

**Neuroprotektive Wirkung von
Sideritis scardica Griseb. in
Caenorhabditis elegans als Modellorganismus
für neurodegenerative Erkrankungen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Felix Heiner

geboren in Hohenmölsen, Deutschland

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Felix Heiner

geboren in Hohenmölsen, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung:

**Neuroprotektive Wirkung von
Sideritis scardica Griseb. in
Caenorhabditis elegans als Modellorganismus
für neurodegenerative Erkrankungen**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Wink

Prof. Dr. Jürgen Reichling

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Publikationen.....	ii
Zusammenfassung.....	iii
Summary	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1 Alzheimer-Erkrankung	1
1.1.2 Parkinson-Erkrankung.....	7
1.1.3 Huntington-Erkrankung	9
1.1.4 Gemeinsame Charakteristika neurodegenerativer Erkrankungen	11
1.2 Griechischer Bergtee	14
1.2.1 Botanische Beschreibung und traditionelle Anwendung	14
1.2.2 Phytochemie	16
1.2.3 Pharmakologische Eigenschaften.....	17
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	20
1.3.1 Nervensystem	22
1.3.2 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus.....	23
1.4 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Labormaterial	27
2.1.2 Instrumente.....	27
2.1.3 Software	28
2.1.4 Chemikalien	28
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	30
2.1.6 Pflanzenmaterial	33
2.1.7 <i>C. elegans</i> -Stämme.....	34
2.2 Methoden	36
2.2.1 Extraktion der Droge und Rücklösen der Auszüge	36
2.2.2 Phytochemische Analyse (durch Fa. Finzelberg).....	36
2.2.3 Messung des Gesamt-Polyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu)	37
2.2.4 DPPH-Assay.....	38
2.2.5 <i>C. elegans</i> : Kultivierung und Alterssynchronisation.....	38
2.2.6 Behandlung von <i>C. elegans</i>	39
2.2.7 Wachstumskontrolle	40
2.2.8 Toxizitätskontrolle.....	41
2.2.9 Intrazelluläre ROS-Belastung	41
2.2.10 Einfluss auf die Expression von HSP-16.2	42
2.2.11 Translokation von DAF-16.....	42
2.2.12 Survival-Assay	42
2.2.13 Lifespan-Assay	43
2.2.14 Quantifizierung von A β -Plaques	43
2.2.15 Paralyse-Assay (A β -Toxizität)	43
2.2.16 Chemotaxis-Assay und Einfluss auf die Serotonin-Hypersensibilität	44
2.2.17 Beeinflussung von Tau-induzierter Bewegungsstörung.....	45

2.2.18	Einfluss auf die Aggregation von α -Synuclein und dadurch bedingte Fettablagerungsstörungen.....	46
2.2.19	Protektion dopaminerger Neuronen vor 6-OHDA-induzierter Degeneration	46
2.2.20	Quantifizierung von PolyQ-Plaques.....	47
2.2.21	Bewertung der PolyQ-Neurotoxizität.....	47
2.2.22	Prüfung auf Korrelation der Ergebnisse.....	48
2.2.23	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Phytochemische Analyse (Fa. Finzelberg)	49
3.2	Wachstumskontrollen	52
3.3	Toxizitätskontrolle	54
3.4	Metabolischer Einfluss der Bakterien und Resorption der Polyphenole.....	55
3.5	Antioxidative Eigenschaften.....	57
3.5.1	Radikalfänger-Aktivität <i>in vitro</i> : DPPH-Assay.....	57
3.5.2	Antioxidative Eigenschaften im <i>C. elegans</i> -Modell	59
3.6	Lifespan-Assay	65
3.7	Einfluss auf Alzheimer-assoziierte Pathomechanismen	65
3.7.1	Wirkung auf A β -bedingte Störungen	65
3.7.2	Wirkung auf Tau-bedingte Störungen	77
3.8	Einfluss auf Parkinson-assoziierte Pathomechanismen.....	78
3.8.1	Wirkung auf α -Synuclein-bedingte Störungen.....	78
3.8.2	Protektion vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration.....	81
3.9	Einfluss auf Huntington-assoziierte Pathomechanismen	84
3.9.1	Aggregation von PolyQ.....	84
3.9.2	PolyQ-Neurotoxizität	87
3.10	Korrelation der Ergebnisse.....	89
4	Diskussion	93
4.1	Antioxidative Wirkung und Bioverfügbarkeit.....	93
4.2	Neuroprotektive Wirkung der Sideritis-Extrakte.....	96
4.3	Beurteilung des wirksamen Prinzips	97
4.4	Potentieller Wirkmechanismus	101
4.5	Vergleich zu Referenzextrakten	104
4.5.1	<i>Ginkgo biloba</i>	104
4.5.2	<i>Hypericum perforatum</i>	105
4.5.3	<i>Rhodiola rosea</i>	106
4.5.4	<i>Bacopa monnieri</i>	107
4.6	Einfluss der Bakterien als Futterquelle.....	108
4.7	Schlussfolgerung	110
	Referenzen	111

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Wink dafür bedanken, dass er mich in seiner Arbeitsgruppe willkommen geheißen hat und es ermöglichte, eine interessante Pflanze weiter zu erforschen.

