	0,89125	0,903625
<b>Prozent *</b>	100%	96,1434736	97,478425

Tab. 10.9) Plate 9 MTT-Assay

### Plate 10

	Zellkultur	500µg/ml
	0,935	0,943
	0,916	0,939
	0,909	0,944
	0,889	0,944
	0,893	0,916
	0,91	0,948
	0,894	0,91
	0,946	0,932
<b>Mittelwert</b>	0,9115	0,9345
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,8985	0,9215
<b>Prozent *</b>	100%	102,559822

Tab. 10.10) Plate 10 MTT-Assay

### Plate 11

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml
	0,936	0,845	0,877	0,868
	0,893	0,833	0,854	0,883
	0,876	0,859	0,843	0,9
	0,864	0,844	0,879	0,896
	0,857	0,811	0,817	0,935
	0,869	0,829	0,838	0,893
	0,877	0,809	0,857	0,893
	0,901	0,828	0,873	0,891
<b>Mittelwert</b>	0,884125	0,83225	0,85475	0,894875
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,871125	0,81925	0,84175	0,881875
<b>Prozent *</b>	100%	94,0450567	96,6279237	101,234036

Tab. 10.11) Plate 11 MTT-Assay

### Plate 12

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml	31,25µg/ml
	0,919	0,475	0,548	0,655	0,821	0,933
	0,911	0,48	0,552	0,65	0,789	0,916
	0,881	0,487	0,554	0,65	0,808	0,929
	0,906	0,487	0,567	0,639	0,81	0,925
	0,876	0,465	0,557	0,642	0,823	0,926
	0,889	0,458	0,536	0,669	0,819	0,9
	0,868	0,462	0,539	0,604	0,797	0,911
	0,905	0,433	0,507	0,638	0,803	0,906
<b>Mittelwert</b>	0,894375	0,468375	0,545	0,643375	0,80875	0,91825
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,881375	0,455375	0,532	0,630375	0,79575	0,90525
<b>Prozent *</b>	100%	51,6664303	60,3602326	71,52177	90,2850659	102,708836

Tab. 10.12) Plate 12 MTT-Assay

### Plate 13

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml
	0,934	0,632	0,693	0,906
	0,906	0,653	0,725	0,874
	0,891	0,659	0,684	0,83
	0,887	0,615	0,74	0,854
	0,888	0,641	0,746	0,839
	0,911	0,663	0,688	0,846
	0,924	0,637	0,72	0,914
	0,93	0,63	0,726	0,942
<b>Mittelwert</b>	0,908875	0,64125	0,71525	0,875625
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,895875	0,62825	0,70225	0,862625
<b>Prozent *</b>	100%	70,1269708	78,3870518	96,2885447

Tab. 10.13) Plate 13 MTT-Assay

### Plate 14

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	0,983	0,589	0,706	0,781	0,969
	0,96	0,59	0,713	0,777	0,968
	0,95	0,597	0,711	0,79	0,966
	0,95	0,595	0,717	0,76	0,954
	0,944	0,584	0,715	0,782	0,99
	0,957	0,603	0,737	0,789	0,972
	0,943	0,591	0,696	0,755	0,81
	0,958	0,559	0,712	0,808	0,968
<b>Mittelwert</b>	0,955625	0,5885	0,713375	0,78025	0,949625
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,942625	0,5755	0,700375	0,76725	0,936625
<b>Prozent *</b>	100%	61,0529108	74,3004907	81,3950404	99,3634796

Tab. 10.14) Plate 14 MTT-Assay

### Plate 15

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	0,981	0,61	0,718	0,799	0,956
	0,95	0,623	0,726	0,784	0,996
	0,951	0,626	0,744	0,775	1,007
	0,949	0,634	0,79	0,822	1,042
	0,947	0,61	0,797	0,797	1,026
	0,961	0,618	0,75	0,78	0,966
	0,954	0,61	0,699	0,763	0,972
	0,973	0,602	0,712	0,784	0,971
<b>Mittelwert</b>	0,95825	0,616625	0,742	0,788	0,992
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,94525	0,603625	0,729	0,775	0,979
<b>Prozent *</b>	100%	63,8587675	77,1224544	81,9888918	103,570484

Tab. 10.15) Plate 15 MTT-Assay

### Plate 16

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	0,928	0,518	0,65	0,732	0,944
	0,937	0,515	0,657	0,716	0,937
	0,916	0,522	0,65	0,709	0,935
	0,948	0,538	0,666	0,708	0,932
	0,911	0,521	0,652	0,712	0,932
	0,914	0,523	0,669	0,712	0,939
	0,908	0,523	0,672	0,696	0,929
	0,928	0,513	0,638	0,711	0,947
<b>Mittelwert</b>	0,92375	0,521625	0,65675	0,712	0,936875
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,91075	0,508625	0,64375	0,699	0,923875
<b>Prozent *</b>	100%	55,8468295	70,6835026	76,7499314	101,44112

Tab. 10.16) Plate 16 MTT-Assay

### Plate 17

	Zellkultur	500µg/ml
	0,819	0,81
	0,784	0,757
	0,779	0,823
	0,794	0,827
	0,802	0,813
	0,832	0,854
	0,895	0,813
	0,907	0,816
<b>Mittelwert</b>	0,8265	0,814125
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,8135	0,801125
<b>Prozent *</b>	100%	98,4787953

Tab. 10.17) Plate 17 MTT-Assay

### Plate 18

	Zellkultur	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml	31,25µg/ml
	0,993	0,379	0,451	0,548	0,649	0,932
	0,99	0,369	0,491	0,572	0,628	0,955
	0,972	0,384	0,483	0,606	0,646	0,98
	0,975	0,385	0,485	0,599	0,655	0,967
	0,972	0,396	0,483	0,585	0,68	0,994
	0,965	0,403	0,503	0,601	0,647	0,979
	0,958	0,389	0,504	0,582	0,64	0,948
	0,982	0,371	0,479	0,56	0,667	0,933
<b>Mittelwert</b>	0,975875	0,3845	0,484875	0,581625	0,6515	0,961
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,962875	0,3715	0,471875	0,568625	0,6385	0,948
<b>Prozent *</b>	100%	38,5823705	49,0068804	59,0549137	66,3118266	98,4551473

Tab. 10.18) Plate 18 MTT-Assay

### Kontrolle mit ACG

	Zellkultur	100µM	50µM	25µM	12,5µM
	0,951	0,858	0,856	0,832	0,879
	0,856	0,877	0,885	0,851	0,936
	0,897	0,862	0,894	0,877	0,896
	0,915	0,863	0,894	0,849	0,91
	0,899	0,868	0,894	0,859	0,903
	0,912	0,865	0,901	0,884	0,915
	0,897	0,849	0,839	0,854	0,88
	0,902	0,853	0,849	0,822	0,866
<b>Mittelwert</b>	0,903625	0,861875	0,8765	0,8535	0,898125
<b>Korrigiert mit Blank</b>	0,890625	0,848875	0,8635	0,8405	0,885125
<b>Prozent *</b>	100%	95,3122807	96,954386	94,3719298	99,3824561

Tab. 10.19) ACG-Kontrolle MTT-Assay

\*) Intakte Zellen bei den verschiedenen Extrakt-Konzentrationen in %. Die reine Zellkultur ohne Zusatz wurde als 100% gewertet.

Zum Vergleich der ermittelten Prozentwerte der intakten Zellkulturen der verschiedenen Extrakt-Ansätze dient folgende Graphik:

