

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin,  
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

## **Einfluss des Hormons Vitamin D<sub>3</sub> auf die Hepatitis B sowie Einfluss pflanzlicher Limonoide und Phytosterole auf die Hepatitis-C-Virus-Replikation im Zellkulturmodell**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Claudia Kühne  
aus Dresden

Hamburg 2017

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.07.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Stefan Lüth**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Susanne Polywka**

*Omnia tempus habent.  
Alles hat seine Zeit.*

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	7
1.1	Hepatitis B.....	7
1.1.1	Das Hepatitis-B-Virus.....	7
1.1.2	Infektion und Infektionsverlauf.....	9
1.1.3	Therapie der Hepatitis-B-Infektion .....	10
1.1.4	Hepatitis-B-Virus-Zellmodell .....	11
1.2	Vitamin D <sub>3</sub> .....	12
1.2.1	Der Vitamin-D <sub>3</sub> -Stoffwechsel .....	12
1.2.2	Vitamin D <sub>3</sub> und dessen Bedeutung für die Hepatitis-B-Virus-Infektion .....	14
1.3	Hepatitis C.....	15
1.3.1	Das Hepatitis-C-Virus .....	15
1.3.2	Infektion und Infektionsverlauf.....	16
1.3.3	Therapie der Hepatitis-C-Infektion .....	17
1.3.4	Hepatitis-C-Virus-Zellmodell .....	18
1.4	Pflanzliche Limonoide und Phytosterole aus <i>Trichilia welwitschii</i> .....	19
1.4.1	Bedeutung pflanzlicher Limonoide aus <i>Trichilia welwitschii</i> .....	19
1.4.2	Aufbau und Gewinnung der Limonoide TWF5, TWF9 und TWF10 .....	21
1.4.3	Bedeutung pflanzlicher Phytosterole aus <i>Trichilia welwitschii</i> .....	22
1.4.4	Aufbau und Gewinnung der Phytosterole TWT1 und TTA6 .....	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	24
1.5.1	Zielsetzung und Hypothese I zu Hepatitis B .....	24
1.5.2	Zielsetzung und Hypothese II zu Hepatitis C .....	24
2	Material und Methoden .....	25
2.1	Materialien .....	25
2.1.1	Zelllinien.....	25
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Substanzen.....	25
2.1.3	Lösungen und Medien .....	26
2.1.4	Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Medien .....	27
2.1.5	Kits .....	27
2.1.6	Sonden und Primer.....	27
2.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.8	Gebrauchsmaterialien und Laborgeräte .....	29
2.1.9	Software.....	30
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Zellkultur .....	32
2.2.2	Aussaat und Stimulation der Zellen .....	32

2.2.3	DNA-Extraktion aus Zellkulturüberstand.....	34
2.2.4	Absolute quantitative Realtime-PCR .....	35
2.2.5	Luciferase-Reporter-Assay .....	35
2.2.6	MTT- und CTB-Viabilitätsassay .....	36
2.2.7	HBsAg-Messung .....	36
2.2.8	Statistische Auswertung .....	37
3	Ergebnisse .....	38
3.1	Wirkung von Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> ) .....	38
3.2	Wirkung von Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) .....	39
3.3	Wirkung von Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) .....	41
3.4	Wirkung des Limonoids TWF5 ( <i>Trichilia lactone D5</i> ).....	43
3.5	Wirkung des Limonoids TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ).....	45
3.6	Wirkung des Limonoids TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ) .....	47
3.7	Wirkung des Phytosterols TWT1 .....	48
3.8	Wirkung des Phytosterols TTA6 .....	50
4	Diskussion .....	54
4.1	Vitamin D <sub>3</sub> und dessen Derivate-vermittelte Wirkung auf die HBV-Replikation .....	54
4.1.1	Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> ) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und verringert zeitgleich den rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand .....	54
4.1.2	Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) in HepG2-H1.3-Zellen .....	55
4.1.3	Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) weist möglicherweise in niedrigen Konzentrationen zytotoxische Effekte in HepG2.2.15-Zellen und zellvermehrende Effekte in HepG2-H1.3-Zellen auf .....	55
4.1.4	Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) führt in niedrigen Konzentrationen zu einer Vermehrung des HBV-Oberflächenantigen HBsAg bei gleichbleibender rcDNA-Konzentration im Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen	56
4.1.5	Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) verringert konzentrationsabhängig den HBsAg und rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand von HBV-transgenen HepG2-H1.3-Zellen.....	56
4.2	Wirkung pflanzlicher Limonoide und Phytosterole aus <i>T. welwitschii</i> auf die HCV-Replikation .....	57
4.2.1	Limonoide TWF5 ( <i>Trichilia lactone D5</i> ), TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ) und TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ) zeigen keinen Effekt in HCV-transgenen Zellen.....	57
4.2.2	Das Phytosterol TWT1 zeigt eine konzentrationsabhängige HCV-Reduktion in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen .....	59
4.2.3	Die Konzentration von 25 $\mu$ M des Phytosterols TTA6 wirkt zytotoxisch auf LucUbiNeo-ET .....	60

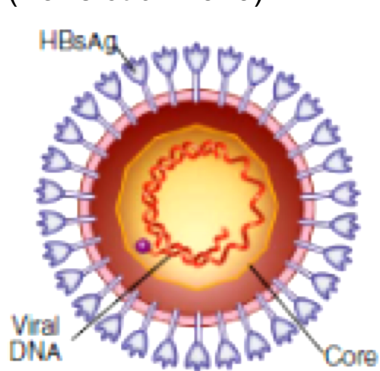
4.2.4	Das Phytosterol TTA6 zeigt eine konzentrationsabhängige HCV-Reduktion in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen .....	60
5	Zusammenfassung .....	63
6	Summary.....	64
7	Abkürzungsverzeichnis .....	65
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Abbildungsverzeichnis .....	82
10	Tabellenverzeichnis .....	84
Anhang der Dissertation .....		85
I.	Effekte von Limonoiden .....	86
II.	Effekte von Phytosterolen .....	95
III.	Konzentrationen der eingesetzten Substanzen .....	98
IV.	Danksagung.....	99
V.	Eidesstattliche Erklärung .....	100

## 1 Einleitung

### 1.1 Hepatitis B

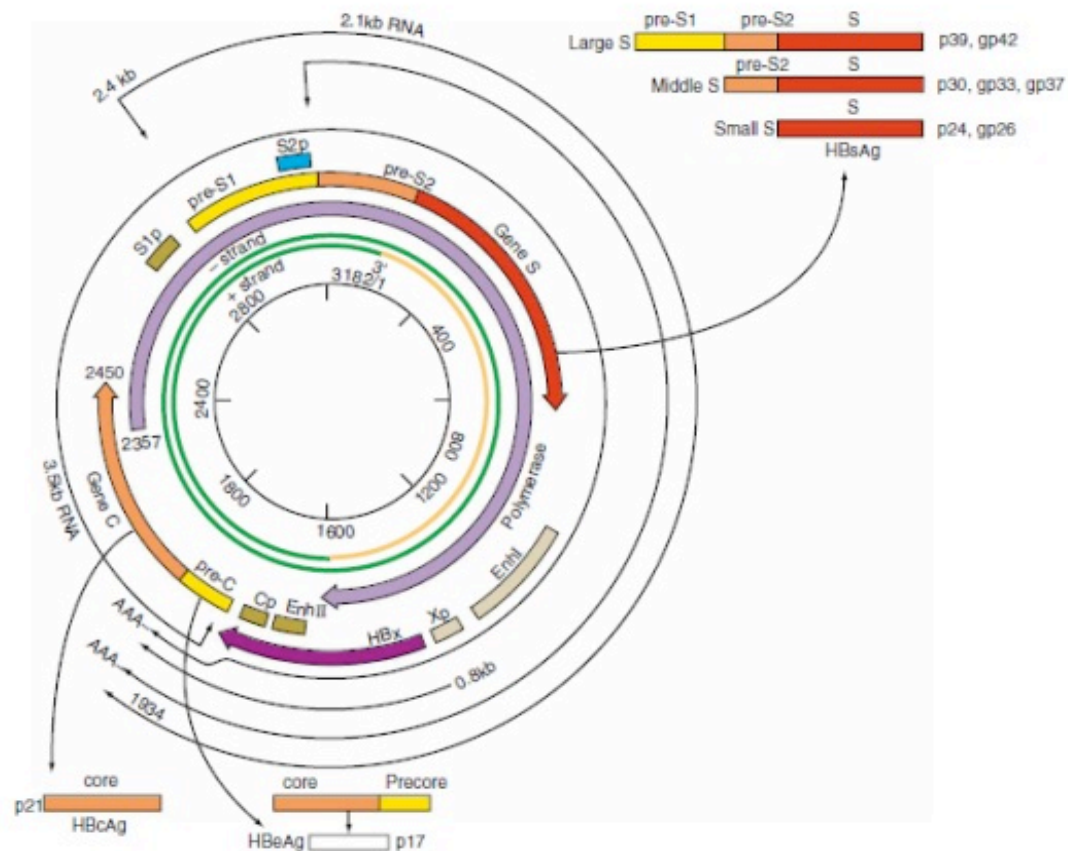
#### 1.1.1 Das Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein behülltes Virus mit einer Größe von 42 nm im Durchmesser. Das ikosaedrische Kernprotein („Hepatitis-B-Core-Antigen“, HBcAg) beinhaltet die virale entspannt-zirkuläre, partiell doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (*relaxed-circular* DNA, rcDNA), die Hepatitis-B-Viruspolymerase und eine Proteinkinase (siehe Abbildung 1). Der Kern ist umhüllt von einer Lipidmembran mit mehreren Oberflächenproteinen („Hepatitis-B-Surface-Antigene“, HBsAg), die in kleine („*Short* Hepatitis-B-Oberflächenproteine“, SHB), mittlere („*Middle* Hepatitis-B-Oberflächenproteine“, MHB) und große („*Large* Hepatitis-B-Oberflächenproteine“, LHB) Oberflächenproteine unterteilt werden (Croagh *et al.* 2015, Koziel und Thio 2010, Jilg *et al.* 2012, Summers *et al.* 1975). Das vollständige Virion wurde von dem englischen Pathologen D. S. Dane entdeckt und nach ihm „Dane-Partikel“ genannt (Dane *et al.* 1970).



**Abbildung 1: Das Hepatitis-B-Viruspartikel.** Bestehend aus Oberflächenantigen (HBsAg), viraler partiell doppelsträngiger DNA und dem ikosaedrischen Kernprotein (aus Koziel und Thio 2010).

Das Hepatitis-B-Virus wird zur Familie der HBV und HBV-ähnlichen tierischen Viruspartikel, den sogenannten *Hepadnaviridae* gezählt. Genauer gehört es zur Gattung der *Orthohepadnaviridae*. Das virale Genom des Hepatitis B Virus ist mit circa 3.200 Nukleotiden Länge sehr klein. Abbildung 2 zeigt das Genom mit seinen 4 überlappenden offenen Leserastern („*open reading frames*“, ORF) für das Oberflächen-Antigen (HBsAg), das Kern-Antigen (HBcAg), das *Envelope*-Antigen (HBeAg) und das Polymerase-Antigen. Das HBeAg dient dabei als Marker für die vorangeschrittene virale Replikation (Jilg *et al.* 2012, Koziel und Thio 2010).



**Abbildung 2: Virales Genom des Hepatitis-B-Virus.** Es beinhaltet die überlappenden Geninformationen für das Kern-Antigen (HBcAg), das *Envelope*-Antigen (HBsAg), welches aus der Kernsequenz und einer Vorläuferkern-Sequenz besteht, das Oberflächen-Antigen (HBsAg) und einer Polymerase (aus Koziel und Thio 2010).

Weltweit gibt es circa 240 - 350 Millionen chronisch Hepatitis B-infizierte Menschen. Wobei als chronische Infektion definiert ist, dass das HBs-Antigen länger als 6 Monate im Blut nachweisbar ist (World Health Organization 2016a, Rehermann 2013, Jilg *et al.* 2012). Die höchste Rate von infizierten Erwachsenen ist mit einer Prävalenz von 5 - 10 % im subsaharischen Teil Afrikas und in Ost-Asien zu finden (World Health Organization 2016a). In Deutschland wird die Zahl der chronisch HBsAg-positiven Personen auf 500.000 geschätzt (Jilg *et al.* 2012). Im Jahr 2015 wurden dem Robert-Koch-Institut (RKI) 3.783 HBV-Infektionen gemeldet, folglich liegt die Inzidenz aktuell bei 2,4 Infektionen pro 100.000 Einwohner. Verglichen mit dem Vorjahr 2014 (0,9 Infektionen pro 100.000 Einwohner) ist ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen (Robert-Koch-Institut 2016). Knapp 700.000 Menschen sterben weltweit jährlich an den Folgen einer akuten oder chronischen Hepatitis-B-Infektion (World Health Organization 2016a, Lozano *et al.* 2012).

Das Hepatitis-B-Virus wurde ursprünglich in 8 Genotypen (A – H) eingeteilt (Jilg *et al.* 2012, Koziel und Thio 2010). Aktuell sind zwei neu entdeckte Genotypen - I und J - hinzugekommen. Die Genotypen können in über 40 Subgenotypen unterteilt werden (Croagh *et al.* 2015, Locarnini *et al.* 2013, Kurbanov *et al.* 2010, Kay und Zoulim 2007, Schaefer 2007). Diese unterschiedlichen Genotypen basieren auf den genetischen Variationen der letzten 8 % des Hepatitis-B-Virus-Genoms (Jilg *et al.* 2012, Koziel und Thio 2010) und weisen eine regionale Zuordnung auf (Abbildung 3). In Europa sind vor allem die Genotypen A (Subtypen A1 – A7) und D (Subtypen D1 –



D4) verbreitet (Zampino *et al.* 2015, Croagh *et al.* 2015, Locarnini *et al.* 2013, Koziel und Thio 2010).

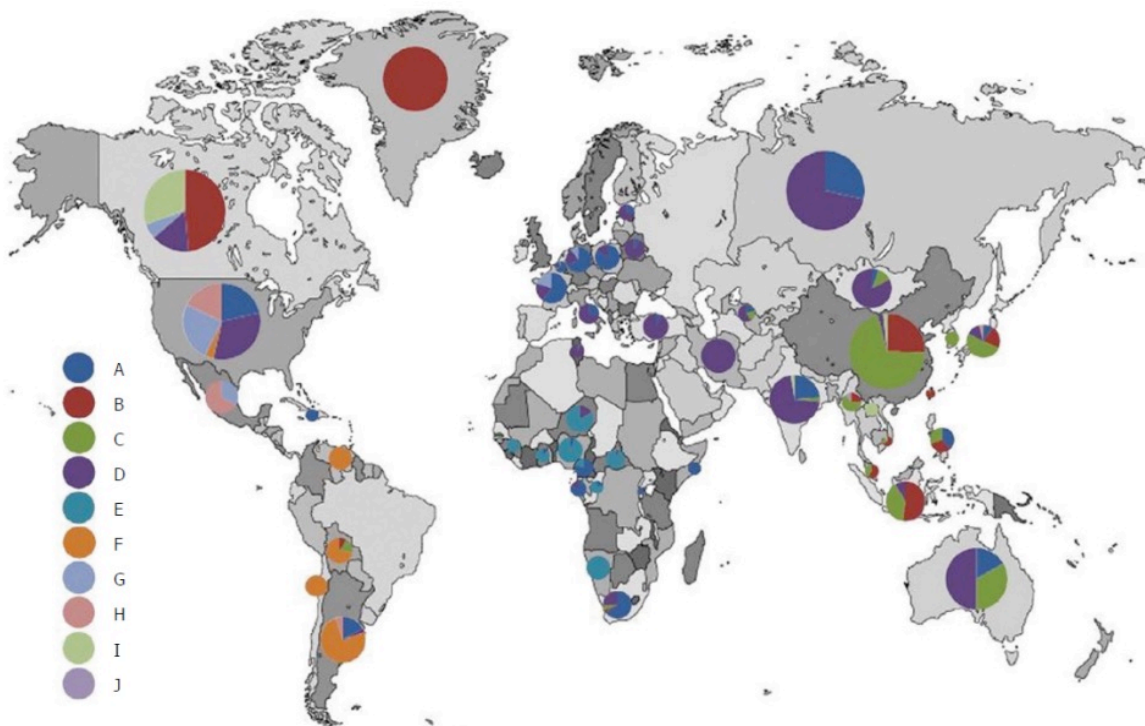


Abbildung 3: Geografische Zuteilung der 10 Hepatitis-B-Virus Genotypen (aus Shi *et al.* 2013).

### 1.1.2 Infektion und Infektionsverlauf

Die Übertragung des Hepatitis-B-Virus erfolgt parenteral, vor allem durch ungeschützten Geschlechtsverkehr, durch Kontakt mit infektiösem Material beim intravenösen Drogengebrauch, über das mütterliche Blut in der Schwangerschaft (perinatal), über Bluttransfusionsprodukte und in der Dialyse (Robert-Koch-Institut 2016). Das Virus weist eine 100-fach effizientere Übertragungsrate nach Nadelstichverletzung auf als das humane Immundefizit-Virus (HIV) (Koziel und Thio 2010). Das bedeutet, bei einer hohen Konzentration von HBV im Blut reichen bereits sehr geringe Blutmengen von 0,1 µl für eine Infektion aus (Cornberg *et al.* 2011).

Seit 1982 ist eine Impfung gegen das Hepatitis-B-Virus mit einem rekombinanten HBs-Antigen verfügbar. 1992 empfahl die World Health Organization die routinemäßige Impfung, drei Jahre später wurde auf Empfehlung des Robert-Koch-Institutes die Impfung auch in den deutschen Impfkalender aufgenommen. Nach vollständiger Grundimmunisierung lassen sich bei 95 % der geimpften Personen Antikörper nachweisen. Jedoch gibt es 5 – 10 % *Nonresponder*, welche nach erfolgter Grundimmunisierung lediglich einen Titer von kleiner 10 IU/l aufweisen (World Health Organization 2016a, Robert Koch Institut 2015a, Cornberg *et al.* 2011).

Ist es zur Übertragung des Virus gekommen, beträgt die mittlere Inkubationszeit 70 – 75 Tage, wobei die Spanne zwischen 30 und 180 Tagen liegt (World Health Organization 2016a, Jilg *et al.* 2012). Das Hepatitis B Virus infiziert vor allem die Hepatozyten, selten aber auch Lymphozyten. Es dringt über einen leberzellspezifischen NTCP (*Natriumtaurocholate Cotransporting Polypeptide*)-Rezeptor mittels Endozytose ein. Die Virionen geben im Zytoplasma des Hepatozyten ihr Kernpartikel ab, wel-

ches dann durch den nuklearen Porenkomplex in den Zellkern eindringt. Im Nukleus schließt sich die virale rcDNA zur kovalent-zirkulär geschlossenen DNA (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) zusammen (Beck und Nassal 2007). In einem infizierten Hepatozyten befinden sich 5 – 50 Kopien dieser cccDNA im Nukleus und machen die Zelle resistent gegen antivirale Behandlung und das körpereigene Immunsystem (Zhang *et al.* 2003, Moraleda *et al.* 1997). Die akute und chronische Leberentzündung (Hepatitis) wird durch die einsetzende körpereigene Immunabwehr, vor allem durch zytotoxische T-Lymphozyten hervorgerufen (Lin *et al.* 2014, Rehermann und Nascimbeni 2005). Ob die Entzündung chronifiziert, hängt vom Alter der Person zum Zeitpunkt der Infektion ab. Bei Kindern, welche in einem Alter von unter 6 Jahren infiziert werden, entwickelt sich in 50 - 90% der Fälle eine chronische Hepatitis (World Health Organization 2016a). Beim Erwachsenen heilen die meisten akuten Hepatitis-B-Infektionen vollständig aus und führen zu einer lebenslangen Immunität. Bei 5 – 10 % der immunkompetenten und bis zu 90 % der immunsupprimierten Personen entwickelt sich eine chronische Verlaufsform (Robert-Koch-Institut 2015a). Wobei als chronisch definiert ist, dass die Infektion länger als 6 Monate besteht und einen positiven HBsAg-Serumspiegel aufweist. Die chronische Infektion kann in 4 Phasen unterteilt werden. Erst in Phase 3, welche gekennzeichnet ist durch eine steigende Inflammation der Leberzellen, bemerken die meisten Patienten erste ikterische Symptome. Komplizierend kommen eventuell extrahepatische Symptome hinzu. Zu den extrahepatischen Symptomen gehören Vaskulitiden, Glomerulonephritiden, Arthritiden und Myalgien, welche durch Hepatitis-B-Antigen-Antikörper-Immunkomplexe bedingt sind (Rehermann 2013, Jilg *et al.* 2012, Koziel und Thio 2010). Als Folge entwickelt circa ein Fünftel der chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Patienten eine Leberzirrhose (Chao *et al.* 2014). Die Raten an Leberzirrhose steigen bei höheren Serumspiegeln an HBV-DNA, Alkoholabusus, zusätzlicher Koinfektion mit HCV oder HIV und einem höheren Alter des Patienten (Lok und McMahon 2007). Des Weiteren kann sich ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) entwickeln, wobei vor allem die Dauer des HBsAg-positiven Trägerstatus entscheidend ist. Bei Patienten mit einer hohen Viruslast (> 2000 IU/ml) erhöht sich das relative Risiko an einem HCC zu erkranken auf Faktor 300 verglichen mit der Normalbevölkerung (Jilg *et al.* 2012).

### 1.1.3 Therapie der Hepatitis-B-Infektion

Die akute Hepatitis-B-Infektion erfordert keine antivirale Therapie, da sie beim immunkompetenten Erwachsenen in 90 – 95 % der Fälle spontan selbst ausheilt. Es wird lediglich symptomatisch behandelt (World Health Organization 2016a, Robert-Koch-Institut 2015a, Tassopoulos *et al.* 1987, McMahon *et al.* 1985).

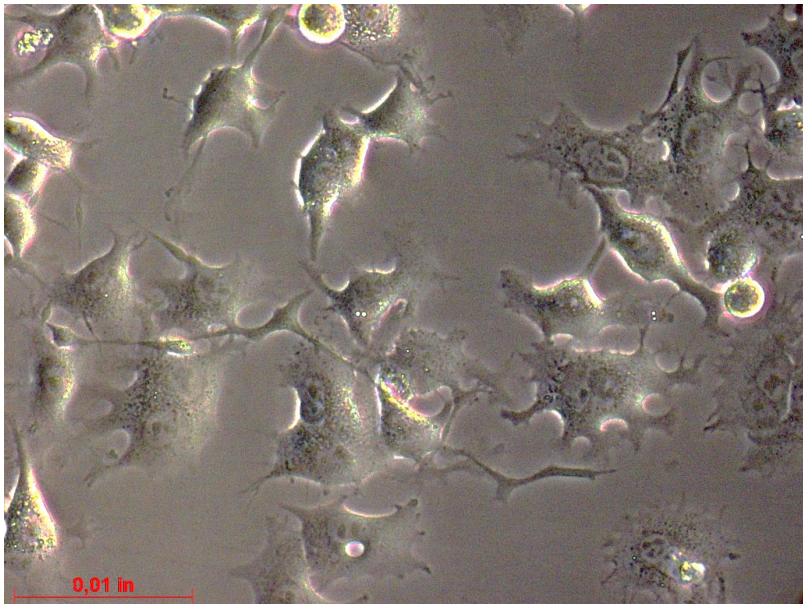
Da das Therapieansprechen bei der chronischen Hepatitis-B-Infektion abhängig vom HBV-Genotyp ist, sollte dieser vor Beginn einer Therapie bestimmt werden (Wiegand *et al.* 2008, Flink *et al.* 2006, Erhardt *et al.* 2005, Janssen *et al.* 2005, Wai *et al.* 2002). Besonders der HBV-Genotyp C scheint schwierig zu therapieren und führt häufiger zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (Chan *et al.* 2009).

In der aktuell veröffentlichten Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) werden drei Substanzgruppen für die Behandlung der chronischen Hepatitis-B-Infektion empfohlen: Alpha-Interferone, Nukleosid-Analoga (zum Beispiel Lamivudin) und Nukleotid-Analoga. Das Ziel der Therapie ist ein ausreichendes Ansprechen, sodass nach 6 Monaten eine Reduktion der HBV-DNA auf < 200 IU/ml vorliegt und sie nach 12 Monaten unter der Nachweisgrenze liegt (Cornberg *et al.* 2011). In den meisten Fällen muss die

Behandlung lebenslang erfolgen (Locarnini *et al.* 2015, World Health Organization 2015a, Zoulim und Locarnini 2013, Jilg *et al.* 2012, Kwon und Lok 2011,). Resistenzen, vor allem gegen Lamivudin, wurden bereits beschrieben (Jilg *et al.* 2012, Zoulim und Locarnini 2009). Gerade in diesem Zusammenhang bietet sich eine Optimierung der Behandlung an.

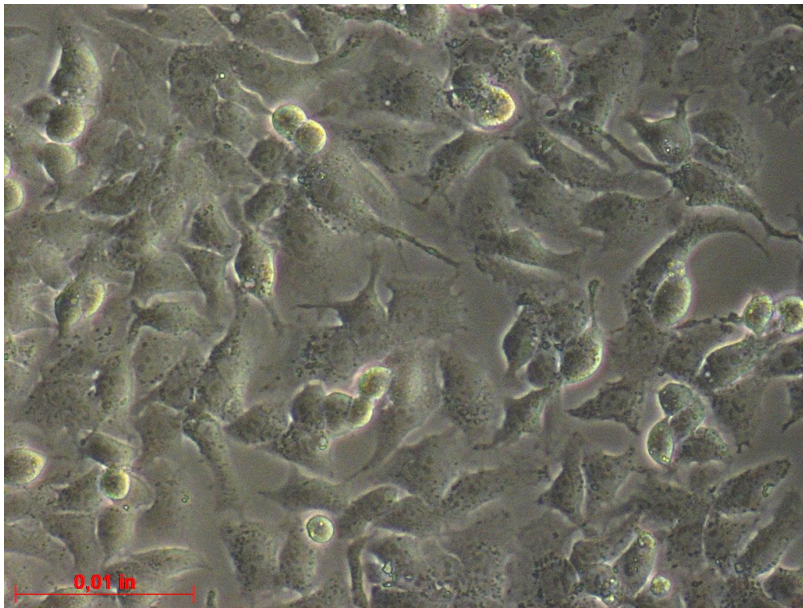
#### 1.1.4 Hepatitis-B-Virus-Zellmodell

Als *in vitro*-Zellmodell der Hepatitis-B-Virusinfektion dient unter anderem die humane Hepatom-Zelllinie HepG2.2.15. Diese wurde 1987 von der Arbeitsgruppe um Sells generiert. Dazu wurde die Hepatom-Zelllinie HepG2 mit dem Vektor „pDolTHBV-1“ transfiziert, welcher zwei „Kopf-an-Schwanz“-Dimere in einer „Schwanz-an-Schwanz“-Orientierung des Hepatitis-B-Virus enthält. Die Zellen produzieren das Oberflächenantigen HBsAg über einen Zeitraum von circa 10 Tagen in einer Konzentration von 4,2 bis 93,4 ng/ml. Ebenfalls produzieren die Zellen das *Envelope*-Antigen HBeAg konstant (Sells *et al.* 1987). Im Überstand der Zellkultur konnte ebenfalls HBsAg und HBeAg, sowie HBV-DNA nachgewiesen werden (Li *et al.* 2007).



**Abbildung 4: HepG2.2.15-Zellen.** HepG2.2.15-Zellen im Zellkulturmedium 24 Stunden nach Aussaat, 32-fache Vergrößerung mit 0,8 Zoom.

Neben der HepG2.2.15-Zelllinie können auch die HepG2-H1.3-Zellen als *in vitro*-Modell eingesetzt werden. Die HepG2-H1.3-Zelllinie stammt ebenfalls von der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 ab, welche mit einer Kopie eines 1,3-fachen Überlängengensoms des Hepatitis-B-Virus transfiziert wurde. Als Nachweis einer HBV-DNA-Persistenz konnte die Produktion von Hepatitis-B-viruspezifischer cccDNA nachgewiesen werden (unpubliziertes Protokoll von Webb und Protzer, Erwähnung in Protzer *et al.* 2007).



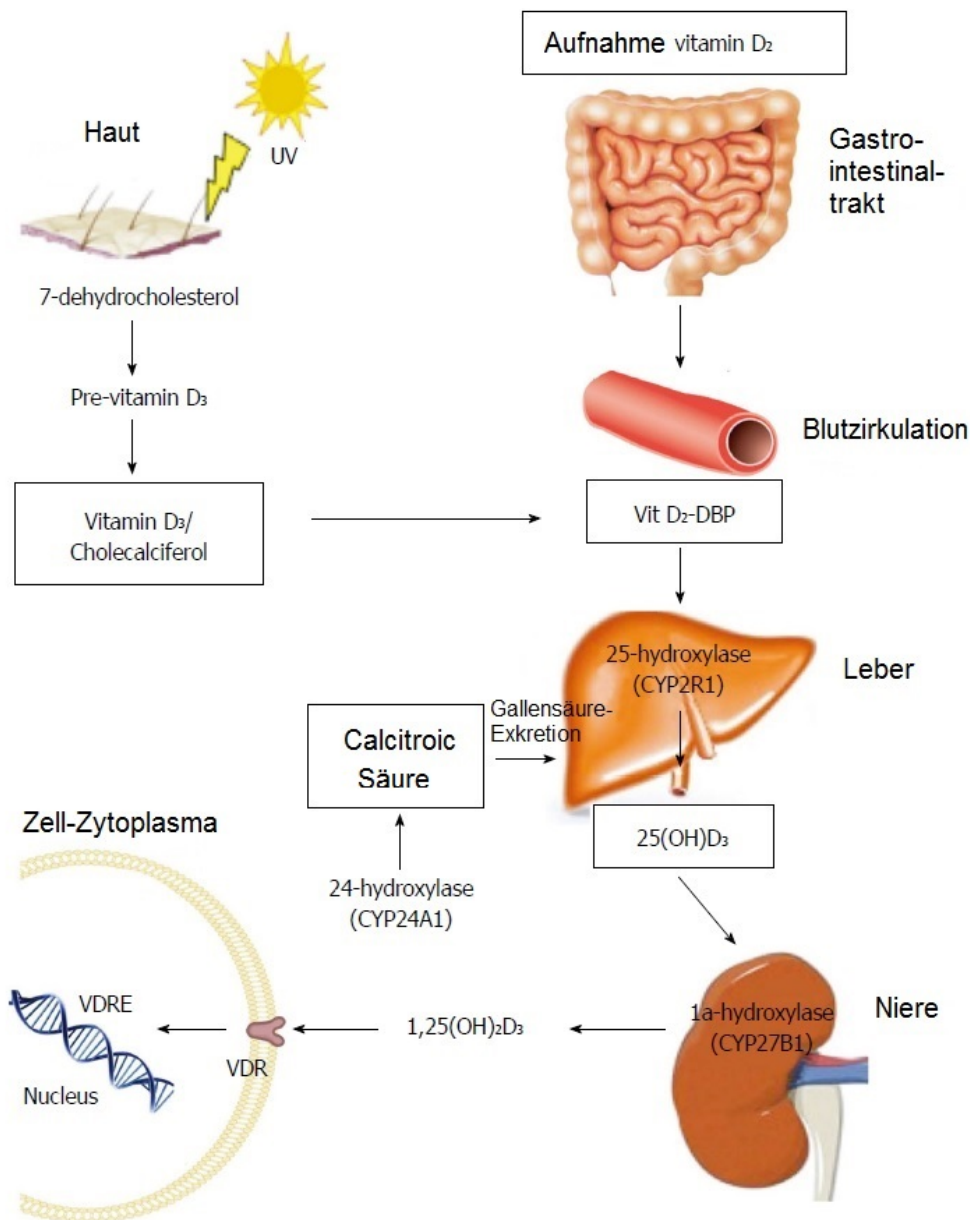
**Abbildung 5: HepG2-H1.3-Zellen.** HepG2-H1.3-Zellen im Zellkulturmedium 24 Stunden nach Aussaat, 32-fache Vergrößerung mit 0,8 Zoom.

## 1.2 Vitamin D<sub>3</sub>

### 1.2.1 Der Vitamin-D<sub>3</sub>-Stoffwechsel

Das Hormon Cholecalciferol, auch Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) genannt, ist für vielfältige physiologische Prozesse im menschlichen Körper notwendig. Die aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub> ist Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) und wird über mehrere Schritte im menschlichen Körper gebildet. Vitamin D<sub>3</sub> kann entweder über die Nahrung, beispielsweise aus bestimmten Fischen (Lachs, Sardinen, Mackrele, Thunfisch), oder als Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) in Nahrungszusätzen aufgenommen werden (Holick 2007). Des Weiteren kann es in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol gebildet werden. Dabei wird aus 7-Dehydrocholesterol im ersten Schritt Previtamin D<sub>3</sub> gebildet, indem der B-Ring durch ultraviolettes Licht (UVB 290 – 213) der Sonne gebrochen wird. Im zweiten Schritt isomerisiert Previtamin D<sub>3</sub> in Vitamin D<sub>3</sub> durch einen nicht katalytischen, wärmesensitiven Prozess. Über das Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) wird Vitamin D<sub>3</sub> in die Leber transportiert und dort durch die mitochondriale Cytochrom-P450-Oxidase 27A1 (CYP27A1) am Kohlenstoffatom C25 hydroxyliert, sodass 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) entsteht. Danach wird 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> ebenfalls über das Vitamin-D-Bindungsprotein in die Niere transportiert. Dort wird es durch das mitochondriale CYP27B1-Enzym (1 $\alpha$ -Hydroxylase) am Kohlenstoffatom C1 zu 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) hydroxyliert (Christakos *et al.* 2016, Bikle 2014, Rosen 2011, Mora *et al.* 2008, Holick 2007) (siehe dazu auch Abbildung 6).





**Abbildung 6: Der Vitamin-D<sub>3</sub>-Stoffwechsel.** Erklärung siehe Text (verändert nach Eliades und Spyrou 2015). DBP = Vitamin-D-Bindungsprotein, VDRE = Vitamin-D-Response-Element, VDR = Vitamin-D-Rezeptor.

Neben den Nierenzellen können aktivierte T-Zellen und wahrscheinlich auch B-Zellen ebenfalls 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> konvertieren, da sie gleichfalls das Enzym 1α-Hydroxylase besitzen. Ebenso können Makrophagen und einige dendritische Zellen (DC) Vitamin D<sub>3</sub> beziehungsweise 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> hydroxylieren (Sigmundsdottir *et al.* 2007, Chen *et al.* 2007, VanEtten und Mathieu 2005, Fritsche *et al.* 2003).