Prof. Dr. Jürgen Reichling möchte ich für seinen stetigen guten Zuspruch und sein ehrliches Interesse an meiner Arbeit danken.

Der Firma Finzelberg, den an Produktion und Analytik der Extrakte beteiligten Mitarbeitern und insbesondere Dr. Björn Feistel gilt mein Dank für die großzügige materielle Unterstützung, die kurzen Dienstwege sowie für zahlreiche Denkanstöße und Diskussionen wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Art.

Auch der Firma Schwabe sei gedankt für die Bereitstellung ihres berühmten Spezialextraktes.

Dr. Christopher Link danke ich für seine große Hilfsbereitschaft, wenn mal wieder „der Wurm drin“ war und für das schnelle Senden des empfindlichen *C. elegans*-Stammes CL4176.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die fruchtbaren Diskussionen und die praktischen Ratschläge. Besten Dank an Dr. Eva Arnold und Astrid Backhaus, die immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art hatten; an die Mitglieder der *C. elegans*-Gruppe für die endlosen Fachgespräche und besonders an Dr. Pille Link für die ersten Einblicke in die Arbeit mit den Fadenwürmern und an Mariana Roxo für die Hilfe, das Labor zu organisieren und ordentlich zu halten, die Arbeitsabläufe stets zu verbessern und die schwarze Magie zu bekämpfen, mit der die Würmer manchmal belegt schienen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mir diesen Weg bereitet und mich in meinen Entscheidungen stets unterstützt haben. Ihr moralischer Beistand war grenzenlos.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Partnerin Cindy Kux, die mir pausenlos den Rücken frei gehalten hat; unendlich geduldig war; mich beruhigt hat, wenn ich erzürnt war; tröstende Worte fand, wenn ich geknickt war und mir alle Freiheiten gewährte, die ich brauchte. Niemand hätte mir in dieser Zeit mehr Halt geben können.

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

Sideritis scardica extracts inhibit aggregation and toxicity of amyloid- β in *Caenorhabditis elegans* used as a model for Alzheimer's disease (Review-Prozess bei *Phytomedicine* läuft)

Activity of *Sideritis scardica* extracts and pure compounds in a *C. elegans* model of Alzheimer's and Parkinson's disease (in Vorbereitung)

Abstracts von Kongressbeiträgen

Heiner F, Feistel B, Wink M (2015) *Sideritis scardica* extracts inhibit the aggregation of α -synuclein and β -amyloid peptides in *Caenorhabditis elegans* used as a model for neurodegenerative diseases. *Planta Med* **81**: PW_127. (Posterpräsentation auf dem 63. GA-Kongress in Budapest)

Heiner F, Feistel B, Wink M (2016) Neuroprotektive Wirkung von *Sideritis scardica*-Extrakten auf *Caenorhabditis elegans*, einem Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen. *Z Phytother* **37**: V22. (Vortrag und Posterpräsentation auf dem Kongress „Phytotherapie 2016“ von GPT, SMGP und ÖGPhyt)

Buchkapitel

Monographie „Sideritis“ in Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen

(Autoren: Felix Heiner, Björn Feistel, Jürgen Reichling)

Zusammenfassung

Sideritis scardica Griseb., auch bekannt als Griechischer Bergtee, ist eine Pflanze aus der Familie der Lamiaceae, welche in der Balkanregion beheimatet ist. Dort wird sie traditionell, meist als Infus, gegen eine Vielzahl von Beschwerden eingesetzt. In den letzten Jahren wurde das Kraut auf die ihm nachgesagten pharmakologischen Eigenschaften hin wissenschaftlich untersucht, wobei v. a. die Wirkungen im Zentralnervensystem in den Fokus rückten, nämlich verbesserte kognitive Leistungen und die Reduktion von β -Amyloid-Ablagerungen, welche für die Alzheimer-Erkrankung typisch sind. Hieran anknüpfend war das Hauptziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob Extrakte aus dem Griechischen Bergtee weiteren Pathomechanismen der Alzheimer-Demenz bzw. anderen neurodegenerativen Erkrankungen entgegen wirken, welche in unserer alternden Gesellschaft ein stetig wachsendes Gesundheitsproblem darstellen.

Dazu wurden sechs hydroalkoholische *S. scardica*-Extrakte unterschiedlicher Lipophilie, welche von der Finzelberg GmbH & Co. KG hergestellt und phytochemisch analysiert worden sind, im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* auf ihre neuroprotektiven Fähigkeiten hin geprüft. Zusätzlich wurden sechs Fraktionen aus einem der aktivsten Auszüge, sieben isolierte Reinsubstanzen sowie vier ausgewählte Extrakte bekannter Arzneipflanzen zu Vergleichszwecken getestet.