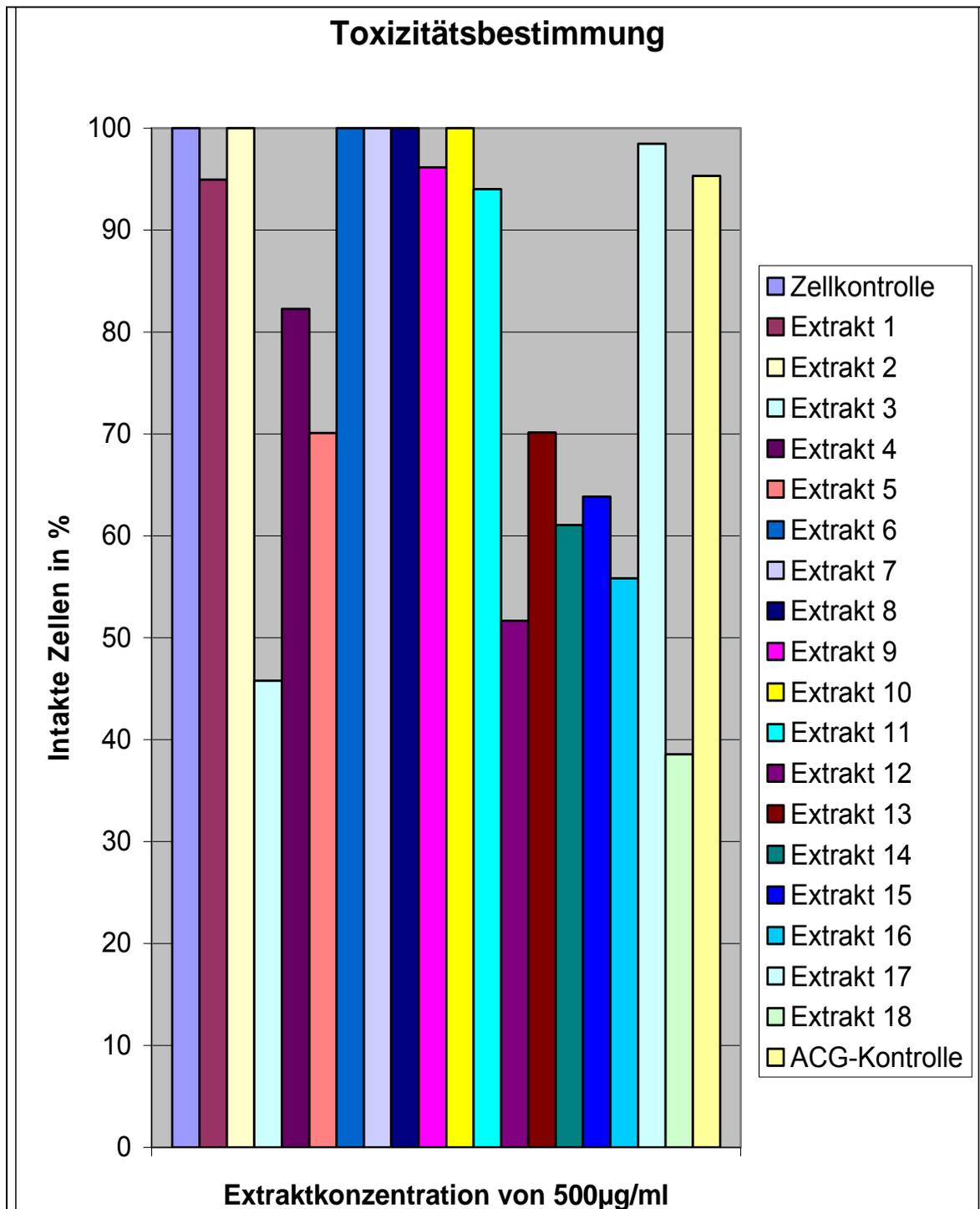


Abb. 6) Vergleich der Zytotoxizität der Rheum-Extrakte bei einer Konzentration von 500µl/ml bestimmt durch MTT-Assay

### 3.3 IC<sub>50</sub>, TC<sub>50</sub> und Therapeutischer Index

Mittels des Computer-Programms CalcuSyn werden wie erläutert die Werte für IC<sub>50</sub>, TC<sub>50</sub> und des Therapeutischen Indexes berechnet und in folgender Tabelle dargestellt:

Ansatz	IC <sub>50</sub> in µg/ml (EC <sub>50</sub> )	TC <sub>50</sub> in µg/ml (CC <sub>50</sub> )	Therapeutischer Index
Nr. 1	>500	>500	unwirksam
Nr. 2	277	>500	>1,8
Nr. 3	26,5	125	4,7
Nr. 4	36	500	14
Nr. 5	103	>500	>4,9
Nr. 6	277	500	1,8
Nr. 7	51	250	4,9
Nr. 8	69	500	7.2
Nr. 9	42	>500	>12
Nr. 10	51	>500	>9,8
Nr. 11	46	125	2,7
Nr. 12	21	60	2,9
Nr. 13	27	250	9,3
Nr. 14	21	125	6
Nr. 15	20	250	12,5
Nr. 16	20	125	6,3
Nr. 17	28	>500	>18
Nr. 18	16	60	3,8
ACG (Kontrolle)	45µM	>100µM	>22

Tab. 11) IC<sub>50</sub>, TC<sub>50</sub> und Therapeutischer Index

TI: wirksames Antiviral wenn TI mind. 10 (d.h. Reduzierung des CPE und geringe/  
keine Toxizität der Substanz) TC/IC = TI

Wie in der obigen Tabelle dargestellt, zeigen Extrakte 9, 10 und 17 (gelb hervorgehoben) die höchsten Therapeutischen Indizes, bei vergleichsweise niedriger

Toxizität. Ab einem Therapeutischen Index von 10 erachtet man eine Substanz als potentiell antiviral Wirksam. Im Vergleich hierzu die Positivkontrolle mit Aciclovir mit einem Therapeutischen Index von 22.

### 3.4 Virale Vorinkubation

An die simultane Inkubation von Virus und Extrakt anschließend wurde noch eine Versuchsreihe mit viraler Vorinkubation von einer, sechs und 24 Stunden durchgeführt. Getestet wurden Extrakte 9, 10, und 17, die im ersten Schritt die höchsten therapeutischen Indexe präsentierten. Eine virale Vorinkubation kann schon einen Hinweis auf den eventuellen Wirkmechanismus geben, sie gibt Aufschluss, ob auch bei schon mit Virus infizierten Zellen eine antivirale Wirkung zu beobachten ist. Wie aus Tabelle 13) ersichtlich, ist nach Vorinkubation von einer und sechs Stunden noch einer Reduktion des CPE durch Konzentrationen im nicht-toxischen Bereich zu beobachten. Gerade bei Stoff 17 zeigt sich hinsichtlich der notwendigen inhibitorischen Konzentration nur ein geringer Anstieg zwischen ein- und sechsständiger Vorinkubation.

### 3.4.1 Virale Vorinkubation von einer Stunde

<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Konzentration</b>	<b>2%</b>	<b>1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,125%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,015%</b>
<b>Extrakt 9</b>	0%	10%	50%	80%	100%			
<b>Extrakt 9</b>	0%	5%	30%	60%	90%	100%		
<b>Extrakt 9</b>	0%	5%	50%	80%	100%			
<b>Mittelwert</b>	0%	6,6%	43%	73%	100%			
<b>Extrakt 10</b>	0%	20%	80%	100%				
<b>Extrakt 10</b>	0%	5%	30%	70%	100%			
<b>Extrakt 10</b>	0%	10%	50%	100%				
<b>Mittelwert</b>	0%	11,6%	53%	90%	100%			
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	40%	100%				
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	25%	70%	100%			
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	30%	80%	100%			
<b>Mittelwert</b>	0%	0%	32%	83%	100%			
<b>Kontrolle</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Konzentration</b>	<b>100µM</b>	<b>50µM</b>	<b>25µM</b>	<b>12,5µM</b>	<b>6,25µM</b>	<b>3µM</b>	<b>1,5µM</b>	<b>0,75µM</b>
<b>ACG</b>	0%	1%	5%	10%	25%	35%	50%	70%
<b>ACG</b>	0%	1%	0%	5%	15%	30%	50%	80%
<b>Mittelwert</b>	0%	1%	2,5%	7,5%	20%	30%	50%	75%

Tab. 12.1) Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 1h

### 3.4.2 Virale Vorinkubation von 6 Stunden

<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Konzentration</b>	<b>2%</b>	<b>1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,125%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,015%</b>
<b>Extrakt 9</b>	0%	5%	40%	100%				
<b>Extrakt 9</b>	0%	0%	30%	50%	100%			
<b>Extrakt 9</b>	0%	0%	50%	100%				
<b>Mittelwert</b>	0%	1,7%	40%	83%				
<b>Extrakt 10</b>	0%	10%	60%	100%				
<b>Extrakt 10</b>	<5%	5%	30%	100%				
<b>Extrakt 10</b>	<5%	10%	60%	100%				
<b>Mittelwert</b>	2,5%	8%	50%	100%				
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	50%	100%				
<b>Extrakt 17</b>	0%	0%	30%	100%				
<b>Extrakt 17</b>	0%	5%	30%	100%				
<b>Mittelwert</b>	0%	1,7%	36,6%	100%				

Tab. 12.2) Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 6h

### 3.4.3 Virale Vorinkubation von 24 Stunden

<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Konzentration</b>	<b>2%</b>	<b>1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,125%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,015%</b>
<b>Extrakt 9</b>	40%	60%	80%	100%				
<b>Extrakt 9</b>	80%	80%	80%	100%				
<b>Extrakt 9</b>	50%	70%	90%	100%				
<b>Mittelwert</b>	<b>56,6%</b>	<b>70%</b>	<b>80%</b>	<b>100%</b>				
<b>Extrakt 10</b>	50%	70%	100%					
<b>Extrakt 10</b>	80%	100%						
<b>Extrakt 10</b>	50%	80%	100%					
<b>Mittelwert</b>	<b>60%</b>	<b>80%</b>	<b>100%</b>					
<b>Extrakt 17</b>	50%	70%	100%					
<b>Extrakt 17</b>	80%	80%	100%					
<b>Extrakt 17</b>	50%	80%	100%					
<b>Mittelwert</b>	<b>60%</b>	<b>80%</b>	<b>100%</b>					

Tab. 12.3) Zytopathischer Effekt in % bei viraler Vorinkubation von 24h

### 3.4.5 IC<sub>50</sub> nach viraler Vorinkubation

	1h	6h	24h
<b>Extrakt 9</b>	98 µg/ml	124 µg/ml	>500 µg/ml
<b>Extrakt 10</b>	118 µg/ml	159 µg/ml	>500 µg/ml
<b>Extrakt 17</b>	80 µg/ml	95,5 µg/ml	>500 µg/ml
<b>ACG-Kontrolle</b>	1,9 µMol		