Die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub>, 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, bindet an einen Vitamin-D-Rezeptor (VDR) aus der Familie der ligandenaktivierten Steroidrezeptoren (Margolis und Christakos 2010). Das Gen für den Rezeptor befindet sich auf Chromosom 12 codiert und ist sehr polymorph (Labuda *et al.* 1992, Baker *et al.* 1988). Der Rezeptor wird auf vielen humanen Geweben exprimiert wie beispielsweise in der Leber, im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, sowie in Immunzellen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen) (Konstantakis *et al.* 2016). Bindet nun 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> an diesen Rezeptor, bildet er ein Heterodimer mit einem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und migriert so in den Nucleus. Das Heterodimer bindet dort an

spezifische Vitamin-D-Desoxyribonukleinsäure-Antwortelemente („*Response Elements*“) (VDRE) und kann so die Expression von über 200 Genen regulieren (Elangovan *et al.* 2017, Lin 2016, Christakos *et al.* 2016, Bouillon *et al.* 2008). Die aktive Form 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ist somit an vielfältigen immunmodulatorischen Effekten beteiligt (Holick und Garabedian 2006, Holick 2006, Penna *et al.* 2005, Dusso *et al.* 2005, DeLuca 2004, Bouillon 2001). Sie inhibiert beispielsweise die T-Zell-Proliferation und die CD8<sup>+</sup>-zellvermittelte Zytotoxizität und reduziert die Expression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Yang und Burnstein 2003, Meehan *et al.* 1992, Rigby *et al.* 1987, Reichel *et al.* 1987, Bhalla *et al.* 1986, Lemire *et al.* 1985, Lemire *et al.* 1984, Rigby *et al.* 1984). Niedrige Vitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegel sind assoziiert mit zahlreichen malignen Erkrankungen wie Kolonkarzinom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom (Garland *et al.* 2006, Giovannucci *et al.* 2006, Gorham *et al.* 2005, Feskanich *et al.* 2004, Ahonen *et al.* 2000) sowie mit Autoimmunerkrankungen, kardiovaskulären Erkrankungen, Insulinresistenz und infektiösen Erkrankungen (Garland *et al.* 2006, Zittermann 2006, VanAmerongen *et al.* 2004, Chiu *et al.* 2004, Holick 2004, Muhe *et al.* 1997, Davies *et al.* 1985). Abgebaut wird 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> durch das Enzym 24-Hydroxylase (CYP24A1), welches sich in den Nieren und im Interstitium befindet (Akeno *et al.* 1997). Es spaltet 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Calcitroic-Säure, welche dann anschließend mit der Galle ausgeschieden wird (Mora *et al.* 2008) (siehe dazu auch Abbildung 6).

### 1.2.2 Vitamin D<sub>3</sub> und dessen Bedeutung für die Hepatitis-B-Virus-Infektion

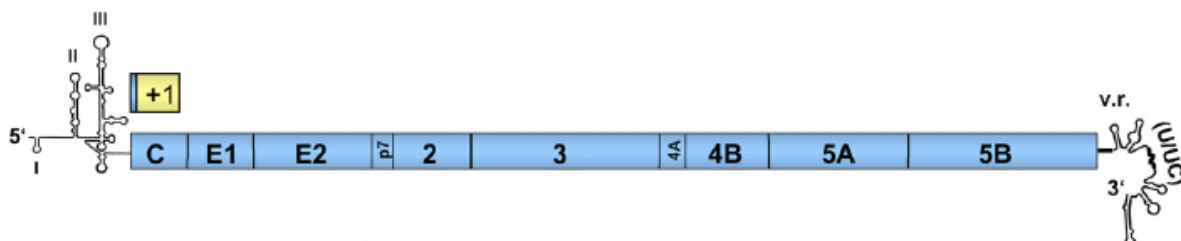
Derzeit eingesetzte Medikamente in der Hepatitis-B-Therapie führen nicht immer zu der erwünschten Reduktion der Viruslast. Das Ansprechen der antiviralen Therapie hängt dabei von vielfältigen Faktoren ab. In einer klinischen Studie mit 203 chronisch Hepatitis-B-infizierten Patienten konnte gezeigt werden, dass das Therapieansprechen bei niedrigen Vitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegeln vermindert ist (Farnik *et al.* 2013). Die Arbeitsgruppe um Chen *et al.* sieht ebenfalls einen Zusammenhang zwischen niedrigen 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegeln und erhöhten HBV-DNA-Spiegeln in einem Kollektiv von 128 westchinesischen Patienten (Chen *et al.* 2015). In einer anderen Studie mit 426 chinesischen Patienten, welche an chronischer Hepatitis-B-Infektion leiden, konnte gezeigt werden, dass niedrige 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegel mit einer erhöhten Anzahl an klinischen Ereignissen (in der Studie definiert als ein Auftreten von hepatozellulärem Karzinom, Lebertransplantation oder Tod) assoziiert ist (Wong *et al.* 2015). In einer aktuellen Studie mit 400 Patienten bestätigt die Arbeitsgruppe um Hoan *et al.* die vorherigen Ergebnisse und kommt zu dem Schluss, dass ein Defizit von Vitamin D<sub>3</sub> bei chronisch Hepatitis-B-Infizierten invers korreliert zum HBV-DNA-Serumspiegel sowie zu mehr Lebererkrankungen und mehr Todesfällen führt (Hoan *et al.* 2016). Auf der anderen Seite konnte aktuell eine große multizentrische Studie mit insgesamt 740 Patienten aus verschiedenen Ländern keine Assoziation zwischen Vitamin D<sub>3</sub> und HBV-DNA-Serumspiegeln feststellen (Chan *et al.* 2015). Ein möglicher Wirkmechanismus ist nach derzeitigem Literaturstand noch unbekannt. Eine Empfehlung zur prophylaktischen Supplementation von Vitamin D während der antiviralen HBV-Therapie wurde bereits ausgesprochen (Hoan *et al.* 2016). Zur generellen Übernahme der Empfehlung in Leitlinien müssen noch genauere Aussagen zu dem Zusammenhang zwischen Hepatitis-B-Virusinfektion und Vitamin D<sub>3</sub> getroffen und ein Wirkmechanismus identifiziert werden.

## 1.3 Hepatitis C

### 1.3.1 Das Hepatitis-C-Virus

Erst in den späten 1980er-Jahren konnte durch die Arbeitsgruppen um Houghtons und Bradley das bisher als Non-A-Non-B Hepatitisvirus bezeichnete Hepatitis-C-Virus (HCV) isoliert werden (Ray und Thomas 2010, Choo *et al.* 1989). Das Hepatitis C Virus wird der Familie der *Flaviviridae* und der Gattung der *Hepaciviridae* zugeordnet. Es ist ein kleines behülltes Virus von ungefähr 40 – 80 nm Durchmesser und einer ikosaedrischen Nukleokapsid-Hülle. Der strukturelle Aufbau des Virions ist jedoch bisher schlecht erforscht. Die Plus-Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNA) des Virus ist charakterisiert durch eine hohe genetische Variabilität, mit Ausnahme der NTR-Region („*nontranslated RNA*“) und der 5'-terminalen Hälfte der für den Kern codierenden Region (Dubuisson und Cosset 2014, Catanese *et al.* 2013, Rehermann 2013, Meisel *et al.* 2012, Ray und Thomas 2010, Georgel *et al.* 2010, Moradpour *et al.* 2007, Bartenschlager und Sparacio 2007, Kato 2001).

Die Abbildung 7 zeigt das virale Genom des Hepatitis-C-Virus mit einer Länge von 9600 Nukleotiden. Es beinhaltet die Informationen für sogenannte strukturelle Proteine, das Kapsel-Protein „C“ und die beiden Hüllproteine „E1“ und „E2“. Zu den Genen, die wichtig für die virale Replikation sind, gehört „p7“, welches für einen Ionenkanal der Viroporin-Familie codiert und das nicht-strukturelle Gen „NS2“, welches für eine Cystein-Protease codiert. Das nicht-strukturelle Gen „NS3“ codiert für eine Serin-Protease und eine NTPase/Helicase, „NS4A“ dient ihm dabei als Kofaktor. „NS4B“ bildet ein membranöses Vesikel, „NS5A“ dient der RNA-Replikation. Das fünfte nicht-strukturelle Gen „NS5B“ codiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Ray und Thomas 2010, Bartenschlager und Sparacio 2007).



**Abbildung 7: Virales Genom des Hepatitis-C-Virus.** Das Genom beinhaltet die strukturellen Gene für das Kapsel-Protein (C), die beiden Hüllproteine (E1, E2), zwei weitere Proteine, die wichtig sind für die virale Replikation: p7 (Ionenkanal) und das nicht-strukturelle Protein 2 (NS2) sowie fünf weitere nicht-strukturelle Proteine (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (aus Bartenschlager und Sparacio 2007, Ray und Thomas 2010).

Weltweit gibt es circa 130 - 170 Millionen chronisch HCV-infizierte Menschen, dies entspricht einer globalen Prävalenz von circa 2,5 %. Als chronische Infektion ist definiert, dass die Hepatitis-C-Virus-RNA länger als 6 Monate im Blut nachweisbar ist. Vor allem in Afrika und in Zentral- sowie Ost-Asien ist eine hohe Prävalenz vorzufinden (World Health Organization 2016b, Petruzzello *et al.* 2016). Im Rahmen einer Studie wurden von 2008 bis 2011 in einer Stichprobe rund 7.000 Deutsche untersucht, wobei eine Prävalenz von 0,3 % für den Anti-HCV-Trägerstatus festgestellt wurde (Poethko-Muller *et al.* 2013). Im Jahr 2015 wurden dem Robert-Koch-Institut 4.887 Fälle einer erstdiagnostizierten Hepatitis-C-Virus-Infektion gemeldet, was einer Inzidenz von 6,1 pro 100.000 Einwohner entspricht. Verglichen mit dem Vorjahr 2014 (7,2 pro 100.000 Einwohner) ist die Fallzahl sinkend, jedoch noch höher als in den Jahren zuvor (Median der Jahre 2007 bis 2013: 6,4 pro 100.000 Einwohner) (Robert-

Koch-Institut 2016). Bis zu 700.000 Menschen sterben weltweit jährlich an den Folgen einer akuten oder chronischen Hepatitis-C-Infektion (World Health Organization 2016b).

Das Hepatitis-C-Virus wurde in 6 Genotypen (1 – 6) und circa 100 Subgenotypen eingeteilt (Ray und Thomas 2010, Bartenschlager und Sparacio 2007, Simmonds et al. 1993). Aktuell wurde eine neue Sequenz entdeckt und als Genotyp 7 bezeichnet (Nakano *et al.* 2012, Meisel *et al.* 2012). Diese unterschiedlichen Genotypen basieren auf einer Divergenz in den Gensequenzen, wobei sich die Nukleotid-Sequenz zwischen den Genotypen bis zu 35 % unterscheidet. Jeder Genotyp kann weiterhin in 67 feste und 20 provisorische Subtypen unterteilt werden. Die Stränge der einzelnen Subtypen unterscheiden sich bis zu 15 % in ihrer Nukleotid-Sequenz (Smith *et al.* 1997). Die Häufigkeit der HCV-Genotypen kann regional zugeordnet werden (siehe Abbildung 8). Der Subtyp 1b kommt dabei weltweit am häufigsten vor, in Deutschland eher der Subtyp 1a (Kartashev *et al.* 2016, Gower *et al.* 2014, Meisel *et al.* 2012, Bartenschlager und Sparacio 2007).

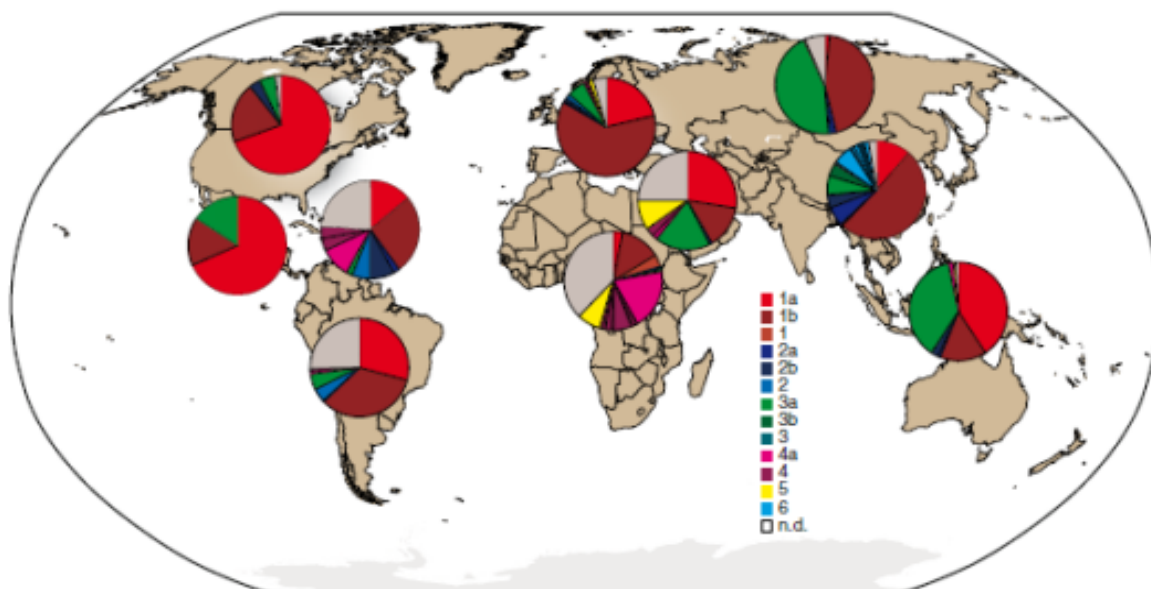


Abbildung 8: Geografische Zuteilung der 6 Hepatitis-C-Virus-Genotypen (Ray und Thomas 2010).

### 1.3.2 Infektion und Infektionsverlauf

Die Übertragung des Hepatitis-C-Virus erfolgt parenteral, vor allem durch intravenösen Drogengebrauch, durch Blutprodukte, bei ungeschütztem homosexuellen Geschlechtsverkehr, in der Dialyse und über das mütterliche Blut in der Schwangerschaft (perinatal) (Robert-Koch-Institut 2016). Derzeit ist keine Immunisierung gegen das Hepatitis-C-Virus vorhanden, es wird jedoch auf diesem Gebiet ausgiebig geforscht (World Health Organization 2016b).

Ist es zur Übertragung des Virus gekommen, beträgt die Inkubationszeit zwischen 14 und 180 Tagen (World Health Organization 2016b). Das Hepatitis-C-Virus infiziert vor allem die Hepatozyten. Es dringt mithilfe seiner Oberflächen-Glycoproteine E1 und E2 über Bindung an wirtszellspezifische Rezeptoren in die Zelle ein. Die an der Zelloberfläche gebundenen Viruspartikel werden Clathrin-abhängig mittels Endozytose aufgenommen und im Endosom fusioniert. Das virale RNA-Genom wird somit in das Zytosol der Hepatozyte freigesetzt und direkt translatiert. Virale und wirtszelleigene



Proteasen produzieren die 10 virusspezifischen Proteine (C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Nach dem Zusammenbau des Virions wird es über den sekretorischen Weg aus der Hepatozyte heraus geschleust (Dubuisson und Cosset 2014, Lohmann 2013, Coller *et al.* 2012, Meisel *et al.* 2012, Bartenschlager und Sparacio 2007). Der HCV-Kern induziert pro- und anti-apoptotische Mechanismen, welche mit dem Hepatozyten-Zelluntergang und nachfolgend mit der Leberfibrose assoziiert sind (Shiu *et al.* 2013, Jahan *et al.* 2011, Nakamura *et al.* 2011, Berg *et al.* 2009, Malhi und Gores 2008, Siavoshian *et al.* 2005). Während einer akuten Infektion weisen die Patienten in 75 – 80 % der Fälle keine oder nur unspezifische Symptome auf. Zu den akuten Symptomen gehören Fieber, Übelkeit, verminderter Appetit, Erbrechen, Abdominalschmerzen, dunkler Urin, entfärbter Stuhl und ikterische Verfärbung der Skleren und der Haut. In circa 15 bis zu 45 % der Fälle ist das Virus ohne antivirale Therapie innerhalb von 6 Monaten nicht mehr im Blut nachweisbar. In 50 – 85 % der Fälle entwickelt sich eine chronische Hepatitis-C-Virusinfektion (World Health Organization 2016b, Robert-Koch-Institut 2015b, Santantonio *et al.* 2006, Corey *et al.* 2006, Thimme *et al.* 2001). Die chronische HCV-Infektion verläuft in der Regel in Schüben und ist gekennzeichnet durch eine persistierende Entzündung der Leber (Meisel *et al.* 2012, Rosen und Gretch 1999). 40 – 76 % der Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Virusinfektion weisen im Verlauf mindestens ein extrahepatisches Symptom auf (Ferri *et al.* 2007). Zu den extrahepatischen Erkrankungen, deren Zusammenhang als gesichert gilt, gehören solche des endokrinen Formenkreises wie Diabetes Mellitus, des rheumatischen Formenkreises (gemischte Kryoglobulinämie, Kryoglobulinämische Vaskulitis, periphere Neuropathie, membrano-proliferative Glomerulonephritis, membranöse Glomerulonephritis) und des hämatologischen Formenkreises (Non-Hodgkin-Lymphome, Monoklonale Gammopathie (Ferri *et al.* 2007, Zignego *et al.* 2007, Hermine *et al.* 2002). Des Weiteren entwickeln von den persistent infizierten Personen bis zu 30 % eine Leberzirrhose (Robert-Koch-Institut 2015b, Lin *et al.* 2014, Ray und Thomas 2010). Die Raten an Leberzirrhose steigen bei deutlich erhöhten Lebertransaminasen-Werten (Erhöhungen um mehr als 3 – 5-fach über der Norm), bei männlichem Geschlecht, bei höherem Lebensalter, bei Infektionen, bei chronischem Alkoholabusus, bei Koinfektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) oder humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und bei chronischer Hämodialyse an (Thein *et al.* 2008, Ryder *et al.* 2004, Hui *et al.* 2003, Alberti und Benvegna 2003, Ghany *et al.* 2003, Adinolfi *et al.* 2001, Pessione *et al.* 1998, DiBisceglie 1997). Bis zu 25 % der Leberzirrhose-Patienten entwickeln im weiteren Verlauf ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) (Ray und Thomas 2010).

### 1.3.3 Therapie der Hepatitis-C-Infektion

Anders als bei der akuten Hepatitis-B-Infektion sollte die akute Hepatitis-C-Infektion medikamentös antiviral behandelt werden, denn Patienten, die später als 4 – 6 Monate nach Beginn einer akuten Hepatitis-C-Infektion behandelt werden, zeigen ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Medikamente (DeRosa *et al.* 2006, Santantonio *et al.* 2005). Bis zum Jahr 2013 wurde die akute Hepatitis-C-Virusinfektion in Deutschland mit einer über 24 Wochen andauernden Therapie mit Interferon- $\alpha$  oder pegyliertem Interferon- $\alpha$  behandelt (Meisel *et al.* 2012, Sarrazin *et al.* 2010). Die dabei als Ansprechmarker geltende „sustained virologic response“ (SVR)-Rate (dauerhaftes virologisches Therapieansprechen) betrug unter oben genannter Therapie 71 – 98 %. Eine SVR-Rate von 71 – 98 % bedeutet dabei, dass bei 71 – 98 % der durch oben genannte Therapie behandelten akuten Hepatitis-C-Infektionsfälle die HCV-

RNA im Blut 24 Wochen nach Therapieende durch einen sensitiven Test nicht mehr nachweisbar war (Sarrazin *et al.* 2010).

Die chronische Hepatitis-C-Infektion wurde bis 2013 in Deutschland mit einer Kombination aus Interferon- $\alpha$  und Ribavirin als Standardtherapie behandelt (Sarrazin *et al.* 2010). Dies führte zu durchschnittlichen SVR-Raten von 40 – 50 %, wobei die Ansprechrate stark vom viralen Genotyp abhing. So führte die Behandlung vom HCV-Genotyp 2 oder 3 zu SVR-Raten von 70 – 80 % und beim häufigsten Genotyp 1 lediglich zu einer SVR von 40 – 50 % (Nakamoto *et al.* 2015). Da die Therapie mit Interferon- $\alpha$  häufige und starke Nebenwirkungen wie Depressionen, Blutbildveränderungen, Hautausschläge, Schilddrüsenüber- oder -unterfunktion hervorruft, wurde stark an einer neuen Therapieform geforscht (Sarrazin *et al.* 2010, Manns *et al.* 2009, Schaefer *et al.* 2008, Hillier *et al.* 2006, Fried *et al.* 2002). Seit 2011 sind neue, so genannte „*direct-acting antiviral agents*“ (DAAs) (direkt-wirksam antivirale Agenzien) zur Therapie der chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion zugelassen. In Studien konnten gute Ansprechraten bei geringen Nebenwirkungen dokumentiert werden. In der QUEST-1/2-Studie zeigte sich beispielsweise eine SVR von 84 % (Jacobson *et al.* 2014, Manns *et al.* 2014); und in der FISSION-Studie konnte bei einer Kombinationsbehandlung mit dem DAA Sofosbuvir und Ribavirin eine SVR-Rate von 95 % gezeigt werden. Dabei waren die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen Übelkeit und Kopfschmerzen (Lawitz *et al.* 2013).

Nach diesen Ergebnissen veröffentlichte die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) am 18.02.2015 eine ergänzende Empfehlung zur Behandlung der chronischen Hepatitis-C-Infektion. In dieser sind neben den konventionellen Substanzen wie pegyliertes Interferon- $\alpha$  und Ribavirin auch neue, direkt-wirksame antivirale Agenzien (DAAs) empfohlen. Da die Therapieansprechrate stark abhängig vom HCV-Genotyp ist, sollte vor Beginn einer Therapie der Genotyp bestimmt werden. Je nach Genotyp werden in der deutschen Leitlinie entsprechende Therapieoptionen empfohlen (Sarrazin *et al.* 2014).

### 1.3.4 Hepatitis-C-Virus-Zellmodell

Um die Effekte der Hepatitis-C-Virusprotein-Expression beurteilen zu können, kann unter anderem eine HCV-transgene Zelllinie mit Replikonsystem benutzt werden. Die von der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 abstammenden LucUbiNeo-ET-Zellen tragen ein solches Replikonsystem in sich und codieren für den Hepatitis-C-Virus-Genotyp 1b. Das Replikon enthält die genetische Information für die nicht-strukturellen Proteine „NS3“, „NS4A“, „NS4B“, „NS5A“ und „NS5B“. Zusätzlich beinhaltet es das Enzym *Firefly-Luciferase* („Ffl-luc“), den Selektionsmarker für die Neomycin-Phosphotransferase („neo“) unter der Kontrolle des Promotors Ubiquitin („ubi“). Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus (E-IRES) dient der Replikationskontrolle der nicht-strukturellen HCV-Proteine (Abbildung 9). Zur Selektion der Zellen, welche das Replikonsystem besitzen, wurde Geneticin/G418 verwendet. Der Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase spaltet das Geneticin/G418, andernfalls würden die Zellen zugrunde gehen (Bartenschlager 2005, Frese *et al.* 2003). Über das *Firefly-Luciferase*-Enzym kann somit eine präzise Quantifizierung der HCV-Replikation durchgeführt werden (Krieger *et al.* 2001). In Studien konnte eine Steigerung der *Firefly-Luciferase*-Aktivität bis 72 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden (Bartenschlager und Sparacio 2007).



**Abbildung 9: Aufbau des Replikons der LucUbiNeo-ET-Zellen (HCV Genotyp 1b).** Das Replikon enthält die genetische Information für die nicht-strukturellen Proteine „NS3“, „NS4A“, „NS4B“, „NS5A“ und „NS5B“. Zusätzlich beinhaltet es das Enzym *Firefly-Luciferase* („Ffl-luc“), den Selektionsmarker für die Neomycin-Phosphotransferase („neo“) und den Selektionsmarker für Ubiquitin („ubi“). Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus (E-IRES) dient der Replikationskontrolle der nicht-strukturellen HCV-Proteine (Bartenschlager 2005).

Neben den LucUbiNeo-ET Zellen, welche für den HCV-Genotyp 1b stehen, können auch andere Hepatitis-C-Virus-transgene Zelllinien eingesetzt werden. So beispielsweise die ebenfalls von der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 abstammenden JFH-LucUbiNeo-Zellen. Diese codieren für den HCV-Genotyp 2a. Dieser Genotyp-Klon wurde aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis isoliert, weswegen er „*Japanese Fulminant Hepatitis*“ (JFH) genannt wird (Kato *et al.* 2003). Das Replikon besteht ebenfalls aus den Geninformationen für die nicht-strukturellen Proteine „NS2“, „NS3“, „NS4A“, „NS4B“, „NS5A“ und „NS5B“. Anders als bei den LucUbiNeo-ET-Zellen besitzen die JFH-LucUbiNeo-Zellen auch die Geninformationen für die Strukturproteine des Kerns („C“) und der Hülle („E1“, „E2“) sowie einen Ionenkanal („p7“). Ebenfalls beinhaltet das Replikon das Enzym *Firefly-Luciferase* („Ffl-luc“), den Selektionsmarker für die Neomycin-Phosphotransferase („neo“) unter der Kontrolle des Promotors Ubiquitin („ubi“). Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus (E-IRES) dient der Replikationskontrolle der nicht-strukturellen HCV-Proteine (siehe Abbildung 10) (Bartenschlager 2005, Frese *et al.* 2003). Die JFH-LucUbiNeo-Zellen benötigen anders als die LucUbiNeo-ET-Zellen keine Selektion durch Geneticin/G418, da sie sich auch so effizient replizieren (Kato *et al.* 2003).



**Abbildung 10: Aufbau des Replikons der JFH-LucUbiNeo-Zellen (HCV Genotyp 2a).** Das Replikon enthält die genetische Information für die Strukturproteine „C“, „E1“, „E2“ und „p7“, sowie die nicht-strukturellen Proteine „NS3“, „NS4A“, „NS4B“, „NS5A“ und „NS5B“. Zusätzlich beinhaltet es das Enzym *Firefly-Luciferase* („Ffl-luc“), den Selektionsmarker für die Neomycin-Phosphotransferase („neo“) und den Selektionsmarker für Ubiquitin („ubi“). Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus (E-IRES) dient der Replikationskontrolle der nicht-strukturellen HCV-Proteine (Abbildung abgewandelt aus Bartenschlager 2005).

Die infektiösen Hüllproteine E1 und E2 konnten im Versuch nachgewiesen werden. Das somit *in vitro* generierte Hepatitis-C-Virus ist infektiös für Huh7-Zellen und Schimpansen (Wakita *et al.* 2005). Anders als bei den LucUbiNeo-ET-Zellen konnte eine Steigerung der *Firefly-Luciferase* von JFH-LucUbiNeo-Zellen nur bis 24 Stunden nach Infektion der Zellen gemessen werden. Danach stellte sich bis zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Infektion ein Plateau ein (Bartenschlager und Sparacio 2007).

## 1.4 Pflanzliche Limonoide und Phytosterole aus *Trichilia welwitschii*

### 1.4.1 Bedeutung pflanzlicher Limonoide aus *Trichilia welwitschii*

Die Baumspezies *Trichilia welwitschii* gehört zur Familie der *Meliaceae* (auch genannt *Sapindales*). Die *Meliaceae*-Familie besteht aus circa 50 Gattungen, die Gattung *Trichilia* aus ungefähr 90 Spezies. Die Bäume der *Trichilia*-Spezies befinden sich vor allem in tropischen sowie in subtropischen Gebieten (siehe Abbildung 11) (Gouvêa *et al.* 2008, Angiosperm Phylogeny Website Version 13). Der große Baum

*Trichilia welwitschii* ist vor allem in Nigeria, Kamerun, Angola und Gabun heimisch (Louppe et al. 2008).



Abbildung 11: Vorkommen der Gattung *Meliaceae* (Angiosperm Phylogeny Website Version 13).

Da Pflanzen aus der Familie der *Meliaceae* in der traditionellen afrikanischen Medizin unter anderem bei Leberbeschwerden und Ikterus eingesetzt werden, liegt das Interesse darin, die Wirkstoffe zu klassifizieren (Galani et al. 2015). Pflanzen enthalten von Natur aus verschiedene sekundäre Metaboliten, die für die Wirkung in der traditionellen afrikanischen Medizin sprechen könnten. Aus unterschiedlichen Gattungen der Familie *Meliaceae* wurden bereits verschiedene Limonoide als sekundäre Metaboliten isoliert und klassifiziert (Tundis et al. 2012, Gouvêa et al. 2008, Hasegawa und Miyake 1996). So wurden beispielsweise sechs neue Limonoide aus dem südafrikanischen Baum *Turraea floribunda* (Familie der *Meliaceae*) (McFarland et al. 2004), drei neue Limonoide aus dem madagassischen Baum *Neobeguea leandreana* (*Meliaceae*) (Coombes et al. 2003), sieben neue Limonoide aus dem madagassischen Baum *Quivisia papinae* (*Meliaceae*) (Coombes et al. 2007), zwei neue Limonoide aus *Astrotrichilia voamatata* (*Meliaceae*) (Mulholland et al. 2000) und drei neue Limonoide aus *Trichilia rubescens* (*Meliaceae*) (Tsamo Tontsa et al. 2013) isoliert. Da gezeigt werden konnte, dass verschiedene Limonoide antivirale Effekte hervorrufen, könnten diese Stoffe eine Erklärung für den hepatoprotektiven Effekt der *Meliaceae* sein. Die bisher publizierte antivirale Wirkung von Limonoiden bezog sich auf das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) und auf das Herpes-Simplex-1-Virus (HSV-1) (Langeswaran et al. 2012, Champagne et al. 1992). Jedoch konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie mit Extrakten aus den Wurzeln von *Trichilia dregeana* (*Meliaceae*) nachgewiesen werden, dass starke antivirale Aktivität gegen das Hepatitis-C-Virus vorhanden ist (Galani et al. 2015). Auch die Arbeitsgruppe um Wahyuni konnte eine signifikante Inhibition der Viruseintrittsschritte von HCV durch Ethanolextrakte von *Toona sureni* (*Meliaceae*) nachweisen (Wahyuni et al. 2013). Die wirksamen sekundären Metaboliten von *Toona sureni* wurden bisher noch nicht isoliert und klassifiziert, sodass möglicherweise Limonoide an der Wirkung beteiligt sind. Diese befinden sich, wie oben aufgeführt, sehr häufig in Pflanzen der *Meliaceae*-Familie. Ein weiterer Hinweis in diese Richtung ist die Arbeit von Germanò, in welcher Limonoide aus *Trichilia emetica* (*Meliaceae*) als verantwortlich für den hepatoprotektiven Effekt bei chloroforminduzierter Leberzerstörung in Ratten gemacht wurden (Germanò et al. 2005). Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2016, in welcher 17 Limonoide untersucht wurden, belegt ebenfalls den hepatoprotektiven Effekt von drei Limonoiden in pri-

mären Maus-Hepatozyten. Die verwendeten Limonoide wurden aus der Baumart *Carapa guianensis Andiroba* gewonnen, der ebenfalls zur Familie der *Meliaceae* gehört (Ninomiya *et al.* 2016). Diese Beispiele sprechen stark für hepatoprotektive Effekte der Stoffklasse Limonoide aus Bäumen der *Meliaceae*-Familie.

In den letzten Jahren wurden mehr als 100 Limonoide isoliert und charakterisiert. Neben dem antiviralen und hepatoprotektiven Effekt konnten auch andere Wirkungen der Limonoide nachgewiesen werden. Einen Überblick bietet die im Anhang befindliche Tabelle 15.

#### 1.4.2 Aufbau und Gewinnung der Limonoide TWF5, TWF9 und TWF10

Limonoide bestehen aus zwei Hauptstrukturen. Zum einen aus der Struktur von Limonin (Abbildung 12.1), welche aus fünf Ringen besteht und zum anderen aus der Struktur von Nomilin (Abbildung 12.2), welche aus vier Ringen zusammengesetzt ist (Tundis *et al.* 2012).

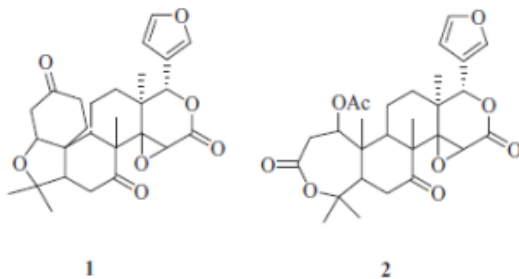
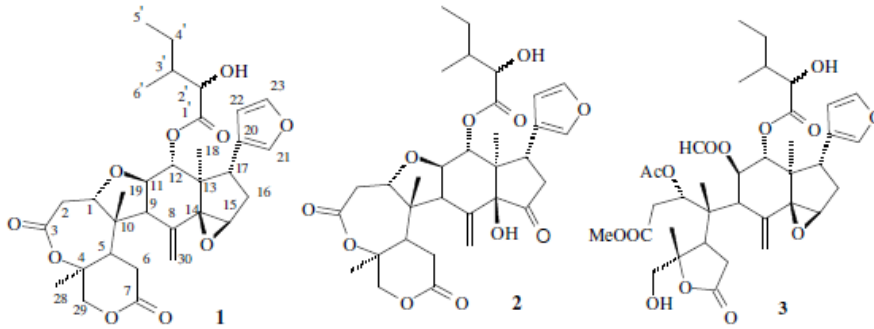


Abbildung 12: Struktureller Aufbau von Limonin (1) und Nomilin (2) (Tundis *et al.* 2012).

Die strukturelle Variation der einzelnen Limonoide beschränkt sich meist auf Veränderungen am A- oder B-Ring. Die Limonoide aus Pflanzen der Gattung *Meliaceae* sind sehr komplex aufgebaut und beinhalten viele Oxidationen und Strukturveränderungen (Pekala *et al.* 2015, Tundis *et al.* 2012).

Zur Gewinnung der Limonoide TWF5, TWF9, TWF10 wurden die Samen und Blätter der westafrikanischen Pflanze *Trichilia welwitschii* in der Zentralregion von Kamerun gesammelt. Das Blattmaterial wurde durch Dr. Nolle am *Institut de recherches Médicales et d'études des Plantes Médicinales* (IMPM) untersucht. Proben wurden am Nationalen Herbarium von Kamerun hinterlegt (Nummer 31288/SRF Cam). Die luftgetrockneten und pulverisierten Samen und Blätter wurden mazeriert und die Extrakte separat bei Raumtemperatur für 24 Stunden mit Dichlormethan und Methanol (1:1) vermischt. Nach Verdunstung der Flüssigkeit entstanden grünliche Samen- und Blattextrakte, welche durch Chromatographie über ein Siliziumgel aufgetrennt wurden. So entstanden fünf Fraktionen (F1-F5). Fraktion 3 wurde nochmals über ein Siliziumgel chromatografisch aufgetrennt. Die dabei entstandenen drei Fraktionen wurden analysiert und als Stigmasterol, Sitosterol und Dregeanin DM4 klassifiziert. Dregeanin DM4 wird auch als „TWF10“ (*Trichilia welwitschii*-Fraktion 10) bezeichnet. Fraktion 4 wurde ebenfalls durch einen zweiten Schritt auf dem Siliziumgel chromatografisch aufgetrennt. Die so entstandenen Fraktionen wurden als Rohituka-3 (TWF9) und *Trichilia lactone* D5 (TWF5) klassifiziert (Tsamo *et al.* 2013).



**Abbildung 13: Limonoide isoliert aus *Trichilia welwitschii* (Meliaceae).** (1) Dregeanin DM4 (TWF10), (2) Rohituka-3 (TWF9), (3) *Trichilia* lactone D5 (TWF5) (Dzoyem *et al.* 2015).

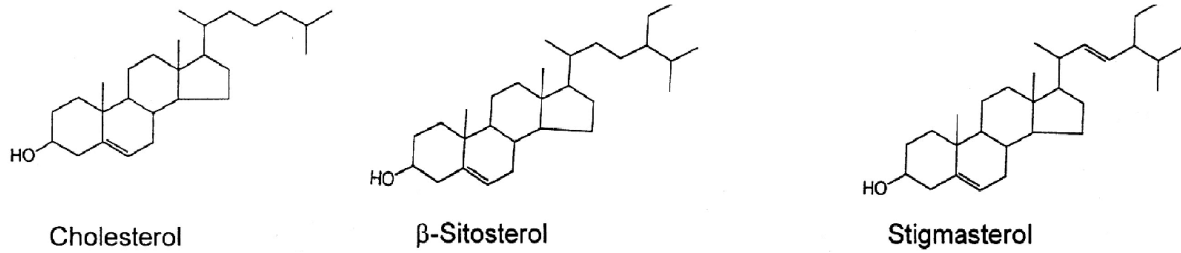
### 1.4.3 Bedeutung pflanzlicher Phytosterole aus *Trichilia welwitschii*

Wie bereits zuvor ausgeführt, beinhalten Pflanzen verschiedene sekundäre Metaboliten. Für die antiviralen Effekte der in der traditionellen afrikanischen Medizin eingesetzten Pflanzen werden unter anderem die Stoffe aus den Gruppen der Limonoide, Alkaloide, Lignane, Organosulfure, Furfyle, Thiophene, Polyline, Terpenoide, Flavonoide, Polyphenole, Sulphide, Saponine, Coumarine und Chlorophylline verantwortlich gemacht (Tundis *et al.* 2012). Phytosterole sind Bausteine der pflanzlichen Zellmembran und gehören somit ebenfalls zu den sekundären Metaboliten. Pflanzliche Phytosterole wurden auch in einigen Arten der *Meliaceae*-Familie nachgewiesen. So beispielsweise drei Sterole aus *Turraea pubescens* (*Meliaceae*) (Yuan *et al.* 2013), ein Phytosterol aus *Xylocarpus granatum* (*Meliaceae*) (Du *et al.* 2009) und drei Phytosterole aus *Toona ciliata* (*Meliaceae*) (Chowdhury *et al.* 2003).