Insbesondere die mittelpolaren Auszüge aus *S. scardica* sowie die lipophileren Extraktfraktionen und die Phenylethanoid-Glykoside wirkten *in vivo* der Aggregation bzw. Toxizität von β -Amyloid-Peptiden, Tau, α -Synuclein und Polyglutamin-Proteinen entgegen und verminderten die Degeneration dopaminerger Nervenzellen durch 6-Hydroxydopamin; antioxidative Eigenschaften zeigten sie im Wurmodell hingegen nicht. Das Wirkungsspektrum von *Sideritis scardica* glich am meisten dem von *Bacopa monnieri* (Brahmi), einer Heilpflanze aus der ayurvedischen Medizin.

Die Reduktion der Neurotoxizität der genannten Proteine und Verbindungen machen *S. scardica*-Extrakte interessant für die präventive oder therapeutische Behandlung von Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington und weiteren neurodegenerativen Krankheiten. Die in der Pflanze enthaltenen Phenylethanoide konnten als mindestens wirkungsmittelbestimmende Inhaltsstoffe identifiziert werden, wobei synergistische Effekte zwischen verschiedenen polaren Extraktivstoffen in den Auszügen weiterhin in Betracht gezogen werden müssen. Ein hypothetischer Wirkmechanismus konnte ebenfalls postuliert werden: eine Bindung der Polyphenole an die Peptide, was ihre Aggregation zu toxischen Oligomeren bzw. Ablagerungen direkt inhibiert.

Die Wirkung von hydroalkoholischen *Sideritis scardica*-Extrakten gegen Charakteristika der Alzheimer-Erkrankung konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zudem wurden erstmalig positive Effekte auf weitere neurotoxische Substanzen aufgezeigt, was das neuropharmakologische Profil des Griechischen Bergtees stark erweitert. Da bereits einige Studien an Vertebraten bzw. am Menschen durchgeführt worden sind, die, neben der Unbedenklichkeit von Zubereitungen aus *Sideritis scardica*, v. a. den positiven Einfluss auf die kognitive Leistungsfähigkeit beobachteten, wären nun große klinische Studien wünschenswert, die eine präventive oder therapeutische Wirksamkeit gegen Alzheimer etc. untersuchen.

Summary

Sideritis scardica Griseb., also known as Greek mountain tea, is a plant that belongs to the family of Lamiaceae. It is endemic to the Balkan region, where the herb is traditionally used against a broad range of afflictions, mostly as an infusion. Over the past few years, *S. scardica* has been scientifically investigated for the pharmacological properties it is said to have, especially focusing on the effects in the central nervous system, such as an improved cognitive performance and the reduction of β -amyloid plaques which are typical in Alzheimer's disease. Following this issue, the main goal of the present study was to examine whether extracts of Greek mountain tea counteract further pathomechanisms of this and other neurodegenerative disorders which are a rising health concern in our ageing society.

For this purpose six hydroalcoholic *S. scardica* extracts of different lipophilicity, that were produced and phytochemically analysed by Finzelberg GmbH & Co. KG, were investigated for their neuroprotective activity in the model organism *Caenorhabditis elegans*. Additionally, six fractions of one of the most potent extracts, seven isolated pure compounds and extracts of some well-known medicinal plants were tested.

The mid-polar extracts of *S. scardica* in particular, as well as the more lipophilic fractions and the phenylethanoid glycosides, were counteracting the aggregation or toxicity of β -amyloid peptides, α -synuclein, 6-hydroxydopamine, tau- and polyglutamine proteins *in vivo*, whereas they did not reveal any antioxidant properties in the nematodes. The spectrum of activities of *S. scardica* was especially comparable with that of *Bacopa monnieri* (Brahmi), a plant used in ayurvedic medicine.

The alleviation of the neurotoxicity of the proteins and compounds make *S. scardica* extracts interesting for the preventive or therapeutic treatment of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's and other neurodegenerative diseases. The phenylethanoids could be identified as active constituents, although synergistic effects between extractives of different polarity remain probable and have to be taken into consideration. Also, a hypothetical mode of action could be postulated: the bonding of polyphenols to the peptides, directly inhibiting their aggregation to toxic oligomers or plaques and fibrils.

In the present study, the activity of hydroalcoholic *Sideritis scardica* extracts against hallmarks of Alzheimer's disease could be affirmed and for the first time, positive effects on further neurotoxic substances could be shown, expanding the neuropharmacological profile of the Greek mountain tea. As some studies on vertebrates and humans assessing the influence on cognitive performance and proving the harmlessness have already been conducted, high-quality clinical studies investigating the preventive or therapeutic efficacy against Alzheimer's etc. should be performed.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's disease)
ACh	Acetylcholin
ACN	Acetonitril
Adsorb EtOH	Ethanolfraktion aus Auftrennung von EtOH40 über Adsorbersäule
Adsorb H ₂ O	Wasserfraktion aus Auftrennung von EtOH40 über Adsorbersäule
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AZM	Auszugsmittel
BBB	Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier)
BV	Bioverfügbarkeit
CCS	Caffeoylchinasäure(n)
DA	Dopamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DDR	Discoidin domain-Rezeptor
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration (half maximal effective concentration)
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
EtOH20...	Auszug aus <i>S. scardica</i> mit 20 % Ethanol (V/V) usw.
Fl-Fl BuOH	Butanolfraktion aus Flüssig-Flüssig-Extraktion von EtOH40
Fl-Fl H ₂ O	Wasserfraktion aus Flüssig-Flüssig-Extraktion von EtOH40
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat
H ₂ O	Wässriger Auszug aus <i>S. scardica</i>
HD	Huntington-Krankheit (Huntington's disease)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)