Tab. 13) IC<sub>50</sub> nach viraler Vorinkubation

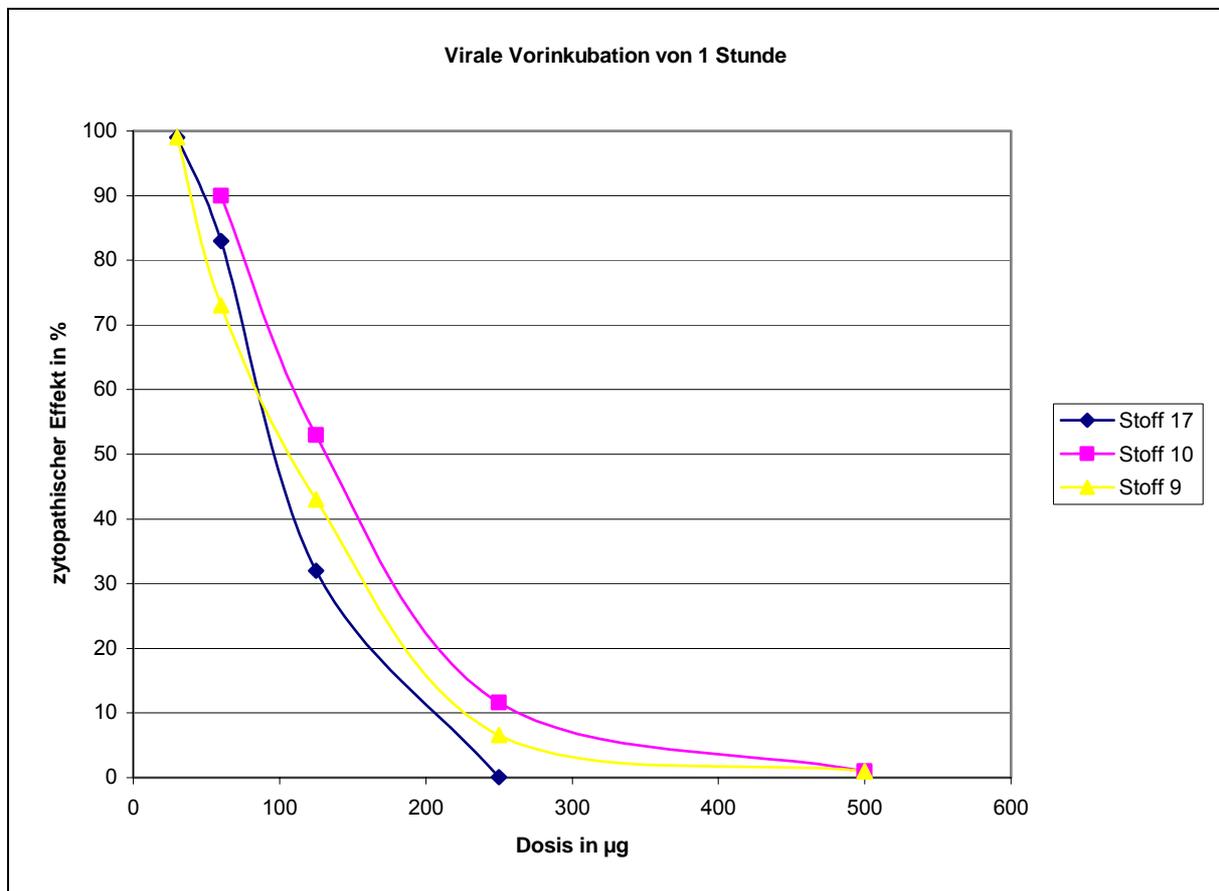


Abb. 7.1) Dosis-Wirkungs-Kurve bei viraler Vorinkubation von 1 Stunde

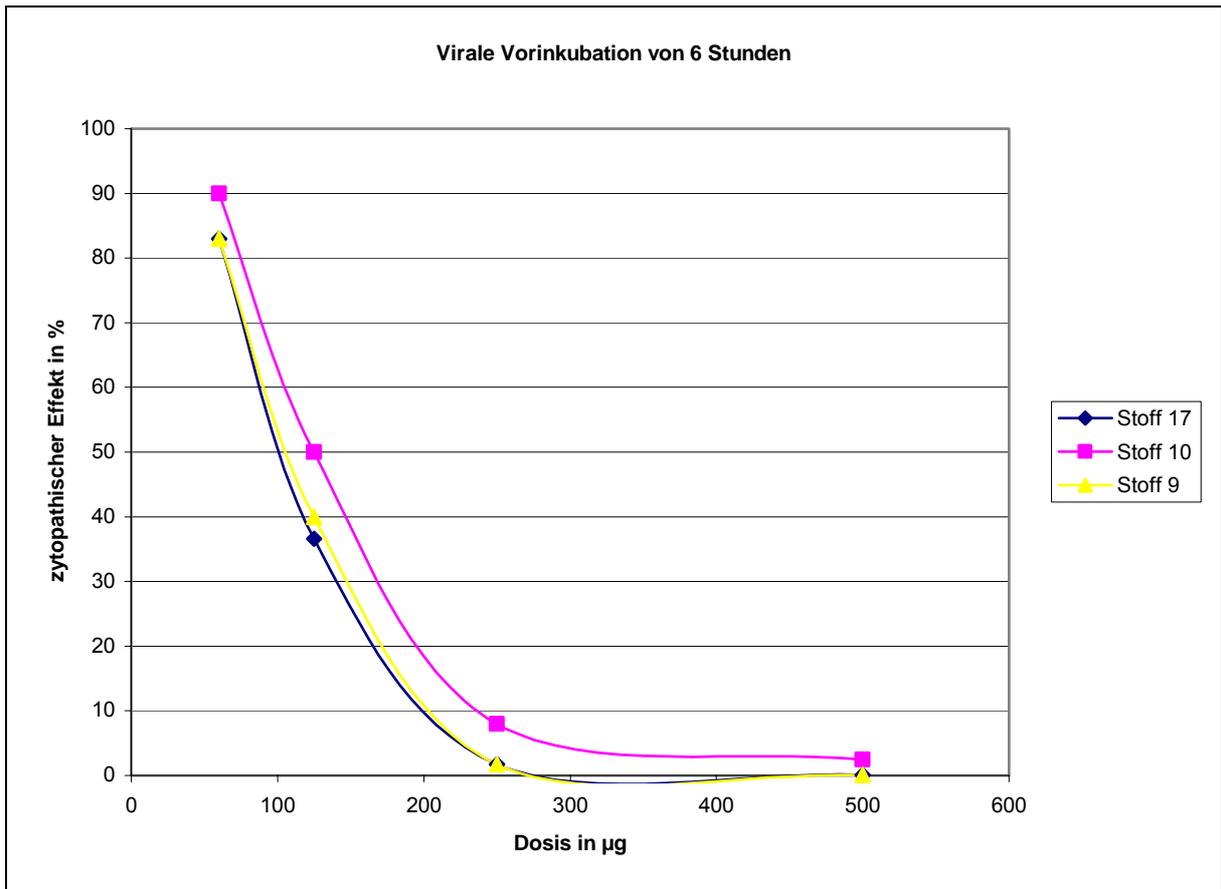


Abb. 7.2) Dosis-Wirkungs-Kurve bei viraler Vorinkubation von 6 Stunden

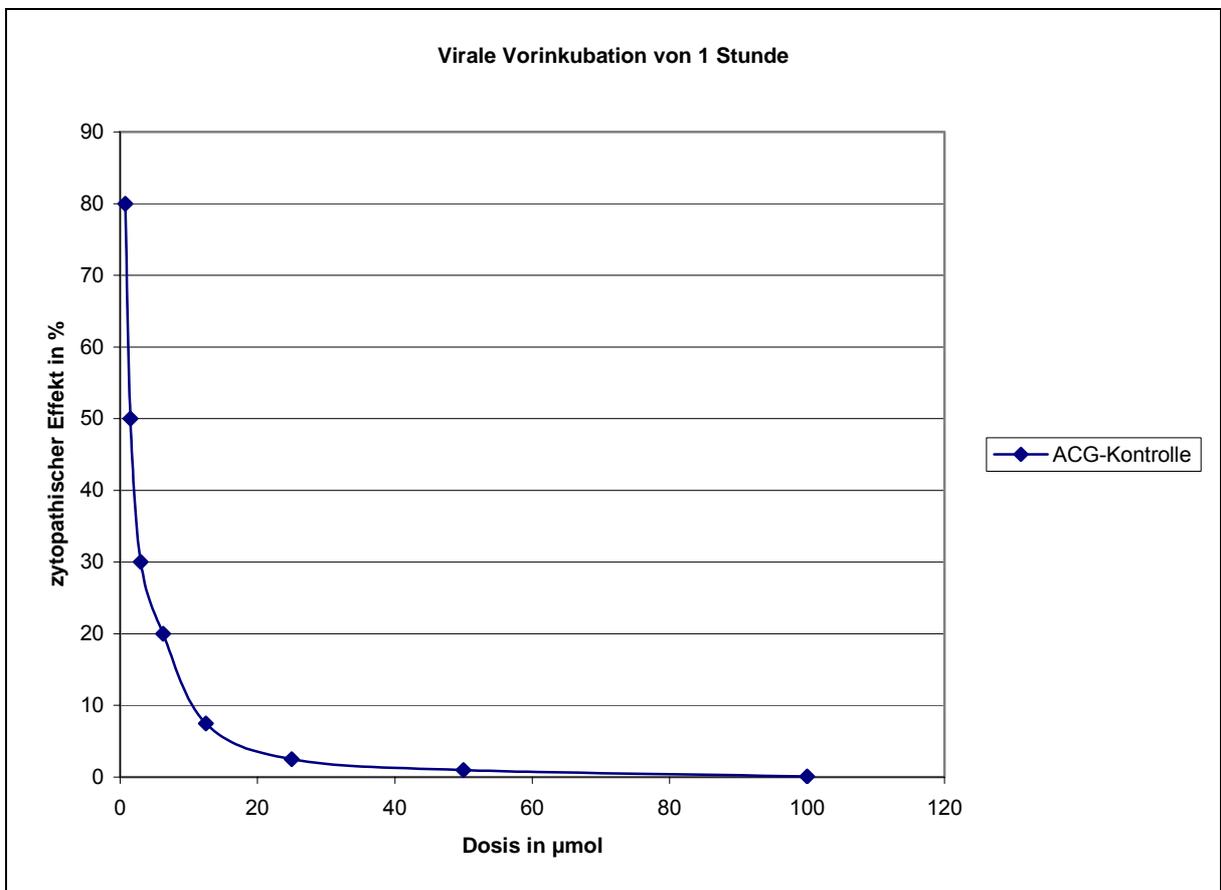


Abb. 7.3) Dosis-Wirkungs-Kurve der ACG-Kontrolle bei viraler Vorinkubation von 1 Stunde

## 4. Diskussion

### 4.1 Fehlerquellen

#### 4.1.1 Fehlerhafte Auswahl der Zellkulturen

##### 4.1.1.1 Veränderte kontinuierliche Zelllinien

Zellkulturen können theoretisch von allen Organismen gewonnen und als primäre Zellkultur gehalten werden. Primäre Zellkulturen sind die am aussagekräftigsten Kulturen, da sie das Ursprungsgewebe am besten repräsentieren. Sie sind jedoch schwer zu halten und erfordern viel Erfahrung. Zudem sind sie meist von heterogener Natur und potentielle Kontamination ist meist unvermeidbar. Die von primären Kulturen folgenden Zell-Passagen werden als „finite“ Zelllinien bezeichnet. Sie besitzen noch den „normalen“ Phänotyp. Wenn die Zellen von embryonalem Gewebe abstammen, erlauben sie meist mehr Passagen, als die die von differenziertem Gewebe stammen. Die in der Routine am häufigsten eingesetzten Zellkulturen sind kontinuierliche Zelllinien, die beispielsweise direkt von spontan entarteten Tumorgeweben abstammen oder die durch Behandlung mit bestimmten Noxen zur Transformation verleitet werden. Kontinuierliche Zelllinien zeigen im Vergleich zum Ursprungsgewebe einen veränderten Phänotyp und veränderte Eigenschaften, sind aber einfach und schnell zu kultivieren, da sie eine verlängerte Lebensspanne und kürzere Teilungsraten haben. In dieser Arbeit wurden Vero-Zellen verwendet. Diese Zelllinie wurde erstmalig 1962 von japanischen Wissenschaftlern aus normalen Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) kultiviert (Yasumura, Kawakita, 1963). Es handelt sich um aneuploide Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie (Sheets, 2000). Durch diese vorliegende Aneuploidie unterscheiden sich Verozellen eindeutig von Zellen des menschlichen Organismus mit einem diploiden Chromosomensatz. Hierdurch ist keine exakte Übertragung der Ergebnisse aus dem Vero- Zellkulturmodell möglich.

#### 4.1.1.2 Infektion mit Mykoplasmen

Eine der Ursachen für eine Kontamination mit Mykoplasmen bei der Arbeit mit Zellkulturen stellt die Verwendung von Tierserum und Trypsin dar. Die Kontrollen bei der Produktion sind zwar verschärft worden, dennoch ist es wichtig auf bewährte Hersteller zu achten und vor Verarbeitung wiederholte Kontrollen durchzuführen. Eine weitere häufige Ursache für eine Kontamination mit Mykoplasmen liegt in der Verbreitung zwischen einzelnen Zellkulturen am Arbeitsplatz. Die Übertragung erfolgt über Aerosole, die beim Arbeitsprozess entstehen. Mykoplasmen sind intrazelluläre Bakterien, die mit dem Lichtmikroskop nicht detektierbar sind, weshalb deren Nachweis mittels direkter DNA-Anfärbung, Kultivierung oder durch spezielle Kits vorgenommen werden muss. Im Falle eines positiven Nachweises bleiben meist nur die Entfernung der Kulturen und das Zurückgreifen auf gefrorene Stocks.

#### 4.1.2 Fehlerhafte Auswahl und Bearbeitung des Virusstammes

##### 4.1.2.1 Veränderte Infektiosität

In diesem Versuch wurde ein Herpes Simplex Virus Stamm namens Mc Intyre verwendet, der als Versuchsstamm weit verbreitet ist und sich bewährt hat. Er wurde von der ATCC bezogen, sodass keine Unregelmäßigkeiten zu erwarten sind. Dennoch könnten Fehler bei der Lagerung oder Aufbereitung zu einer Inaktivierung oder Mutation mit veränderter Infektiosität führen.