Einige Phytosterole zeigen eine antivirale Wirkung gegen beispielsweise das Tabak-Mosaik-Virus (TMV) (Yan *et al.* 2014), das Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) (Petraera *et al.* 2014, Eugster *et al.* 1997), das humane Zytomegalievirus (CMV) oder das humane Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) (Eugster *et al.* 1997). Phytosterole, welche aus *Aglaiia erythrosperma* (*Meliaceae*) gewonnen wurden, konnten im *in vitro*-Versuch ebenfalls einen antiviralen Effekt gegen das Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) erzielen (Phongmaykin *et al.* 2011). Neben den antiviralen Wirkungen wurden vielfältige andere Wirkungen nachgewiesen. Am bekanntesten ist der Cholesterin-senkende Effekt. Einen Überblick über weitere Effekte bietet die Tabelle 16 im Addendum.

### 1.4.4 Aufbau und Gewinnung der Phytosterole TWT1 und TTA6

Phytosterole sind strukturell ähnlich dem Cholesterol, unterscheiden sich jedoch in einer Seitenkette, welche eine Methylgruppe (Ampesterol) oder Ethylgruppe ( $\beta$ -Sitosterol oder Stigmasterol) enthält (Chan *et al.* 2006, Ortega *et al.* 2006, Thompson und Grundy 2005, Ostlund 2002). Das Vorkommen von Phytosterolen wurde in Weizenkeimöl, Sojabohnenöl, Maisöl, Sesamsamen, Nüssen und einigen Früchten wie Orangen und Feigen nachgewiesen (Marangoni und Poli 2010, Chan *et al.* 2006, Devaraj und Jialal 2006).



**Abbildung 14: Struktureller Aufbau von Cholesterol,  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol** (Awad und Fink 2000).

Die genaue Herstellung der Phytosterole TWT1 und TTA6 aus der westafrikanischen Pflanze *Trichilia welwitschii* (*Meliaceae*) ist leider unbekannt. Die Stoffe wurden durch eine Kooperation mit der Universität von Yaoundé in Kamerun zur Verfügung gestellt. Publikationen zu TWT1 und TTA6 sind derzeit nicht verfügbar. Lediglich das molekulare Gewicht der Substanzen ist bekannt.



## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

### 1.5.1 Zielsetzung und Hypothese I zu Hepatitis B

Das Ansprechen der antiviralen Hepatitis-B-Therapie hängt von vielfältigen Faktoren ab. Die Arbeitsgruppe um Farnik (Farnik *et al.* 2013) konnte nachweisen, dass niedrige Vitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegel mit höheren HBV-Replikationsraten in Patienten mit chronischer Hepatitis B assoziiert sind. Vitamin D<sub>3</sub> weist vielfältige immunmodulatorische Effekte auf zellulärer Ebene auf. Der erste Schritt zur Erforschung des genauen Signalweges ist die Etablierung eines funktionierenden Zellkulturmodells. Die erste Hypothese dieser Dissertationsarbeit kann wie folgt formuliert werden:

Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) beziehungsweise seine Vorstufen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) hemmen die HBV-Replikation in den Hepatitis-B-transgenen Zelllinien HepG2.2.15 und HepG2-H1.3.

### 1.5.2 Zielsetzung und Hypothese II zu Hepatitis C

Die lange Zeit geltende antivirale Hepatitis-C-Therapie mit Interferon- $\alpha$  und Ribavirin wurde in den letzten Jahren zugunsten neuer direkt wirkender Agenzien (DAAs) geändert. Die neuen Substanzen sind aufgrund umfangreicher Forschung sehr teuer. Gerade Länder mit einem niedrigen Bruttojahreseinkommen weisen eine viel größere Prävalenz des Hepatitis-C-Virus auf. Die Erforschung von neuen, erschwinglicheren oder einfacher herzustellenden antiviralen Agenzien ist somit essentiell. Sekundäre pflanzliche Metaboliten wie die Stoffklasse der Limonoide können aus Bäumen der *Meliaceae*-Familie isoliert werden. In einigen aktuellen Studien konnten antivirale Effekte, auch gegen das Hepatitis-C-Virus, nachgewiesen werden. Pflanzliche Phytosterole gehören ebenfalls zu den sekundären Metaboliten von *Meliceae* und zeigen ebenso antivirale Effekte im *in vitro*-Zellmodell. Der Einfluss pflanzlicher Limonoide und Phytosterole aus Blättern und Samen des westafrikanischen Baums *Trichilia welwitschii* aus der Familie der *Meliaceae* soll im Zellkulturmodell mit Hepatitis-C-Virus-transgenen Zellen untersucht werden, sodass die zweite Hypothese dieser Dissertationsarbeit wie folgt formuliert werden kann:

Die pflanzlichen Limonoide TWF5, TWF9, TWF10 und die pflanzlichen Phytosterole TWT1 und TTA6 hemmen die HCV-Replikation in den Hepatitis-C-Virus-transgenen Zelllinien LucUbiNeo-ET (HCV Genotyp 1b) und JFH-LucUbiNeo (HCV Genotyp 2a).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
HepG2.2.15	Bereitgestellt von Prof. Ulrike Protzer, LMU München (Sells <i>et al.</i> 1987)	HBV 2-fach Überlängengenom
HepG2-H1.3	Bereitgestellt von Prof. Ulrike Protzer, LMU München (Protzer <i>et al.</i> 2007)	HBV 1,3-fach Überlängengenom
JFH-LucUbiNeo	Bereitgestellt von Prof. Gisa Tiegs, UKE Hamburg (Kato <i>et al.</i> 2003)	Huh-7 Hintergrund, HCV-Replikon, Genotyp 2a
LucUbiNeoET	Bereitgestellt von Prof. Gisa Tiegs, UKE Hamburg (Frese <i>et al.</i> 2003)	Huh-7 Hintergrund, HCV-Replikon, Con1-Genom, Genotyp 1b

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Zelllinien

#### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> , Calcitriol	Enzo Life Science, Inc., USA	2 mM, steril, in Ethanol
25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> , Calcidiol	Enzo Life Science, Inc., USA	20 mM, steril, in Ethanol
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, USA	
Geneticin solution (G418)	Gibco by Life Technologies, Germany	50 mg/ml
HCl (Chlorwasserstoff)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	
Luciferase Assay Puffer (Cell Lysis Buffer)	Promega Corporation, USA	Lyophilisiert
Luciferase Assay Substrat	Promega Corporation, USA	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Di-Sodiumhydrogenphosphat Di-Hydrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	
NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem GmbH, Deutschland	
PEI Reference Prep-	Paul-Ehrlich-Institut, Deutsch-	80.000 IU/ml

aration HBV DNA	land	
Penicillin / Streptomycin	Gibco by Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	je 10.000 U/ml
Reporter Lysis 5X Puffer	Promega Corporation, USA	
SDS (Sodium Dodecylsulfat)	AppliChem GmbH, Deutschland	
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	
Trypan Blue Solution (1:10)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	
Trypsin-EDTA 10x	BIOWEST SAS, Frankreich	
TTA6	Bereitgestellt von Dr. Etienne Tsamo, TWAS Research Unit, University of Yaoundé	10 mM, steril, in DMSO
TWF10, Dregeanin DM4	Bereitgestellt von Dr. Etienne Tsamo, TWAS Research Unit, University of Yaoundé	10 mM, steril, in DMSO
TWF5, Trichilia lactone D5	Bereitgestellt von Dr. Etienne Tsamo, TWAS Research Unit, University of Yaoundé	10 mM, steril, in DMSO
TWF9, Rohituka-3	Bereitgestellt von Dr. Etienne Tsamo, TWAS Research Unit, University of Yaoundé	10 mM, steril, in DMSO
TWT1	Bereitgestellt von Dr. Etienne Tsamo, TWAS Research Unit, University of Yaoundé	10 mM, steril, in DMSO
Vitamin D <sub>3</sub> , Calciol	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	200 mM, steril, in Ethanol

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Substanzen

### 2.1.3 Lösungen und Medien

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
1 mM Natrium-Pyruvat	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
100 µg/ml Penicillin / Streptomycin	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
2 mM L-Glutamin	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
Collagen R, 2 mg/ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland	Steril
ddH <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	QIAGEN GmbH, Deutschland	
Distilled water, RNase free	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	
DMEM GlutaMax	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril

DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose, ohne L-Glutamin	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
DMSO, für Molekularbiologie	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland	Steril
Ethanol 100%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland	
Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert (FCS)	Gibco by Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Steril
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Deutschland	Steril, für Zellkultur

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Lösungen und Medien

### 2.1.4 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
5% MTT-Reagenz	5% (v/v) Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) in PBS
DMEM-GlutaMax-Zellkulturmedium für LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo Zellen	10% (v/v) Fötale Kälberserum 1% (v/v) 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin
DMEM-Zellkulturmedium für HepG2.2.15 und HepG2-H1.3 Zellen	10% (v/v) Fötale Kälberserum 1% (v/v) 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin 1% (v/v) 2 mM L-Glutamin 1% (v/v) 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren 1% (v/v) 1 mM Natrium-Pyruvat
PBS	137.9 mM NaCl 6.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.7 mM KCl pH 7.4 NaOH
SDS-Lysispuffer	20% (w/v) SDS in PBS + 100 µl 10 M HCl

Tabelle 4 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Medien

### 2.1.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega GmbH, Deutschland	
FastStart Essential DNA Green Master Mix (2x)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	
NucleoSpin® Tissue (250 preps)	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Deutschland	

Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten Kits

### 2.1.6 Sonden und Primer

Bezeichnung	Hersteller	Sequenz (5' → 3')
HBV_rcDNA_Fwd_TUM, sense Primer,	Life Technologies by Thermo Fisher	GTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC

lyophilisiert	Scientific Inc., USA	
HBV_rcDNA_Rev_T UM, antisense Pri- mer, lyophilisiert	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	GGAGGGATACATAGAGGTTCTTGA

Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Sonden und Primer

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
0.2 ml PCR-Gefäß	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland	steril, DNase-frei
1.5 ml-ERG	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
10 µl Qualitäts- Pipettenspitzen mit Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril
10 µl Qualitäts- Pipettenspitzen ohne Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	
10-ml Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
1250 µl Qualitäts- Pipettenspitzen mit Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril
1250 µl Qualitäts- Pipettenspitzen ohne Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	
15-ml Zentrifugen- röhren	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	
2,0-ml Mikro-Röhren mit Schraubver- schluss	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
2.0 ml-ERG	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
200 µl Qualitäts- Pipettenspitzen mit Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril
200 µl Qualitäts- Pipettenspitzen ohne Filter	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	
25-ml Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
2-ml Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
5,0-ml ERG	Eppendorf AG, Deutschland	steril
50-ml Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
50-ml Zentrifugen- röhren	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei
5-ml Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	steril, pyrogen-frei

Gewebekulturflaschen mit PE Schnellverschluss-Schraubkappe	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	Wachstumsbereich: 25 cm <sup>2</sup>
Gewebekulturflaschen mit PE Schnellverschluss-Schraubkappe	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	Wachstumsbereich: 75 cm <sup>2</sup>
Gewebekulturflaschen mit PE Schnellverschluss-Schraubkappe	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	Wachstumsbereich: 175 cm <sup>2</sup>
LightCycler® 8-Tube Strips (white)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	
Micro-Touch® Nitra-Tex® Untersuchungshandschuhe	Ansell Healthcare Europe, Belgien	
Nunc Multidishes Nunclon™ Δ, 24°-Platte	Nalge Nunc International by Thermo Fisher Scientific Inc., USA	

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Gebrauchsmaterialien

### 2.1.8 Gebrauchsmaterialien und Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
1 – 10 µl Eppendorf Research® plus Pipette	Eppendorf AG, Deutschland	
10 – 100 µl Eppendorf Research® plus Pipette	Eppendorf AG, Deutschland	
10 – 20 µl Eppendorf Research® plus Pipette	Eppendorf AG, Deutschland	
10 – 200 µl Eppendorf Research® plus Pipette	Eppendorf AG, Deutschland	
100 – 1000 µl Eppendorf Research® plus Pipette	Eppendorf AG, Deutschland	
Automatic-Sarpette®	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland	
BLAUBRAND®-Zählkammer	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland	
Blockheizthermostat	PEQLAB Biotechnologie GmbH,	

HX-1	Deutschland	
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Deutschland	Mit Eppendorf F45-30-11 Rotor (max. 14.000 rpm)
Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Deutschland	Mit Eppendorf FA-45-30-11 Rotor (max. 14.000 rpm)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Deutschland	Mit Eppendorf A-4-81 Rotor (max. 4.000 rpm)
Clean Bench Hera Safe	Heraeus Instruments, Germany	
HandyStep® Electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland	
HERAcell 240 i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	
IKA®-Schüttler MTS4	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland	
Infinite M200	Tecan Group Ltd., Schweiz	
Kühlschrank Profi Line	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland	
LightCycler® 96	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	
MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	
PeqSTAR 2X Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland	
Shaker DRS-12	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Deutschland	
Tiefkühlschrank Comfort Nofrost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland	
Transferpette®-8 20 – 200 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland	
Ultratiefkühlschrank UF V 500	BINDER GmbH, Deutschland	
VWR Analog Vortex Mixer	VWR International, LLC, USA	
Wasserbad GFL 1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland	

Tabelle 8 Übersicht über das verwendete Equipment

### 2.1.9 Software

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc., USA	Version 6
LightCycler® 96 SW 1.1	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	Version 1.1
Microsoft Excel®	Microsoft Corporation, USA	Version 2010
Microsoft Word®	Microsoft Corporation, USA	Version 2010

Tecan i-Control 1.10	Tecan Group Ltd., Schweiz	
----------------------	---------------------------	--

Tabelle 9 Übersicht über die verwendete Software

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die HBV-transgenen Zelllinien HepG2.2.15 und HepG2-H1.3 wurden in sterilen T25-, T75- oder T175-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden zuvor mit 10 ml Kollagenlösung (200 µg/ml) beschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kollagenlösung verworfen. Der Mediumwechsel erfolgte zwei Mal wöchentlich bis zu einer maximalen Passagenzahl von 25 Passagen. Es wurde auf 37 °C vorgewärmtes DMEM-Zellkulturmedium verwendet (Zusammensetzung in Tabelle 4).

Die HCV-transgenen Zelllinien LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo wurden ebenfalls in sterilen T25-, T75- oder T175-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls zwei Mal wöchentlich mit auf 37 °C erwärmten DMEM-GlutaMax-Zellkulturmedium (Zusammensetzung in Tabelle 4). Vor Aussaat der Zellen wurde 0,5 mg/ml Geneticin zum Zellkulturmedium hinzugefügt, um diejenigen Zellen mit dem Con-1 Replikonsystem zu selektieren. Dieses Replikonsystem codiert unter anderem für eine Geneticin-Resistenz.

### 2.2.2 Aussaat und Stimulation der Zellen

Zu Beginn eines jeden Experimentes wurden die adhärenenten Zellen aus einer T175-Zellkulturflasche mittels 7,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung nach 5 minütiger Inkubationszeit bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellett in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen. 400 µl Trypanblau-Lösung (Trypanblau verdünnt 1:10 mit PBS) wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) gegeben und mit 100 µl der Zellsuspension vermischt. 10 µl dieser Lösung wurden auf eine BLAUBRAND®-Zählkammer pipettiert und die Zellen am Mikroskop ausgezählt. Nachdem eine definierte Zellzahl (siehe Tabelle 10) pro Milliliter Zellkulturmedium eingestellt worden war, wurden 1 ml Zellsuspension pro Kavität in eine 24-Well-Platte beziehungsweise 100 µl pro Kavität einer 96-Well-Platte gegeben. Die Kavitäten für die Versuche mit den HBV-transgenen Zelllinien wurden dabei zuvor mit jeweils 500 µl Kollagenlösung (200 µg/ml) pro Kavität einer 24-Well-Platte beziehungsweise 100 µl pro Kavität einer 96-Well-Platte beschichtet und bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Kollagenlösung verworfen.

Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden konnte das Zellkulturmedium verworfen werden und die adhärenenten Zellen wurden mit 900 µl frischem Medium pro Kavität einer 24-Well-Platte beziehungsweise 90 µl pro Kavität einer 96-Well-Platte bedeckt. Zur Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Testsubstanzen wurden diese entsprechend der gewünschten Endkonzentration zuvor verdünnt. 100 µl Testlösung pro Kavität wurde zu dem Zellkulturmedium in jede Kavität der 24-Well-Platte beziehungsweise 10 µl pro Kavität einer 96-Well-Platte gegeben. Bei jedem Versuch in einer 24-Well-Platte, war der Versuchsaufbau wie in Tabelle 11 gezeigt, gleich aufgebaut. Die Versuche in den 96-Well-Platten waren ebenfalls gleich aufgebaut, wie in Tabelle 12 gezeigt. PBS diente dabei als Verdunstungsschutz und wurde nur in die umliegenden Randkavitäten gegeben.

Als Negativkontrolle bei den Vitaminen wurde in den Versuchen Ethanol verwendet, bei den Limonoiden / Phytosterolen DMSO. Die Platten wurden so für den entspre-



chenden Zeitraum von 24, 48 oder 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturschrank kultiviert.

Zelllinie	Benutzte Platte	Dauer der Stimulation	Verwendete Zellzahl pro Milliliter Kulturmedium
HepG2.2.15, HepG2-H1.3	24-Well	24 Stunden	500.000
		48 Stunden	375.000
		72 Stunden	250.000
	96-Well	72 Stunden	500.000
LucUbiNeo-ET, JFH-LucUbiNeo	24-Well	24 Stunden	100.000
		48 Stunden	75.000
	96-Well	24 Stunden	200.000
		48 Stunden	150.000

Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Zellzahlen

	1	2	3	4	5	6
A	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)
B	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)
C	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)
D	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)

Tabelle 11 Versuchsaufbau einer 24-Well-Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 1	1 2
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS				
B	PBS	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)	PBS			
C	PBS	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)	PBS			
D	PBS	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)	PBS			
E	PBS	Negativkontrolle (Lösungsmittel)	Testsubstanz (höchste Konzentration)	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz	Testsubstanz (niedrigste Konzentration)	PBS			
F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS			
G												
H												

Tabelle 12 Versuchsaufbau einer 96-Well-Platte

### 2.2.3 DNA-Extraktion aus Zellkulturüberstand

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 Stunden wurde der gesamte Zellkulturüberstand aus jeder Kavität in ein neues 2,0 ml ERG überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Nachdem die gewonnenen Zellkulturüberstände auf Raumtemperatur gebracht waren, wurde laut Anleitung des NucleoSpin Tissue Kits vorgegangen. Dazu wurde jeweils 200 µl Probe in ein neues 1,5 ml ERG überführt und mit 25 µl Proteinase K versetzt. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer B3 wurde die Probe 10 – 20 Sekunden lang kräftig durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) inkubiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation in einem 70°C heißen Heizblock wurden die Proben mit 210 µl 100 % Ethanol versetzt. Ein anschließendes Mischen der Proben erfolgte mit dem Vortex Mixer. Nun wurde die gesamte Probenlösung auf je eine NucleoSpin Tissue-Säule gegeben und bei 11.000 g für eine Minute bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die in der Säule befindliche DNA wurde anschließend gereinigt. Dazu wurden 500 µl Puffer BW pro Säule pipettiert und ebenfalls für eine Minute bei 11.000 g und Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs folgte ein zweiter Waschschriff mit 600 µl Puffer B5 pro Säule der Probe und ebenfalls einer Zentrifugation über eine Minute bei 11.000 g und Raumtemperatur (15 – 25 °C). Der Durchfluss konnte wiederum verworfen werden. Um die Aufreinigung zu verbessern, wurde anschließend die Säule nochmals bei 11.000 g für eine Minute bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Um die sich in der Säule befindliche DNA zu eluieren, wurde die Säule nun in ein neues 1,5 ml ERG gegeben und mit 100 µl Elutionspuffer BE beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) wurden die Proben bei 11.000 g für eine Minute bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Die so gewonnene DNA, gelöst in Elutionspuffer, wurde zu Qualitätskontrollzwecken im NanoDrop®-ND-1000 Spektrophotometer vermessen. Dabei wurde eine Probe als rein angesehen, welche einen Extinktionsquotien-

ten beziehungsweise Optische-Dichte-Quotienten (OD) bei 260/380 nm von größer gleich 1,8 aufweist.

## 2.2.4 Absolute quantitative Realtime-PCR

Zur Vorbereitung der absoluten quantitativen Realtime-PCR werden die Primer für die rcDNA des Hepatitis-B-Virus auf eine Endkonzentration von 5 pmol/µl verdünnt. Pro Ansatz wurden 10 µl *FastStart Essential DNA Green Master Mix*, 3 µl destilliertes RNA-freies Wasser, 1 µl des 5 pmol/µl vorverdünnten Vorwärts- und 1 µl des Rückwärts-Primers verwendet. Mit 5 µl DNA-Probe ergab sich ein finales Reaktionsvolumen von 20 µl.

Als Standard-Referenz diente eine HBV-DNA-Referenzprobe des Paul-Ehrlich-Institutes, für welche eine Viruslast von 80.000 IU/ml bekannt war. In Vorversuchen wurden 3- bis 4-fach Bestimmungen in 5 bis 6 Logstufen mit dieser Referenzprobe durchgeführt, um eine Standardkurve zu ermitteln. Die gemittelte Effizienz der Standardkurve lag dort bei 1,80.

Die zu untersuchenden DNA-Proben, jeweils eine Referenz-DNA-Probe und eine Negativkontrolle (10 µl *FastStart Essential DNA Green Master Mix*, 8 µl destilliertes RNA-freies Wasser, 1 µl 5 pmol/µl Vorwärts- und 1 µl Rückwärts-Primer) wurden in LightCycler® 8-Tube Streifen pipettiert und bei 1.500 g zwei Minuten lang zentrifugiert. Die Streifen wurden anschließend für 45 Zyklen (genaue Angaben siehe Tabelle 13) im LightCycler®-96-Realtime-PCR-Gerät amplifiziert. Die Auswertung der Zyklus-Schwellenwerte (Cp-Wert oder Ct-Wert genannt) erfolgte mittels der LightCycler®-96-SW 1.1 Software. Die Software kann anhand einer einzigen Referenz-DNA-Probe und des manuell eingegebenen Effizienz-Wertes eine Standardkurve berechnen. So konnte zuverlässig die HBV-rcDNA in Internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) ermittelt werden.

Segment	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Rampe [°C/s]
1 (Vorinkubation)	1	95	300	4,4
2 (Amplifikation)	45	95	25	4,4
		60	15	2,2
		72	30	4,4
3 (Schmelzung)	1	95	10	4,4
		65	60	2,2
4 (Kühlung)	1	37	20	4,4

Tabelle 13 Einstellungen rcDNA-Realtime-PCR-Zyklen

## 2.2.5 Luciferase-Reporter-Assay

Nach entsprechender Stimulationszeit wurde der Zellkulturüberstand der adhärennten Zellen abgesaugt und 120 µl Zelllysispuffer in jede Kavität der 24-Well-Platte gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) wurde das entstandene Zelllysat in ein neues 1,5 ml ERG überführt. Das Zelllysat wurde anschließend bei 20.000 g für zwei Minuten bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml ERG gegeben. In eine weiße 96-Well-Mikrotiterplatte wurde jeweils 70 µl Zelllysat pipettiert und zügig 50 µl Luciferase-Assay-Substrat hinzugegeben. Das hierin befindliche Luciferin wird da-

bei mittels des Enzyms *Firefly*-Luciferase, welches auf dem Replikonsystem der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen codiert ist, zu Oxyluciferin oxidiert. Die dabei entstehende Biolumineszenz der Proben wurde bei einer Integrationszeit von 2000 ms in einem Infinite®-M200-Absorptionsmessgerät gemessen.

Zur Normalisierung der Absorptionswerte wurde ein Coomassie-Brilliantblau-Proteinassay, auch bekannt als Bradford-Assay, durchgeführt (Bradford 1976). Dazu wurden aus den noch vorhandenen 60 µl Zellysat 2 µl entnommen und mit 198 µl Bradford-Reagenz (Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250) vermischt. Der Farbstoff bildet im sauren Milieu mit den vorhandenen Proteinen Komplexe und gelangt so in seine blaue, unprotonierte Form, welche bei 600 nm gemessen werden kann. Dazu wurden die 200 µl pro Probe in je eine Kavität einer 96-Well-Platte gegeben und mit einem Infinite M200-Absorptionsmessgerät gemessen. Als Leerwert diente dabei 2 µl des Zellysispuffers. Der Absorptionswert des Leerwertes wurde von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert und die so gewonnene Differenz mit den Chemilumineszenz-Absorptionswerten multipliziert, um eine Normalisierung der Werte zu erreichen.

### 2.2.6 MTT- und CTB-Viabilitätsassay

Für den 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid-Assay (MTT-Assay) wurde nach entsprechender Inkubationszeit das Zellkulturmedium aus den Kavitäten der 96-Well-Platte abgesaugt. Nachdem 100 µl frisches Zellkulturmedium pro Kavität vorgelegt wurde, wurde in jede Kavität 20 µl 5 % MTT-Reagenz hinzugegeben. Die Platte wurde dann für 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert. Die mitochondrialen Reduktase-Enzyme reduzieren dabei die Substanz MTT zu dem unlöslichen Stoff Formazan, welcher eine violette Farbe aufweist. Diese Farbgebung konnte nach vorangegangener Lyse der adhärennten Zellen in einem Absorptionsmessgerät bei 570 nm gemessen werden.

Zur Lyse der Zellen wurden 50 µl auf 37 °C vorgewärmter SDS-Lysispuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) pro Kavität in die 96-Well-Platte gegeben und die Platte in einen auf 37 °C aufgeheizten Inkubator 8 bis 24 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 100 µl aus jeder Kavität in eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und im Infinite®-M200-Absorptionsmessgerät gemessen.

Für den Cell-Titer-Blue-Viabilitätsassay (CTB-Assay) wurden nach Ende der Stimulationszeit 20 µl CTB-Reagenz zu jeder Probe pro Kavität der 96-Well-Platte gegeben und auf einem Platten-Schüttler vermengt. Die Platte wurde anschließend für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert. Das CTB-Reagenz enthält Resazurin. Dieser Stoff wird von lebenden Zellen zu dem fluoreszierenden Stoff Resorufin reduziert. Die Reduktion zu Resorufin ist proportional zu der Anzahl der metabolisch aktiven und lebenden Zellen. Am Ende der einstündigen Inkubation wurde die Platte nochmals für 10 Sekunden auf dem Platten-Schüttler gemischt. Anschließend wurde die Fluoreszenz von Resorufin bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen.

### 2.2.7 HBsAg-Messung

Das spezifische Hepatitis-B-Oberflächenantigen HBsAg wurde durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Frau PD Dr. med. S. Polywka mittels eines Abbott-

m24sp-Gerätes gemessen. Die Ergebnisse wurden in der Signal-to-Cut-Off (S/CO) Ratio übermittelt. Zur Errechnung dieser Ratio dividiert man den Wert des Extinktionsquotienten beziehungsweise den Optische-Dichte-Quotient (OD) der Probe durch den höchsten OD-Wert des Probendurchlaufs. Dieser Wert ist spezifisch für jeden Testdurchlauf und kann statistisch genau positive Ergebnisse vorhersagen.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mit dem GraphPad-Prism®-Programm Version 6 durchgeführt. Dabei wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Um Effekte durch Mehrfachtestung auszugleichen, wurde der Bonferroni-Test angewandt. Im Folgenden werden die Daten als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen als Balkendiagramm dargestellt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  ist mit 0,05 definiert. Es wird die Spannweite angegeben mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  und \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wirkung von Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>)

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Cholecalciferol-Konzentrationen eine toxische Wirkung auf die HBV-transgenen Zellen haben, wurde zunächst ein Cell-Titer Blue-Viabilitätsassay (kurz CTB-Assay) durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Cholecalciferol in den Konzentrationen von 0,01 µM bis 10 µM das Zellüberleben, verglichen zur mit Ethanol behandelten Kontrollgruppe, bei Behandlungszeiträumen von 24, 48 und 72 Stunden in HepG2.2.15-Zellen nicht beeinflusst (siehe Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17). Hingegen führen bereits kleinste Mengen (0,01 µM) Cholecalciferol in HepG2-H1.3 Zellen nach einer 24-stündigen Inkubationszeit zu einer Reduktion der Zellzahl. Dieser Effekt ließ sich nach 48 Stunden nur noch geringfügig, nach 72 Stunden gar nicht mehr nachweisen.

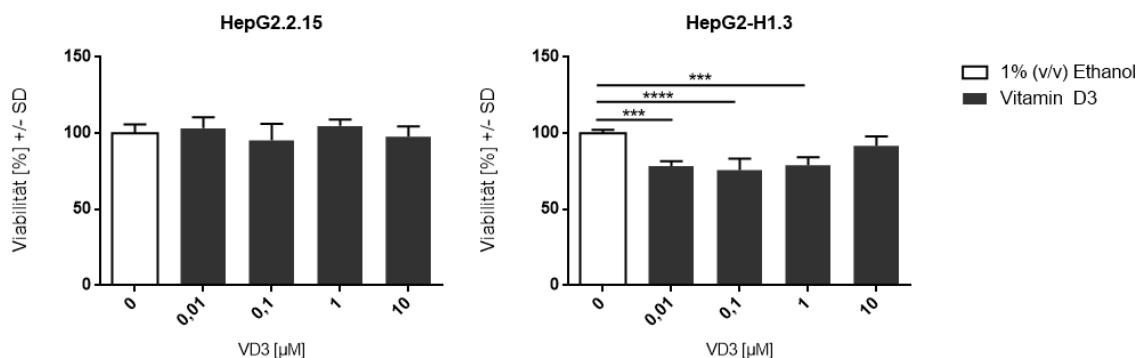


Abbildung 15: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

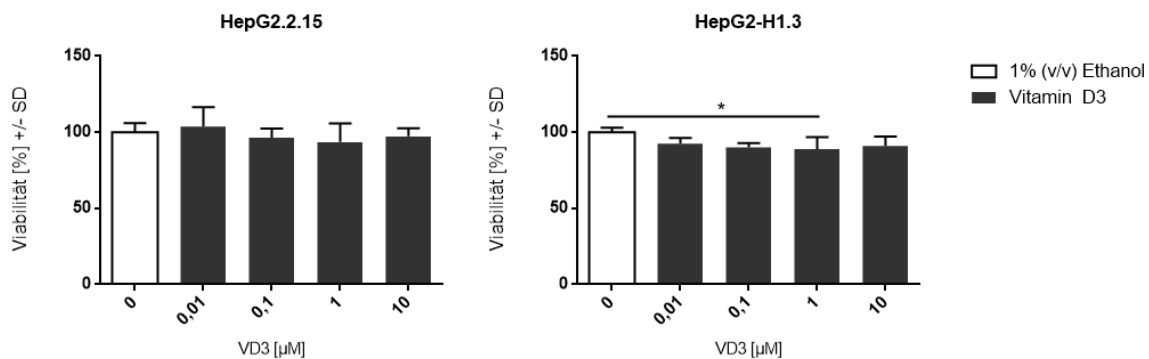


Abbildung 16: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay (\* $p < 0,05$ )

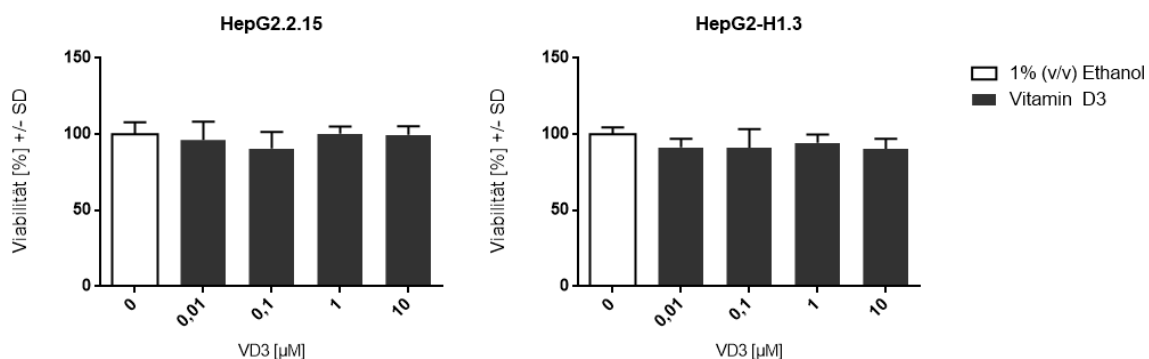
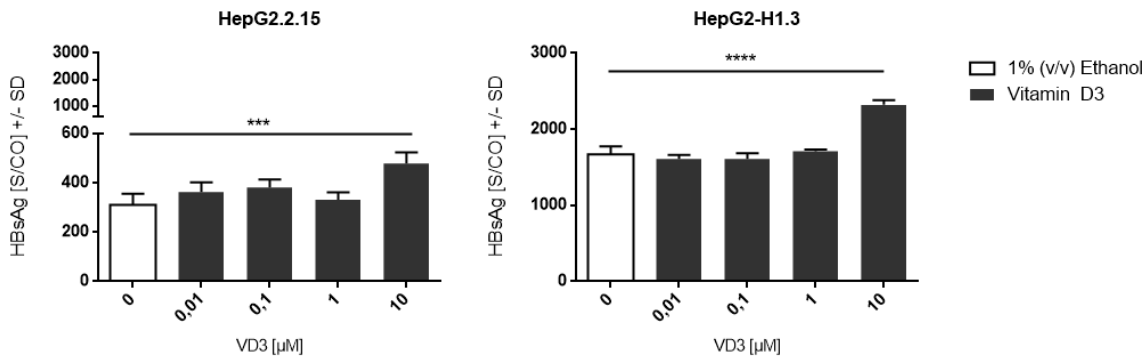


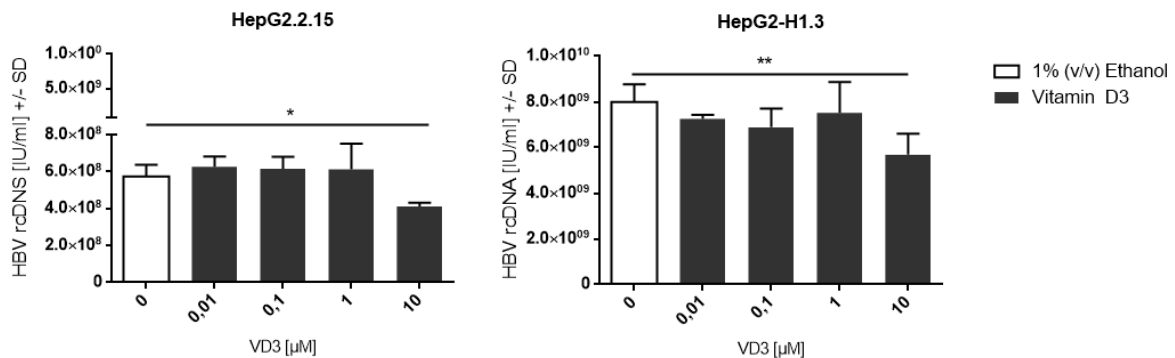
Abbildung 17: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden-Inkubation mit Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay

Mögliche Wirkungen von Cholecalciferol auf die Virusreplikation wurden zum einen über den Gehalt an spezifischem Oberflächenantigen (Hepatitis-B-Surface-Antigen, HBsAg) und zum anderen an der Menge an Hepatitis-B-Virus-rcDNA gemessen. Wie in Abbildung 18 gezeigt, erhöhte sich die Menge an HBsAg bei der höchsten Konzentration von 10 µM Cholecalciferol im Zellkulturüberstand in beiden getesteten Zellsystemen signifikant.