HSP	Hitzeschockprotein
KFT	Karl-Fischer-Titration
M	Maltodextrin
M+S	Maltodextrin und Siliciumdioxid
MAO	Monoaminoxidase
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MCI	Mild Cognitive Impairment
MeOH	Methanol-Auszug aus <i>S. scardica</i>
MPP+	1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-Ion
NA	Noradrenalin
NGM	Wachstumsmedium für Nematoden (nematode growth medium)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PD	Parkinson-Krankheit (Parkinson's disease)
PolyQ	Polyglutamin-Protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
sAPP α	Sezerniertes Amyloid-Precursor-Protein-Fragment Alpha
Sre	Säure
TS	Trockensubstanzgehalt
Umlös Lös	Lösliche Fraktion aus Umlösung von EtOH40 in 70 % Ethanol (V/V)
Umlös Satz	Bodensatz-Fraktion aus Umlösung von EtOH40 in 70 % Ethanol (V/V)
WM	Wirkmechanismus
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Wir leben in einer Gesellschaft, in der immer mehr Menschen ein hohes Alter erreichen. 2015 waren ca. 6,5 % der Weltbevölkerung 65 Jahre oder älter. Neueste Hochrechnungen ergaben, dass sich dieser Anteil bis 2050 wahrscheinlich mehr als verdoppelt; auf 17 % (He *et al.*, 2016). Da das Risiko für die meisten neurodegenerativen Erkrankungen mit dem Alter steigt, stellen sie ein Gesundheitsproblem von immer größerer Bedeutung dar.

Eingeteilt werden neurodegenerative Erkrankungen z. B. nach betroffenen Strukturen (Motoneuronenerkrankung wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), neuroaxonale Dystrophien, vaskuläre oder frontotemporale Demenz) oder nach der Art der beteiligten neurotoxischen Proteine (Tauopathien wie Alzheimer und Morbus Pick, Synucleinopathien wie Parkinson, Trinukleotiderkrankungen wie Huntington, Prionenerkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob). Gemeinsam haben alle den progressiven Abbau oder Funktionsverlust von Nervenzellen. Betrifft dies Neuronen im Gehirn, entwickeln viele Patienten eine Demenz als neurologisches Syndrom; haben also neben anderen Symptomen v. a. eingeschränkte kognitive Fähigkeiten. Nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation werden Demenzen in Alzheimer-, vaskuläre und Demenz bei anderenorts klassifizierten Krankheitsbildern wie Lewy-Körperchen-, frontotemporale und Parkinson-Demenz unterteilt. Die Reihenfolge der genannten Demenzformen spiegelt auch ihre Prävalenzen wider (Alzheimer am häufigsten) (WHO, 2013). Die aktuelle Klassifikation des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-5 spricht mittlerweile nicht mehr von „Demenz“, sondern von „neurocognitive disorders“ (Maier und Barnikol, 2014).

1.1.1 Alzheimer-Erkrankung

Morbus Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) wurde zum ersten Mal vom deutschen Arzt Alois Alzheimer beschrieben. Seine Patientin, Auguste Deter, litt an Gedächtnisverlust, Verwirrung und Angstzuständen (Alzheimer, 1907). Nach ihrem Tod mit 56 Jahren fand Alzheimer in einer Autopsie eine fortgeschrittene Atrophie der Gehirnmasse, fibrilläre Einschlüsse und extrazelluläre Ablagerungen vor. Heute sind diese als Neurofibrillenbündel (aggregiertes, hyperphosphoryliertes Tau) und senile Plaques (aggregiertes β -Amyloid) bekannt (Abbildung 1.1) und AD stellt sowohl die am häufigsten auftretende Form von neurodegenerativen Erkrankungen, als auch die der Demenz dar. Laut dem World Alzheimer Report litten 2015 weltweit über 47 Mio. Menschen an der Krankheit und diese Zahl könnte sich aller 20 Jahre verdoppeln (Prince *et al.*, 2015). Auch die Prävalenz des sogenannten Mild Cognitive Impairment (MCI), was als Vorstufe von Demenzerkrankungen und AD angesehen wird, steigt. Diese ist charakterisiert durch verringerte kognitive Fähigkeiten, die aber das Alltagsleben noch nicht beeinflussen (Gauthier *et al.*, 2006).