##### 4.1.2.2 Fehlerhafte Quantifizierung

Für den exakten und reproduzierbaren Versuchsaufbau ist die genaue Quantifizierung der Virusmenge essentiell. Es wurde mit einer Dosis von 150 TCID<sub>50</sub> gearbeitet, was einer MOI von 0,01 (d.h. 1 Viruspartikel auf 100 Zellen) entspricht. Ein falsch berechneter Titer, der zu einer fehlerhaften Virus-Konzentration führt, die zu hoch oder zu niedrig bzw. nicht in allen Ansätzen identisch ist, resultiert in inkorrekten nicht aussagefähigen Daten.

### 4.1.3 Rheum Extrakte

#### 4.1.3.1 Verunreinigte Rheum-Extrakte

Die verwendeten Extrakte wurden aus Radix und Rhizom von Rhabarber-Pflanzen gewonnen. Diese Pflanzen wurden kultiviert und sind hier gewachsen. Dennoch handelt es sich um Naturprodukte, deren genaue Inhaltsstoffe man nicht vorhersehen kann. Pflanzen nehmen während ihres Wachstums Nährstoffe aus Boden und Wasser auf und speichern deren Abbauprodukte. Es besteht die Möglichkeit, dass die Pflanzen zum Schutz vor Schädlingen mit Bekämpfungsmitteln behandelt worden sind, oder dass sie mit Dünger in Kontakt gekommen sind. Weiterhin könnte das Wasser mit Tensiden oder Ähnlichem belastet sein. Eventuelle Rückstände fremder Substanzen könnten in den Extrakten vorliegen und die Ergebnisse verfälschen. Auch bei der Extraktgewinnung bei der Verschiedene Lösungs- und Trennvorgänge durchgeführt werden sind Rückstände von Lösungsmitteln nicht auszuschließen.

#### 4.1.3.2 Eigenfärbung und Löslichkeit der Extrakte

Zum Lösungsvorgang der Extrakte wurde PBS/ Ethanol im Verhältnis von 9:1 verwendet. Die reinen Extrakte haben eine dunkelbraune Farbe und eine harzige Konsistenz. Auch nach dem Lösungsvorgang konnten die Extrakte teilweise trotz wiederholten Vortexens nicht komplett gelöst werden. Es verblieben kristalline Rückstände, die mit versuchter Methode nicht zu lösen waren. Es erscheint sinnvoll, weiter nach anderen Möglichkeiten zur Verarbeitung der Extrakte zu suchen. Durch Lösung dieser verbleibenden Rückstände könnte sich möglicherweise die Wirksamkeit des Stoffes maximieren, indem sich die Konzentration an wirksamer Substanz im Extrakt erhöht.

Weiterhin kommt erschwerend eine Trübung der Extrakte hinzu. So besitzen auch die gelösten Extrakte noch eine bräunliche Färbung, die durch ein 5-minütiges Ultraschallbad nur teilweise zu klären war. Besonders die Ergebnisse des MTT-Assays werden dadurch nachhaltig verfälscht. Der MTT-Assay ist ein colorimetrischer Test, der mit Hilfe eines Photometers die Blaufärbung der Proben vergleicht und so die Vitalität der Zellen beurteilt. Als Referenz fungiert eine

Zellkontrolle ohne Extraktzugabe, die als 100% intakte Zellen gesetzt wird. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich zeigen nun einige Proben Werte über 100%, was sich möglicherweise auf die Eigenfärbung der Extrakte zurückführen lässt. Die durch die Eigenfärbung verursachten falsch hohen Werte des MTT-Assays könnten die tatsächliche Toxizität eines Extraktes verschleiern. Da auch nicht alle Extrakte eine identische Färbung vorweisen ist es schwerlich möglich die Daten zu vergleichen. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der toxischen Konzentrationen und des Therapeutischen Index die visuelle Auswertung und Beurteilung der Toxizität verwendet.