**Abbildung 18: Spezifisches Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis-B-Surface-Antigen, HBsAg) - Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72-Stunden-Inkubation mit Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>)** (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Zusätzlich verringerte sich der Gehalt an Hepatitis-B-Virus-rcDNA im Zellkulturüberstand bei 10 µM Konzentration von Cholecalciferol ebenfalls signifikant in beiden getesteten Zellsystemen (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: Hepatitis-B-rcDNA Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72-Stunden-Inkubation mit Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>)** (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

### 3.2 Wirkung von Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>)

Zur Überprüfung der toxischen Wirkung der eingesetzten Calcidiol-Konzentrationen auf die HBV-transgenen Zellen wurde ebenfalls ein CTB-Viabilitätsassay durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Calcidiol in den Konzentrationen von 0,01 µM bis 10 µM das Zellüberleben, verglichen zur mit Ethanol behandelten Kontrollgruppe, bei Behandlungszeiträumen von 24, 48 und 72 Stunden in HepG2.2.15-Zellen nicht beeinflusst (siehe Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22). In den HepG2-H1.3-Zellen zeigte sich bei der höchsten Konzentration von 10 µM Calcidiol nach 24 Stunden Inkubationszeit eine signifikante Reduktion der lebenden Zellen im Vergleich zur Ethanol-Kontrollgruppe. Dieser Effekt ließ sich nach 48 sowie nach 72 Stunden nicht mehr nachweisen.

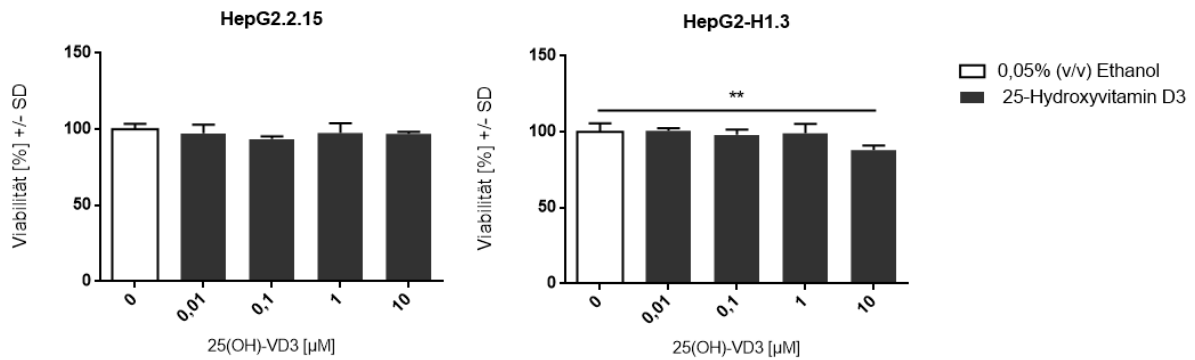


Abbildung 20: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay (\*\* $p < 0,01$ )

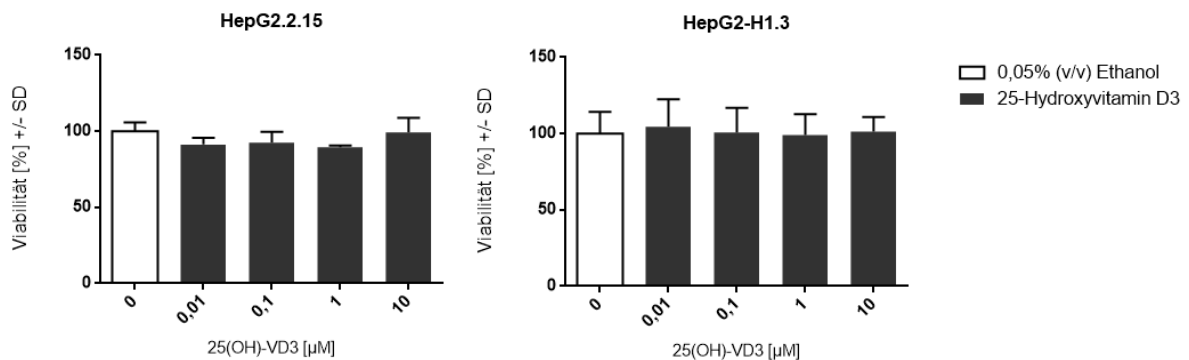


Abbildung 21: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay

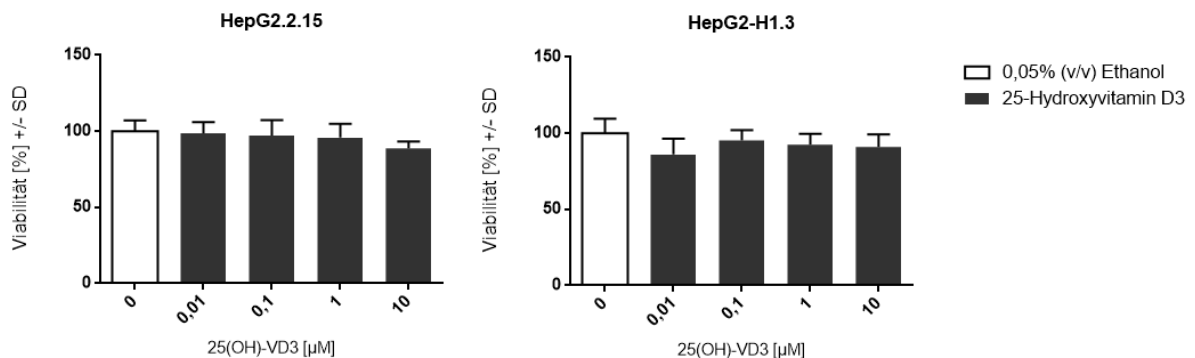
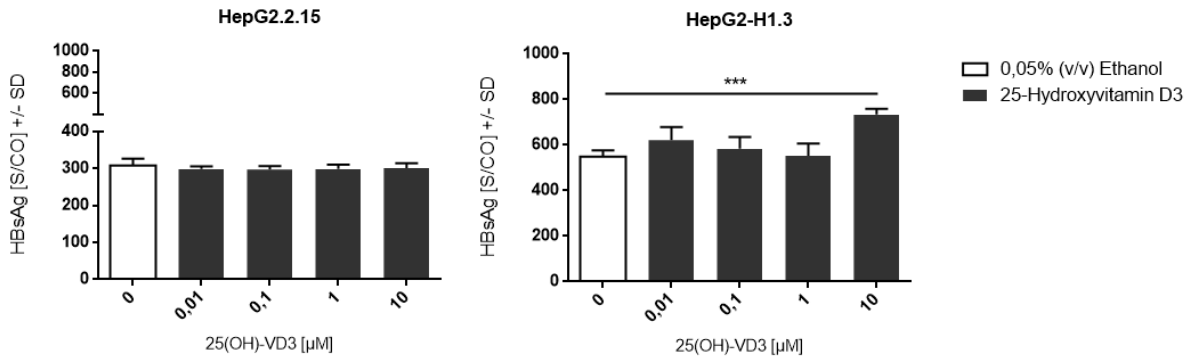


Abbildung 22: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden-Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay

Mögliche Wirkungen von Calcidiol auf die Virusreplikation wurden ebenfalls über den Gehalt an Oberflächenantigen (HBsAg) und an der Menge an Hepatitis-B-Virus-rcDNA gemessen.

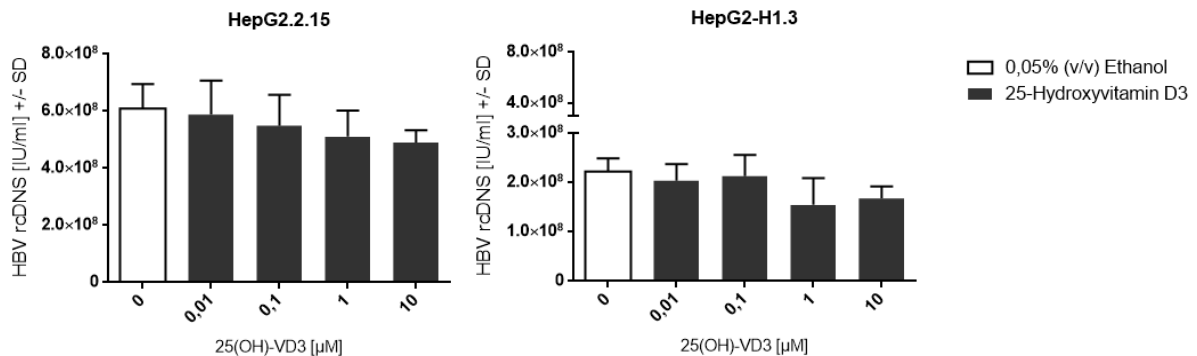
Wie in Abbildung 23 dargestellt, erhöhte sich die Menge an HBsAg bei der höchsten Konzentration von 10 µM Calcidiol im Zellkulturüberstand ausschließlich bei den HepG2-H1.3-Zellen signifikant.





**Abbildung 23:** Gehalt an spezifischem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcitriol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) (\*\**p* < 0,001)

Verglichen mit der Ethanol-Kontrollgruppe war die Konzentration von Hepatitis-B-Virus-rcDNA in den beiden untersuchten Zellsystemen im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubationszeit mit Calcitriol nicht verringert (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Hepatitis-B-rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcitriol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>)

### 3.3 Wirkung von Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>)

Die toxische Wirkung der eingesetzten Calcitriol-Konzentrationen auf die HBV-transgenen Zellen wurde ebenfalls durch einen CTB-Viabilitätsassay überprüft. Dabei zeigte sich bei den HepG2.2.15-Zellen für alle verwendeten Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubationszeit eine signifikante Verringerung der Zellviabilität im Vergleich zu der Ethanol-Kontrollgruppe (siehe Abbildung 25). Dieser Effekt konnte nach 48 Stunden Inkubationszeit nur noch bei Konzentrationen von 0,001  $\mu$ M bis 0,1  $\mu$ M Calcitriol beobachtet werden (siehe Abbildung 26). Nach 72 Stunden war kein Effekt mehr sichtbar.

Die HepG2-H1.3-Zellen hingegen zeigten bei 24 und 72 Stunden Inkubation mit den verwendeten Konzentrationen von Calcitriol keine Verringerung im Zellüberleben verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 25, Abbildung 27). Nach 48 Stunden Inkubation zeigte sich im Kontrast dazu eine Erhöhung der Zellviabilität bei niedrigen Konzentrationen von Calcitriol (siehe Abbildung 26).

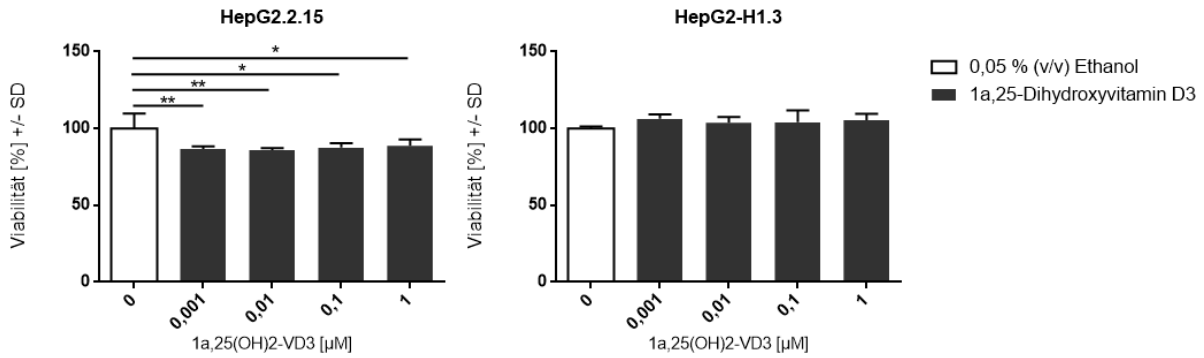


Abbildung 25: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay (\* $p$  < 0,05, \*\* $p$  < 0,01)

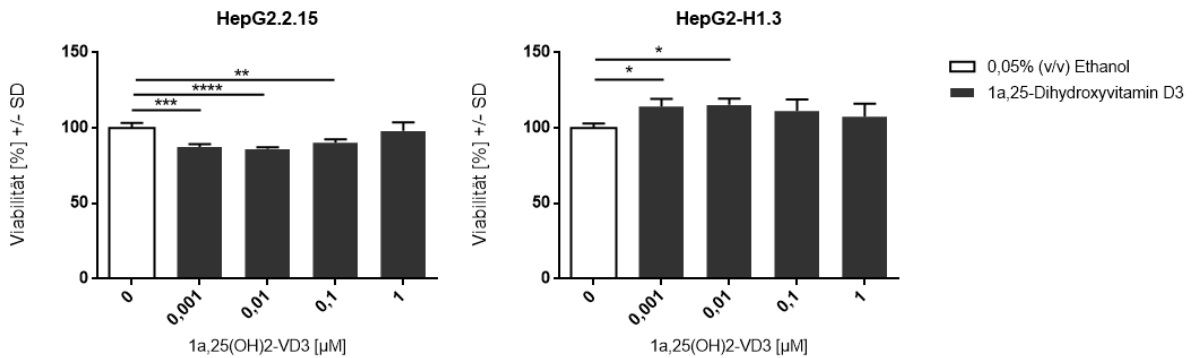


Abbildung 26: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay (\* $p$  < 0,05, \*\* $p$  < 0,01, \*\*\* $p$  < 0,001, \*\*\*\* $p$  < 0,0001)

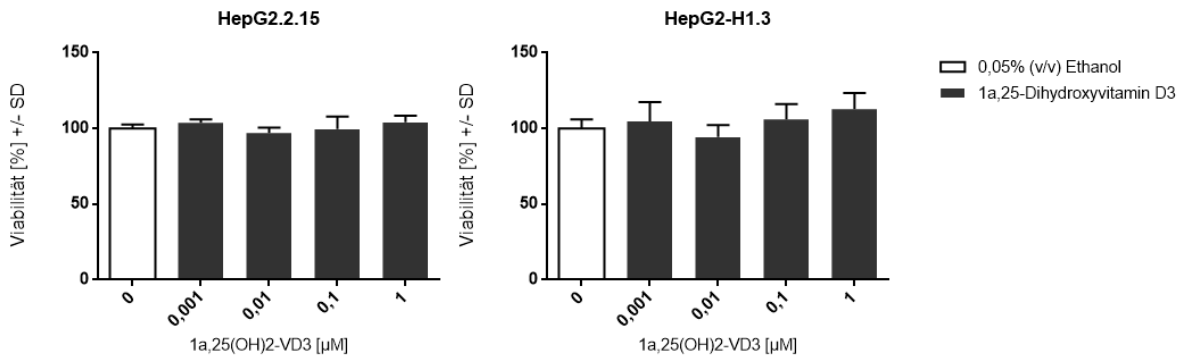
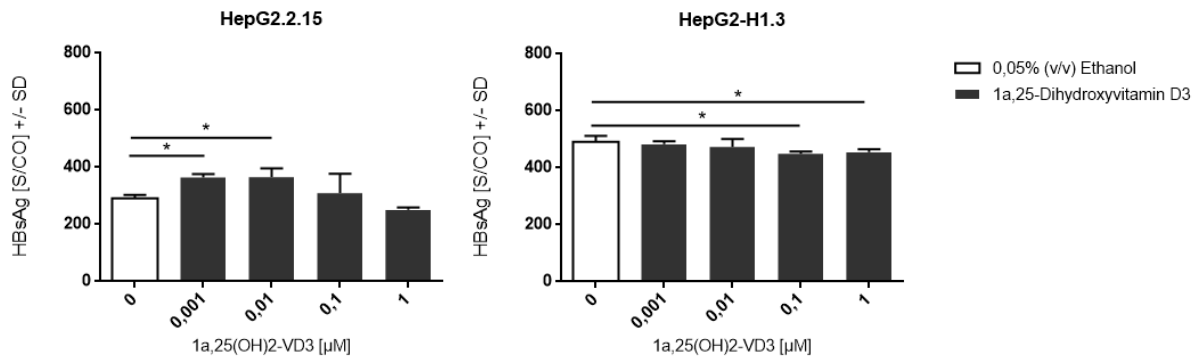


Abbildung 27: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden-Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay

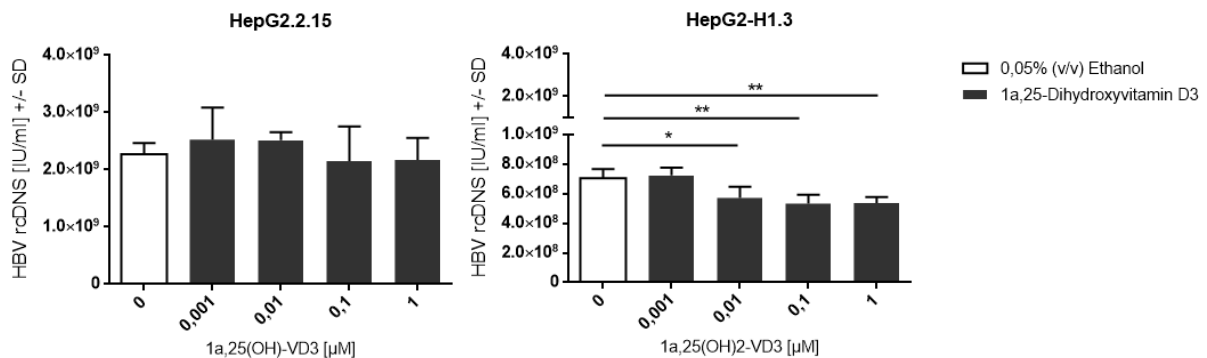
Mögliche Effekte von Calcitriol auf die Virusreplikation wurden ebenfalls zum einen über den Gehalt an Oberflächenantigen (HBsAg) und zum anderen an der Menge von Hepatitis-B-Virus-rcDNA gemessen.

Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden erhöhte sich die Menge an HBsAg im Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen signifikant bei einer Calcitriol-Konzentration von 0,001  $\mu$ M und 0,01  $\mu$ M (siehe Abbildung 28). Dieser Effekt zeigte sich bei den HepG2-H1.3-Zellen nicht. Hier verringerten die Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Calcitriol das Oberflächenantigen im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Ethanol-Kontrollgruppe signifikant.



**Abbildung 28:** Gehalt an spezifischem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcitriol (1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) (\**p* < 0,05)

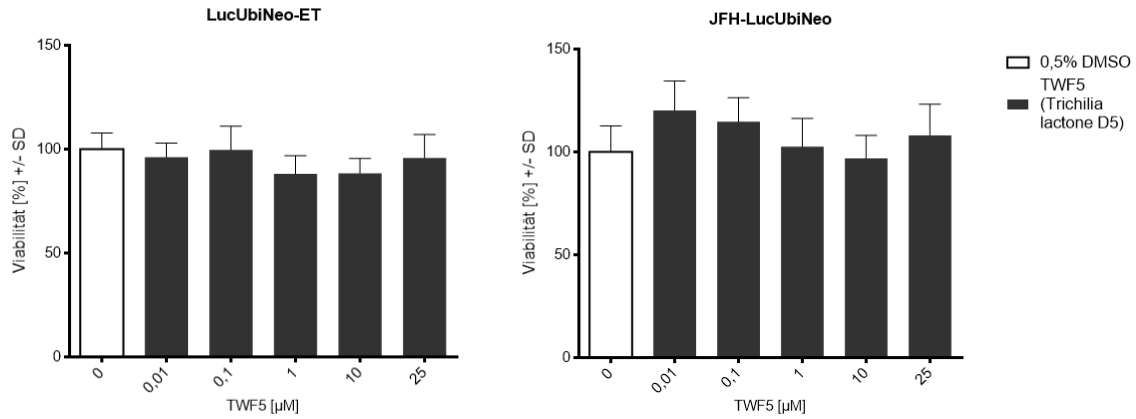
Im Vergleich zur Ethanol-Gruppe war der Gehalt von Hepatitis-B-Virus-rcDNA von HepG2.2.15-Zellen im Zellkulturüberstand nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden mit Calcitriol nicht verändert (siehe Abbildung 29). Bei den HepG2-H1.3-Zellen hingegen führten die Konzentrationen von 0,01 μM, 0,1 μM und 1 μM Calcitriol zu einer signifikanten Reduktion von HBV-rcDNA im Zellkulturüberstand nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden.



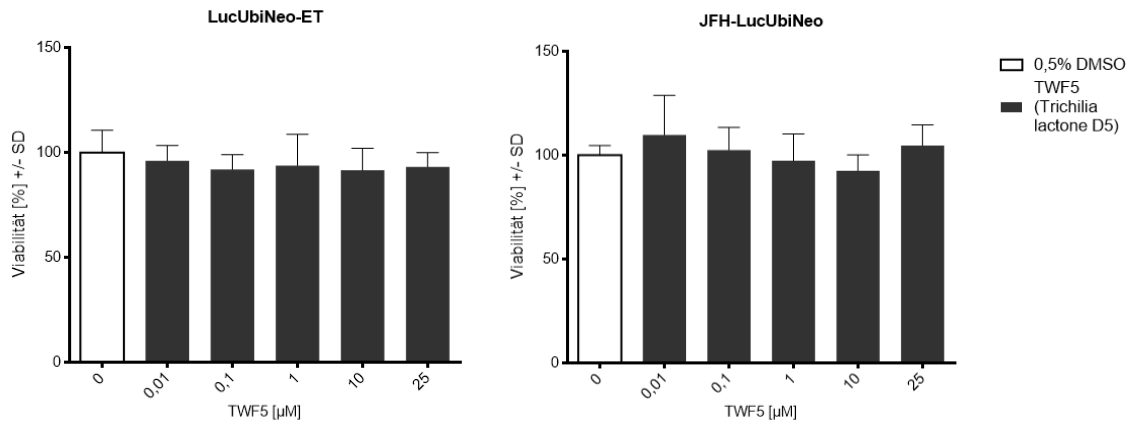
**Abbildung 29:** Hepatitis-B-rcDNA Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcitriol (1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) (\**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01)

### 3.4 Wirkung des Limonoids TWF5 (*Trichilia lactone D5*)

Das bisher wenig näher erforschte Limonoid TWF5 (auch *Trichilia lactone D5* genannt) wurde zunächst auf seine Toxizität auf die HCV-transgenen Zelllinien LucUbi-Neo-ET und JFH-LucUbiNeo mittels eines MTT-Testes untersucht. Dabei zeigte sich, dass TWF5 in den eingesetzten Konzentrationen von 0,01 μM bis maximal 25 μM über einen Inkubationszeitraum von 24 und 48 Stunden keine Reduktion der Zellzahl verglichen mit der DMSO-Negativkontrolle zur Folge hatte (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31).

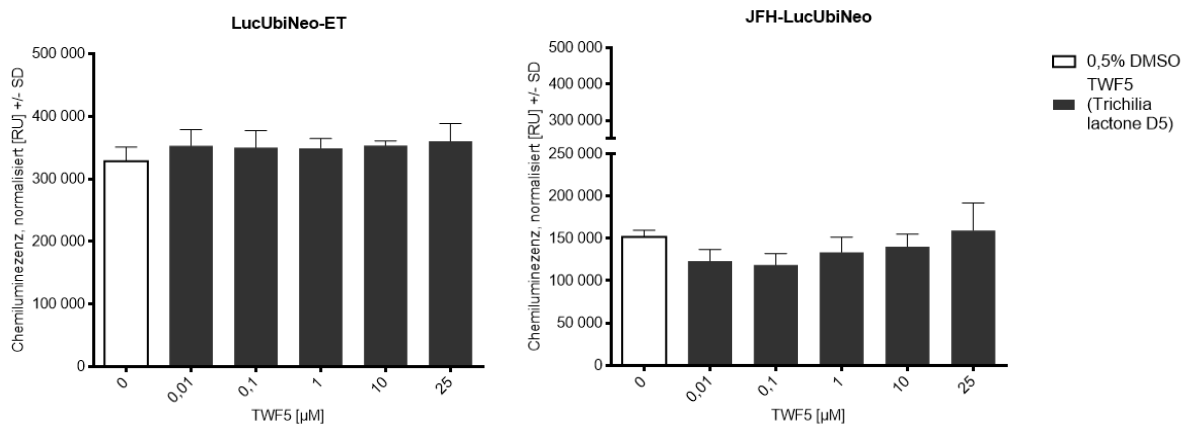


**Abbildung 30: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF5 (*Trichilia lactone D5*), getestet mit dem MTT-Assay**



**Abbildung 31: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF5 (*Trichilia lactone D5*), getestet mit dem MTT-Assay**

Mögliche Effekte der Substanz auf die Zellen wurden über die Chemilumineszenz des Luciferase-Gens bestimmt. Wie in Abbildung 32 und Abbildung 33 gezeigt, hat TWF5 in den eingesetzten Konzentrationen bei einem Inkubationszeitraum von 24 und 48 Stunden keinen Effekt auf die intrazelluläre Viruslast der HCV-transgenen Zelllinien LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo.



**Abbildung 32: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF5 (*Trichilia lactone D5*)**

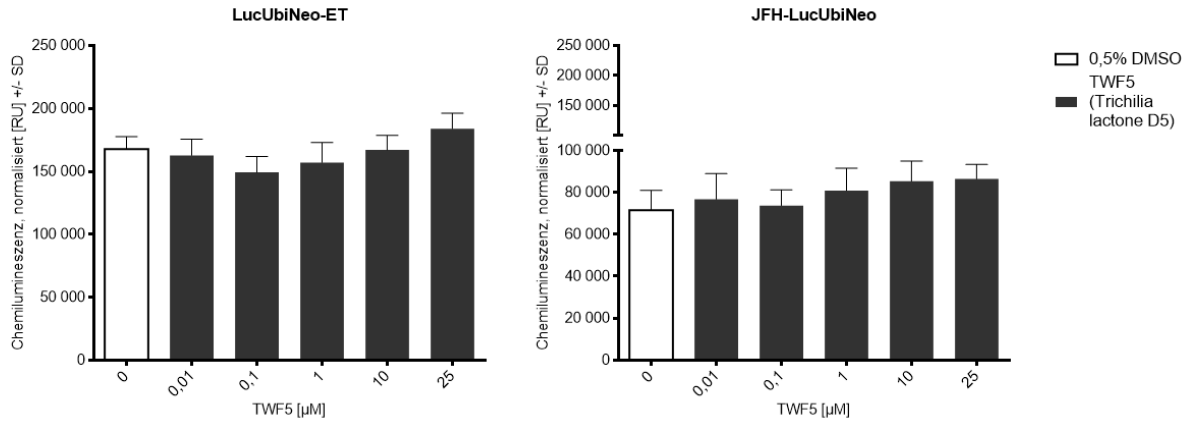


Abbildung 33: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF5 (*Trichilia lactone D5*)

### 3.5 Wirkung des Limonoids TWF9 (*Rohituka-3*)

Zhang *et al.* 2013 und Zhang *et al.* 2007 erwähnten bereits den strukturellen Aufbau des Limonoids TWF9 (*Rohituka-3*), jedoch wurde seine Wirkung auf Hepatitis-C-Virus transgene Zellen bisher noch nicht untersucht. Um sicher zu stellen, dass die eingesetzten Konzentrationen von 0,01 µM bis maximal 25 µM keine toxische Wirkung auf die Zellen vorweisen, wurde zunächst eine Zellviabilitätstestung mittels des MTT-Testes durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Effekt auf die LucUbiNeo-ET Zellen. Hingegen kam es bei den JFH-LucUbiNeo Zellen zu einer Verringerung der Zellzahl bei den Konzentrationen von 0,1 µM, 1 µM und 10 µM nach der 24-Stunden-Inkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurde (siehe Abbildung 34). Dieser Effekt konnte nach 48 Stunden Inkubationsdauer nicht mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35).

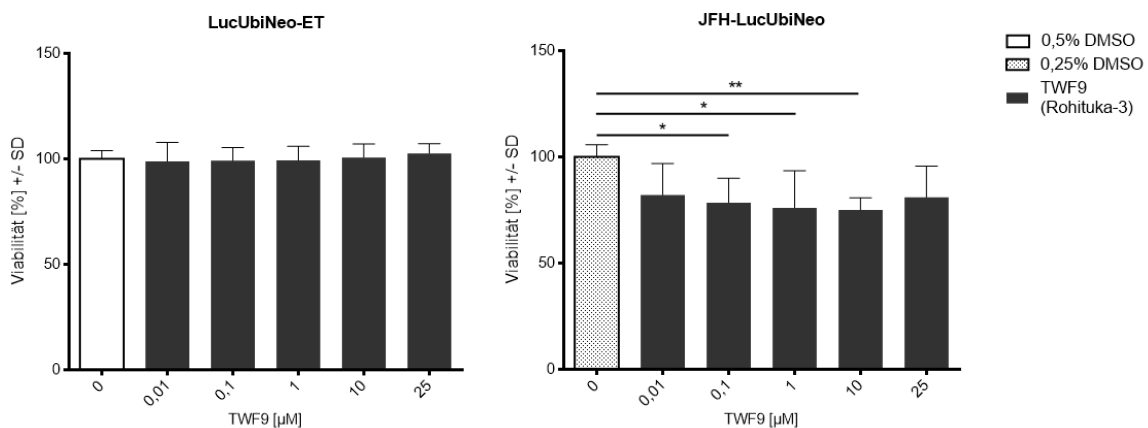


Abbildung 34: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF9 (*Rohituka-3*), getestet mit dem MTT-Assay (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

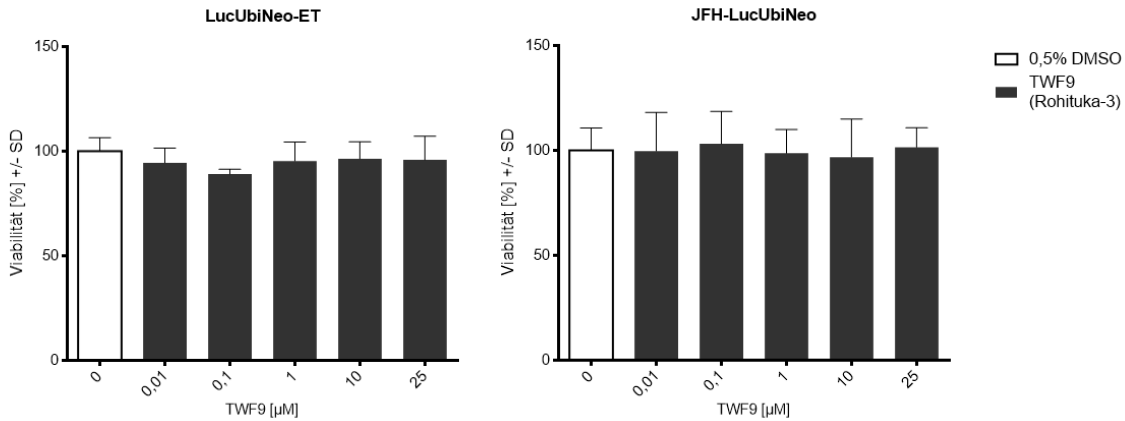


Abbildung 35: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF9 (Rohituka-3), getestet mit dem MTT-Assay

Mögliche Wirkungen des Limonoids TWF9 (Rohituka-3) auf die Zellen wurden über die Chemilumineszenz des Luciferase-Gens bestimmt. Abbildung 36 zeigt dabei, dass 24 Stunden Inkubationszeit in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Virusreplikation innerhalb der HCV-transgenen Zellen verglichen mit der Negativkontrollgruppe hatte. Nach einem Inkubationszeitraum von 48 Stunden konnte bei den LucUbiNeo-ET-Zellen eine signifikante Verminderung der Chemilumineszenz bei 1 µM TWF9 und bei den JFH-LucUbiNeo-Zellen eine signifikante Erhöhung bei einer Konzentration von 10 µM TWF9 gezeigt werden (siehe Abbildung 37).

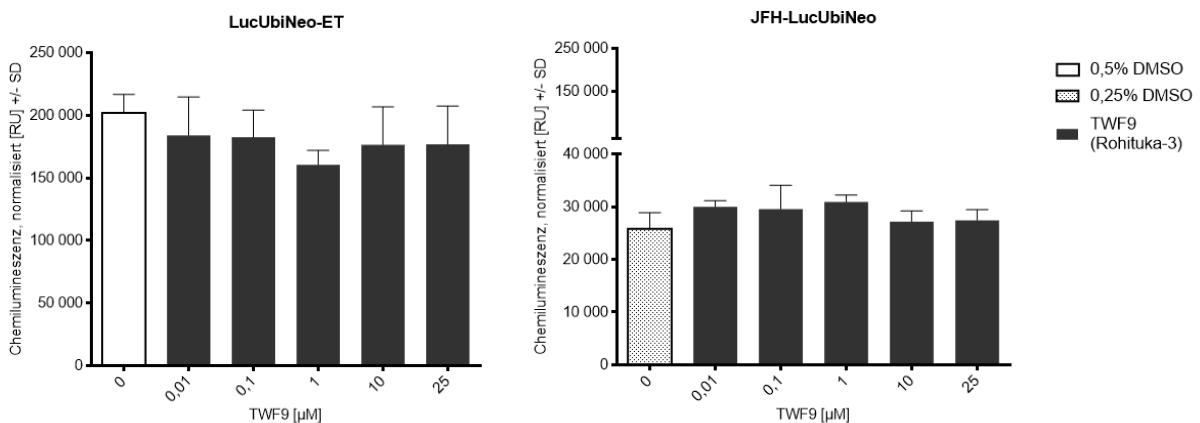


Abbildung 36: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF9 (Rohituka-3)

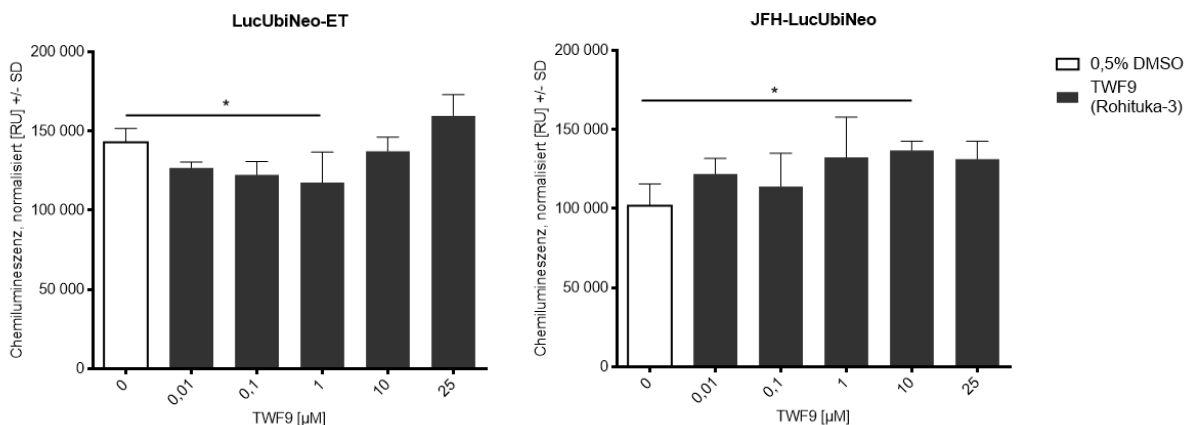


Abbildung 37: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF9 (Rohituka-3) (\* $p < 0,05$ )

### 3.6 Wirkung des Limonoids TWF10 (Dregeanin DM4)

TWF10 (Dregeanin DM4), welches bisher in der Literatur wenig Erwähnung fand, wurde zunächst auf toxische Wirkungen gegenüber den verwendeten Zelllinien untersucht. Mittels des MTT-Testes konnte gezeigt werden, dass TWF10 bei einem Inkubationszeitraum von 24 beziehungsweise 48 Stunden keine Reduktion der Zellzahl in den verwendeten Konzentrationen auf die LucUbiNeo-ET- und die JFH-LucUbiNeo-Zellen zur Folge hat (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). Lediglich die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  TWF10 führte bei den LucUbiNeo-ET-Zellen nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl verglichen mit der DMSO-Negativkontrollgruppe.