Im Verlauf der Alzheimer-Krankheit sterben immer mehr Nervenzellen in bestimmten Hirnarealen, v. a. dem cerebralen Cortex, ab. Dadurch entstehen Lücken im Temporallappen und Hippocampus, welche für das Speichern und Abrufen neuer Informationen verantwortlich

sind. Symptome von AD schließen den Verlust des (Kurzzeit-)Gedächtnisses, Orientierungsschwierigkeiten, Sprachprobleme, ein gestörtes emotionales Empfinden und Verhalten, eine verringerte Entscheidungswilligkeit und Depressionen mit ein (Cummins, 2000; Lyketsos *et al.*, 2011; Peña-Casanova *et al.*, 2012). Auf der molekularen Ebene erfahren die β -Amyloid-Peptide und Tau-Proteine bzw. deren Ablagerungen als Ursache der Neurodegeneration oder zumindest wichtigem Bestandteil der Pathogenese von AD die größte wissenschaftliche Aufmerksamkeit, weswegen sie in den nächsten beiden Kapiteln ausführlicher behandelt werden.

Normal vs. Alzheimer's Diseased Brain

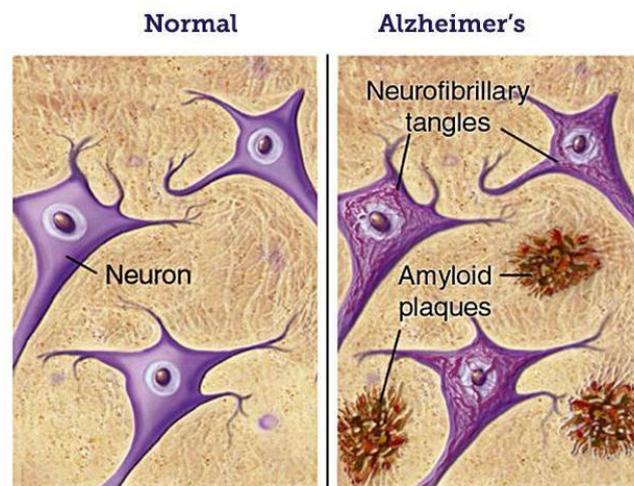


Abbildung 1.1: Illustrierter Vergleich zwischen einem gesunden und einem von Alzheimer betroffenen Gehirn. Im rechten Bild sind die für AD typischen, extrazellulären β -Amyloid-Plaques und die intrazellulären Neurofibrillenbündel aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein zu sehen. Quelle: BrightFocus Foundation.

1.1.1.1 β -Amyloid

Nachdem 1992 die „Amyloid-Hypothese“ vorgestellt wurde, die die extrazellulären Plaques als Hauptursache für das Entstehen der Alzheimer-Krankheit deklarierte, wurde dieser Thematik mit Abstand die größte Beachtung in der medizinischen Forschung geschenkt (Hardy und Higgins, 1992). Bis heute wurde viel an dieser Hypothese verifiziert, falsifiziert und modifiziert. Im Wesentlichen spielen die β -Amyloid-Peptide immer noch die zentrale Rolle, nur rückten die kleineren Oligomere in den Fokus und alles wird im Gesamtkontext mit den anderen pathophysiologischen Effekten betrachtet (Selkoe und Hardy, 2016).

β -Amyloid ($A\beta$) ist ein Peptid aus 37-43 Aminosäuren (häufigste Form $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$), welches ein Spaltprodukt aus einem Transmembranprotein namens Amyloid-Precursor-Protein (APP) darstellt. Dieses besteht aus 695 bis 770 Aminosäuren und wird besonderes in Nervenzellen exprimiert (Beyreuther *et al.*, 1993; Koo und Squazzo, 1994). Die genaue Funktion von APP bzw. $A\beta$ ist noch nicht vollständig verstanden. Eine gewisse Menge des $A\beta$ -Peptids scheint jedoch für eine reibungslose Informationsübertragung notwendig zu sein (Abramov *et al.*, 2009). Da $A\beta$ antimikrobielle Eigenschaften aufweist, wird ihm auch