#### 4.1.3.3 Reproduzierbarkeit

Da es sich bei den Rheum-Extrakten wie oben erwähnt um pflanzliche Produkte handelt ist die Reproduzierbarkeit der Testung eingeschränkt. Auch wenn das Verfahren der Extraktgewinnung, Aufarbeitung und der Lösung standardisiert sind ist es schwierig vorherzusehen, ob die Extrakte immer die gleiche Konzentration einer wirksamen Substanz beinhalten. Für eine bessere Steuerbarkeit und Reproduzierbarkeit ist es unerlässlich den wirksamen Bestandteil zu identifizieren und zu isolieren, um ihn dann gezielt einzusetzen.

#### 4.1.4 Fehler bei der Bewertung des zytopathischen Effektes

Die Ablesung und Auswertung der Ergebnisse der antiviralen Testung erfolgten hauptsächlich durch die Beurteilung des zytopathischen Effektes der Zellkulturen unter dem Auflicht-Mikroskop. Als Referenzen dienten die Viruskontrolle mit 100% CPE und die Zellkontrolle mit 0% CPE. Im Verhältnis zu diesen Vergleichs-Werten wurden die anderen Proben mikroskopiert und beurteilt. Das Ausmaß des CPE in Prozent bleibt aber ein vom Augenmaß der ablesenden Person abhängiger Schätzwert. Um diesen subjektiven Eindruck mehr Relevanz zu verleihen wurden die Proben unabhängig von mindestens 2 erfahrenen Personen abgelesen und ein entsprechender Mittelwert gebildet.

#### 4.1.5 Probleme bei der Interpretation

Vergleichbar mit der Beurteilung der Wirksamkeit der Extrakte über das Ausmaß des CPE, erfolgte die Abschätzung ihrer Zytotoxizität. Hierbei musste genau unterschieden werden ob beobachtete Zellveränderungen das Resultat der viralen Infektion oder der Toxizität der zu testenden Substanzen darstellten. Hierbei sind Interpretationsfehler möglich, die zur Verzerrung und Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnten.

#### 4.2 Ist diese virale Testung sinnvoll?

Die Erfolge der antiviralen Chemotherapie führten zu großen Erwartungen, was die weitere Forschung auf diesem Gebiet anbelangt. Durch Resistenzentwicklung und Mehrfach-Kombinationen in der Therapie steigt der Bedarf an neuen antiviralen Substanzen. Ein breiter Einsatz von Technologien wie PCR in der Routine erlaubt eine schnelle Diagnostik und therapeutischen Nutzen wie bei der Analyse viraler Gene auf eventuelle Resistenzen. Zusätzlich können durch Röntgenstrukturanalyse chemischen Strukturen definiert werden, deren Bindungspotential an virale Schlüsselenzyme bekannt ist. Die Erfolge der kombinatorischen Chemie ermöglicht zudem eine starke Vermehrung der potentiellen Substanzen. Mit heutigen modernen Testverfahren wie PCR und ELISA-Techniken zur antiviralen Testung ist es möglich schnell viele Stoffe auf eine Aktivität hin zu screenen. Jedoch nur in seltenen Fällen führt dies zu einem positiven Ergebnis. Auch von einer viel versprechenden Verbindung, die die Funktion viraler Enzyme inhibiert ist es noch ein weiter Weg. Hürden wie *in vivo* Aktivität, Zellwandpenetration, Resorption und orale Bioverfügbarkeit müssen überwunden werden, damit das Präparat an seinen Wirkort gelangt. Selektivität soll hoch und Nebenwirkungen gering sein.

Als Schätzung gilt, dass unter 100.000 *in vitro* gescreenten Substanzen sich 100 mit messbarer Aktivität *in vitro* finden, davon besitzen 20 eine Aktivität *in vivo* und es existiert vielleicht eine Substanz, die das Stadium der klinischen Testung erreicht (Oxford et al., 1999).

#### 4.3 Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse

Die Fähigkeit Zellen *in vitro* zu kultivieren brachte einen immensen Fortschritt auf dem Gebiet der Virologie. Viele Zelltypen werden in der Routine für Forschung und Diagnostik verwendet. Dennoch muss man erkennen, dass Zellen, die *in vitro* gewachsen sind sich eventuell anders verhalten, als in einem intakten Organismus. Ein Zellkultursystem stellt nur ein Modell eines lebenden Organismus dar. Diese Kulturen bestehen jedoch nur aus einer einzigen Zellart, ein Organismus hingegen aus multiplen Zell- und Organsystemen, die miteinander in Kommunikation stehen. Dieses komplexe System, das über Signalkaskaden und Botenstoffe funktioniert, kann nicht durch eine einfache Zellkultur kopiert werden. Zum Beispiel führt die Proliferation von *in vitro* kultivierten Zellen nicht zu deren voller Differenzierung, was zwangsläufig zu einer Veränderung der biologischen Eigenschaften, und damit zur Begrenzung der Einsetzbarkeit führt. Auch fehlende Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen beeinträchtigt das Zellverhalten.

Aus diesen Gründen lassen sich Ergebnisse, die bei einem *in vitro* Versuch gewonnen werden nur bedingt auf *in vivo* Verhältnisse übertragen.

Die Hauptprobleme die bei der Übertragung von gewonnenen *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Verhältnisse entstehen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

- Problem der Resorption und Verstoffwechslung – Konzentration!
- Kommt Substanz am Wirkort an?
- Nebenwirkungen, Wechselwirkungen, Zelltoxizität, Karzinogenität, Teratogenität
- Resistenzentwicklung

Tab. 14) Probleme bei der Übertragung von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Verhältnisse

#### 4.4 Inhaltsstoffe von Rheum Extrakten

Die verwendeten wässrigen und ethanolischen Extrakte aus Wurzeln und Rhizomen von Medizinal-Rhabarber konnten eine *in vitro* Wirksamkeit gegen Herpes Simplex Viren vom Typ I zeigen. Die wichtigste Frage, die sich nun stellt ist die genaue stoffliche Zusammensetzung der wirksamen Extrakte. Hier bekommt die schon in der Einleitung erwähnte Wissenschaft der Pharmakognosie Bedeutung. Die Herstellung

der Extrakte erfolgt über verschiedene Prozesse, die die Ausschüttung mittels Petrolether und Ethylacetat und die Einengung im Vakuum von getrockneten und gemahlenden Rhabarberwurzeln involvieren. Um Näheres über die Inhaltsstoffe der viel versprechenden Extrakte zu erfahren sind verschiedene chromatographische und andere diagnostische Maßnahmen erforderlich. Die zu Beginn besprochenen möglichen wirksamen Komponenten wie zum Beispiel die Polyphenole wie Flavonoide oder Tannine und Anthranoide, die gesamt als Inhaltsstoffe des Rheum vorkommen müssen nachgewiesen und isoliert werden. Ein nächster Schritt wäre die Überprüfung des isolierten Wirkstoffes auf seine Toxizität und Wirksamkeit.

#### 4.5 Wirkmechanismus

In dieser Arbeit wurde der Nachweis einer antiviralen Aktivität erbracht, über den genauen Wirkmechanismus, beziehungsweise die Angriffsstelle im viralen Replikations-Zyklus, kann bis jetzt aber nur spekuliert werden. Durch den vorliegenden Versuchsaufbau ermittelt man eine Verminderung des zytopathischen Effektes, welcher durch die Infektion mit HSV verursacht wird. Aufgrund dieser Verminderung geht man von einer Reduktion der Infektiosität bzw. Inaktivierung der Herpes-Viren aus, was wiederum für die Potenz der zu testenden Substanz spricht.

Der erste Schritt der antiviralen Testung bei dem die Inkubation von HSV und Rheum-Extrakten simultan erfolgt gibt noch keinen konkreten Hinweis, sondern untersucht das generelle Vorliegen einer Wirksamkeit. Hierbei zeigten besonders Extrakte 9, 10 und 17 ein inhibitorisches Potential bei geringer zellulärer Toxizität, was sich in einem Therapeutischen Index von  $> 10$  widerspiegelt. Extrakt 17 demonstriert mit seinem TI von 18 ein vergleichbares Verhalten wie die Kontroll-Substanz Aciclovir (TI = 22).

Aufgrund dieser viel versprechenden Ergebnisse wurde eine zweite Versuchsreihe mit viraler Vorinkubation angesetzt. Diese antivirale Testung mit viraler Vorinkubation von ein, sechs und 24 Stunden ist sinnvoll. Hiermit lässt sich zeigen, ob auch die virale Replikation in einem späteren Stadium der Infektion inhibiert werden kann oder ob sich die antivirale Wirkung lediglich auf eine Beeinflussung des Zell-Entry begründet. Die verschiedenen Vorinkubationen demonstrieren verschiedene Stadien

der HSV Infektion. Besonders Stoff 17 zeigt bei Vorinkubationen von 1 und 6 Stunden eine signifikante Abnahme des zytopathischen Effektes, und somit eine antivirale *in vitro* Aktivität.