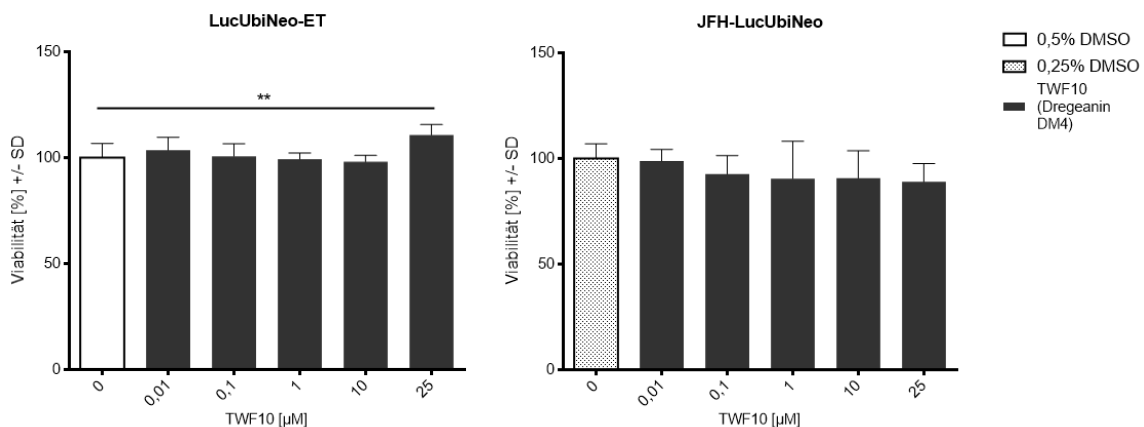


Abbildung 38: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF10 (Dregeanin DM4), getestet mit dem MTT-Assay (\*\* $p < 0,01$ )

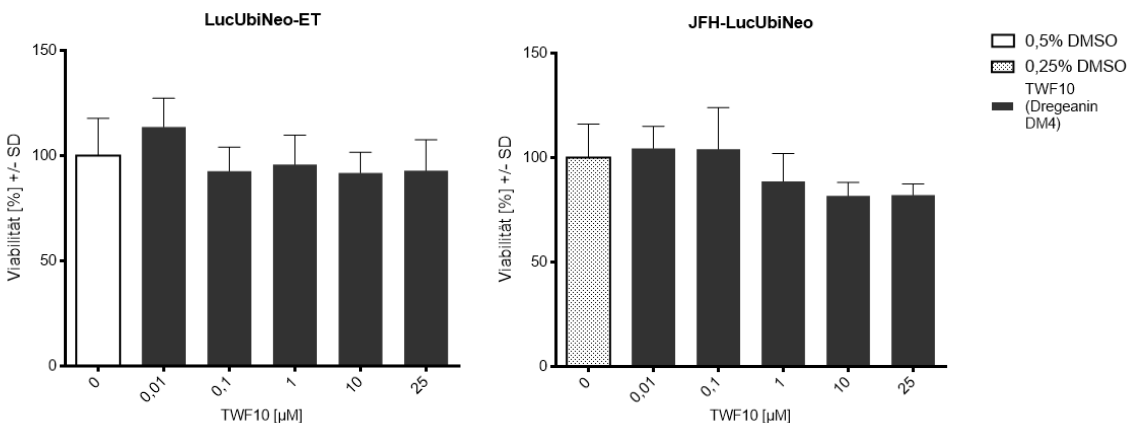


Abbildung 39: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF10 (Dregeanin DM4), getestet mit dem MTT-Assay

Über die Messung der Chemilumineszenz der Zellen wurde der Gehalt an Hepatitis-C-Virus-Replikonsystemen bestimmt. Wie in Abbildung 40 und Abbildung 41 gezeigt, veränderte sich die Chemilumineszenz in den verwendeten Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$  TWF10 in der 24-, sowie in der 48-Stunden-Inkubation nicht signifikant verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle.

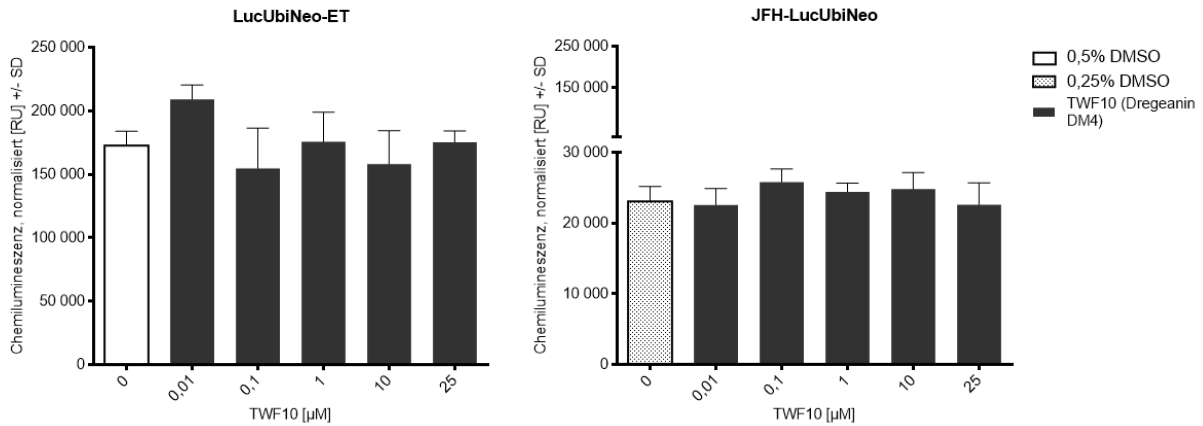


Abbildung 40: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF10 (Dregeanin DM4)

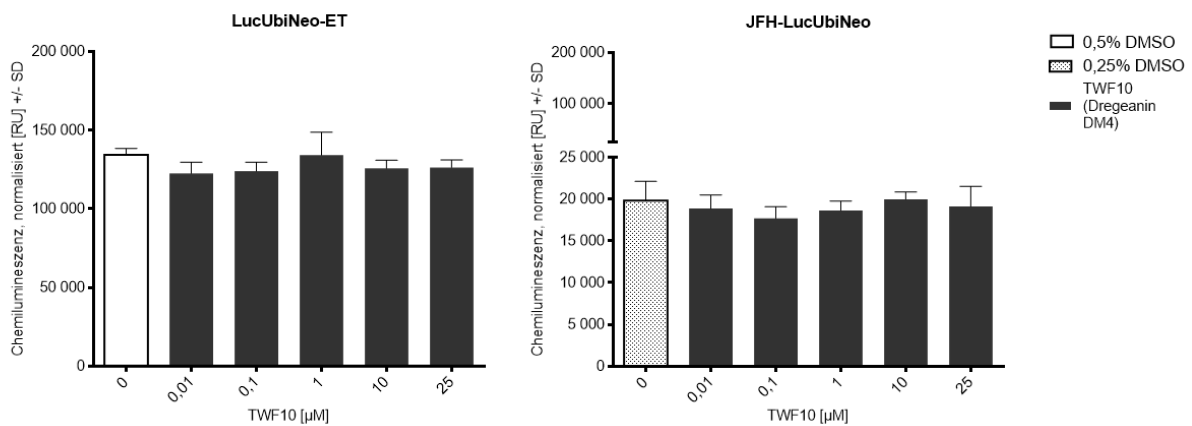


Abbildung 41: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF10 (Dregeanin DM4)

### 3.7 Wirkung des Phytosterols TWT1

Die zur Gruppe der Phytosterole gehörige Substanz TWT1 wurde zunächst über ein MTT-Viabilitätsassay auf zelltoxische Effekte untersucht. Nach Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden zeigte sich in den verwendeten Konzentrationen keine Änderung der Viabilität der LucUbiNeo-ET- und der JFH-LucUbiNeo-Zellen (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43).

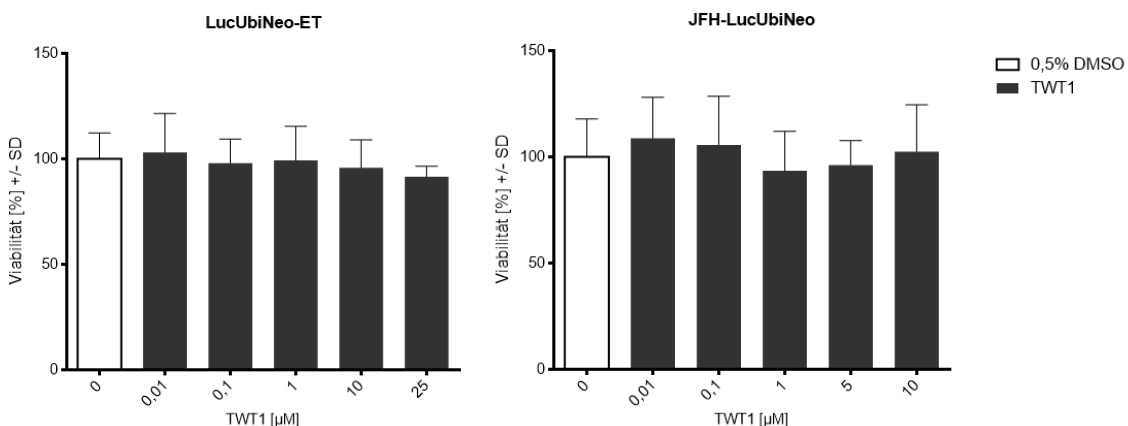
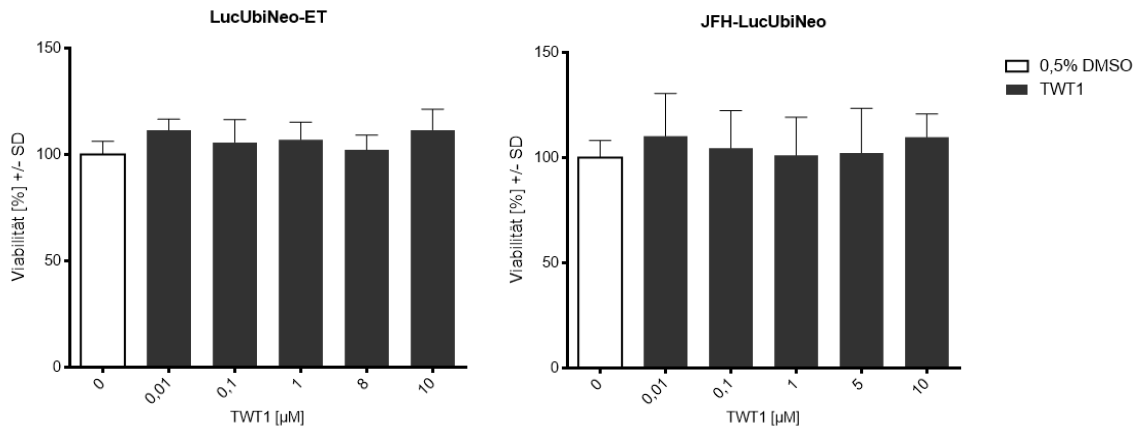


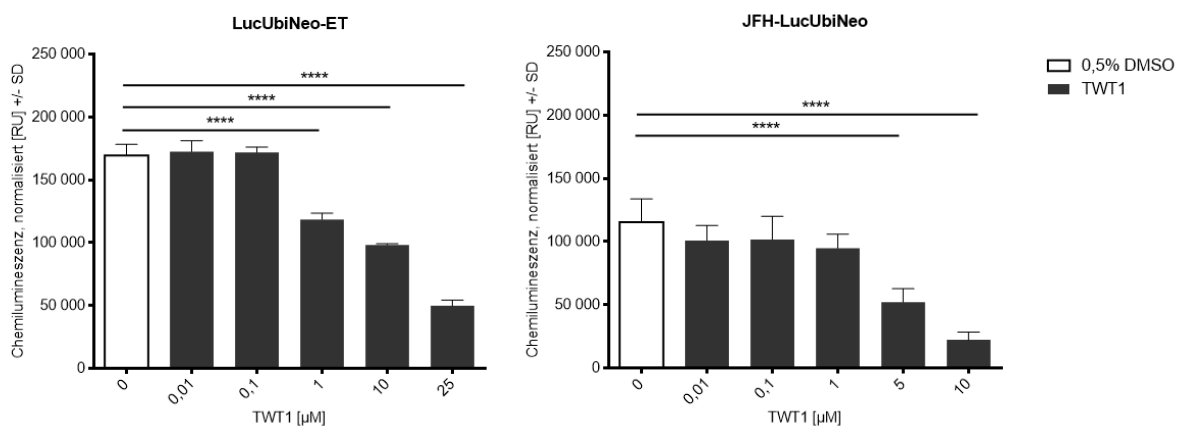
Abbildung 42: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWT1, getestet mit dem MTT-Assay





**Abbildung 43: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWT1, getestet mit dem MTT-Assay**

Mögliche Wirkungen der Substanz wurden über die Messung der Chemilumineszenz beurteilt. Bereits nach 24 Stunden Inkubationsdauer in LucUbiNeo-ET-Zellen zeigte sich bei den Konzentrationen von 1 µM, 10 µM und 25 µM TWT1 eine signifikante Reduktion der Chemilumineszenz und somit der viralen Replikonsysteme (siehe Abbildung 44). Um bei den folgenden Versuchen Substanz zu sparen, wurde als höchste Konzentration 10 µM TWT1 eingesetzt. So zeigte sich ebenfalls nach 24 Stunden Inkubation eine signifikante Reduzierung der Chemilumineszenz bei Konzentrationen von 5 µM und 10 µM TWT1 in den JFH-LucUbiNeo-Zellen.



**Abbildung 44: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWT1 (\*\*\*\* $p < 0,0001$ )**

Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bestätigte sich der zuvor beobachtete Effekt. Die LucUbiNeo-ET-Zellen wiesen eine signifikante Verminderung der Chemilumineszenz bei 8 µM und 10 µM TWT1 auf, die JFH-LucUbiNeo-Zellen bei 5 µM und 10 µM TWT1-Konzentration (siehe Abbildung 45). TWT1-Konzentrationen von 0,01 µM, 0,1 µM und 1 µM führten in den JFH-LucUbiNeo-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden zu einer Erhöhung der Chemilumineszenz verglichen mit der DMSO-Kontrollgruppe.

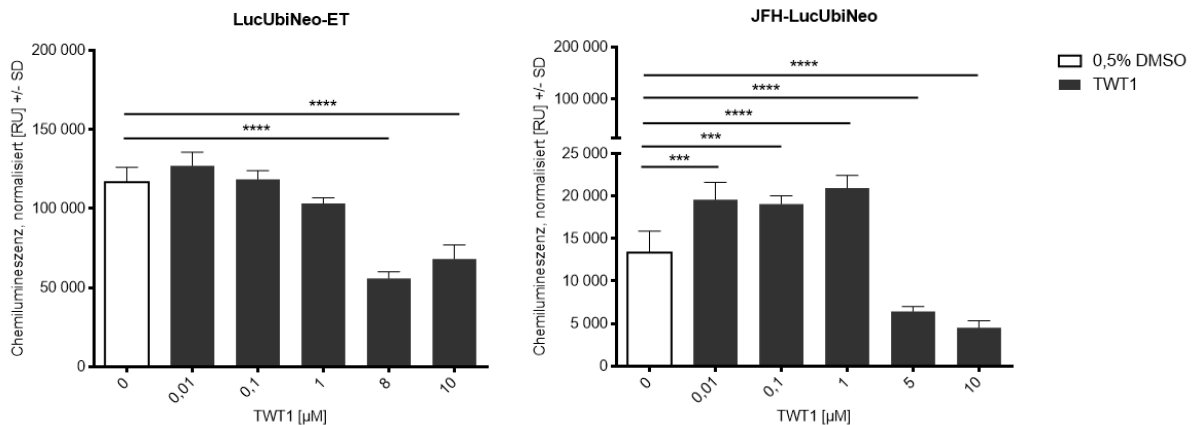


Abbildung 45: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWT1 (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden die Versuche reproduziert (Daten nicht gezeigt) und logarithmisch aufgetragen, um eine halb-maximale effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) bestimmen zu können (Abbildung 46). Dabei ergibt sich bei einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden für das LucUbiNeo-ET-Zellsystem eine Konzentration von  $EC_{50} = 1,186 \mu\text{M}$  TWT1 (95% KI: 0,9204 – 1,529) und für die JFH-LucUbiNeo-Zellen eine Konzentration von  $EC_{50} = 1,272 \mu\text{M}$  TWT1 (95% KI: 1,014 – 1,596).

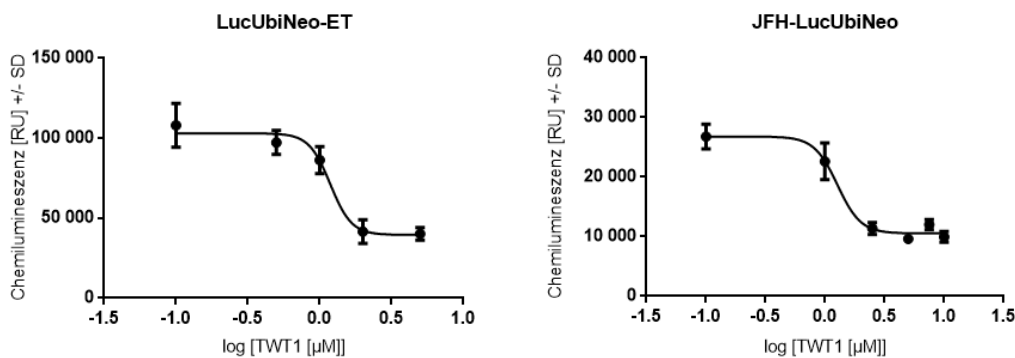
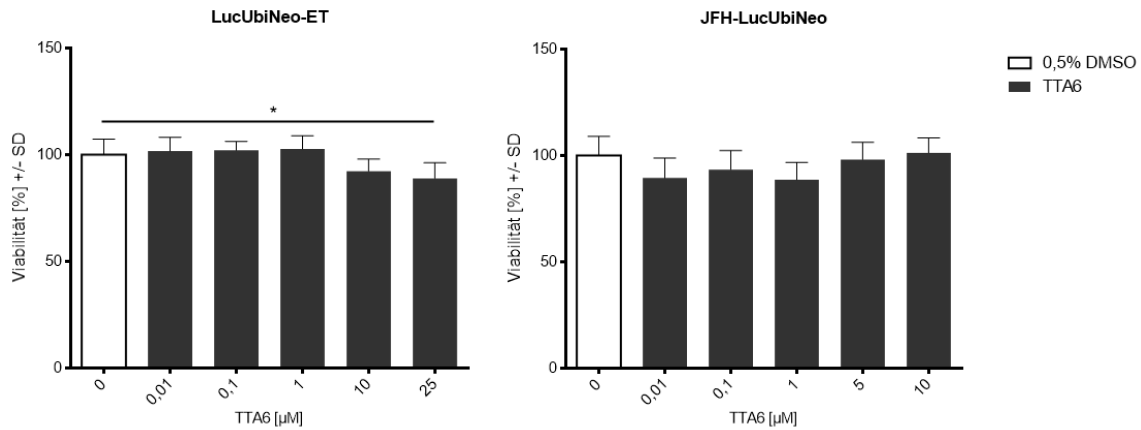


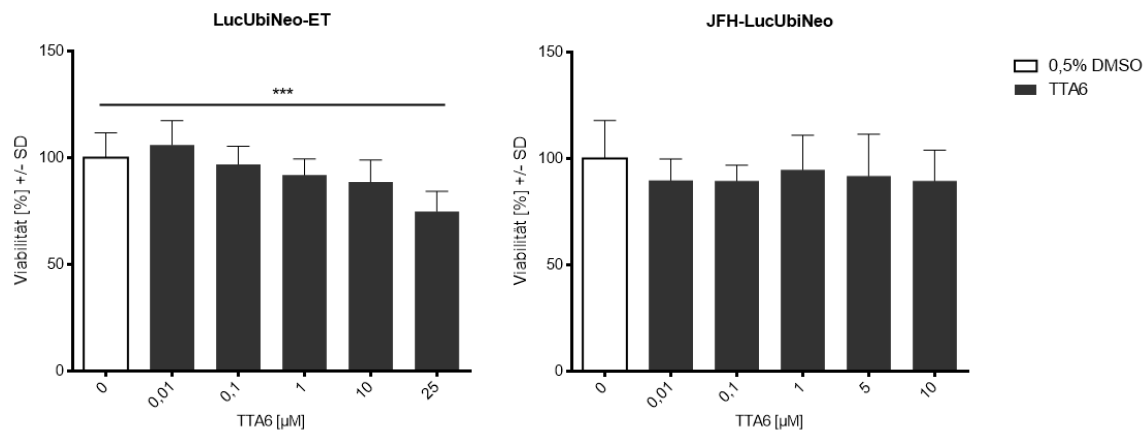
Abbildung 46: Logarithmische Auftragung der Chemilumineszenz von LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit mit TWT1

### 3.8 Wirkung des Phytosterols TTA6

Die ebenfalls zur Gruppe der Phytosterole gehörige Substanz TTA6 wurde zunächst über einen MTT-Viabilitätsassay auf zelltoxische Effekte untersucht. Bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigte die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  TTA6 eine signifikante Reduktion der LucUbiNeo-ET-Zellen verglichen mit der Lösungsmittel-Kontrollgruppe (Abbildung 47). Nach 48 Stunden Inkubation bestätigte sich dieser Effekt (Abbildung 48), sodass in folgenden Versuchen die eingesetzte Höchstkonzentration auf maximal 10  $\mu\text{M}$  verringert wurde. Diese Konzentration wies in den LucUbiNeo-ET und in den JFH-LucUbiNeo-Zellen keine Änderung der Zellviabilität auf (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).

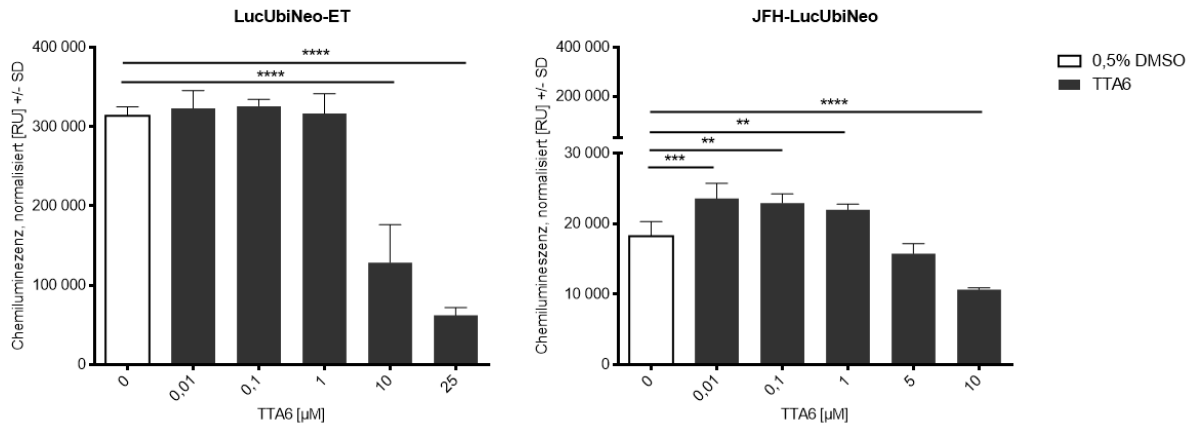


**Abbildung 47:** Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TTA6, getestet mit dem MTT-Assay (\* $p < 0,05$ )



**Abbildung 48:** Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TTA6, getestet mit dem MTT-Assay (\*\*\* $p < 0,001$ )

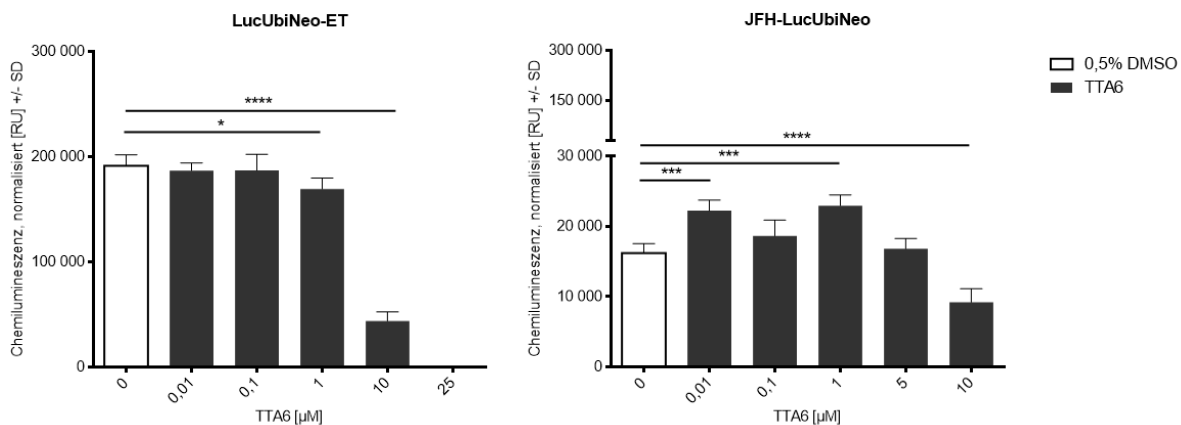
Mögliche Effekte von TTA6 wurden durch Messung der Chemilumineszenz beurteilt. Die toxische Konzentration von 25 µM TTA6 zeigte bereits nach 24 Stunden Inkubation eine signifikante, starke Verminderung der Chemilumineszenz in den LucUbiNeo-ET Zellen. Jedoch führte auch die Konzentration von 10 µM TTA6 zu einer signifikanten Reduktion (siehe Abbildung 49). Bei den JFH-LucUbiNeo-Zellen ergab die Konzentration von 10 µM TTA6 über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden ebenfalls eine signifikante Reduktion der Chemilumineszenz. Die niedriger getesteten Konzentrationen von 0,01 µM, 0,1 µM und 1 µM führten hingegen zu einer signifikanten Steigerung der Chemilumineszenz im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrollgruppe (Abbildung 49).



**Abbildung 49:** Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TTA6 (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte bei der toxischen Konzentration von 25 µM in den LucUbiNeo-ET-Zellen gar keine Chemilumineszenz detektiert werden. Die zuvor bei einem 24-Stunden-Inkubationszeitraum signifikant reduzierend wirkende Konzentration von 10 µM TTA6 reduzierte auch nach 48 Stunden die Chemilumineszenz in den LucUbiNeo-ET-Zellen signifikant im Vergleich zur Negativkontrollgruppe. Auch die eingesetzte Konzentration von 1 µM TTA6 führte zu einer Reduktion (siehe Abbildung 50).

Die ebenfalls zuvor bei der 24-Stunden-Inkubationsdauer signifikant reduzierend wirkende Konzentration von 10 µM TTA6 reduzierte auch nach 48 Stunden die Chemilumineszenz in den JFH-LucUbiNeo-Zellen signifikant verglichen mit der DMSO-Negativkontrolle. Zusätzlich führten die niedrigeren Konzentrationen von 0,01 µM und 1 µM TTA6 wiederum zu einer Erhöhung der Chemilumineszenz in den JFH-LucUbiNeo-Zellen. Dieser Effekt zeigte sich bereits nach 24 Stunden Inkubation und bestätigte sich nach 48 Stunden (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TTA6 (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden die Versuche reproduziert (Daten nicht gezeigt) und logarithmisch aufgetragen, um eine halb-maximale effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) bestimmen zu können (Abbildung 51). Dabei ergibt sich bei einem Inkubationszeitraum von 48 Stunden für die LucUbiNeo-ET-Zellen eine Konzentration von  $EC_{50} = 6,333$  µM TTA6 (95% KI: 5,556 – 7,219) und für die JFH-LucUbiNeo-Zellen eine ungefähre Konzentration von  $EC_{50} \approx 29,71$  µM TTA6 (95% KI aus den vorhandenen Daten nicht ermittelbar).

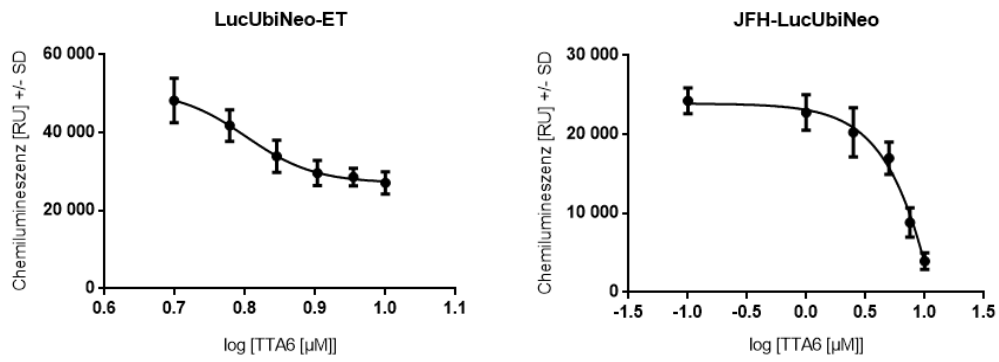


Abbildung 51: Logarithmische Auftragung der Chemilumineszenz von LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit mit TTA6

## 4 Diskussion

### 4.1 Vitamin D<sub>3</sub> und dessen Derivate-vermittelte Wirkung auf die HBV-Replikation

#### 4.1.1 Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und verringert zeitgleich den rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand

Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) ist schon lange unter anderem bekannt als potenter Immunmodulator. Ein Vitamin-D<sub>3</sub>-Mangel ist mit vielfältigen Erkrankungen assoziiert. Seit die Arbeitsgruppe um Farnik *et al.* einen Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D<sub>3</sub> Spiegeln im Serum von chronischen Hepatitis-B-Patienten und schlechterem Therapieansprechen postulierte, nahm das Interesse auf diesem Gebiet zu (Farnik *et al.* 2013). Zur Erforschung des intrazellulären Wirkmechanismus wurde mit dem HBV-transgenen Zelllinien HepG2.2.15 und HepG2-H1.3 gearbeitet. In diesen Zelllinien wurden Konzentrationen von 0,01 µM bis 10 µM Vitamin D<sub>3</sub> eingesetzt. Diese Konzentrationen stellen einen Überblick über vier Logstufen dar und orientieren sich rund um die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Konzentration an der täglichen Mindestaufnahme von Calcidiol (0,05 µM) (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2017). Die höchste eingesetzte Konzentration von 10 µM Cholecalciferol zeigte im Zellmodell eine Erhöhung des Hepatitis-B-Oberflächenantigens HBsAg nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden. Das Oberflächenantigen umgibt filamentös den kompletten Viruspartikel wie eine Art Hülle (Koziel und Thio 2010). Es ist durchaus möglich, dass der Viruspartikel durch Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> von mehr HBsAg-Filamenten umhüllt wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass freie Filamente in das Zellkulturmedium sezerniert und so mittels des ELISA detektiert wurden (siehe Abbildung 18). Von einer realen Vermehrung des Virus ist in diesem Versuchsaufbau nicht auszugehen, da die gemessene Menge an extrazellulärer DNA, sogenannte entspannt-zirkuläre DNA (rcDNA), bei der effektiven Konzentration von 10 µM Cholecalciferol signifikant reduziert war (siehe Abbildung 19). Auch von einem toxischen Effekt des Vitamins auf die Zellen ist nicht auszugehen. Die in Abbildung 15 und Abbildung 16 gezeigten toxischen Effekte sind dem Zellkultursystem an sich geschuldet. Auch wenn standardisiert vorgegangen wurde, können Unterschiede in der ausgezählten und ausgesäten absoluten Zellzahl pro Kavität der Versuchsplatte nicht ausgeschlossen werden. So führen mehr ausgesäte Zellen in den Kavitäten der Vergleichsreihe zu einer vermeintlichen Abnahme der Zellzahl in den anderen Reihen. Auch können die oben genannten Effekte beobachtet werden, wenn sich die Zellen nicht alle gleich schnell und gleich oft vermehren. Zur Vermeidung dieser Diversitäten wurden immer jeweils Vierfach-Bestimmungen durchgeführt. Der vermeintlich toxische Effekt nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit ist nach einer 72-Stunden-Inkubation nicht mehr zu beobachten, was ebenfalls für einen Zelleffekt spricht und nicht für eine Toxizität der Substanz an sich. Ausgehend von der Annahme, dass Cholecalciferol in einer Konzentration von 10 µM für beide Zelllinien nicht toxisch ist, konnte eine signifikante Abnahme der extrazellulären Hepatitis-B-Virus-rcDNA bei gleichzeitiger Vermehrung des Oberflächenantigens HBsAg gemessen werden. Diese Daten zeigen möglicherweise den bisher nur *in vivo* gezeigten Effekt, dass hohe Serumkonzentrationen von Vitamin D<sub>3</sub> mit niedrigeren HBV-DNA-Spiegeln einhergehen (Chen *et al.* 2015, Farnik *et al.* 2013).

#### **4.1.2 Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) in HepG2-H1.3-Zellen**

Zur weiteren Untersuchung möglicher *in vitro*-Effekte von Vitamin D<sub>3</sub> wurden als nächstes Versuchsreihen mit dem Derivat Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) durchgeführt. Dieses wird natürlicherweise durch die in den Leberzellen vorhandene mitochondriale 25-Hydroxylase (CYP27A1) aus Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) gebildet. Im menschlichen Körper ist es die Form von Vitamin D<sub>3</sub>-Derivaten, welche den prozentual größten Anteil ausmacht.

Wie bereits für Cholecalciferol gezeigt, erhöhte sich auch in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM Calcidiol signifikant die Menge an HBV-Oberflächenantigen HBsAg nach 72 Stunden Inkubationszeit (siehe Abbildung 23). Jedoch wurde dieser Effekt nur bei einer der beiden untersuchten Zelllinien beobachtet. Dies kann wiederum durch eine vermehrte Bestückung mit HBsAg-Filamenten um das Viruspartikel oder mit vermehrter Bildung freier Filamente erklärt werden. Von einer Erhöhung der Viruskonzentration ist nicht auszugehen, da die extrazelluläre rcDNA im Zellkulturüberstand der HepG2-H1.3 bei einer Konzentration von 10 µM Calcidiol nicht erhöht ist (siehe Abbildung 24). Hingegen zeigt sich sogar eine Tendenz zur Verringerung der rcDNA, welche jedoch nicht signifikant ist. Dieser Trend ist ebenfalls bei den HepG2.2.15-Zellen zu erkennen, ohne dass es eine Veränderung in der HBsAg-Konzentration gibt. Bisher unveröffentlichte Daten einer kooperierenden Arbeitsgruppe um Prof. Protzer in München zeigen eine signifikante Verringerung der rcDNA bei Inkubationskonzentrationen von bis zu 10 µM Calcidiol in HepG2.2.15, welche den hier gezeigten Trend bestätigt. Dass die gezeigten Daten keine Signifikanz aufweisen, kann wiederum dem Zellkultursystem an sich geschuldet sein. Unterschiedlich starkes Wachstum der Zellen oder unterschiedlich viele ausgesäte Zellen in den jeweiligen Kavitäten der Probenplatte könnten Gründe gewesen sein. Dies sind ebenfalls mögliche Faktoren, um die Toxizität von 10 µM Calcidiol nach 24 Stunden Inkubation auf die HepG2-H1.3-Zellen zu erklären. Da der Effekt sich nach 48 und 72 Stunden nicht reproduzieren lässt, ist von einer nicht realen Toxizität auszugehen (siehe Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22).