eine Beteiligung an der zentralen Immunabwehr nachgesagt (Kagan *et al.*, 2011; Soscia *et al.*, 2010). APP wirkt an der Bildung von Synapsen bzw. neuronaler Plastizität mit, wobei hier auch andere Spaltprodukte als A β , wie das sAPP α -Fragment beteiligt sind (Kögel *et al.*, 2012; Priller *et al.*, 2006). APP kann nämlich von verschiedenen Sekretasen, proteolytischen Enzymen, in verschiedene Produkte gespalten werden (Abbildung 1.2). Dabei kann über den nicht-amyloidogenen Weg durch die α -Sekretase, deren Spaltstelle zwischen Lys-16 und Leu-17 und damit in der A β -Sequenz liegt (Esch *et al.*, 1990), lösliches sAPP α entstehen, welches neurotrophe und –protektive Eigenschaften besitzt (Bell *et al.*, 2008; Meziane *et al.*, 1998; Ring *et al.*, 2007). Gut erforscht ist die α -Sekretase-Aktivität von Metalloproteinasen der ADAM-Familie, v. a. ADAM10 (Lichtenthaler, 2011). Eine andere mögliche Art der APP-Prozessierung ist die Spaltung über β - und γ -Sekretasen, was dem amyloidogenen Weg entspricht, also in der Produktion von A β resultiert. Weitere Produkte sind hierbei das sAPP β -Fragment sowie AICD (APP intracellular C-terminal domain). Die β -Sekretase ist auch unter dem Namen BACE1 bekannt (β -site of APP cleaving enzyme) (Zhang *et al.*, 2011). Die γ -Sekretase ist ein Komplex aus verschiedenen Proteinen, dazu gehört auch Präsenilin (PSEN) (Kimberly *et al.*, 2003). Dies ist in den 2 Genen *PSEN1* und *PSEN2* codiert, welche vielfältige pathogene Mutationen aufweisen können, die zu einer veränderten APP-Prozessierung und einer Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum amyloidogenen Weg führen können (Cruts *et al.*, 2012; Haass *et al.*, 1994). Damit stellen *PSEN1* und *PSEN2* Risikogene für die Ausbildung einer familiären Alzheimer-Erkrankung dar. Mutationen innerhalb des APP-Gens bzw. in der A β -Sequenz selbst können auch zu einer erhöhten A β -Produktion führen (viele davon wurden in der Nähe der Spaltungsstellen der β - und γ -Sekretase gefunden) und auch die Kinetik der Peptidaggregation beeinflussen (Agostinho *et al.*, 2015; Citron *et al.*, 1992; de Jonghe *et al.*, 2001; Mullan *et al.*, 1992).

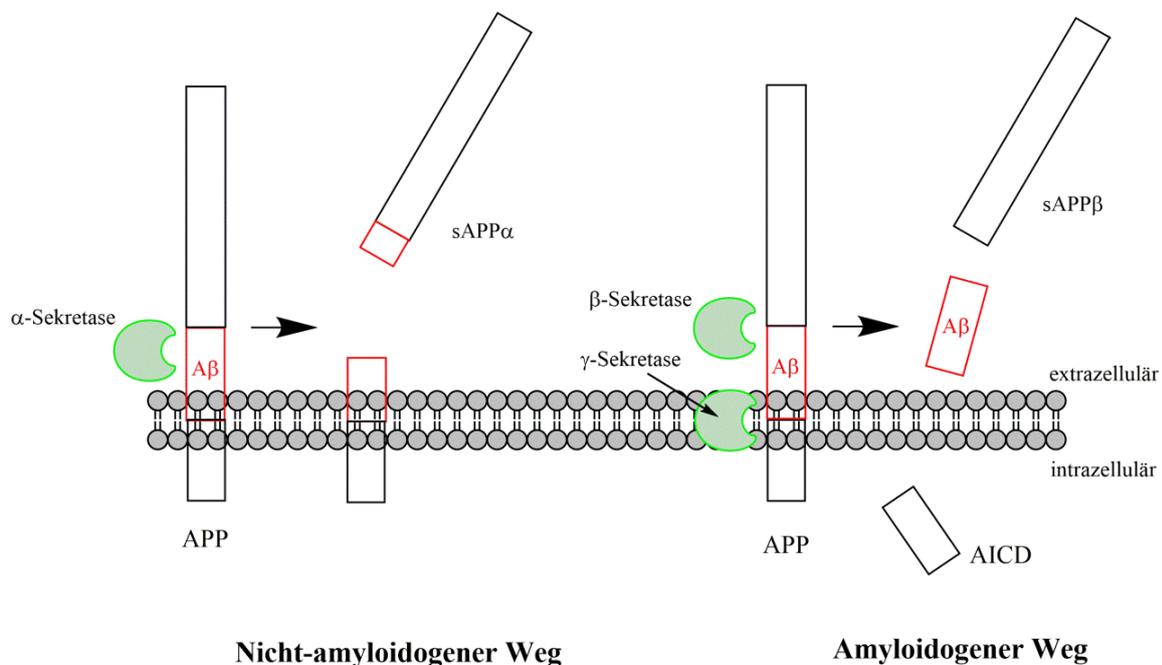


Abbildung 1.2: Die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Abhängig von den beteiligten Sekretasen kann entweder das neuroprotektive sAPP α -Fragment (links) oder das β -Amyloid-(A β)-Monomer u. a. (rechts) entstehen, welches sich mit anderen Monomeren zusammenlagern und die senilen Plaques bilden kann. AICD: APP intracellular C-terminal domain