Um die genauen Mechanismen zu definieren ist zunächst die Identifikation und Isolierung des Wirkstoffes aus dem Extrakt notwendig. Anschließend könnte eine Röntgenstrukturanalyse des Wirkstoffes sinnvoll sein, welche die möglichen Bindungseigenschaften erkennen ließe. Weiterhin wäre eine gezielte Untersuchung einzelner viraler Proteine auf eine Interaktion mit dem getesteten Wirkstoff vorteilhaft. In der Literatur sind bisher die Bindung von Flavonoiden an viralen Proteinen beschrieben, wodurch die Replikation behindert wird, sowie eine Intervention beim Eindringen in die Wirtszelle, durch Veränderung deren Oberflächenstruktur. Vereinzelt und in höherer Konzentration auch die Hemmung der viralen Proteinsynthese.

#### 4.6 Bisherige Erkenntnisse

Bisher ist die antivirale Wirksamkeit von *Rheum palmatum* gegen HSV nur in chinesischer Literatur veröffentlicht. Hsiang et al. screenen 31 antiinflammatorisch und antipyretisch wirksame Heilpflanzen der traditionellen Chinesischen Medizin mittels Plaque Reduktions-Assay auf ihre Wirkung gegen HSV. Sie beschreiben eine Inhibition von Bindung und Eintritt in die Wirtszelle durch ethanolische Rheum-Extrakte (Hsiang et al., 2001). Wang et al untersuchten die Wirkung von ethanolischem Rheum-Extrakt auf Zellkulturen und beschreiben deren geringe Zytotoxizität auch bei einer Dosis von 20.000µg/ml. Weiterhin beobachteten sie einen Schutz der vorbehandelten Zellen vor Infektion (Wang et al., 1996). Anschließend an diese Ergebnisse testeten sie die *in vivo* Effekte von ethanolischen Rheum-Extrakten mit HSV infizierten BALB/c Mäusen. Die mit REE behandelten Mäuse zeigten in Milz keine und in Leber und Nieren weniger ausgeprägte pathologische Läsionen und geringere virale Titer (Wang et al., 2003).

Die topische Anwendung von einem Präparat aus Rheum und Salbei bei Herpes labialis wurde von Saller et al. an einer Gruppe von 145 Patienten getestet. Die Parameter Dauer, Schmerz und Schwellung zeigten mit Aciclovir vergleichbare Ergebnisse (Saller et al., 2001).

Andere Forschungsgruppen untersuchten die antivirale Wirkung von Rheum-Extrakten gegen Hepatitis B-Viren. Im Zellkulturmodell mit HepG 2.2.15 Zellen, eine HBV-produzierende Zelllinie konnte nach 8- bzw. 11-tägiger Anwendung von Rheum-Extrakten eine signifikante Reduktion der Sekretion von HBsAG, HBeAG sowie von extrazellulärer Virus DNA nachgewiesen werden (Kim et al., 2001;Liu et al., 2004).

#### 4.7 Aussichten

Durch den erbrachten Nachweis von antiviraler *in vitro* Aktivität der verschiedenen Rheum Extrakte gegen Herpes Simplex stellen sich nun im Anschluss weitere Fragen. Vorausgesetzt man wäre in der Lage die wirksamen Stoffe in den Rheum-Extrakten zu isolieren und könnte eine Wirksamkeit derer *in vivo* nachweisen wäre es bis hin zum Einsatz von Rheum als Pharmakon noch ein weiter Weg. Dennoch zeigen die hier ermittelten Ergebnisse, dass Rheum eine viel versprechende Substanz ist, die möglicherweise das Potential besitzt eine wirksame Substanz in der Herpes-Therapie zu werden. Zu klären gilt, ob ein Anbau der Heilpflanzen für die Produktion möglich wäre. Weiterhin müssten standardisierte Verfahren zur Aufarbeitung und Verarbeitung entwickelt werden. Im Anschluss müsste die Substanz die verschiedenen Phasen der klinischen Arzneimitteltestung durchlaufen und auf Neben- und Wechselwirkungen hin untersucht werden.

Ein zusätzliches Hindernis stellt sicher auch die Akzeptanz in der Bevölkerung dar. Während ein Teil der Patienten sich homöopathischen und phytotherapeutischen Behandlungsmethoden öffnet, bleibt bei den übrigen die Skepsis gegenüber pflanzlichen Medikamenten erhalten. Als Fazit lässt sich dennoch sagen, dass selbst als „gewöhnlich“ und „bekannt“ betrachtete Heilpflanzen wie der hier untersuchte Rhabarber medizinisch verwertbares Potential bergen, welches sich im Zeitalter der zunehmenden Resistenzentwicklungen gegen herkömmliche Therapien durchaus als nützlich erweisen könnte.

#### 4.8 Zusammenfassung

Die zunehmende Resistenzentwicklung bei der Therapie gegen Herpes Simplex Viren vom Typ-1, besonders bei immundefizienten Patienten, erfordert die Entwicklung von Therapie-Alternativen. In Anlehnung an die Erkenntnisse der

Traditionellen Chinesischen Medizin, die sich die Wirksamkeit von Heilpflanzen zu Nutze macht, wurde in dieser Arbeit das antivirale Potential von Extrakten aus Rheum Spezies gegen HSV-1 untersucht. Rheum oder Rhabarber gehört zur Familie der Polygonaceae. Die hier verwendeten Extrakte stammen aus den Wurzeln und Rhizomen von *Rheum palmatum* L. und *Rheum rhaponticum*, welche ursprünglich aus Asien stammende Heilpflanzen sind. Rheum ist reich an polyphenolen Inhaltsstoffen der Gruppe der Flavonoide und Tannine, welche Gegenstand der Forschung sind und denen schon vielfache pharmakologische Wirkungen zugesprochen wurden. Die antivirale Wirksamkeit von Rheum wurde bislang nur in der chinesischen Literatur veröffentlicht, wo bestimmte Untersuchungen mit HBV und HSV vorgenommen wurden.

Hier wurde in einem Zellkulturmodell mit Vero-Zellen eine antivirale Testung vorgenommen. Die Auswirkungen der Rheum Extrakte auf den durch HSV-1 verursachten zytopathischen Effekt wurden untersucht. Eine Verminderung oder das Fehlen des CPE wurde als antivirale Wirksamkeit gewertet. In zwei Versuchsreihen, einmal mit simultaner Beimpfung der Vero-Zellen mit Virus in einer MOI von 0,01 und Extrakten in Konzentrationen von 500µg/ml bis 4µg/ml und dann mit viraler Vorinkubation von 1, 6 und 24 Stunden wurde das Verhalten der Zellen beobachtet. Unter dem Auflichtmikroskop wurde das Ausmaß des CPE beurteilt und anschließend mit Hilfe des Computerprogramms CalcuSyn die IC<sub>50</sub> Werte berechnet. Der Wert der 50% inhibitorischen Konzentration sagt aus, bei welcher Extraktkonzentration 50% der Zellen einen CPE aufweisen und ist somit Maß für die antivirale Wirksamkeit. Weiterhin wurden die Rheum Extrakte mittels MTT-Assay auf ihre Zytotoxizität hin untersucht und der TC<sub>50</sub> Wert als Maß der Toxizität berechnet. Der aus IC<sub>50</sub> und TC<sub>50</sub> berechnete Therapeutische Index setzt Wirksamkeit und Toxizität in Relation und ist ein Wert für die mögliche Validität einer Substanz. Je höher dieser Wert, desto viel versprechender die Substanz. Besonders Extrakte 9, 10 und 17 bedürfen der genaueren Betrachtung, da sie in der vorliegenden Untersuchung Therapeutische Indexe von >12, >9,8 und >17,9 gezeigt haben. Dies deutet auf ein antivirales Potential, bei keiner nachweisbaren Zytotoxizität in verwendeten Konzentrationen, hin. Im Vergleich zeigte Aciclovir einen TI von 22. Mit diesen drei Substanzen wurde der Versuch dann mit viraler Vorinkubation von 1, 6 und 24 Stunden wiederholt. Vor Allem Extrakt Nr. 17 zeigte auch bei Vorinkubation von einer und sechs Stunden mit einem IC<sub>50</sub> von 80µg/ml und 95,5 µg/ml eine

signifikante Reduktion des CPE. Dies gibt einen Hinweis auf die mögliche Art des Wirkmechanismus, denn Zeichen der Wirksamkeit trotz Vorinkubation sprechen für eine Intervention im späteren Stadium des viralen Replikationszyklus. Problematisch ist die Übertragung der hier ermittelten *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse. Allerdings sind die Ergebnisse vielversprechend und eine weiterführende Untersuchung erscheint lohnenswert. Hier ist vor Allem die genaue Charakterisierung und Isolierung der Inhaltsstoffe der wirksamen Extrakte notwendig. Nachfolgend könnte die Wirksamkeit der ermittelten Polyphenole in einem Tierversuch verifiziert werden.