#### **4.1.3 Calcitriol (1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) weist möglicherweise in niedrigen Konzentrationen zytotoxische Effekte in HepG2.2.15-Zellen und zellvermehrende Effekte in HepG2-H1.3-Zellen auf**

Das zweite Derivat von Vitamin D<sub>3</sub>, Calcitriol (1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), wurde ebenfalls auf seine *in vitro*-Effekte untersucht. Calcitriol wird mittels des in Nierenzellen befindlichen mitochondrialen Enzyms 1α-Hydroxylase aus Calcidiol gebildet und weist die höchste biologische Aktivität aller drei Derivate auf (Rosen 2011). Durch die bekannte hohe biologische Aktivität wurden in den Versuchsreihen mit Calcitriol bereits eine Logstufe geringere Konzentrationen gewählt (0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM statt 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM Calcitriol beziehungsweise Cholecalciferol). Die in Abbildung 25 und Abbildung 26 gezeigten Ergebnisse, dass es in den HepG2.2.15 Zellen bei Konzentrationen von 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM und 1 µM nach 24 Stunden Inkubationszeit respektive bei 0,001 µM, 0,01 µM und 0,1 µM nach 48 Stunden Inkubationszeit zu einer Verminderung der Zellviabilität gekommen ist, kann, wie oben bereits ausgeführt wurde, dem Zellkultursystem an sich geschuldet sein. Wie ebenfalls erläutert, gibt es sicherlich immer Unterschiede in den ausgesäten Zellzahlen, obwohl ein standardisiertes Zähl- und Verdünnungsverfahren genutzt wurde. Um die Effekte so weit wie möglich auszugleichen, wurde jeweils eine Vier-

fachbestimmung für jede Konzentration durchgeführt. In einer anderen *in vitro*-Arbeit mit ebenfalls humanen Hepatomzellen (Hep-3B) konnten die Autoren eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Zellwachstums der Hep-3B-Zellen ab Konzentrationen von 0,0001  $\mu\text{M}$  Calcitriol belegen (Pourgholami *et al.* 2000). Die Inkubationsdauer betrug jedoch 120 Stunden, sodass die Daten nicht in dem Sinne vergleichbar sind. Im Falle einer realen Toxizität der Konzentrationen an Calcitriol sollte sich dieser Effekt theoretisch nach verlängerter Inkubationszeit verstärken. Dies ist nach den vorliegenden Daten nicht der Fall (siehe Abbildung 27), sodass in erster Linie von einem dem Zellkultursystem geschuldeten Zellverlust auszugehen ist.

Bei der zweiten untersuchten HBV-transgenen Zelllinie HepG2-H1.3 zeigte sich jedoch ein inverser Effekt: Die beiden niedrigsten eingesetzten Konzentrationen (0,001  $\mu\text{M}$  und 0,01  $\mu\text{M}$  Calcitriol) führen zu einer Steigerung der Zellzahl nach 48 Stunden (siehe Abbildung 26). Auch dies ist möglicherweise dem Zellkultursystem an sich geschuldet. So könnte beispielsweise eine zu gering ausgesäte Anzahl an Zellen in der Referenzreihe eine Begründung sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass die eingesetzte 0,05 % (v/v) Ethanolkonzentration als Standardreferenz eine toxische Wirkung auf die HepG2-H1.3-Zellen nach 48 Stunden aufweist. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da zuvor Testreihen mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen mit den beiden Zelllinien gemacht wurden, die eine Toxizität auf die Zellen erst bei 10 % (v/v) Ethanol nach 48 Stunden aufzeigen (Daten nicht gezeigt).

#### **4.1.4 Calcitriol ( $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin $\text{D}_3$ ) führt in niedrigen Konzentrationen zu einer Vermehrung des HBV-Oberflächenantigens HBsAg bei gleichbleibender rcDNA-Konzentration im Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen**

Bei der Untersuchung von Calcitriol ( $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ ) auf die HepG2.2.15 konnte nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden eine signifikante Erhöhung des HBV-Oberflächenantigens HBsAg nachgewiesen werden (siehe Abbildung 28). Dieser Effekt zeigte sich besonders bei den niedrigen eingesetzten Konzentrationen von 0,001  $\mu\text{M}$  und 0,01  $\mu\text{M}$  Calcitriol. Wie zuvor in Abschnitt Cholecalciferol (Vitamin  $\text{D}_3$ ) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und verringert zeitgleich den rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand und Abschnitt Calcidiol (25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$ ) erhöht konzentrationsabhängig die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) in HepG2-H1.3-Zellen erläutert, zeigt sich dieser Effekt ebenfalls für Cholecalciferol bei beiden eingesetzten HBV-transgenen Zelllinien und für Calcidiol nur bei HepG2-H1.3-Zellen. Mögliche Erklärung sind in allen Fällen die vermehrte Bestückung mit HBsAg-Filamenten an den fertigen HBV-Partikeln oder die freie Sezernierung von Filamenten in das umgebene Zellkulturmedium.

Anders als bei den beiden Vorstufen Calcidiol (25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$ ) und Cholecalciferol (Vitamin  $\text{D}_3$ ) wirkt Calcitriol offenbar in den niedrigsten eingesetzten Konzentrationen. Dieser Unterschied lässt sich nach aktuellem Wissenstand nicht interpretieren. Ferner zeigt Calcitriol keine Auswirkung auf die Konzentration an rcDNA im Zellkulturmedium verglichen zur Standardkontrollgruppe.

#### **4.1.5 Calcitriol ( $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin $\text{D}_3$ ) verringert konzentrationsabhängig den HBsAg und rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand von HBV-transgenen HepG2-H1.3-Zellen**



Entgegen der bisher gezeigten Daten für Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) und Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) führt Calcitriol in den Konzentrationen von 0,1 µM und 1 µM bei einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden zu einer Verringerung der HBsAg-Filamente im Zellkulturmedium von HepG2-H1.3-Zellen (siehe Abbildung 28). Dieses Erkenntnis ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht anderweitig publiziert oder bestätigt worden. Der strukturelle Aufbau der drei Vitaminderivate ist unterschiedlich, sodass nicht grundsätzlich von einer gleichbleibenden Wirkungsweise ausgegangen werden kann. Die zusätzliche Hydroxylgruppe im Calcitriol kann durchaus andere molekulare Mechanismen angreifen und so zu einer Verminderung des HBV-Oberflächenantigens HBsAg führen.

Wie auch für Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) gezeigt, reduziert Calcitriol in den höchsten Konzentrationen den rcDNA-Gehalt im Zellkulturmedium signifikant nach 72 Stunden Inkubation (siehe Abbildung 29). Es könnte somit beispielsweise davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der kompletten Viruspartikel vermindert wird, denn es ist weniger HBsAg nachweisbar und auch der Gehalt an rcDNA ist niedriger. Diese Daten sprechen nur für das frei in das Medium sezernierte Viruspartikel. Der Gehalt von intrazellulärer Hepatitis-B-Virus-cccDNA wurde aktuell nicht mit einbezogen. Weitere *in vitro*-Arbeiten in ähnlicher Art und Weise sind derzeit noch nicht publiziert. Es sollte als nächster Schritt eine Analyse des intrazellulären Wirkmechanismus durchgeführt werden.

## 4.2 Wirkung pflanzlicher Limonoide und Phytosterole aus *T. welwitschii* auf die HCV-Replikation

### 4.2.1 Limonoide TWF5 (*Trichilia lactone D5*), TWF9 (*Rohituka-3*) und TWF10 (*Dregeanin DM4*) zeigen keinen Effekt in HCV-transgenen Zellen

Die Nachfrage nach alternativen und pflanzlichen Behandlungsmöglichkeiten für diverse Krankheiten und Symptome ist in den letzten Jahrzehnten enorm angewachsen. Erschwinglichere Produkte mit weniger Nebenwirkungen stellen einen großen Markt dar. So ist es nicht verwunderlich, dass Pflanzen, welche bereits seit Jahrhunderten in der traditionellen afrikanischen Medizin eingesetzt werden, nun laborchemisch analysiert werden. So wurden in den letzten Jahren über 100 pflanzliche Limonoide aus Pflanzen der *Meliaceae*-Familie isoliert. Es konnten viele verschiedene Effekte nachgewiesen werden. Einen Überblick bietet Tabelle 15.

Die Limonoide TWF5 (*Trichilia lactone D5*), TWF9 (*Rohituka-3*) und TWF10 (*Dregeanin DM4*) aus den Wurzeln der afrikanischen Pflanze *Trichilia welwitschii*, welche zur Gruppe der *Meliaceae* gehört, zeigten in den eingesetzten Konzentrationen von 0,01 bis 25 µM keinen Effekt auf die Hepatitis-C-transgenen Zelllinien LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit Extrakten aus den Wurzeln der westafrikanischen Pflanze *Trichilia dregeana* (*Meliaceae*), welche auf ebenfalls einer HCV-transgenen Zelllinie (Huh-7) getestet wurden, zeigte hingegen eine starke antivirale Aktivität gegen das Hepatitis-C-Virus (Galani *et al.* 2015). Es wurden Konzentrationen bis zu 125 µg/ml der luftgetrockneten und pulverisierten Wurzeln eingesetzt. Höhere Konzentrationen zeigten einen zytotoxischen Effekt auf die Huh-7-Zellen. In den oben gezeigten Versuchen wurden umgerechnet Konzentrationen bis zu 17,6 µg/ml für TWF5, 15 µg/ml für TWF9 und 14,6 µg/ml für TWF10 (siehe Tabelle 17) eingesetzt. Da die beiden verwendeten HCV-transgenen Zelllinien von Huh-7-Zellen abstammen, könnte von einem ähnlichen Effekt ausgegangen werden. In einer 2014 veröffentlichten Arbeit aus der Arbeitsgruppe um Galani (Galani *et al.*

2014) wurden Extrakte aus der artverwandten afrikanischen Pflanze *Entada africana* (Familie der *Fabaceae*) untersucht. Dabei wurden wie in oben gezeigten Versuchen LucUbiNeo-ET Zellen verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen betragen hierbei bis zu 1 mg/ml (entspricht 1000 µg/ml), es zeigten sich jedoch bereits Effekte bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml (entsprechend 100 µg/ml). Da die von der Arbeitsgruppe um Galani (Galani *et al.* 2015, Galani *et al.* 2014) verwendeten Pflanzenextrakte nicht näher kategorisiert wurden, könnten sie somit verschiedene Wirkstoffe enthalten. Davon ausgehend, dass bei der artverwandten Pflanze *Trichilia dregeana* ebenfalls Limonoide eine Hauptkomponente des Pflanzenextraktes bilden, könnte argumentiert werden, zukünftig höhere Konzentrationen von TWF5, TWF9 und TWF10 einzusetzen. Nicht abgebildete, institutsinterne Ergebnisse aus Vorversuchen mit allen drei Limonoiden zeigten jedoch eine Toxizität auf HepG2-Zellen in höheren Konzentrationen als 25 µM. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden Versuche mit bis zu 25 µM Konzentrationen geplant. HepG2-Zellen stammen ebenso wie die LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen von einer Hepatomzelllinie ab, unterscheiden sich jedoch in ihren spezifischen Eigenschaften. Über eine Vergleichbarkeit der Toxizitäten lässt sich diskutieren. Als weiteres Argument für die niedrigen verwendeten Konzentrationen lässt sich anbringen, dass das aus *Trichilia welwitschii* isolierte Limonoid TWF5 (*Trichilia lactone D5*) in RAW-264.7-Zellen bereits ab Konzentrationen von 5 µg/ml eine signifikante Verminderung der Zellviabilität zur Folge hatte (Dzoyem *et al.* 2015).

Die in Abbildung 34 gezeigte Reduktion in der Viabilität der JFH-LucUbiNeo Zellen für 0,01 µM, 0,1 µM und 1 µM TWF9 nach 24 Stunden Inkubationszeit lässt sich durch das Zellkultursystem an sich erklären. So könnten beispielsweise zu viele Zellen in der Referenzreihe ausgesät worden sein. Dass es sich um ein wahrscheinlich nicht relevantes Ergebnis handelt, liegt darin begründet, dass der zelltoxische Effekt nach 48 Stunden nicht mehr vorhanden ist. Theoretisch sollte er nach längerer Inkubationszeit stärker hervortreten. Außerdem ist es nicht erklärbar, warum die niedrigsten eingesetzten Konzentrationen einen Effekt hervorheben sollen, nicht jedoch die höchsten eingesetzten Konzentrationen. Wäre die Substanz wirklich toxisch für die Zellen, müsste sich der Effekt auch für die zweite getestete Zelllinie LucUbiNeo-ET zeigen, was aber nicht der Fall ist. Die gleiche Argumentationsweise kann für die in Abbildung 38 gezeigte Erhöhung von LucUbiNeo-ET Zellen bei einer Konzentration von 25 µM TWF10 angewandt werden. Ein physiologisch relevanter Effekt sollte sich bei einer längeren Inkubationsdauer von 48 Stunden verstärken. Die Prüfstatistik ist mit Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 definiert und zeigte Signifikanzen an. Diese sind jedoch, wie zuvor ausgeführt, weder biologisch noch physiologisch erklärbar, sodass von einer falsch-positiven Signifikanz auszugehen ist. Es besteht keine bedeutende Toxizität für die eingesetzten Konzentrationen der Limonoide. Dies bestätigte sich auch bildmorphologisch bei der Betrachtung der Zellen (Bilder nicht gezeigt).

Wie bereits oben ausgeführt, sind die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen an TWF5, TWF9 und TWF10 wahrscheinlich zu gering. So ist der in Abbildung 37 gezeigte Effekt einer Reduktion der Chemilumineszenz bei 1 µM TWF9-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation in LucUbiNeo-ET-Zellen sicherlich ebenfalls dem Zellkultursystem an sich geschuldet. Eine wirkliche Reduzierung sollte konzentrationsabhängig mit steigender Konzentration und meistens auch zeitabhängig mit steigender Inkubationsdauer stattfinden. Da der gezeigte Effekt lediglich bei 48 Stunden und bei einer Konzentration auftritt, ist er zu vernachlässigen. Der konträre Effekt dazu, die Erhöhung der Chemilumineszenz bei 10 µM TWF9 nach 48 Stunden Inkubationsdauer in JFH-LucUbiNeo-Zellen, ist ebenfalls als zufälliges Ergebnis zu werten. Vermutlich wurden hierbei in der Kontrollreihe zu wenige Zellen ausgesät.

Auch wenn bestmöglich standardisiert ausgezählt und vorgegangen wurde, können Fehler bei Zellkulturversuchen durch menschliches Versagen oder durch unterschiedliches Zellwachstum nie ganz ausgeschlossen werden.

#### **4.2.2 Das Phytosterol TWT1 zeigt eine konzentrationsabhängige HCV-Reduktion in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen**

Pflanzensterole, auch Phytosterole genannt, sind natürliche Bestandteile der pflanzlichen Zellmembran (Law 2000). Ähnlich wie bei den Limonoiden wurden verschiedene Effekte bereits nachgewiesen. Einen Überblick bietet Tabelle 16. Entsprechend aktueller Recherchen konnte bisher kein antiviraler Effekt von Phytosterolen gegen das Hepatitis-C-Virus im Zellkulturmodell gezeigt werden. Bisherige Arbeiten erwiesen einen *in vivo*-Effekt gegen das Herpes-simplex-Virus-Typ-1 (HSV-1) (Petrera *et al.* 2014, Phongmaykin *et al.* 2011, Eugster *et al.* 1997), das humane Zytomegalievirus (CMV) (Eugster *et al.* 1997), das Tabak-Mosaik-Virus (TMV) (Yan *et al.* 2014) und das humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) (Eugster *et al.* 1997). Umso richtungsweisender sind die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse.

Die verwendeten Konzentrationen des Phytosterols TWT1 von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$  waren nicht toxisch für die HCV-transgenen Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Des Weiteren zeigt sich ein konzentrationsabhängiger, die Chemilumineszenz reduzierender Effekt in der LucUbiNeo-ET-Zelllinie (siehe Abbildung 44 und Abbildung 45). Bei dieser signifikanten Reduktion der Chemilumineszenz ist davon auszugehen, dass weniger von dem intrazellulären Con1-Replikonsystem, welches für Hepatitis-C-Virus-Enzyme codiert, vorhanden war. Somit lässt sich schlussfolgern, dass das Phytosterol TWT1 einen antiviralen Effekt auf das Hepatitis-C-Virus aufweist. In beiden untersuchten Zelllinien zeigt sich die Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  als besonders effektiv. Anhand der gewonnenen Daten konnte die halbmaximale effektive Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) für TWT1 anhand einer Dosis-Antwort-Kurve ausgerechnet werden. Für die Zelllinie LucUbiNeo-ET beträgt der Wert nach 24 Stunden Inkubationsdauer 1,186  $\mu\text{M}$ , entsprechend einer Konzentration von 509,98  $\mu\text{g/l}$  TWT1. Bei der HCV-transgenen Zelllinie JFH-LucUbiNeo konnte eine  $\text{EC}_{50}$  nach 24 Stunden Inkubationszeit von 1,272  $\mu\text{M}$  berechnet werden, was einer Konzentration von 546,96  $\mu\text{g/l}$  TWT1 entspricht. Das Con1-Replikonsystem ist ein seit Jahren verwendetes Zellsystem, welches sehr effektiv und genau arbeitet. Jede Zelle beinhaltet das Replikonsystem, da diese durch Zugabe von Geneticin selektiert wurden. Jedes Replikon beinhaltet die Information für das Luciferase-Enzym. Mittels enzymatischer Reaktion wird aus dem Substrat Luciferin Oxyluciferin oxidiert (Brogan *et al.* 2012). Somit kann ein Verhältnis aus Biolumineszenz und Anzahl der vorhandenen Replikonsysteme gestellt werden. Da die Zellzahl annähernd gleich ist und nicht signifikant reduziert wurde, wie mit dem MTT-Test bestätigt, die Chemilumineszenz im Vergleich mit der Kontrollgruppe jedoch signifikant gesunken ist, kann dieser Effekt einzig mit der Wirkung des Phytosterols auf das Replikonsystem – und somit einem antiviralen Effekt – erklärt werden. Die Werte der halb-maximalen effektiven TWT1-Konzentration liegen nah beieinander, was für einen spezifischen Anti-Hepatitis-C-viralen Effekt spricht.

Neben diesen beachtlichen Ergebnissen bedürfen die in Abbildung 45 rechterhand gezeigten Ergebnisse einer weiteren Erörterung. Hierbei führten Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  TWT1 zu einer signifikanten Erhöhung der Chemilumineszenz in JFH-LucUbiNeo-Zellen. Naheliegende Erklärung war, trotz eines standardisierten Verfahrens, eine unterschiedliche Anzahl an ausgesäten Zellen in den je-

weiligen Versuchsreihen. Da der Unterschied jedoch sehr groß war, wurde eine neue Versuchsreihe zu den Effekten des Lösungsmittels DMSO eröffnet. Dabei zeigte sich, dass Konzentrationen von 0,5 % DMSO eine signifikante Reduzierung der JFH-LucUbiNeo-Zellen verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe nach sich ziehen (Daten nicht gezeigt). Konzentrationen unterhalb von 0,1 % DMSO führten nicht mehr zu einer Reduktion der Zellviabilität im MTT-Test und ebenfalls nicht mehr zu einer Reduktion der Biochemilumineszenz. Aus verfahrenstechnischen Gründen – die benötigten Substanzen konnten nicht weiter in angemessener Zeit und mit angemessenem Aufwand zur Verfügung gestellt werden – wurden die zuvor erfolgten Versuche nicht nochmals wiederholt. Auch wurde in Folgeversuchen auf eine Verringerung der DMSO-Konzentration verzichtet, um die Vergleichbarkeit mit vorherigen Versuchen zu wahren. Die höchste eingesetzte Stoffkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  entspricht einer DMSO-Konzentration von 0,25 %, sodass ein geringer zytotoxischer und Chemilumineszenz-reduzierender Effekt zu erwarten ist. Bei Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  ist dieser Effekt nicht mehr auf das Lösungsmittel DMSO alleinig zu beziehen. Die halb-maximale effektive Konzentration von TWT1 beträgt ungefähr 1  $\mu\text{M}$ , womit ein DMSO-bedingter Effekt ausgeschlossen ist.

#### **4.2.3 Die Konzentration von 25 $\mu\text{M}$ des Phytosterols TTA6 wirkt zytotoxisch auf LucUbiNeo-ET**

Die zweite untersuchte Substanz TTA6 zeigt in der eingesetzten Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  einen zellviabilitätsvermindernden Effekt (siehe dazu Abbildung 47 und Abbildung 48). Wie erwartet trat dieser Effekt nach Verdopplung der Inkubationszeit umso stärker auf. Durch die Erkenntnis der Toxizität von Konzentrationen größer gleich 25  $\mu\text{M}$  TTA6 in LucUbiNeo-ET-Zellen wurden in den folgenden Versuchen mit JFH-LucUbiNeo-Zellen Konzentrationen bis maximal 10  $\mu\text{M}$  TTA6 eingesetzt.

#### **4.2.4 Das Phytosterol TTA6 zeigt eine konzentrationsabhängige HCV-Reduktion in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen**

Die Substanz TTA6, welche der Gruppe der Phytosterole zugeordnet wird, wurde nach aktuellen Recherchen bisher in der Literatur nicht erwähnt. Phytosterole sind natürliche Bestandteile der pflanzlichen Zellmembran (Law 2000). In Tabelle 16 werden bisher nachgewiesene Effekte von Phytosterolen aufgezeigt.

Wie bereits in Abschnitt Die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  des Phytosterols TTA6 wirkt zytotoxisch auf LucUbiNeo-ET aufgeführt, wirkte die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  TTA6 zellviabilitätsvermindernd auf die LucUbiNeo-ET-Zellen, weswegen folgende Versuche mit JFH-LucUbiNeo-Zellen mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt wurden. Unabhängig davon zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, die Chemilumineszenz reduzierender Effekt in den LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zelllinien (siehe dazu Abbildung 49 und Abbildung 50). Durch die signifikante Reduktion der Chemilumineszenz ist davon auszugehen, dass weniger von dem intrazellulären Con1-Replikonsystem, welches für virale Hepatitis-C-Enzyme codiert, vorhanden war. Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass das Phytosterol TTA6 einen antiviralen Effekt auf das Hepatitis-C-Virus aufzeigt. In beiden untersuchten Zelllinien zeigt sich die Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als besonders effektiv. Anhand der Ergebnisse konnte die halb-maximale effektive Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) für TTA6 mittels einer Dosis-Antwort-Kurve ermittelt werden. Der Effekt trat nach 24 Stunden Inkubationszeit, sowie verstärkt nach 48-Stunden-Inkubationszeit auf. Für die Ermittlung der  $\text{EC}_{50}$

wurden die Werte nach der 48 Stunden Inkubation verwendet. Die  $EC_{50}$  für die Zelllinie LucUbiNeo-ET beträgt  $6,33 \mu\text{M}$ , was einer Konzentration von  $2596,53 \mu\text{g/l}$  TTA6 entspricht. Bei der HCV-transgenen Zelllinie JFH-LucUbiNeo konnte eine  $EC_{50}$  von  $\approx 29,71 \mu\text{M}$  berechnet werden, was einer Konzentration von  $12181,1 \mu\text{g/l}$  TTA6 entspräche. Dieser Wert ist jedoch nicht absolut, denn aus den vorhandenen laborexperimentellen Daten konnte nur eine nicht ausreichend aussagekräftige sigmoidale Kurve ermittelt werden (siehe Abbildung 51), sodass das statistische Rechenprogramm keinen genauen Wert für die halb-maximale effektive Konzentration von TTA6 in JFH-LucUbiNeo-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit errechnen konnte.

Wie bereits oben ausgeführt, ist das Con1-Replikonsystem ein seit Jahren erfolgreich angewandtes System. Durch Zugabe des Antibiotikums Geneticin wurden nur jene Zellen selektiert, welche das Con1-Replikonsystem besitzen und somit die Information für eine Geneticin-Resistenz (Loscher 2015). Da jedes Replikon die Information für das Luciferase-Enzym enthält, konnte mittels enzymatischer Reaktion aus dem Substrat Luciferin Oxyluciferin oxidiert werden (Brogan *et al.* 2012) und somit ein Verhältnis aus Biolumineszenz und Anzahl der vorhandenen Replikonsysteme gezogen werden. Die Reduktion der Chemilumineszenz zeigt somit eine Reduzierung der intrazellulären viralen Hepatitis-C-Genomsequenzen an. Um aufzuzeigen, dass die Zellanzahl an sich nicht reduziert wurde, wurde ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Dieser MTT-Test zeigt die relative Anzahl an Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe. Wie bereits zuvor erörtert wirkte die Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  TTA6 toxisch auf die LucUbiNeo-ET-Zellen. Somit ist auch zu erklären, dass nach der 48-Stunden-Inkubation mit  $25 \mu\text{M}$  TTA6 absolut keine Chemilumineszenz detektiert werden konnte (siehe Abbildung 50 linke Seite). Da die anderen Konzentrationen nicht zellvermindernd wirkten, ist durch die oben beschriebene signifikante Verringerung der Chemilumineszenz von einer *in vitro* nachgewiesenen Wirksamkeit des Phytosterols TTA6 in den oben genannten halb-maximal effektiven Konzentrationen auszugehen.

Ähnlich wie im Abschnitt Das Phytosterol TWT1 zeigt eine konzentrationsabhängige HCV-Reduktion in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen erläutert, scheinen auch niedrige Konzentrationen des Phytosterols TTA6 zu einer viralen Vermehrung in JFH-LucUbiNeo-Zellen zu führen (siehe dazu Abbildung 49 und Abbildung 50). Die Chemilumineszenz ist signifikant erhöht bei Konzentrationen von  $0,01 \mu\text{M}$ ,  $0,1 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  TTA6 nach 24 Stunden Inkubation und bei  $0,01 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  TTA6 nach 48 Stunden Inkubation. Vermehrte Biolumineszenz spricht für mehr aktive Con1-Replikonsysteme in den Zellen und somit für mehr Hepatitis-C-Virus-Enzyme. Nach derzeitigem Wissensstand liegt keine Vermehrung vor, sondern eher ein Effekt des als Kontrollgruppe eingesetzten Lösungsmittels DMSO. Neben der naheliegenden Erklärung, dass eine unterschiedliche Anzahl an ausgesäten Zellen in den jeweiligen Versuchsreihen vorhanden war, wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO eröffnet. Dabei zeigte sich, dass Konzentrationen von  $0,5 \%$  DMSO eine signifikante Reduzierung der JFH-LucUbiNeo-Zellen verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe nach sich ziehen (Daten nicht gezeigt). Konzentrationen unterhalb von  $0,1 \%$  DMSO führten nicht mehr zu einer Reduktion der Zellviabilität im MTT-Test und ebenfalls nicht mehr zu einer Reduktion der Biochemilumineszenz. Aus verfahrenstechnischen Gründen, da die benötigten Substanzen nicht weiter zur Verfügung standen, wurden die zuvor erfolgten Versuche nicht nochmals wiederholt. Auch wurde in Folgeversuchen auf eine Verringerung der DMSO-Konzentration verzichtet, um die Vergleichbarkeit mit vorherigen Versuchen zu wahren. Die höchste eingesetzte Stoffkonzentration von  $25 \mu\text{M}$  entspricht einer DMSO-Konzentration von  $0,25 \%$ , sodass ein geringer zytotoxischer und Chemilumines-

zenz-reduzierender Effekt zu erwarten ist. Bei Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  ist dieser Effekt nicht mehr allein auf das Lösungsmittel DMSO zu beziehen. Die halb-maximale effektive Konzentration von TTA6 beträgt ungefähr 6  $\mu\text{M}$ , womit ein DMSO-bedingter Effekt nicht komplett auszuschließen ist. Jedoch ist die Reduktion der Chemilumineszenz so stark, dass von einer effektiven Wirkung des Phytosterols TTA6 auszugehen ist.

## 5 Zusammenfassung

Die viralen Hepatitiden B und C sind ein weltweites Problem mit mindestens 240 Millionen persistent mit Hepatitis-B-Virus (HBV) und mindestens 130 Millionen mit Hepatitis-C-Virus (HCV) infizierten Personen weltweit. Daraus resultieren knapp 700.000 Todesfälle durch Hepatitis B assoziierte und mindestens 700.000 Todesfälle durch Hepatitis C assoziierte Erkrankungen, wie Leberzirrhose oder hepatozelluläres Karzinom (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators 2015, Lozano *et al.* 2012). In klinischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen niedrigeren Vitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegeln und schlechterem Ansprechen der antiviralen Therapie postuliert (Farnik *et al.* 2013). Um diesen klinischen Zusammenhang *in vitro* zu untersuchen, wurden zwei HBV-transgene Zelllinien (HepG2.2.15-, HepG2-H1.3-Zellen) verwendet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach 72 Stunden Inkubationszeit 1.) 10 µM Vitamin D<sub>3</sub> zu einer signifikanten Reduktion von entspannt-zirkulärer Desoxyribonukleinsäure (rcDNA) des Hepatitis-B-Virus im Zellkulturüberstand beider Zelllinien führte, sowie 2.) 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in den Konzentrationen von 0,1 µM und 1 µM eine Verringerung der Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigene (HBsAg) und rcDNA von HepG2-H1.3-Zellen im Zellkulturüberstand bewirkt. Eine mögliche Schlussfolgerung daraus ist, dass Vitamin D<sub>3</sub> beziehungsweise 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> die Elimination des Hepatitis-B-Virus aus den Hepatozyten unterstützen und somit klinisch zu höheren dauerhaften virologischen Therapieansprechraten (SVRs) führen könnte.

In bis zu 10% der Fälle liegt eine kombinierte Infektion von HBV und HCV vor. Da der Verlauf einer kombinierten Infektion wesentlich fulminanter ist, ist eine effektive Behandlung beider Erkrankungen anzustreben (Gaeta *et al.* 2006). Neue Medikamente wirken mit einer SVR von über 90%, jedoch sind sie teuer und weisen diverse Nebenwirkungen auf (Lawitz *et al.* 2013). Die Tagestherapiekosten sind insbesondere für Erkrankte in Ländern mit einem niedrigen Durchschnittseinkommen nicht finanzierbar. Gerade in diesen Ländern ist jedoch eine hohe Prävalenz an Hepatitis-Seropositiven vorhanden (World Health Organisation 2016b). Bezahlbare Alternativmedikamente mit möglichst wenigen Nebenwirkungen könnten Abhilfe schaffen. Da in der traditionellen afrikanischen Medizin schon lange Pflanzen gegen verschiedene Erkrankungen erfolgreich eingesetzt wurden (Tsamo Tontsa *et al.* 2013), ist die Erforschung der Wirkstoffe essentiell. Bereits erforschte Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Familie *Meliaceae* zeigten hepatoprotektive Effekte (Germanò *et al.* 2005), sodass in der vorliegenden Arbeit mit der afrikanischen Pflanze *Tichilia welwitschii* aus der Familie der *Meliaceae* gearbeitet wurde. Da die Hepatitis-C-Virus Genotypen 1a und 2 mit 25,6% beziehungsweise 4,8% sehr häufig vorkommen (Kartashev *et al.* 2016), wurden diese im Zellkulturmodell (LucUbiNeo-ET-, JFH-LucUbiNeo-Zellen) verwendet. Die vorliegende Arbeit zeigt dabei, dass 1.) die aus *Tichilia welwitschii* gewonnenen Limonoide TWF5, TWF9 und TWF10 in den eingesetzten Konzentrationen keinen antiviralen Effekt aufwiesen, sowie 2.) die ebenfalls aus der Pflanze gewonnenen Phytosterole TWT1 und TTA6 zu einer Verminderung der Chemilumineszenz in LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen führten, was gleichzusetzen ist mit einer Reduktion der viralen Last. Dabei betrug die EC<sub>50</sub> von TWT1 in LucUbiNeo-ET-Zellen 1,186 µM (95% KI: 0,9204 – 1,529) und in JFH-LucUbiNeo-Zellen 1,272 µM (95% KI: 1,014 – 1,596) nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die EC<sub>50</sub> von TTA6 in LucUbiNeo-ET-Zellen betrug 6,333 µM (95% KI: 5,556 – 7,219) und in JFH-LucUbiNeo-Zellen ≈ 29,71 µM nach 48 Stunden Inkubationszeit. Es sollten zukünftig weitere Studien mit diesen Substanzen durchgeführt werden, um die gezeigten Daten zu validieren.

## 6 Summary

The viral hepatitis B and C are a global problem with at least 240 million persistent hepatitis B virus (HBV) and at least 130 million with hepatitis C virus (HCV) infected individuals worldwide. This results in at least 700,000 deaths due to hepatitis B-associated and at least 700,000 deaths due to hepatitis C-associated diseases, such as cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC) (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators 2015, Lozano *et al.* 2012). The relationship between lower vitamin D3 serum levels and lower response of antiviral therapy was postulated in clinical trials (Farnik *et al.* 2013). To investigate this clinical context *in vitro*, two HBV transgenic cell lines (HepG2.2.15, HepG2 H1.3 cells) were used. In the present study it is shown that after 72 hours of incubation 1.) 10  $\mu\text{M}$  Vitamin D3 leads to a significant reduction of relaxed-circular Deoxyribonucleic Acid (rcDNA) of hepatitis B virus in the cell culture supernatant of both cell lines, and 2.) 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 in the concentrations of 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  causes a reduction in hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) and rcDNA of HepG2 H1.3 cells in the cell culture supernatant. One possible conclusion is that vitamin D3 or 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 eliminates the Hepatitis B virus from the hepatocytes and so there are clinically higher sustained virological responses (SVRs).