Die gebildeten A β -Monomere liegen zunächst nicht gefaltet und in Lösung vor. Abhängig von ihrer Konzentration, dem pH-Wert, dem Vorhandensein diverser Metallionen und weiteren physikochemischen Einflüssen, können die Monomere zu Oligomeren, Polymeren und final zu senilen Plaques aggregieren. (Burdick *et al.*, 1992). Dabei haben A β ₁₋₄₂, welches in einer β -Faltblatt-Struktur vorliegt und v. a. fehlgefaltetes A β eine viel größere Tendenz, Aggregate zu bilden (Barrow *et al.*, 1992; Knowles *et al.*, 2014; Stefani und Dobson, 2003). Nach der Formulierung der Amyloid-Hypothese standen zuerst die senilen Plaques allein im Verdacht, die Neurodegeneration und damit die Alzheimer-Demenz auszulösen. Da aber die Menge an Ablagerungen und die kognitiven Leistungen oft nicht direkt korrelieren (Hardy und Selkoe, 2002; Snowdon, 2003), wurden die kleineren A β -Spezies genauer erforscht. Man ist sich heute weitgehend einig, dass die Oligomere die größte Neurotoxizität aufweisen (Cleary *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 1998; Lesne *et al.*, 2008). Wie genau sie die Nervenzellen schädigen, ist jedoch nicht so klar. Die Hypothesen reichen von einer unspezifischen Wirkung auf Zellmembranen, z. B. durch Induktion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Kapitel 1.1.4.1), der Erhöhung der Membranpermeabilität durch Lipidperoxidation oder Bildung von Poren und dem damit einhergehenden Einstrom von Calcium-Ionen (Kadowaki *et al.*, 2005b; Kaye *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2001) bis hin zu noch nicht genauer definierten Rezeptoren, an die die löslichen Oligomere binden und so die Struktur bzw. Plastizität der Synapsen und die neuronale Kommunikation stören können oder exzitotoxisch wirken (Dinamarca *et al.*, 2012; Lacor *et al.*, 2007; Um *et al.*, 2012).

1.1.1.2 Tau

Die intraneuronalen Ablagerungen, die damals schon Alois Alzheimer vorfand, sind die neurofibrillären Bündel aus aggregiertem Tau-Protein. In den Zellen bindet Tau an die Mikrotubuli des Zytoskeletts, reguliert dessen Zusammenbau aus Tubulin und stabilisiert die Struktur, weswegen es zu den MAPs gezählt wird (Mikrotubulus-assoziierte Proteine) (Fellous *et al.*, 1977; Panda *et al.*, 1995). In Nervenzellen haben die Mikrotubuli neben der klassischen Funktion der Formgebung und Zellbewegung auch Einfluss auf die Ausbildung von Axonen und den Transport von Vesikeln. Dort, in den Axonen, ist die Konzentration an Tau-Protein auch am höchsten, da die Stabilität und Transportfunktionen des Axons durch Mikrotubuli sichergestellt sein müssen (Binder *et al.*, 1985; Trojanowski *et al.*, 1989). Je nach Isoform, welche durch alternatives Splicing entstehen, besteht das Tau-Protein aus 352 bis 757 Aminosäuren. 6 Isoformen lassen sich im ZNS nachweisen, eine siebte im peripheren Nervensystem (Couchie *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1989). Im Gegensatz zum APP bzw. A β sind Mutationen im Tau-Gen nicht mit der Ausbildung einer familiären Alzheimer-Demenz verknüpft, wohl aber mit einer frontotemporalen Demenz (Ghetti *et al.*, 2015). Das Risiko für AD steigt hingegen mit posttranslationalen Modifikationen des Proteins, allem voran die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen, welche zu veränderter Bindungsaffinität an die Mikrotubuli und Aggregation führen kann (Bramblett *et al.*, 1993; Fontaine *et al.*, 2015; Lovestone und Reynolds, 1997; Wang *et al.*, 2007). Auch in gesunden Menschen liegen die Tau-Proteine zu einem gewissen Grad phosphoryliert vor, jedoch sind sie bei Alzheimer hyperphosphoryliert. In diesem Zustand bindet Tau kaum noch an die Mikrotubuli, was zu Dysfunktionen des Zytoskeletts und des axonalen Transportes führt und es aggregiert vermehrt zu Fibrillen, die sich in den Neuronen ablagern (Alonso *et al.*, 1996; Bancher *et al.*,