#### 4.9 Summary

Increasing numbers of highly resistant herpes simplex virus tribes, especially in immunodeficient patents, demonstrate the need of therapeutic alternatives. In consideration of the principles of traditional chinese medicine, to use the potential of medical plants, in this work we tested the antiviral potential of extracts from rheum extracts against one tribe of herpes simplex type 1. Rheum belongs like the common rhubarb to the family of polygonaceae. The used extracts were gained from roots and rhizomes of *Rheum palmatum* Linné and *Rheum rhaponticum*. Rheum is rich of polyphenolic substances of the flavonoid and tannin group. These substances were target of variuos research and have been found to be highly pharmacologically active. So far the antiviral potential of polyphenols extracted from rheum, for instance against herpes simplex or hepatitis B virus, has only been published in chinese literature.

In this work we used a Vero cell culture model to investigate the antiviral potential of rheum extracts against herpes simplex type 1 (Mc Intyre). To evaluate their effectivity we used the dimension of the cytopathogenic effect caused by herpes simplex type 1 on the vero cell culture. In case of absent or reduced cytopathogenic effect the extract was considered to have antiviral activity. In two different test series the properties of the cells were studied. In the first series the inoculation of the vero cells with herpes simplex virus in a MOI of 0,01 and rheum extracts in concentrations ranging from 500µg/ml to 4µg/ml was carried out simultaneously.

In the second series the vero cells were previously incubated with virus for one, six and 24 hours respectively before the rheum extracts were added.

The cytopathogenic effect (CPE) caused by herpes virus on the cells seen through a reflected-light microscope was used as a measure of the antiviral effect of the rheum extracts. Subsequently the program CalcuSyn® was used to evaluate the IC50. The value of the 50% inhibiting concentration states the concentration in which vero cells showed a CPE in 50% and is therefore a measure of antiviral potency.

Furthermore the rheum extracts were tested for their amount of toxicity using a MTT-Assay to investigate the TC50. Relating the IC50 and the TC50 it is possible to calculate the therapeutic index, which is a measure of the substances validity.

The higher the acquired therapeutic index, the more promising the substance.

In this work we finally concentrated on three extracts (Number 9, 10 and 17), which showed therapeutic indices of >12, >9,8 and >17,9. Here our data indicates antiviral potential without measurable toxicity. For comparison acyclovir showed a therapeutic index of 22. Using the above named three extracts the experiment was repeated, adding previous viral incubation of 1, 6 and 24 hours in the vero-cell model. Especially extract number 17 showed with 50% inhibiting concentrations of 80 and 95µg/ml a significant reduction of CPE despite of previous viral incubation of 1 and 6 hours. Furthermore this could be a sign of antiviral activity through interference of the viral replication. Problematic seems to be the transmission of *in vitro* data to conditions *in vivo*. Nevertheless further investigation of the evaluated data appears worthwhile. Previously exact characterisation of the polyphenols from the rheum extracts is necessary. Hereafter the properties of the polyphenols could be investigated in an animal experiment.

Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine* 11:657-661.

Altersberger, I. and Kurz, B. <http://www.gesundheit.de/heilpflanzen-lexikon/rhabarber/rhabarber.shtml>. Internet . 2005.

Ref Type: Electronic Citation

Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. 1991. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res* 16:185-196.

Arvin AM, Greenberg HB. 2006. New viral vaccines. *Virology* 344:240-249.

Bieza K, Lois R. 2001. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol* 126:1105-1115.

Blaut M, Schoefer L, Braune A. 2003. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res* 73:79-87.

Chen C, Tang HR, Sutcliffe LH, Belton PS. 2000. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. *J Agric Food Chem* 48:5710-5714.

Cody V, Middleton E, Harborne JB. 1986. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical-, Pharmacological and Structure-Activity Relationship*. New York: Alan R. Liss Inc.

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. 2000. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468:166-170.

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 436:71-75.

Doerr, H. W. and Preiser, W. <http://www.kgu.de/zhyg/virologie/handout19.pdf>. Internet . 2005.

Ref Type: Electronic Citation

Doerr HW, Rabenau H. 1996. Dermatotrope Herpesviren, Infektionsbiologie, Epidemiologie und Diagnostik. *Chemotherapie Journal* 5. Jahrgang:1-11.

Duthie SJ, Dobson VL. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 38:28-34.

Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES. 2005. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res*.

Frobert E, Ooka T, Cortay JC, Lina B, Thouvenot D, Morfin F. 2005. Herpes simplex virus thymidine kinase mutations associated with resistance to acyclovir: a site-directed mutagenesis study. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1055-1059.

Fukumoto LR, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48:3597-3604.

Günzburg, H. W. <http://www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/HERPESGEN1.HTML>. Internet . 2005.

Ref Type: Electronic Citation

Hänsel O, Sticher O, Steinegger E. 2004. *Pharmakognosie und Phytopharmazie*. Springer Verlag.

Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.

Hayashi K, Hayashi T, Otsuka H, Takeda Y. 1997. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* 39:821-824.

Heldt HW. 1999. *Pflanzenbiochemie*. Göttingen: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, . 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155:381-386.

Hierholzer JC, Killington RA. 1996. Virus isolation and quantitation. In: Mahy BWJ, Kangro Ho, eds. *Virology methods manual*. London, San Diego: Academic Press. pp 25-46.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62:1276-1282.

Hou DX, Kai K, Li JJ, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, Fujii M, Young MR, Colburn N. 2004. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25:29-36.

Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, Uto T, Terahara N, Yoshimoto M, Fujii M. 2003. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol* 23:705-712.

Hou DX, Yanagita T, Uto T, Masuzaki S, Fujii M. 2005. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem Pharmacol* 70:417-425.

Hsiang CY, Hsieh CL, Wu SL, Lai IL, Ho TY. 2001. Inhibitory effect of anti-pyretic and anti-inflammatory herbs on herpes simplex virus replication. *American Journal of Chinese Medicine* 29:459-467.

- Hu JM, Hsiung GD. 1989. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. *Antiviral Res* 11:217-232.
- Huang Q, Shen HM, Ong CN. 2004. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappa B. *Biochemical Pharmacology* 68:361-371.
- Iwu MM, Igboko OA, Okunji CO, Tempesta MS. 1990. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. *J Pharm Pharmacol* 42:290-292.
- Jenkins FJ, Casadaban MJ, Roizman B. 1985. Application of the mini-Mu-phage for target-sequence-specific insertional mutagenesis of the herpes simplex virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4773-4777.
- Joshi PJ, Fisher TS, Prasad VR. 2003. Anti-HIV inhibitors based on nucleic acids: emergence of aptamers as potent antivirals. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3:383-400.
- Kärber G. 1938. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 480-483.
- Kato K, Takahashi S, Cui L, Toda T, Suzuki S, Futakuchi M, Sugiura S, Shirai T. 2000. Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 91:786-791.
- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. 2003. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J Allergy Clin Immunol* 112:951-957.
- Kim AI, Saab S. 2005. Treatment of hepatitis C. *Am J Med* 118:808-815.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96:229-245.
- Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, Kim SH. 2001. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytother Res* 15:718-720.
- Kinghorn AD. 2002. The role of pharmacognosy in modern medicine. *Expert Opin Pharmacother* 3:77-79.
- Koelle DM. 2006. Vaccines for herpes simplex virus infections. *Curr Opin Investig Drugs* 7:136-141.
- Lai ST. 2005. Treatment of severe acute respiratory syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1-9.
- Lee H, Hanes J, Johnson KA. 2003. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry* 42:14711-14719.

- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. 2005. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:124-131.
- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 276:534-538.
- Lin X, Lubinski JM, Friedman HM. 2004. Immunization strategies to block the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol* 78:2562-2571.
- Liu N, Zhu B, Huang Z, Zhu Y, Chen Q, Guo X, Li G. 2004. [The inhibitive effects of the ethanol extract from Radix et Rhizoma Rhei on the secretion of HBsAg and HBeAg]. *Zhong Yao Cai* 27:419-421.
- Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK, Wu S, Jiang S. 2005. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim Biophys Acta* 1723:270-281.
- Lubinski JM, Jiang M, Hook L, Chang Y, Sarver C, Mastellos D, Lambris JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Friedman HM. 2002. Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J Virol* 76:9232-9241.
- Machha A, Mustafa MR. 2005. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:36-40.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230S-242S.
- Marder M, Paladini AC. 2002. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem* 2:853-867.
- Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M. 1997. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 52:58-64.
- Middleton E Jr. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439:175-182.
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36:1199-1208.
- Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT, Bakker A, Roberts MR, June CH, Jalali S, Lin AA, Pennathur-Das R, Hege KM. 2000. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96:785-793.