In up to 10% of cases there is a combined infection with HBV and HCV. Since the course of disease of a combined infection is much more fulminant, an effective treatment of both diseases is needed (Gaeta *et al.* 2006). New drugs interact with a SVR of 90%, but they are expensive and have various side effects (Lawitz *et al.* 2013). The pricing is particularly important for countries with a low average income because these countries have a high prevalence of infected individuals (World Health Organisation 2016b). Alternative medications with as low as possible side effects are required. For a long time in the traditional African medicine plants have been successfully used against various diseases (Tsamo Tontsa *et al.* 2013). Exploring the main active pharmaceutical ingredients is essential. Already researched ingredients from plants of the family *Meliaceae* showed hepatoprotective effects (Germanò *et al.* 2005). So that is the reason why the African plant *Tichilia welwitschii* from family of *Meliaceae* was used in the present work. Because hepatitis C virus genotypes 1a and 2 are with 25.6% and 4.8% very common (Kartashev V *et al.* 2016), these genotypes were used as the cell model (LucUbiNeo-ET, JFH-LucUbiNeo cells). The present study shows that 1.) the isolated substances from *Tichilia welwitschii*, the limonoides TWF5, TWF9, TWF10 in the used concentrations had no antiviral effect, and 2.) the plant phytosterols TWT1 and TTA6 lead to a reduction of chemiluminescence in LucUbiNeo-ET and JFH-LucUbiNeo cells, which is equivalent to a reduction in viral load. After 48 hours of incubation the  $\text{EC}_{50}$  of TWT1 in LucUbiNeo-ET cells was 1.186  $\mu\text{M}$  (95% CI: 0.9204 to 1.529) and of JFH-LucUbiNeo cells was 1.272  $\mu\text{M}$  (95% CI: 1.596 to 1.014). The  $\text{EC}_{50}$  of TTA6 in LucUbiNeo-ET cells was 6.333  $\mu\text{M}$  (95% CI: 5.556 to 7.219) and in JFH-LucUbiNeo cells  $\approx$  29.71  $\mu\text{M}$  after 48 hours of incubation. Further research with these substances or other substances of the class of phytosterols should be carried out in future to show the reduction of virus *in vivo*.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
µg/l	Mikrogramm pro Liter
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
C	Core (Kern)-Strukturprotein des Hepatitis-C-Virus
cccDNA	„covalently closed circular“ cccDNA (kovalent zirkulär geschlossene DNA)
CD8 <sup>+</sup>	<i>cluster of differentiation 8 positive</i>
CD81	<i>cluster of differentiation 81</i>
CMV	humanes Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cp	<i>Crossing point</i> , auch Ct-Wert ( <i>Cycle threshold</i> = Schwellenwert-Zyklus)
Ct	<i>Cycle threshold</i> = Schwellenwert-Zyklus, auch Cp-Wert ( <i>Crossing point</i> )
CTB	Cell-Titer-Blue
CYP24A1	Cytochrom-P450-Oxidase 24A1
CYP27A1	Cytochrom-P450-Oxidase 27A1
CYP27B1	Cytochrom-P450-Oxidase 27B1
DAAs	<i>direct-acting antiviral agents</i> , direkt wirksame antivirale Agentien
DBP	Vitamin-D-Bindungsprotein
DC	Dendritische Zellen
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> , auch: Desoxyribonukleinsäure
E1	<i>Envelope 1</i> (Oberflächen 1) Strukturprotein des Hepatitis-C-Virus-Genoms
E2	<i>Envelope 2</i> (Oberflächen 2) Strukturprotein des Hepatitis-C-Virus-Genoms
EC <sub>50</sub>	Halb-maximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle des Enzephalomyokarditis Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERG	Einmal-Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae / et alia</i> (und andere)
FBS	Fetal Bovine Serum, auch: Fötale Kälberserum (FCS)
FCS	Fötale Kälberserum, auch: Fetal Bovine Serum (FBS)
Ffl-luc	<i>Firefly</i> -Luciferase
g	Erdbeschleunigung
HBcAg	Hepatitis-B-Kern-Antigen

HBeAg	Hepatitis-B- <i>Envelope</i> -Antigen
HBsAg	Hepatitis-B- <i>Surface</i> Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Hydrogenchlorid, auch: Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus-1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IMPM	Institut de recherches Médicales et d'études des Plantes Médicinales
in	Inch
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle ( <i>internal ribosomal entry site</i> )
IU/l	Internationale Einheiten pro Liter
IU/ml	Internationale Einheiten pro Milliliter
IU/ml	Internationale Einheiten pro Milliliter
JFH	Japanese Fulminant Hepatitis
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
LHB	Großes Oberflächenprotein des Hepatitis-B-Virus, <i>Large</i> Hepatitis B-Oberflächenprotein
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MHB	Mittelgroßes Oberflächenprotein des Hepatitis-B-Virus, <i>Middle</i> Hepatitis B-Oberflächenproteine
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Di-Sodiumhydrogenphosphat Di-Hydrat
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
neo	Neomycin-Phosphotransferase
nm	Nanometer
NRT	<i>nontranslated</i> Ribonukleinsäure
NS2	Nicht-Strukturprotein 2 des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NS3	Nicht-Strukturprotein 3 des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NS4A	Nicht-Strukturprotein 4A des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NS4B	Nicht-Strukturprotein 4B des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NS5A	Nicht-Strukturprotein 5A des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NS5B	Nicht-Strukturprotein 5B des Hepatitis-C-Virus-Genoms
NTCP	<i>Natriumtaurocholate Cotransporting Polypeptide</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Densität
ORF	überlappende offene Leseraster („ <i>open reading frames</i> “)
P7	Ionenkanal des Hepatitis-C-Virus-Genoms
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , auch: Polymerase-Kettenreaktion
rcDNA	<i>relaxed-circular desoxyribonuclein acid</i> , auch: Entspannt-zirkuläre Desoxyribonukleinsäure
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleinacid, auch: Ribonukleinsäure (RNS)
RTD-PCR	<i>Realtime Polymerase Chain Reaction</i> , auch: Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S/CO	<i>Signal-to-Cut-Off Ratio</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , auch: Natriumlaurylsulfat
SHB	Kleines Oberflächenprotein des Hepatitis-B-Virus, <i>Short Hepatitis B-Oberflächenprotein</i>
SVR	<i>sustained virologic response</i> (anhaltendes virologisches Ansprechen)
TMV	Tobak-Mosaik-Virus
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TWF10	<i>Trichilia welwitschii</i> Fraktion 10, auch: Dregeanin DM4
TWF5	<i>Trichilia welwitschii</i> Fraktion 5, auch: <i>Tichilia lactone</i> D5
TWF9	<i>Trichilia welwitschii</i> Fraktion 9, auch: <i>Rohituka-3</i>
ubi	Ubiquitin
v/v	Volumen im Verhältnis zu Volumen
VD <sub>3</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	Vitamin-D-Desoxyribonukleinsäure-Antwortelemente, auch: Vitamin D <i>Desoxyribonucleinacid reponse elements</i>
VSV	Vesikulares-Stomatitis-Virus
w/v	Masse im Verhältnis zum Volumen
WHO	World Health Organization

Tabelle 14 Verzeichnis der Abkürzungen

## 8 Literaturverzeichnis

- Adinolfi *et al.* 2001** **Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G (2001)** Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*. 33: 1358-1364.
- Ahonen *et al.* 2000** **Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P (2000)** Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control*. 11: 847-852.
- Akeno *et al.* 1997** **Akeno N, Saikatsu S, Kawane T, Horiuchi N (1997)** Mouse vitamin D-24-hydroxylase: molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional regulation by  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology*. 138: 2233–2240.
- Alberti und Benvegnu 2003** **Alberti A, Benvegnu L (2003)** Management of hepatitis C. *J Hepatol*. 38 Suppl 1: S104-118.
- Angiosperm Phylogeny Website Version 13** **Angiosperm Phylogeny Website (Version 13)** Meliaceae [Online im Internet] URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Stand: 31.10.2015, 23:14 Uhr]
- Awad und Fink 2000** **Awad AB, Fink CS (2000)** Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr*. 130(9): 2127-2130.
- Baker *et al.* 1988** **Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW (1988)** Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(10): 3294-3298.
- Bartenschlager 2005** **Bartenschlager R (2005)** The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *J Hepatol*. 43(2): 210-6.
- Bartenschlager und Sparacio 2007** **Bartenschlager R, Sparacio S (2007)** Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res*. 127(2): 195-207.
- Beck und Nassal 2007** **Beck J, Nassal M (2007)** Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol*. 13: 48–64.
- Berg *et al.* 2009** **Berg CP, Schlosser SF, Neukirchen DK, Papadakis C, Gregor M, Wesselborg S, Stein GM (2009)** Hepatitis C virus core protein induces apoptosis-like caspase independent cell death. *Virology*. 6: 213.
- Bhalla *et al.* 1986** **Bhalla AK, Amento EP, Krane SM (1986)** Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. *Cell Immunol*. 98: 311–322.
- Bikle 2014** **Bikle DD (2014)** Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 21(3): 319-329.
- Bouillon 2001** **Bouillon R (2001)** Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders, Seiten: 1009-1028.
- Bouillon *et al.*** **Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A,**

- 2008** **Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M (2008)** Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 29(6): 726-776.
- Bradford 1976** **Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brogan et al. 2012** **Brogan J, Li F, Li W, He Z, Huang Q, Li CY (2012)** Imaging molecular pathways: reporter genes. *Radiat Res.* 177(4): 508-513.
- Catanese et al. 2013** **Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM (2013)** Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 9505–9510.
- Chan et al. 2006** **Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, Jones PJ (2006)** Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev.* 64: 385–402.
- Chan et al. 2009** **Chan HL, Wong GL, Tse CH, Chim AM, Yiu KK, Chan HY, Sung JJ, Wong VW (2009)** Hepatitis B virus genotype C is associated with more severe liver fibrosis than genotype B. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 1361-1366.
- Chan et al. 2015** **Chan HL, Elkhashab M, Trinh H, Tak WY, Ma X, Chuang WL, Kim YJ, Martins EB, Lin L, Dinh P, Charuworn P, Foster GR, Marcellin P (2015)** Association of baseline vitamin D levels with clinical parameters and treatment outcomes in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 63(5): 1086-1092.
- Chao et al. 2014** **Chao DT, Lim JK, Ayoub WS, Nguyen LH, Nguyen MH (2014)** Systematic review with meta-analysis: the proportion of chronic hepatitis B patients with normal alanine transaminase  $\leq$  40 IU/L and significant hepatic fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 39(4): 349-358.
- Chen et al. 2007** **Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Lipsky PE (2007)** Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *J Immunol.* 179: 1634–1647.
- Chen et al. 2015** **Chen EQ, Bai L, Zhou TY, Fe M, Zhang DM, Tang H (2015)** Sustained suppression of viral replication in improving vitamin D serum concentrations in patients with chronic hepatitis B. *Sci Rep.* 5: 15441.
- Chiu et al. 2004** **Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF (2004)** Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and  $\beta$  cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 79(5): 820-825.
- Choo et al. 1989** **Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989)** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244: 359-364.
- Chowdhury et al. 2003** **Chowdhury R, Rashid RB, Sohrab MH, Hasan CM (2003)** 12 $\alpha$ -hydroxystigmast-4-en-3-one: a new bioactive steroid from *Toona ciliata* (Meliaceae). *Pharmazie.* 58(4): 272-273.
- Christakos et al. 2016** **Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016)** Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 96(1): 365-408.
- Coller et al. 2012** **Coller KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G (2012)** Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* 8: e1002466.

- Coombes et al. 2003** **Coombes PH, Mulholland DA, Randrianarivelojosia M (2003)** Phragmalin limonoids from the Madagascan Meliaceae *Neobeguea leandreana*. *J Nat Prod.* 66(6): 735-738.
- Coombes et al. 2007** **Coombes PH, Mulholland DA, Randrianarivelojosia M (2005)** Mexicanolide limonoids from the Madagascan Meliaceae *Quivisia papinae*. *Phytochemistry.* 66(10): 1100-1107.
- Corey et al. 2006** **Corey KE, Ross AS, Wurcel A, Schulze Zur Wiesch J, Kim AY, Lauer GM, Chung RT (2006)** Outcomes and treatment of acute hepatitis C virus infection in a United States population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4: 1278-1282.
- Cornberg et al. 2011** **Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Sarrazin C, Dollinger MM, Schirmacher P, Dathe K, Kopp IB, Zeuzem S, Gerlich WH, Manns MP (2011)** Aktualisierung der S3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. AWMF-Register-Nr.: 021/011. *Z Gastroenterol.* 49: 871-930.
- Croagh et al. 2015** **Croagh CM, Desmond PV, Bell SJ (2015)** Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol.* 7(3): 289-303.
- Dane et al. 1970** **Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970)** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1: 695-698.
- Davies et al. 1985** **Davies PD, Brown RC, Woodhead JS (1985)** Serum concentrations of vitamin D metabolites in untreated tuberculosis. *Thorax.* 40(3): 187-190.
- DeLuca 2004** **DeLuca HF (2004)** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 80: Suppl: 1689S-1696S.
- DeRosa et al. 2006** **DeRosa FG, Bargiacchi O, Audagnotto S, Garazzino S, Cariti G, Raiteri R, Di Perri G (2006)** Dose-dependent and genotype-independent sustained virological response of a 12 week pegylated interferon alpha-2b treatment for acute hepatitis C. *J Antimicrob Chemother.* 57: 360-363.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2017** **Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2017)** Vitamin D (Calciferole). [Online im Internet] URL: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/vitamin-d/> [Stand: 01.02.2017, 21:56 Uhr]
- Devaraj und Jialal 2006** **Devaraj S, Jialal I (2006)** The role of dietary supplementation with plant sterols and stanols in the prevention of cardiovascular disease. *Nutr Rev.* 64: 348-354.
- DiBisceglie 1997** **DiBisceglie AM (1997)** Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 26: 34S-38S.
- Du et al. 2009** **Du S, Wang M, Zhu W, Qin Z (2009)** A new fungicidal lactone from *Xylocarpus granatum* (Meliaceae). *Nat Prod Res.* 23(14): 1316-1321.
- Dubuisson und Cosset 2014** **Dubuisson J, Cosset FL (2014)** Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 61(1 Suppl): S3-S13.
- Dusso et al. 2005** **Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005)** Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: F8-F28.
- Dzoyem et al. 2015** **Dzoyem JP, Tsamo AT, Melong R, Mkounga P, Nkengfack AE, McGaw LJ, Eloff JN (2015)** Cytotoxicity, nitric oxide and acetylcho-

- linesterase inhibitory activity of three limonoids isolated from *Trichilia welwitschii* (Meliaceae). *Biol Res.* 48: 57.
- Elangovan et al. 2017** **Elangovan H, Chahal S, Gunton JE (2017)** Vitamin D in liver disease: Current evidence and potential directions. *Biochim Biophys Acta.* 1863(4): 907-916.
- Eliades und Spyrou 2015** **Eliades M, Spyrou E (2015)** Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol.* 21(6): 1718-1727.
- Erhardt et al. 2005** **Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D (2005)** Response to interferon alpha is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut.* 54: 1009–1013.
- Eugster et al. 1997** **Eugster C, Rivara G, Biglino A, Cavallo R, Gioannini P, Forno B, Macario M, Pollono AM (1997)** Phytosterol compounds having antiviral efficacy. *Panminerva Med.* 39(1): 12-20.
- Farnik et al. 2013** **Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, Keppler OT, Zeuzem S, Sarrazin C, Lange CM (2013)** Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus (HBV) replication in chronically infected patients. *Hepatology.* 58(4): 1270-1276.
- Ferri et al. 2007** **Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, Pileri SA, Zignego AL (2007)** HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Dig Liver Dis.* 39 Suppl 1:S13-S21.
- Feskanich et al. 2004** **Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Hollis BW, Giovannucci EL (2004)** Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(9): 1502-1508.
- Flink et al. 2006** **Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, deMan RA, Schalm SW, Janssen HL; HBV 99-01 Study Group (2006)** Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol.* 101: 297-303.
- Frese et al. 2003** **Frese M, Barth K, Kaul A, Lohmann V, Schwärzle V, Bartschlager R (2003)** Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor-alpha. *J Gen Virol.* 84(Pt 5): 1253-1259.
- Fried et al. 2002** **Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J (2002)** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 347(13): 975-982.
- Fritsche et al. 2003** **Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M (2003)** Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase and production of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by human dendritic cells. *Blood.* 102: 3314–3316.
- Gaeta et al. 2006** **Gaeta GB, Precone DF, Cozzi-Lepri A, Cicconi P, D'Arminio Monforte A (2006)** Multiple viral infections. *J Hepatol.* 44: S108-113.
- Galani et al. 2014** **Galani BRT, Sass G, Njayou NF, Mkounga P, Tiegs G, Moundipa PF (2014)** Anti-Hepatitis C Virus Activity of Crude Extract and Fractions of *Entada africana* in Genotype 1b Replicon Systems. *Am J*

- Chin Med. 42: 853-868.
- Galani et al. 2015** **Galani BRT, Sahuc ME, Njyou FN, Deloison G, Mkounga P, Feudjou WF, Brodin P, Rouillé Y, Nkengfack AE, Moundipa PF, Séron K (2015)** Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. *Front Microbiol.* 6: 488.
- Garland et al. 2006** **Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF (2006)** The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health.* 96(2): 252-261.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators 2015** **GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators (2015)** Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 385(9963): 117-171.
- Georgel et al. 2010** **Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, Baumert TF (2010)** Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med.* 16(6): 277-286.
- Germanò et al. 2005** **Germanò MP, D'Angelo V, Sanogo R, Catania S, Alma R, De Pasquale R, Bisignano G (2005)** Hepatoprotective and antibacterial effects of extracts from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). *J Ethnopharmacol.* 96: 227-232.
- Ghany et al. 2003** **Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH (2003)** Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 124: 97-104.
- Giovannucci et al. 2006** **Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC (2006)** Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 98(7): 451-459.
- Gorham et al. 2005** **Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, Newmark HL, Giovannucci E, Wei M, Holick MF (2005)** Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97(1-2): 179-194.
- Gouvêa et al. 2008** **Gouvêa CF, Dornelas MC, Rodriguez AP (2008)** Floral development in the tribe Cedreleae (Meliaceae, sub-family Swietenioideae): *Cedrela* and *Toona*. *Ann Bot.* 101(1): 39-48.
- Gower et al. 2014** **Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H (2014)** Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 61(1 Suppl): S45-57.
- Hasegawa und Miyake 1996** **Hasegawa S und Miyake M (1996)** Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. *Food Rev Int.* 12: 413-435.
- Hermine et al. 2002** **Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, Delmas B, Valensi F, Cacoub P, Brechot C, Varet B, Troussard X (2002)** Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 347: 89-94.
- Hillier et al. 2006** **Hillier AE, Mand J, Raza A, Markov M, Nadir A (2006)** Consensus interferon induced interstitial pneumonitis in a patient with HCV. *Am J Gastroenterol.* 101: 200-202.



- Hoan et al. 2016** **Hoan NX, Khuyen N, Binh MT, Giang DP, Van Tong H, Hoan PQ, Trung NT, Anh DT, Toan NL, Meyer CG, Kreamsner PG, Velavan TP, Song LH (2016)** Association of vitamin D deficiency with hepatitis B virus - related liver diseases. *BMC Infect Dis.* 16(1): 507.
- Holick 2004** **Holick MF (2004)** Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79(3): 362-371.
- Holick 2006** **Holick MF (2006)** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 116: 2062-2072.
- Holick 2007** **Holick MF (2007)** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 357(3): 266-281.
- Holick und Garabedian 2006** **Holick MF, Garabedian M (2006)** Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6. Auflage. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, Seiten: 129-137.
- Hui et al. 2003** **Hui CK, Belaye T, Montegrando K, Wright TL (2003)** A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepato.* 38: 511-517.
- Jacobson et al. 2014** **Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalsky VV, Moroz L, Craxi A, Peeters M, Lenz O, Ouwkerk-Mahadevan S, De La Rosa G, Kalmeijer R, Scott J, Sinha R, Beumont-Mauviel M (2014)** Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 384: 403-413.
- Jahan et al. 2011** **Jahan S, Khaliq S, Siddiqi MH, Ijaz B, Ahmad W, Ashfaq UA, Hassan S (2011)** Anti-apoptotic effect of HCV core gene of genotype 3a in Huh-7 cell line. *Virology.* 8: 522.
- Janssen et al. 2005** **Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, deMan RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW; HBV 99-01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research (2005)** Pegylated interferon alpha-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet.* 365: 123–129.
- Jilg et al. 2012** **Jilg W, Meisel H, Krüger DH (2012)** Hepatitis B Virus (HBV). In: *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.* Darai G, Handermann M, Sonntag H-G, Zöller L (Hrg.) Springer Medizin Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Aufl., 371-377.
- Kartashev et al. 2016** **Kartashev V, Döring M, Nieto L, Coletta E, Kaiser R, Sierra S, HCV EuResist Study group (2016)** New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. *J Clin Virol.* 81: 82-89.
- Kato 2001** **Kato N (2001)** Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Oka-yama.* 55(3): 133-159.
- Kato et al. 2003** **Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T (2003)** Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* 125(6):

- 1808-1817.
- Kay und Zoulim 2007** **Kay A, Zoulim F (2007)** Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 127: 164–176.
- Konstantakis et al. 2016** **Konstantakis C, Tselekouni P, Kalafateli M, Triantos C (2016)** Vitamin D deficiency in patients with liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol.* 29(3): 297-306.
- Koziel und Thio 2010** **Koziel MJ, Thio CL (2010)** Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus. In: Principles and Practise of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrg.) Elsevier Inc., Philadelphia, 7. Aufl., 2059 – 2086.
- Krieger et al. 2001** **Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R (2001)** Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol.* 75: 4614–4624.
- Kurbanov et al. 2010** **Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M (2010)** Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 40: 14–30.
- Kwon und Lok 2011** **Kwon H, Lok AS (2011)** Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(5): 275-284.
- Labuda et al. 1992** **Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH (1992)** Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res.* 7(12): 1447-1453.
- Law 2000** **Law M (2000)** Plant sterol and stanol margarines and health. *Br Med J.* 320: 861–864.
- Lawitz et al. 2013** **Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, Davis MN, Kayali Z, Reddy KR, Jacobson IM, Kowdley KV, Nyberg L, Subramanian GM, Hyland RH, Arterburn S, Jiang D, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Sheikh AM, Younossi Z, Gane EJ (2013)** Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 368: 1878-1887.
- Lemire et al. 1984** **Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC (1984)** 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 74: 657–661.
- Lemire et al. 1985** **Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC (1985)** 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol.* 134: 3032–3035.
- Li et al. 2007** **Li GQ, Xu WZ, Wang JX, Deng WW, Li D, Gu HX (2007)** Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol.* 13(16): 2324-2327.
- Lin 2016** **Lin R (2016)** Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signaling, and Innate Immunity. *Biomed Res Int.* 2016: 1375858.
- Lin et al. 2014** **Lin J, Wu JF, Zhang Q, Zhang HW, Cao GW (2014)** Virus-related liver cirrhosis: molecular basis and therapeutic options. *World J Gastroenterol.* 20(21): 6457-6469.
- Locarnini et al. 2013** **Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L (2013)** Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Bi-*

- ol. 23: 561–575.
- Locarnini et al. 2015** **Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, Lok A (2015)** Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol.* 62(1S): S76-S86.
- Lohmann 2013** **Lohmann V (2013)** Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 369: 167–198.
- Lok und McMahon 2007** **Lok AS, McMahon BJ (2007)** Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 45: 507-539.
- Loscher 2015** **Loscher C (2015)** Mechanisms of Osteopontin-mediated effects on chronic hepatic inflammation and cancer. Dissertation Universität Hamburg.
- Louppe et al. 2008** **Louppe D, Oteng-Amoaka AA, Brink M (2008)** Plant resources of tropical Africa. *Timbers 1.* PROTA Foundation. Leiden: Blackhuys Publishers. 7(1): 562–563.
- Lozano et al. 2012** **Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, et al. (2012)** Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380: 2095-2128.
- Malhi und Gores 2008** **Malhi H, Gores GJ (2008)** Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 134: 1641-1654.
- Manns et al. 2009** **Manns M, Zeuzem S, Sood A, Lurie Y, Cornberg M, Klinker H, Buggisch P, Rössle M, Hinrichsen H, Merican I, Ilan Y, Mauss S, Abu-Mouch S, Horban A, Müller TH, Welsch C, Chen R, Faruqi R, Pedicone LD, Wedemeyer H (2009)** Reduced dose and duration of peginterferon alfa-2b and weight-based ribvairin in European and Asian genotype 2 and 3 chronic hepatitis C patients (REDD 2/3 trial). *J Hepatol.* 50: A144.
- Manns et al. 2014** **Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, Horsmans Y, Janczewska E, Villamil F, Scott J, Peeters M, Lenz O, Ouwerkerk-Mahadevan S, De La Rosa G, Kalmeijer R, Sinha R, Beumont-Mauviel M (2014)** Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 384: 414-426.
- Marangoni und Poli 2010** **Marangoni F, Poli A (2010)** Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res.* 61: 193–199.
- Margolis und Christakos 2010** **Margolis RN, Christakos S (2010)** The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. *Ann N Y Acad Sci.* 1192: 208-214.
- McFarland et al. 2004** **McFarland K, Mulholland DA, Fraser LA (2004)** Limonoids from *Turraea floribunda* (Meliaceae). *Phytochemistry.* 65(14): 2031-2037.
- McMahon et al. 1985** **McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE (1985)** Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis.* 151: 599–603.
- Meehan et al. 1992** **Meehan MA, Kerman RH, Lemire JM (1992)** 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the generation of nonspecific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in a human MLR. *Cell Immunol.* 140: 400–409.

- Meisel et al. 2012** **Meisel H, Jilg W, Krüger DH (2012)** Hepatitis C Virus (HCV). In: Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. Darai G, Handermann M, Sonntag H-G, Zöller L (Hrg.) Springer Medizin Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Aufl., 377-382.
- Mora et al. 2008** **Mora JR, Iwata M, von Andrian UH (2008)** Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol.* 8(9): 685-698.
- Moradpour et al. 2007** **Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007)** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 5(6): 453-463.
- Moraleda et al. 1997** **Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS (1997)** Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol.* 71(12): 9392-9399.
- Muhe et al. 1997** **Muhe L, Lulseged S, Mason KE, Simoes EA (1997)** Case-control study of the role of nutritional rickets in the risk of developing pneumonia in Ethiopian children. *Lancet.* 349(9068): 1801-1804.
- Mulholland et al. 2000** **Mulholland DA, Randrianarivelosia M, Lavaud C, Nuzillard JM, Schwikkard SL (2000)** Limonoid derivatives from *Astrotrichilia voamatata*. *Phytochemistry.* 53(1): 115-118.
- Nakamoto et al. 2015** **Nakamoto S, Kanda T, Shirasawa H, Yokosuka O (2015)** Antiviral therapies for chronic hepatitis C virus infection with cirrhosis. *World J Hepatol.* 7(8): 1133-1141.
- Nakamura et al. 2011** **Nakamura H, Aoki H, Hino O, Moriyama M (2011)** HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatol Res.* 41: 455-462.
- Nakano et al. 2012** **Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M (2012)** An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 32: 339-345.
- Ninomiya et al. 2016** **Ninomiya K, Miyazawa S, Ozeki K, Matsuo N, Muraoka O, Kikuchi T, Yamada T, Tanaka R, Morikawa T (2016)** Hepatoprotective Limonoids from *Andiroba* (*Carapa guianensis*). *Int J Mol Sci.* 17(4).
- Ortega et al. 2006** **Ortega RM, Palencia A, Lopez-Sobaler AM (2006)** Improvement of cholesterol levels and reduction of cardiovascular risk via the consumption of phytosterols. *Br J Nutr.* 96(Suppl. 1): S89-93.
- Ostlund 2002** **Ostlund RE Jr (2002)** Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 22: 533-549.
- Pekala et al. 2015** **Pekala J, Strub DJ, Koziol A, Lochynski S (2015)** Variability of Biological Activities of Limonoids Derived from Plant Sources. *Mini-Rev Org Chem.* 11: 269-279.
- Penna et al. 2005** **Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, Adorini L (2005)** Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* 106(10): 3490-3497.
- Pessione et al. 1998** **Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot-Peignoux M, Degott C, Valla D, Erlinger S, Rueff B (1998)** Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 27: 1717-1722.
- Petrera et al.** **Petrera E, Nittolo AG, Alché LE (2014)** Antiviral action of synthetic

- 2014** stigmasterol derivatives on herpes simplex virus replication in nervous cells in vitro. *Biomed Res Int.* 2014: 947560.
- Petruzziello et al. 2016** **Petruzziello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C (2016)** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 22(34): 7824-7840.
- Phongmaykin et al. 2011** **Phongmaykin J, Kumamoto T, Ishikawa T, Saifah E, Suttisri R (2011)** Biologically active constituents of *Aglaia erythrosperma*. *Nat Prod Res.* 25(17): 1621-1628.
- Poethko-Muller et al. 2013** **Poethko-Muller C, Zimmermann R, Hamouda O, Faber M, Stark K, Ross RS, Thamm M (2013)** Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz.* 56(5 – 6): 707–715.
- Pourgholami et al. 2000** **Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL (2000)** In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Lett.* 151(1):97-102.
- Protzer et al. 2007** **Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, Sass G, Svorcova M, Webb D, Bohne F, Hösel M, Schirmacher P, Tiegs G (2007)** Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 133(4): 1156-1165.
- Ray und Thomas 2010** **Ray SC, Thomas DL (2010)** Hepatitis C Virus. In: Principles and Practise of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Hrg.) Elsevier Inc., Philadelphia, 7. Aufl., 2157–2177.
- Rehermann 2013** **Rehermann B (2013)** Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med.* 19(7): 859-868.
- Rehermann und Nascimbeni 2005** **Rehermann B, Nascimbeni M (2005)** Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 5: 215–229
- Reichel et al. 1987** **Reichel H, Koeffler HP, Tobler A, Norman AW (1987)** 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits  $\gamma$ -interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 3385–3389.
- Rigby et al. 1984** **Rigby WF, Stacy T, Fanger MW (1984)** Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol). *J Clin Invest.* 74: 1451–1455.
- Rigby et al. 1987** **Rigby WF, Yirinec B, Oldershaw RL, Fanger MW (1987)** Comparison of the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol.* 17: 563–566.
- Robert-Koch-Institut 2015a** **Robert-Koch-Institut (2015)** Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B und D im Jahr 2014. *Epidemiologisches Bulletin.* 29: 271-288.
- Robert-Koch-Institut 2015b** **Robert-Koch-Institut (2015)** Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis C im Jahr 2014. *Epidemiologisches Bulletin.* 30: 289-302.
- Robert-Koch-Institut 2016** **Robert-Koch-Institut (2016)** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2015. [Online im Internet] URL: <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2015.htm?nn=2374622> [Stand: 16.01.2017, 18:31 Uhr]
- Rosen 2011** **Rosen CJ (2011)** Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med.* 364(3): 248-254.

- Rosen und Gretch 1999** **Rosen HR, Gretch DR (1999)** Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol Med Today*. 5(9): 393-399.
- Ryder et al. 2004** **Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC (2004)** Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut*. 53: 451-455.
- Santantonio et al. 2005** **Santantonio T, Fasano M, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, Francavilla R, Pastore G (2005)** Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance. *J Hepatol*. 42: 329-333.
- Santantonio et al. 2006** **Santantonio T, Medda E, Ferrari C, Fabris P, Cariti G, Massari M, Babudieri S, Toti M, Francavilla R, Ancarani F, Antonucci G, Scotto G, Di Marco V, Pastore G, Stroffolini T (2006)** Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. *Clin Infect Dis*. 43: 1154-1159.
- Sarrazin et al. 2010** **Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH, Peck-Radosavljevic M, Ferenci P, Vogel W, Moradpour D, Heim M, Cornberg M, Protzer U, Manns MP, Fleig WE, Dollinger MM, Zeuzem S (2010)** Update der S 3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion, AWMF-Register-Nr.: 021 / 012. *Z Gastroenterol*. 48(2): 289-351.
- Sarrazin et al. 2014** **Sarrazin C, Berg T, Buggisch P, Dollinger M, Hinrichsen H, Hüppe D, Manns M, Mauss S, Petersen J, Simon KG, van Thiel I, Wedemeyer H, Zeuzem S (2014)** Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. *Z Gastroenterol*. 52(10): 1185-1197.
- Schaefer 2007** **Schaefer S (2007)** Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 13: 14-21.
- Schaefer et al. 2008** **Schaefer M, Sarkar R, Spengler U, et al. (2008)** Es-Citalopram for the prevention of PEG-IFN-alpha and ribavirin associated depression in HCV-infected patients without psychiatric risk factors (CIP-PAD-study). *Hepatology*. 48: 432A-433A.
- Sells et al. 1987** **Sells MA, Chen ML, Acs G (1987)** Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(4): 1005-1009.
- Shi et al. 2013** **Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG (2013)** Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol*. 16: 355-361.
- Shiu et al. 2013** **Shiu TY, Huang SM, Shih YL, Chu HC, Chang WK, Hsieh TY (2013)** Hepatitis C virus core protein down-regulates p21(Waf1/Cip1) and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells. *PLoS One*. 8: e61089.
- Siavoshian et al. 2005** **Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kieny MP, Schuster C (2005)** Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Viro*. 75: 402-411.
- Sigmundsdottir** **Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC (2007)** DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3

- et al.* 2007 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nature Immunol.* 8: 285–293.
- Simmonds *et al.* 1993** **Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS (1993)** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 74 (Pt 11): 2391-2399.
- Smith *et al.* 1997** **Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P (1997)** The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol.* 78 ( Pt 2): 321-328.
- Summers *et al.* 1975** **Summers J, O'Connell A, Millman I (1975)** Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(11): 4597-4601.
- Tassopoulos *et al.* 1987** **Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Roumeliotou-Karayannis A, Gerin JL, Purcell RH (1987)** Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology.* 92: 1844–1850.
- Thein *et al.* 2008** **Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD (2008)** Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology.* 48: 418-431.
- Thimme *et al.* 2001** **Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV (2001)** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 194: 1395-1406.
- Thompson und Grundy 2005** **Thompson GR, Grundy SM (2005)** History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *Am J Cardiol.* 96: 3D–9D.
- Tsamo *et al.* 2013** **Tsamo A, Langat MK, Nkouna P, Waffo AFK, Nkengfack AE, Mulholland DA (2013)** Limonoids from the West African *Trichilia welwitschii* (Meliaceae). *Biochem Syst Ecol.* 50: 368–370.
- Tsamo Tontsa *et al.* 2013** **Tsamo Tontsa A, Mkouna P, Njyou FN, Manautou J, Kirk M, Hultin PG, Nkengfack AE (2013)** Rubescins A, B and C: new havanensin type limonoids from root bark of *Trichilia rubescens* (Meliaceae). *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 61(11): 1178-1183.
- Tundis *et al.* 2012** **Tundis R, Loizzo MR, Menichini F (2012)** An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54(2): 225-50.
- VanAmerongen *et al.* 2004** **VanAmerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH (2004)** Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *Eur J Clin Nutr.* 58(8): 1095-1109.
- VanEtten und Mathieu 2005** **VanEtten E, Mathieu C (2005)** Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97: 93–101.
- Wahyuni *et al.* 2013** **Wahyuni TS, Tumewu L, Permanasari AA, Apriani E, Adianti M, Rahman A, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H, Kawahara N, Shoji I, Deng L, Aoki C, Hotta H (2013)** Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virol J.* 10: 259.
- Wai *et al.* 2002** **Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS (2002)** HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology.* 36: 1425–1430.

- Wakita et al. 2005** **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005)** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11(7): 791-6.
- Wiegand et al. 2008** **Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL (2008)** Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther.* 13: 211–220.
- Williams 2006** **Williams R (2006)** Global challenges in liver disease. *Hepatology.* 44: 521-526.
- Wong et al. 2015** **Wong G LH, Chan H LY, Chan HY, Tse C-H, Chim A ML, Lo A OS, Wong V WS (2015)** Adverse Effects of Vitamin D Deficiency on Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis B. *Clin Gastroenterol a Hepatol.* 13: 783–790.
- World Health Organization 2016a** **World Health Organization (2016)** Hepatitis B (Fact Sheet N°204). [Online im Internet] URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> [Stand: 16.01.2017, 17:50 Uhr]
- World Health Organization 2016b** **World Health Organization (2016)** Hepatitis C (Fact Sheet N°164). [Online im Internet] URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> [Stand: 16.01.2011, 17:50 Uhr]
- Yan et al. 2014** **Yan Y, Zhang JX, Liu KX, Huang T, Yan C, Huang LJ, Liu S, Mu SZ, Hao XJ (2014)** Seco-pregnane steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum atratum* and their anti-TMV activity. *Fitoterapia.* 97: 50-63.
- Yang und Burnstein 2003** **Yang ES, Burnstein KL (2003)** Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem.* 278(47): 46862-46868.
- Yuan et al. 2013** **Yuan CM, Tang GH, Wang XY, Zhang Y, Cao MM, Li XH, Li Y, Li SL, Di YT, He HP, Hao XJ, Hua HM (2013)** New steroids and sesquiterpene from *Turraea pubescens*. *Fitoterapia.* 90: 119-125.
- Zampino et al. 2015** **Zampino R, Boemio A, Sagnelli C, Alessio L, Adinolfi LE, Sagnelli E, Coppola N (2015)** Hepatitis B virus burden in developing countries. *World J Gastroenterol.* 21(42): 11941-11953.
- Zhang et al. 2003** **Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J (2003)** Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21): 12372-12377.
- Zhang et al. 2007** **Zhang H, Chen F, Wang X, Wu D, Chen Q (2007)** Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for rings A,B-seco limonoids from the seed of *Aphan-amixis polystachya*. *Magn Reson Chem.* 45(2): 189-192.
- Zhang et al. 2013** **Zhang Y, Wang JS, Wang XB, Gu YC, Wei DD, Guo C, Yang MH, Kong LY (2013)** Limonoids from the fruits of *Aphanamixis polystachya* (Meliaceae) and their biological activities. *J Agric Food Chem.* 61(9): 2171-2182.
- Zignego et al. 2007** **Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB (2007)** Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general over-



- Zittermann  
2006** view and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis.* 39: 2-17.  
**Zittermann A (2006)** Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 92(1): 39-48.
- Zoulim und  
Locarnini  
2009** **Zoulim F, Locarnini S (2009)** Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 137: 1593–1608.
- Zoulim und  
Locarnini  
2013** **Zoulim F, Locarnini S (2013)** Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance. *Liver Int.* 33(Suppl 1): 116-124.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Hepatitis-B-Viruspartikel. ....	7
Abbildung 2: Virales Genom des Hepatitis-B-Virus. ....	9
Abbildung 4: HepG2.2.15-Zellen. ....	12
Abbildung 6: Der Vitamin-D <sub>3</sub> -Stoffwechsel. ....	13
Abbildung 7: Virales Genom des Hepatitis-C-Virus. ....	15
Abbildung 8: Geografische Zuteilung der 6 Hepatitis-C-Virus-Genotypen .....	16
Abbildung 9: Aufbau des Replikons der LucUbiNeo-ET-Zellen (HCV Genotyp 1b). .	19
Abbildung 10: Aufbau des Replikons der JFH-LucUbiNeo-Zellen (HCV Genotyp 2a	20
Abbildung 12: Struktureller Aufbau von Limonin (1) und Nomilin (2) .....	21
Abbildung 13: Limonoide isoliert aus <i>Trichilia welwitschii</i> ( <i>Meliaceae</i> ). .....	22
Abbildung 14: Struktureller Aufbau von Cholesterol, b-Sitosterol und Stigmasterol	23
Abbildung 15: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden- Inkubation mit Vitamin D3 (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay.....	38
Abbildung 16: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden- Inkubation mit Vitamin D3 (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay) .....	38
Abbildung 17: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden- Inkubation mit Vitamin D3 (Cholecalciferol), getestet mit dem CTB-Assay.....	38
Abbildung 18: Spezifisches Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis-B-Surface- Antigen, HBsAg) - Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72-Stunden-Inkubation mit Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> ).....	39
Abbildung 19: Hepatitis-B-rcDNA Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72-Stunden- Inkubation mit Cholecalciferol (Vitamin D <sub>3</sub> ) .....	39
Abbildung 20: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden- Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay .....	40
Abbildung 21: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden- Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay .....	40
Abbildung 22: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden- Inkubation mit 25-Hydroxyvitamin D3 (Calcidiol), getestet mit dem CTB-Assay .....	40
Abbildung 23: Gehalt an spezifischem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D3) .....	41
Abbildung 24: Hepatitis-B-rcDNA-Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) .....	41
Abbildung 25: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 24-Stunden- Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay	42
Abbildung 26: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 48-Stunden- Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay	42
Abbildung 27: Viabilität der HepG2.2.15- und HepG2-H1.3-Zellen in der 72-Stunden- Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), getestet mit dem CTB-Assay	42
Abbildung 28: Gehalt an spezifischem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ).....	43
Abbildung 29: Hepatitis-B-rcDNA Gehalt im Zellkulturüberstand nach 72 Stunden Inkubation mit Calcidiol (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> ) .....	43
Abbildung 30: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24- Stunden-Inkubation mit TWF5 ( <i>Trichilia lactone</i> D5), getestet mit dem MTT-Assay.	44
Abbildung 31: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48- Stunden-Inkubation mit TWF5 ( <i>Trichilia lactone</i> D5), getestet mit dem MTT-Assay.	44

Abbildung 32: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF5 ( <i>Trichilia lactone D5</i> ) .....	44
Abbildung 33: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF5 ( <i>Trichilia lactone D5</i> ) .....	45
Abbildung 34: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ), getestet mit dem MTT-Assay .....	45
Abbildung 35: Viabilität der LucUbiNeo-ET und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ), getestet mit dem MTT-Assay .....	46
Abbildung 36: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ) .....	46
Abbildung 37: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF9 ( <i>Rohituka-3</i> ) .....	46
Abbildung 38: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ), getestet mit dem MTT-Assay ....	47
Abbildung 39: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ), getestet mit dem MTT-Assay ....	47
Abbildung 40: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ).....	48
Abbildung 41: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWF10 ( <i>Dregeanin DM4</i> ).....	48
Abbildung 42: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWT1, getestet mit dem MTT-Assay.....	48
Abbildung 43: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWT1, getestet mit dem MTT-Assay.....	49
Abbildung 44: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TWT1 .....	49
Abbildung 45: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TWT1 .....	50
Abbildung 46: Logarithmische Auftragung der Chemilumineszenz von LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit mit TWT1 .....	50
Abbildung 47: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TTA6, getestet mit dem MTT-Assay.....	51
Abbildung 48: Viabilität der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TTA6, getestet mit dem MTT-Assay.....	51
Abbildung 49: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 24-Stunden-Inkubation mit TTA6 .....	52
Abbildung 50: Chemilumineszenz der LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen in der 48-Stunden-Inkubation mit TTA6 .....	52
Abbildung 51: Logarithmische Auftragung der Chemilumineszenz von LucUbiNeo-ET- und JFH-LucUbiNeo-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit mit TTA6 .....	53

---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Zelllinien.....	25
Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Substanzen .....	26
Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Lösungen und Medien .....	27
Tabelle 4 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Medien .....	27
Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten Kits .....	27
Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Sonden und Primer .....	28
Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Gebrauchsmaterialien.....	29
Tabelle 8 Übersicht über das verwendete Equipment.....	30
Tabelle 9 Übersicht über die verwendete Software.....	31
Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Zellzahlen .....	33
Tabelle 11 Versuchsaufbau einer 24-Well-Platte .....	33
Tabelle 12 Versuchsaufbau einer 96-Well-Platte .....	34
Tabelle 13 Einstellungen rcDNA-Realtime-PCR-Zyklen .....	35
Tabelle 14 Verzeichnis der Abkürzungen.....	67
Tabelle 15: Bisher nachgewiesene Effekte von Limonoiden.....	94
Tabelle 16: Bisher nachgewiesene Effekte von Phytosterolen .....	97
Tabelle 17: Konzentrationen der eingesetzten Limonoide und Phytosterole .....	98

**Anhang der Dissertation**

## I. Effekte von Limonoiden

Effekt	Quelle
Analgetisch	Yang Y, Wang X, Zhu Q, Gong G, Luo D, Jiang A, Yang L, Xu Y (2014) Synthesis and pharmacological evaluation of novel limonin derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents with high water solubility. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 24, 1851–1855.
Anti-apoptotisch	Harish Kumar G, Vidya Priyadarsini R, Vinothini G, Vidjaya Letchoumy P, <i>et al.</i> (2009) Nimbolide a limonoid from <i>Azadirachta indica</i> inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. <i>Invest New Drugs</i> 27: 246–252.
Antibakteriell	<p>Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN (1992) Biological activity of limonoids from the rutales. <i>Phytochem.</i> 31(2): 377-394.</p> <p>Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubramanian MP (2012) Attenuation of aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis by a citrus bioactive compound-limonin. <i>J Pharm Res.</i> 5: 177–182.</p> <p>Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS (2012) Limonin 7-methoxime interferes with <i>Escherichia coli</i> biofilm formation and attachment in type 1 pili and antigen 43 dependent manner. <i>Food Control:</i> 26, 427–438.</p> <p>Ribeiro AB; Abdelnur PV, Garcia CF, Belini A, Severino VGP, da Silva MF, Fernandes JB, Vieira PC, de Carvalho SA, de Souza AA, <i>et al.</i> (2008) Chemical characterization of <i>Citrus sinensis</i> grafted on <i>C. limonia</i> and the effect of some isolated compounds on the growth of <i>Xylella fastidiosa</i>. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 56, 7815–7822.</p> <p>Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS (2012) Obacunone represses salmonella pathogenicity Islands 1 and 2 in an envz-dependent fashion. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 78, 7012–7022.</p> <p>Vikram A, Jesudhasan PR, Jayaprakasha GK, Pillai BS, Patil BS (2010) Grapefruit bioactive limonoids modulate <i>E. coli</i> O157:H7 TTSS and biofilm. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 140, 109–116.</p> <p>Vikram A, Jesudhasan PR, Jayaprakasha GK, Pillai SD, Patil BS (2011) Citrus limonoids interfere with <i>Vibrio harveyi</i> cell–cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. <i>Microbiology.</i> 157, 99–110.</p>

	Vikram A, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS (2012) Isolimononic acid interferes with Escherichia coli O157:H7 biofilm and TTSS in QseBC and QseA dependent fashion. BMC Microbiol. 12, 261.
Antifungal	Mulholland DA, Parel B, Coombes PH (2000) The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. Curr Org Chem. 4(10): 1011-1054.
Anti-inflammatorisch	<p>Kim W, Fan YY, Smith R, Patil B, Jayaprakasha GK, <i>et al.</i> (2009) Dietary curcumin and limonin suppress CD4+ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. J Nutr. 139: 1042–1048.</p> <p>Akihisa T, Noto T, Takahashi A, Fujita Y, Banno N, <i>et al.</i> (2009) Melanogenesis inhibitory, anti-inflammatory, and chemopreventive effects of limonoids from the seeds of Azadirachta indica A. Juss. (neem). J Oleo Sci. 58: 581–594.</p> <p>Xie F, Zhang M, Zhang CF, Wang ZT, Yu BY, <i>et al.</i> (2008) Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from Melia toosendan fruit. J Ethnopharmacol. 117: 463–466.</p> <p>Penido C, Conte FP, Chagas MS, Rodrigues CA, Pereira JF, <i>et al.</i> (2006) Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from Carapa guianensis Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. Inflamm Res. 55: 457–464.</p> <p>Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, <i>et al.</i> (2005) Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from Carapa guianensis Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. Inflamm Res. 54: 295–303.</p> <p>Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubramanian MP (2012) Attenuation of aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis by a citrus bioactive compound-limonin. J Pharm Res. 5: 177–182.</p> <p>Yang Y, Wang X, Zhu Q, Gong G, Luo D, Jiang A, Yang L, Xu Y (2014) Synthesis and pharmacological evaluation of novel limonin derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents with high water solubility. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 1851–1855.</p> <p>Mahmoud MF, Hamdan DI, Wink M, El-Shazly AM (2014) Hepatoprotective effect of limonin, a natural limonoid from the seed of Citrus aurantium var. bigaradia, on D-galactosamine-induced liver injury in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 387, 251–261.</p> <p>Mahmoud MF, Gamal S, El-Fayoumi HM (2014) Limonin atten-</p>

	<p>uates hepatocellular injury following liver ischemia and reperfusion in rats via toll like receptor dependent pathway. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> 740, 676–682.</p> <p>Kim J, Jayaprakasha GK, Muthuchamy M, Patil BS (2011) Structure-function relationships of citrus limonoids on p38 MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> 670, 44–49.</p> <p>Chan Y-Y, Li C-H, Shen Y-C, Wu T-S (2010) Anti-inflammatory principles from the stem and root barks of <i>Citrus medica</i>. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 58, 61–65.</p>
Antikanzerös	<p>Mulholland DA, Parel B, Coombes PH (2000) The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. <i>Curr Org Chem.</i> 4(10): 1011-1054.</p> <p>Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, Taddeo SS, <i>et al.</i> (2006) Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. <i>Carcinogenesis.</i> 27: 1257–1265.</p> <p>Priyadarsini RV, Manikandan P, Kumar GH, Nagini S (2009) The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. <i>Free Radic Res.</i> 43: 492–504.</p> <p>Miller EG, Gonzales-Sanders AP, Couvillon AM, BinnieWH, Hasegawa S, Lam LK (1992) Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by limonin 17-beta-D-glucopyranoside. <i>Nutr Cancer.</i> 17: 1–7.</p> <p>Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubramanian MP (2012) Attenuation of aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis by a citrus bioactive compound-limonin. <i>J Pharm Res.</i> 5: 177–182.</p> <p>Kim, J.; Jayaprakasha, G.K.; Patil, B.S. Limonoids and their anti-proliferative and anti-aromatase properties in human breast cancer cells. <i>Food Funct.</i> 2013, 4, 258–265.</p> <p>Poulose SM, Jayaprakasha GK, Mayer RT, Girenavar B, Patil BS (2007) Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes. <i>J. Sci. Food Agric.</i> 87, 1699–1709.</p> <p>Patil JR, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Chetti MB, Patil BS (2009) Bioactive compounds from mexican lime (<i>Citrus aurantifolia</i>) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 57, 10933–10942.</p> <p>Perez JL, Jayaprakasha GK, Valdivia V, Munoz D, Dandekar</p>



<p>DV, Ahmad H, Patil BS (2009) Limonin methoxylation influences the induction of glutathione S-transferase and quinone reductase. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 57, 5279–5286.</p> <p>Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, Taddeo SS, Murphy ME, Pike LM, Chapkin RS, Lupton JR, Turner ND (2006) Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. <i>Carcinogenesis</i>. 27, 1257–1265.</p> <p>El-Readi MZ, Hamdan D, Farrag N, El-Shazly A, Wink M (2010) Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> 626, 139–145.</p> <p>Patil JR, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Chetti MB, Patil BS (2010) Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. <i>Microchem. J.</i> 94, 108–117.</p> <p>Han YL, Yu HL, Li D, Meng XL, Zhou ZY, Yu Q, Zhang XY, Wang FJ, Guo C (2011) Inhibitory effects of limonin on six human cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in vitro. <i>Toxicol. In Vitro.</i> 25, 1828–1833.</p> <p>Shimizu S, Miyamoto S, Fujii G, Nakanishi R, Onuma W, Ozaki Y, Fujimoto K, Yano T, Mutoh M (2015) Suppression of intestinal carcinogenesis in Apc-mutant mice by limonin. <i>J. Clin. Biochem. Nutr.</i> 57, 39–43.</p> <p>Langeswarana K, Kumar SG, Perumal S, Revathy R, Balasubramaniam MP (2013) Limonin—A citrus limonoid, establish anticancer potential by stabilizing lipid peroxidation and antioxidant status against N-nitrosodiethylamine induced experimental hepatocellular carcinoma. <i>Biomed. Prev. Nutr.</i> 3, 165–171.</p> <p>Das A, Miller R, Lee P, Holden CA, Lindhorst SM, Jaboin J, Vandergrift WA, Banik NL, Giglio P, Varma AK, et al. (2015) A novel component from citrus, ginger, and mushroom family exhibits antitumor activity on human meningioma cells through suppressing the Wnt/catenin signaling pathway. <i>Tumor Biol.</i> 36, 7027–7034.</p> <p>Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS (2013) Citrus limonoids and curcumin additively inhibit human colon cancer cells. <i>Food Funct.</i> 4, 803–810.</p> <p>Poulose SM, Harris ED, Patil BS (2006) Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. <i>Nutr. Cancer.</i> 56, 103–112.</p> <p>Ahmad H, Li J, Polson M, Mackie K, Quiroga W, Patil BS (2006)</p>
---

<p>Citrus limonoids and flavonoids: Enhancement of phase II detoxification enzymes and their potential in chemoprevention. ACS Symp. Ser. 936, 130–143.</p> <p>Perez JL, Jayaprakasha GK, Cadena A, Martinez E, Ahmad H, Patil BS (2010) In vivo induction of phase II detoxifying enzymes, glutathione transferase and quinone reductase by citrus triterpenoids. BMC Complement. Altern. Med. 10, 51.</p> <p>Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS (2015) Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death. Toxicology. 329, 88–97.</p> <p>Kim J, Jayaprakasha GK, Patil BS (2014) Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity in vitro by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. Biochimie. 105, 36–44.</p> <p>Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS (2011) Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis Food Chem. Toxicol. 49, 1616–1625.</p> <p>Zhao HY, Yang L, Wei J, Huang M, Jiang J-G (2012) Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i> Engl. Food Chem. 135, 2175–2181.</p> <p>Kim J, Jayaprakasha GK, Vikram A, Patil BS (2012) Methyl nomilinate from citrus can modulate cell cycle regulators to induce cytotoxicity in human colon cancer (SW480) cells in vitro. Toxicol. In Vitro. 26, 1216–1223.</p> <p>Zunino SJ, Storms DH, Freytag TL, Adkins YC, Bonnel EL, Woodhouse LR, Breksa AP, Manners GD, Mackey BE, Kelley DS (2016) Dietary supplementation with purified citrus limonin glucoside does not alter ex vivo functions of circulating T lymphocytes or monocytes in overweight/obese human adults. Nutr. Res. 36, 24–30.</p> <p>Kim J, Jayaprakasha GK, Uckoo RM, Patil BS (2012) Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. Food Chem. Toxicol. 50, 423–430.</p> <p>Jayaprakasha GK, Jadegoud Y, Nagana G, Patil BS (2010) Bioactive compounds from sour orange inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell cycle arrest. J. Agric. Food Chem. 58, 180–186.</p> <p>Poulose SM, Harris ED, Patil BS (2005) Citrus limonoids induce</p>
---

	<p>apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. <i>J. Nutr.</i> 135, 870–877.</p> <p>Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS (2012) Obacunone represses salmonella pathogenicity Islands 1 and 2 in an envz-dependent fashion. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 78, 7012–7022.</p>
Anti-nozizeptiv	<p>Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubramanian MP (2012) Attenuation of aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis by a citrus bioactive compound-limonin. <i>J Pharm Res.</i> 5: 177–182.</p>
Antioxidativ	<p>Lam LKT, Li Y, Hasegawa S (1989) Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. <i>J Agric Food Chem.</i> 37: 878–880.</p> <p>Tsamo Tontsa A, Mkounga P, Njyou FN, Manautou J, Kirk M, Hultin PG, Nkengfack AE (2013) Rubescins A, B and C: New Havanensin Type Limonoids from Root Bark of <i>Trichilia rubescens</i> (Meliaceae). <i>Chem Pharm Bull.</i> 61(11): 1178–1183.</p> <p>Hamdan D, El-Readi MZ, Tahrani A, Herrmann F, Kaufmann D, Farrag N, El-Shazly A, Wink M (2011) Chemical composition and biological activity of <i>Citrus jambhiri</i> Lush. <i>Food Chem.</i> 127, 394–403.</p> <p>Pichaiyongvongdee S, Haruenkit R (2009) Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in seven Thai pummelo cultivars. <i>Kasetsart J. (Nat. Sci.)</i> 43, 458–466.</p> <p>Mandadi KK, Jayaprakasha GK, Bhat NG, Patil BS (2007) Red Mexican grapefruit: A novel source for bioactive limonoids and their antioxidant activity. <i>Z. Naturforsch. C.</i> 62, 179–188.</p> <p>Zhao HY, Yang L, Wei J, Huang M, Jiang J-G (2012) Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i> Engl. <i>Food Chem.</i> 135, 2175–2181.</p> <p>Kim J, Jayaprakasha GK, Uckoo RM, Patil BS (2012) Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. <i>Food Chem. Toxicol.</i> 50, 423–430.</p> <p>Poulose SM, Harris ED, Patil BS (2005) Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. <i>J. Nutr.</i> 135, 870–877.</p>
Antiviral	<p>Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN (1992) Biological activity of limonoids from the rutales. <i>Phytochem.</i> 31(2): 377-394.</p> <p>Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubrama-</p>

	<p>nian MP (2012) Attenuation of aflatoxin B1 induced primary hepatocarcinogenesis by a citrus bioactive compound-limonin. <i>J Pharm Res.</i> 5: 177–182.</p> <p>Balestrieri E, Pizzimenti F, Ferlazzo A, Giofrè SV, Iannazzo D, Piperno A, Romeo R, Chiacchio MA, Mastino A, Macchi B (2011) Antiviral activity of seed extract from <i>Citrus bergamia</i> towards human retroviruses. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 19, 2084–2089.</p>
Chemopräventiv	<p>Perez JL, Jayaprakasha GK, Valdivia V, Munoz D, <i>et al.</i> (2009) Limonin methoxylation influences the induction of glutathione S-transferase and quinone reductase. <i>J Agric Food Chem.</i> 57: 5279–5286.</p> <p>Kim W, Fan YY, Smith R, Patil B, Jayaprakasha GK, <i>et al.</i> (2009) Dietary curcumin and limonin suppress CD4+ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. <i>J Nutr.</i> 139: 1042–1048.</p> <p>Lam LKT, Zang J, Hasegawa S (1994) Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. <i>Food Technol.</i> 48: 104–108.</p>
Gegen Allergische Reaktion	<p>Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, <i>et al.</i> (2005) Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from <i>Carapa guianensis</i> Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. <i>Inflamm Res.</i> 54: 295–303.</p>
Gegen Hyperglykämien	<p>Ono E, Inoue J, Hashidume T, Shimizu M, Sato R (2011) Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 410, 677–681.</p> <p>Horiba T, Katsukawa M, Mita M, Sato R (2015) Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPAR pathway. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 463, 846–852.</p>
Gegen Malaria wirkend	<p>Armelle TT, Pamela NK, Pierre M, Müller IB, Marat K, Sass G, Ephrem NA (2016) Antiplasmodial Limonoids from <i>Trichilia rubescens</i> (Meliaceae). <i>Med Chem. Med Chem.</i> 12(7): 655-661.</p> <p>Mohamad K, Hirasawa Y, Litaudon M, Awang K, Hadi AH, Takeya K, Ekasari W, Widyawaruyanti A, Zaini NC, Morita H (2009) Ceramicines B-D, new antiplasmodial limonoids from <i>Chisocheton ceramicus</i>. <i>Bioorg Med Chem.</i> 17(2): 727-30.</p> <p>Lucantoni L, Yerbanga RS, Lupidi G, Pasqualini L, Esposito F, <i>et al.</i> (2010) Transmission blocking activity of a standardized neem (<i>Azadirachta indica</i>) seed extract on the rodent malaria parasite <i>Plasmodium berghei</i> in its vector <i>Anopheles stephensi</i>. <i>Malaria J.</i> 9: 66.</p>

Hepatoprotektiv	<p>Ninomiya K, Miyazawa S, Ozeki K, Matsuo N, Muraoka O, Kikuchi T, Yamada T, Tanaka R, Morikawa T (2016) Hepatoprotective Limonoids from Andiroba (<i>Carapa guianensis</i>). <i>Int J Mol Sci.</i> 17(4).</p> <p>Mahmoud MF, Hamdan DI, Wink M, El-Shazly AM (2014) Hepatoprotective effect of limonin, a natural limonoid from the seed of <i>Citrus aurantium</i> var. <i>bigaradia</i>, on D-galactosamine-induced liver injury in rats. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.</i> 387(3): 251-61.</p> <p>Germanò MP, D'Angelo V, Sanogo R, Catania S, Alma R, De Pasquale R, Bisignano G (2005) Hepatoprotective and antibacterial effects of extracts from <i>Trichilia emetica</i> Vahl. (Meliaceae). <i>J Ethnopharmacol.</i> 96: 227–232.</p> <p>Lu Q, Yang L, Zhao HY, Jiang JG, Xu HL (2013) Protective effect of compounds from the flowers of <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>amara</i> Engl against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury. <i>Food Chem. Toxicol.</i> 62, 432–435.</p> <p>Kelley DS, Adkins YC, Zunino SJ, Woodhouse LR, Bonnel EL, Breksa AP, Manners GD, Mackey BE (2015) Citrus limonin glucoside supplementation decreased biomarkers of liver disease and inflammation in overweight human adults. <i>J. Funct. Foods</i> 12, 271–281.</p>
Insekten <i>Antifeedant</i> (Nährstoffaufnahme-blockierend)	Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN (1992) Biological activity of limonoids from the rutales. <i>Phytochem.</i> 31(2): 377-394.
Insektizidal	Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN (1992) Biological activity of limonoids from the rutales. <i>Phytochem.</i> 31(2): 377-394.
Larventötend (larvizidal)	<p>Bilal H, Akram W, Ali-Hassan S (2012) Larvicidal activity of citrus limonoids against <i>Aedes albopictus</i> larvae. <i>J. Arthropod Borne Dis.</i> 6, 104–111.</p> <p>Hafeez F, Akram W, Shaalan EA (2011) Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against <i>Aedes albopictus</i>. <i>Parasitol. Res.</i> 109, 221–229.</p> <p>Yu X, Ding G, Zhi X, Xu H (2015) Insight into reduction of obacunone, and their ester derivatives as insecticidal agents against <i>Mythimna separata</i> Walker. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 25, 25–29.</p> <p>Yu X, Shi D, Zhi X, Li Q, Yao X, Xu H (2015) Synthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of C7-oxime ester derivatives of obacunone as insecticidal agents. <i>RSC Adv.</i> 5, 31700–31707.</p>
Nährstoffaufnahme-blockierend ( <i>Anti-</i>	Howard AFV, Adongo EA, Hassanali A, Omlin FX, Wanjoya A, Zhou G, Vulule J (2009) Laboratory evaluation of the aqueous

<i>feedant</i> )	extract of <i>Azadirachta indica</i> (Neem) wood chippings on <i>Anopheles gambiae</i> s.s. (Diptera: Culicidae) mosquitoes. <i>J Med Entomol.</i> 46: 107–114.
Neuroprotektiv	Ouyang GQ, Li CJ, Yang JZ, Ma J, Li L, Peng Y, Wang XL, Zhang DM (2016) Limonoids with neuroprotective activity from the stems of <i>Clausena emarginata</i> . <i>J Asian Nat Prod Res.</i> 18(10): 928-937.
p-Glykoprotein Inhibition	El-Readi MZ, Hamdan D, Farrag N, El-Shazly A, Wink M (2010) Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from <i>Citrus</i> species in human colon and leukaemia cell lines. <i>Eur J Pharmacol.</i> 626: 139–145.
Verbesserung der Knochenqualität	Mandadi K, Ramirez M, Jayaprakasha GK, Faraji B, Lihono M, <i>et al.</i> (2009) Citrus bioactive compounds improve bone quality and plasma antioxidant activity in orchidectomized rats. <i>Phyto-medicine</i> 16: 513–520.
Verbesserung der Plasma-Antioxidantien Aktivität	Mandadi K, Ramirez M, Jayaprakasha GK, Faraji B, Lihono M, <i>et al.</i> (2009) Citrus bioactive compounds improve bone quality and plasma antioxidant activity in orchidectomized rats. <i>Phyto-medicine</i> 16: 513–520.
Zytotoxisch	Sun JB, Tang BQ, Li Q, Wang B, Liang JY, Chen L (2016) Cytotoxic limonoids from the root bark of <i>Dictamnus angustifolius</i> . <i>Fitoterapia.</i> 115: 92-95.  Wong CP, Shimada M, Nagakura Y, Nugroho AE, Hirasawa Y, Kaneda T, Awang K, Hadi AH, Mohamad K, Shiro M, Morita H (2011) Ceramicines E-I, new limonoids from <i>Chisocheton ceramicus</i> . <i>Chem Pharm Bull (Tokyo).</i> 59(3): 407-11.
Inhibition der Osteoklasengengese	Kimira Y, Taniuchi Y, Nakatani S, Sekiguchi Y, Kim HJ, Shimizu J, Ebata M, Wada M, Matsumoto A, Mano H (2015) Citrus limonoid nomilin inhibits osteoclastogenesis in vitro by suppression of NFATc1 and MAPK signaling pathways. <i>Phytomedicine.</i> 22, 1120–1124.

Tabelle 15: Bisher nachgewiesene Effekte von Limonoiden

## II. Effekte von Phytosterolen

Effekt	Quelle
Antidiabetisch	Gilani AH, Khan AU, Raof M, Ghayur MN, Siddiqui BS, et al. (2008) Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effects of <i>Hyoscyamus niger</i> are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca <sup>2+</sup> channels. <i>Fundam Clin Pharmacol.</i> 22: 87–99.
Antihistaminerg	Kumar SS, Kumar Y, Khan MS, Anbu J, De Clercq E (2011) Antihistaminic and antiviral activities of steroids of <i>Turbinaria conoides</i> . <i>Nat Prod Res.</i> 25(7):723-9.
Anti-inflammatorisch	<p>Baskar AA, Al Numair KS, Gabriel Paulraj M, Alsaif MA, Muamar MA, et al. (2012) <math>\beta</math>-sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. <i>J Med Food.</i> 15: 335–343.</p> <p>Liz R, Pereira DF, Horst H, Dalmarco EM, Dalmarco JB, et al. (2011) Protected effect of <i>Esenbeckia leiocarpa</i> upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. <i>Int Immunopharmacol.</i> 11: 1991–1999.</p> <p>Bak MJ, Hong SG, Lee JW, Jeong WS (2012) Red ginseng marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NF<math>\kappa</math>B and p38 pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. <i>Molecules.</i> 17: 13769–13786.</p> <p>Liz R, Zanatta L, dos Reis GO, Horst H, Pizzolatti MG, et al. (2013) Acute effect of <math>\beta</math>-sitosterol on calcium uptake mediates anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils. <i>J Pharm Pharmacol.</i> 65: 115–122.</p> <p>Yamamoto M, Matsui T, Sugiyama K, et al. (1991) Anti-inflammatory active constituents of <i>Aloe arborescens</i> Miller. <i>Agric Biol Chem.</i> 55: 1627-1629.</p>
Antikanzerogen	Liz R, Pereira DF, Horst H, Dalmarco EM, Dalmarco JB, et al. (2011) Protected effect of <i>Esenbeckia leiocarpa</i> upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. <i>Int Immunopharmacol.</i> 11: 1991–1999.
Antimikrobiell	Kumar SS, Kumar Y, Khan MS, Anbu J, De Clercq E (2011) Antihistaminic and antiviral activities of steroids of <i>Turbinaria conoides</i> . <i>Nat Prod Res.</i> 25(7):723-9.
Antioxidativ	Baskar AA, Al Numair KS, Gabriel Paulraj M, Alsaif MA, Muamar MA, et al. (2012) $\beta$ -sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. <i>J Med Food.</i> 15: 335–343.
Antispasmodisch	Baskar AA, Ignacimuthu S, Paulraj GM, Al Numair KS (2010) Chemopreventive potential of beta-Sitosterol in experimental colon cancer model – an in vitro and in vivo study. <i>BMC Complement Altern Med.</i> 10: 24–30.

Antiviral	<p>Phongmaykin J, Kumamoto T, Ishikawa T, Saifah E, Suttisri R (2011) Biologically active constituents of <i>Aglaia erythrosperma</i>. <i>Nat Prod Res.</i> 25(17): 1621-1628.</p> <p>Yan Y, Zhang JX, Liu KX, Huang T, Yan C, Huang LJ, Liu S, Mu SZ, Hao XJ (2014) Seco-pregnane steroidal glycosides from the roots of <i>Cynanchum atratum</i> and their anti-TMV activity. <i>Fitoterapia.</i> 97: 50-63.</p> <p>Petrera E, Nittolo AG, Alché LE (2014) Antiviral action of synthetic stigmasterol derivatives on herpes simplex virus replication in nervous cells in vitro. <i>Biomed Res Int.</i> 2014: 947560.</p> <p>Eugster C, Rivara G, Biglino A, Cavallo R, Gioannini P, Forno B, Macario M, Pollono AM (1997) Phytosterol compounds having antiviral efficacy. <i>Panminerva Med.</i> 39(1): 12-20.</p>
Cholesterinsenkend, vor allem Low Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin	<p>Rocha VZ, Ras RT, Gagliardi AC, Mangili LC, Trautwein EA, Santos RD (2016) Effects of phytosterols on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. <i>Atherosclerosis.</i> 248: 76-83.</p> <p>Thompson GR, Grundy SM (2005) History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. <i>Am J Cardiol.</i> 96: 3D–9D.</p> <p>Malinowski JM, Gehret MM (2010) Phytosterols for dyslipidemia. <i>Am J Health Syst Pharm.</i> 67: 1165–73.</p> <p>Patch CS, Tapsell LC, Williams PG (2005) Plant sterol/stanol prescription is an effective treatment strategy for managing hypercholesterolemia in outpatient clinical practice. <i>J Am Diet Assoc.</i> 105: 46–52.</p> <p>Grundy SM (2005) Stanol esters as a component of maximal dietary therapy in the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III report. <i>Am J Cardiol.</i> 96: 47D–50D.</p> <p>AbuMweis SS, Barake R, Jones P (2008) Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. <i>Food Nutr Res.</i> 52.</p> <p>De Jong A, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP (2008) Effects of long-term plant sterol or stanol ester consumption on lipid and lipoprotein metabolism in subjects on statin treatment. <i>Br J Nutr.</i> 100: 937–41.</p> <p>Lichtenstein AH, Deckelbaum RJ (2001) AHA Science Advisory. Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association. <i>Circulation.</i> 103: 1177–9.</p>



	<p>Blair SN, Capuzzi DM, Gottlieb SO, Nguyen T, Morgan JM, Cater NB (2000) Incremental reduction of serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol ester-containing spread to statin therapy. <i>Am J Cardiol.</i> 86: 46–52.</p> <p>Mannarino E, Pirro M, Cortese C, Lupattelli G, Siepi D, Mezzetti A, <i>et al.</i> (2009) Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study. <i>Nutr Metab Cardiovasc Dis.</i> 19: 84–90.</p> <p>Lau VW, Journoud M, Jones PJ (2005) Plant sterols are efficacious in lowering plasma LDL and non-HDL cholesterol in hypercholesterolemic type 2 diabetic and nondiabetic persons. <i>Am J Clin Nutr.</i> 81: 1351–8.</p> <p>Bouic PJD, Etsebeth RW, Liebenberg CF (1996) Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. <i>Int J Immunopharmac.</i> 18: 693–700.</p>
Insulin-regulierende Aktivität	Ivorra MD, D'Ocon MP, Paya M, <i>et al.</i> (1988) Antihyperglycemic and insulin releasing effects of beta-sitosterol 3-B-D-glucoside and its aglycone beta-sitosterol. <i>Arch Int Pharmacodyn Ther.</i> 296: 224–231.
Neuroprotektiv	Chung MJ, Lee S, Park YI, Lee J, Kwon KH (2016) Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from <i>Cirsium setidens</i> and <i>Aster scaber</i> in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. <i>Life Sci.</i> 148: 173–182.

Tabelle 16: Bisher nachgewiesene Effekte von Phytosterolen

**III. Konzentrationen der eingesetzten Substanzen**

Substanz	Molekulargewicht in g/mol der Substanz	Eingesetzte Konzentration in $\mu\text{M}$ (mol/l)	Konzentration in mol/ml	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
TWF5	704	0,01	0,00001	0,00704
		0,1	0,0001	0,0704
		1	0,001	0,704
		10	0,01	7,04
		25	0,025	17,6
TWF9	600	0,01	0,00001	0,006
		0,1	0,0001	0,06
		1	0,001	0,6
		10	0,01	6,0
		25	0,025	15
TWF10	584	0,01	0,00001	0,00584
		0,1	0,0001	0,0584
		1	0,001	0,584
		10	0,01	5,84
		25	0,025	14,6
TWT1	430	0,01	0,00001	0,0043
		0,1	0,0001	0,043
		1	0,001	0,43
		10	0,01	4,3
		25	0,025	10,75
TTA6	410	0,01	0,00001	0,0041
		0,1	0,0001	0,041
		1	0,001	0,41
		10	0,01	4,1
		25	0,025	10,25

Tabelle 17: Konzentrationen der eingesetzten Limonoide und Phytosterole

#### **IV. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. S. Lüth dafür bedanken, dass ich den praktischen Teil der vorliegenden Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen durfte.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Dr. W. Dammermann bedanken, für die vielen hilfreichen Gespräche, Tipps und Ratschläge.

Bei Frau M. Kohring und Frau K. Heinzl möchte ich mich bedanken, für die Geduld mit mir, ein immer offenes Ohr bei Fragen und das Anlernen praktischer Fähigkeiten.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Tiegls und Sass möchte ich danken, für die Hilfestellung an den speziellen Geräten und die Möglichkeit immer Fragen stellen zu können.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Eltern, für die Unterstützung auf dem Weg bis zu dieser Dissertationsarbeit und meinen Freunden, die Abstriche in der Freizeitgestaltung in Kauf nahmen.

Besonders bedanken möchte ich mich zuletzt bei meinem Partner André für die immer dagewesene Unterstützung. Viele hilfreiche und anregende Gespräche, gerade auch aus einem Blickwinkel außerhalb der medizinischen Forschung, haben die Fertigstellung dieser Arbeit erst abgerundet.

**V. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den 24.02.2017

Unterschrift: .....