- Mogensen TH, Melchjorsen J, Malmgaard L, Casola A, Paludan SR. 2004. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 78:5883-5890.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Muldoon MF, Kritchevsky SB. 1996. Flavonoids and heart disease. *BMJ* 312:458-459.
- Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzolillo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. 1996. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 17:1451-1457.
- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. 2003. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem* 246:193-196.
- Nasemann T, Wassilew SW. 1979. Vaccination for herpes simplex genitalis. *Br J Vener Dis* 55:121-122.
- Nesterova M, Cho-Chung YS. 2004. Killing the messenger: antisense DNA and siRNA. *Curr Drug Targets* 5:683-689.
- Nwankwo JO, Tahnteng JG, Emerole GO. 2000. Inhibition of aflatoxin B1 genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by kolaviron biflavonoids and molecular mechanisms of action. *Eur J Cancer Prev* 9:351-361.
- Ong KC, Khoo HE. 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci* 67:1695-1705.
- Oxford JS, Kelly LS, Davies S, Lambkin R. 1999. Antiviral Testing. In: Cann AJ, ed. *Virus Culture, a practical approach*. Oxford: Oxford university press. pp 201-238.
- Peng A, Gu Y, Lin SY. 2005. Herbal treatment for renal diseases. *Ann Acad Med Singapore* 34:44-51.
- Preiser W, Doerr HW. 2003. Fortschritte bei der Therapie viraler Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 21. Jahrgang:75-83.
- Rabenau H, Weber B, Cinatl J, Bauer G, Doerr HW. 1996. Automatisierte In-vitro-Empfindlichkeitstestung von klinischem Herpes-simplex-Virus-(HSV)-Isolaten mit Hilfe eines In-situ-ELISAs. *Chemotherapie* 5. Jahrgang:204.
- Rafferty MJ, Behrens CK, Muller A, Krammer PH, Walczak H, Schonrich G. 1999. Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: Induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J Exp Med* 190:1103-1114.
- Rafferty MJ, Winau F, Kaufmann SH, Schaible UE, Schonrich G. 2006. CD1 antigen presentation by human dendritic cells as a target for herpes simplex virus immune evasion. *J Immunol* 177:6207-6214.
- Reed LI, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 49:3-497.

- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23:519-534.
- Rosenberg Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP. 2002. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777:219-232.
- Saller R, Buechi S, Meyrat R, Schmidhauser C. 2001. Combined herbal preparation for topical treatment of Herpes labialis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 8:373-382.
- Sandoval IV, Carrasco L. 1997. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* 71:4679-4693.
- Sano M, Suzuki M, Miyase T, Yoshino K, Maeda-Yamamoto M. 1999. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J Agric Food Chem* 47:1906-1910.
- Sheets, R. History and Characterization of the Vero Cell Line. 5-12-2000.  
Ref Type: Report
- Shi YQ, Fukai T, Sakagami H, Kuroda J, Miyaoka R, Tamura M, Yoshida N, Nomura T. 2001. Cytotoxic and DNA damage-inducing activities of low molecular weight phenols from rhubarb. *Anticancer Res* 21:2847-2853.
- Song JM, Lee KH, Seong BL. 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.*
- Spearman C. 1908. The method of "right and wrong cases" ("constantstimuli") without the Gauss's formulae. *British Journal of Psychology* 2:227-242.
- Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, Tyring S, Aoki FY, Slaoui M, Denis M, Vandepapeliere P, Dubin G. 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 347:1652-1661.
- Su YT, Chang HL, Shyue SK, Hsu SL. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 70:229-241.
- Surabhi RM, Gaynor RB. 2002. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 76:12963-12973.
- Szewczuk LM, Penning TM. 2004. Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure-activity relationship study. *J Nat Prod* 67:1777-1782.
- Thiagarajan DG, Bennink MR, Bourquin LD, Kavas FA. 1998. Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium. *Am J Clin Nutr* 68:1394S-1399S.

- Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res* 64:91-100.
- Uchibayashi M. 2001. [Rhubarb in the East and the West]. *Yakushigaku Zasshi* 36:171-174.
- Wang Z, Wang G, Xu H, Wang P. 1996. [Anti-herpes virus action of ethanol-extract from the root and rhizome of *Rheum officinale* Baill.]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 21:364-6, 384.
- Wang ZY, Xu B, Song YY, Wang GT, Xu HZ, Wang XF, Xue YL, Wang ZY, Yu XP. 2003. [Inhibition effects of rhubarb ethanol extract on herpes simplex virus infection in vivo]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 17:169-173.
- Weber B, Cinatl J. 1996. Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. *J European Academy of Dermatology and Venerology* 6:112-126.
- Weber JM, Ruzindana-Umunyana A, Imbeault L, Sircar S. 2003. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res* 58:167-173.
- Woodman OL, Chan EC. 2004. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:786-790.
- Wyde PR, Ambrose MW, Meyerson LR, Gilbert BE. 1993. The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer, against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. *Antiviral Res* 20:145-154.
- Yang ZC, Wang BC, Yang XS, Wang Q, Ran L. 2005. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41:79-81.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr* 59:113-122.
- Yasumura Y, Kawakita Y. 1963. A line of cells derived from African Green Monkey kidney. *Nippon Rinsho*.
- Yokozawa T, Nakagawa T, Oya T, Okubo T, Juneja LR. 2005. Green tea polyphenols and dietary fibre protect against kidney damage in rats with diabetic nephropathy. *J Pharm Pharmacol* 57:773-780.
- Yu Z, Tang Y, Hu D, Li J. 2005. Inhibitory effect of genistein on mouse colon cancer MC-26 cells involved TGF-beta1/Smad pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 333:827-832.

## **Danksagung**

Für die große Unterstützung und die Bereitstellung des Dissertationsthemas möchte ich ganz herzlich Prof. Dr. Doerr danken, ohne den diese Promotion „im zweiten Anlauf“ nicht möglich gewesen wäre und der mir stets mit viel Geduld und Rat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Rabenau und Prof. Dr. Schellenberg für die Bereitstellung der verwendeten Rheumextrakte danken.

Großer Dank und Anerkennung gilt Gabriele Bauer, die mich durch ihren Einsatz in der experimentellen Arbeit unterstützte und dadurch diese Promotion ermöglichte.

Während der drei Jahre in denen ich zuvor als studentische Hilfskraft im Zellkulturlabor des Instituts für Medizinische Virologie angestellt war, konnte ich bereits viele hilfreiche Tätigkeiten erlernen und Einsicht in die Arbeit mit Zellkulturen gewinnen. Hierfür möchte ich besonders Prof. Dr. Cinatl, sowie den Mitarbeiterinnen des Labors danken.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinem Freund Christian Landgraf, die mich jederzeit seelisch und moralisch unterstützen.

# Curriculum vitae von Vera Jütte

---

---

- Geburtsdatum: 24.08.1978
- Geburtsort: Offenbach
- Familienstand: Ledig
- Konfession: Evangelisch

## Berufstätigkeit:

---

Seit 16.02.2006 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II (Gastroenterologie, Pneumologie, Diabetologie und Infektiologie) bei Prof. Dr. med. H. Wietholtz , Klinikum Darmstadt

## Ausbildung:

---

### Schule:

1985-1998 Grundschule und Gymnasium in Offenbach

1995/96 Seaholm High School, Birmingham, MI, USA

Juni 1998 Abitur, Note: 1,1

### Studium:

Oktober 1998 Studienbeginn Humanmedizin, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt

August 2000 Physikum, Note: 3,33

August 2001 1. Staatsexamen, Note: 3

März 2004 2. Staatsexamen, Note: 1,66

Mai 2005 3. Staatsexamen, Note: 1

Gesamtnote: 1,66

### Praktisches Jahr:

1. Terial: Städt. Kliniken Offenbach  
Kardiologie, Prof. Klepzig  
Gastroenterologie, Prof. Dancygier

2. Tertial: Städt. Kliniken Offenbach  
Unfallchirurgie, Prof. Hofmann  
Allgemeinchirurgie, Prof. Nier

3. Tertial: Kantonsspital Nidwalden, CH  
Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Chefarzt Dr. R. Ehmann

### Dissertation:

Thema: „Antivirale Wirksamkeit von Polyphenolen aus Rheum-  
Extrakten gegen Herpes Simplex Virus Typ-1“

Betreut von Prof. Dr. H.W. Doerr im Institut für  
Medizinische Virologie der J.W. Goethe-Universität

### Famulaturen:

Chirurgie: St. Elisabeth-Krankenhaus, Berlin, 2001

Innere Medizin: Korle Bu Teaching Hospital, Accra  
Ghana, August 2002

Gynäkologie: Korle Bu Teaching Hospital, Accra  
Ghana, September 2002

Orthopädie/  
Anästhesie: Praxis und ambulantes OP-Zentrum,  
Dr. A. Misalla, Offenbach, 2003

### Kenntnisse und sonstige Tätigkeiten:

---

Medizin: Grundkurs Sonographie, 2004+2007  
Praktikum im Institut für medizinische  
Mikrobiologie der Universität Puebla,  
Mexiko, 2003  
Ringvorlesung Tropenmedizin, 2001

Fremdsprachen: Englisch, Französisch und Spanisch

Nebenjobs: Stud. Hilfskraft, Institut für Virologie  
Zellkulturlabor, 2000-2003  
*Medi Media*, Gelbe Liste  
Verlagstätigkeit, 1999-2002

Freizeit: Basketball (Verein) seit 1992, Lesen, Reisen

## **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johan Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **„Antivirale Wirksamkeit von Polyphenolen aus Rheum-Extrakten gegen Herpes Simplex Virus Typ-1“**

in dem Institut für Medizinische Virologie der Johan Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. H.W. Doerr mit Unterstützung durch Gabriele Bauer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Promotion eingereicht.

Frankfurt am Main, 23.08.2007

Vera Jütte

.....