1989; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Dabei spielt die Isoform des Tau-Proteins keine Rolle (Greenberg *et al.*, 1992). Ebenso wie bei A β wurde und wird diskutiert, ob die Oligomere des Proteins nicht eine größere Toxizität auf die Nervenzellen ausüben, da sie mit Gedächtnisverlust und verringerter synaptischer Plastizität assoziiert sind (Ding und Johnson, 2008; Lasagna-Reeves *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2006; Sydow *et al.*, 2011). Eine weitere Parallele zu A β zeigt sich darin, dass der Mechanismus, wie die Toxizität ausgeübt wird, nicht vollständig geklärt ist. Neben oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion und Neuroinflammation, in denen auch A β involviert ist (Kapitel 1.1.4), werden als spezifischere Pathomechanismen eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität, die Hemmung des Kinesin-abhängigen axonalen Transportes und Wiedereintritt in den Zellzyklus, welcher zur Apoptose der Neuronen führt, genannt (Ittner *et al.*, 2010; Kanaan *et al.*, 2011; Seward *et al.*, 2013). Weitere schädigende Wirkungen von Tau scheinen sich mit denen von A β zu ergänzen, wobei der gehemmte axonale Transport und das instabile neuronale Zytoskelett weitere Fehlfunktionen nach sich ziehen (Yu *et al.*, 2011; Zempel und Mandelkow, 2012; Zempel *et al.*, 2010). Allgemein scheinen A β und Tau auf das Komplexeste miteinander verbunden zu sein. Zum Beispiel kann A β Kinasen wie die Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) und FYN aktivieren, welche Tau phosphorylieren und die Neurodegeneration beschleunigen können (Busciglio *et al.*, 1995; Larson *et al.*, 2012; Terwel *et al.*, 2008). Aber das Tau-Protein kann auch die A β -Toxizität potenzieren (Bright *et al.*, 2015; Roberson *et al.*, 2007). Die Trennung von A β - und Tau-Pathophysiologie und dass nur eine davon die wahre Ursache von AD sein kann, wie vor einigen Jahren mit fast schon religiösem Eifer von den „Baptisten“ und „Taoisten“ disputiert, ist hinfällig. Obwohl Aggregate von A β und Tau auch unabhängig voneinander vorkommen können, werden sie heutzutage als unzertrennliche Partner und wichtigste Merkmale in der Entstehung und Progression der Alzheimer-Erkrankung gesehen (Ittner und Götz, 2011).

1.1.1.3 Weitere Ursachen, Risikofaktoren und Behandlung

AD ist eine multikausale und sehr heterogene Erkrankung und kann deswegen nicht auf eine einzelne Mutation, einzelne Risikofaktoren oder ausschließlich auf A β und/oder Tau zurückgeführt werden. Unter 1 % der Fälle scheint erblich bedingt (familiäre AD) zu sein, der Großteil tritt sporadisch auf (Iqbal und Grundke-Iqbal, 2010). Ein hohes Alter wird heutzutage als der größte Risikofaktor für AD gesehen, da nur ca. 4 % der Fälle vor dem 65. Lebensjahr auftreten; zum Teil können die Patienten dann aber nur 30 Jahre alt sein. V. a. in diesen „early-onset“-Fällen spielen die erblichen Faktoren eine Rolle, im Gegensatz zu den weit häufigerem „late-onset“-AD (Alzheimer's Association, 2015). Die meisten genetischen Risikofaktoren beziehen sich hierbei auf die Prozessierung des APPs (Kapitel 1.1.1.1). Ein weiteres Risikogen ist jenes, dass für Apolipoprotein E Typ 4 (ApoE ϵ 4) codiert. Apolipoproteine sind Komplexe aus Proteinen und Lipiden. Im Blut transportieren sie hydrophobe Stoffe wie Cholesterol, Triglyceride oder Phospholipide, auch im Gehirn. Das ϵ 4-Allel ist mit einem höheren Risiko für AD assoziiert (Corder *et al.*, 1993). Obwohl ApoE auch direkt mit A β interagieren und so dessen Aggregation beeinflussen kann, ist der kausale Zusammenhang zu AD, insbesondere die Rolle der Lipide, noch nicht vollständig verstanden (Garai *et al.*, 2014). Die Komplexität der Thematik der Apolipoproteine zeigt sich auch daran,

dass z. B. für ApoE $\epsilon 2$ ein protektiver Effekt auf AD gefunden wurde (Corder *et al.*, 1994). Bei den nicht-vererbaren Risikofaktoren finden sich viele, die auch kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen, darunter hoher Blutdruck, Übergewicht bzw. zu wenig Bewegung, hohe Cholesterin-Werte, Diabetes und Rauchen (Hoyer, 1998; Rusanen *et al.*, 2010; Tzivgoulis *et al.*, 2009; Yaffe, 2007). Allgemein rücken die Ernährung (z. B. mediterrane Diät) und das soziale Umfeld sowie mental fordernde Aktivitäten als prophylaktische und verlangsamende Faktoren immer mehr in den Fokus (James *et al.*, 2011; Mayeux und Stern, 2012; Shah, 2013). Metabolische Störungen und AD könnten über eine Insulinresistenz verknüpft sein, da Insulin auch an der synaptischen Plastizität des ZNS beteiligt ist (Hoyer, 1988; Ma *et al.*, 2015; Pugazhenti *et al.*, 2017). So konnte bereits gezeigt werden, dass ein vermindertes Ansprechen auf Insulin bzw. den Insulin-like growth factor (IGF-1) die Detoxifizierung von β -Amyloid-Oligomeren erschwert (Zhao *et al.*, 2009). Eine weitere Hypothese zur Ursache der Alzheimer-Demenz beruht auf der defizitären cholinergen Neurotransmission im Hippocampus und cerebralen Cortex aufgrund einer verringerten Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh), was zu einem Verlust cholinergischer Neuronen im *Nucleus basalis* führt. Da diese eine wichtige Funktion in der kognitiven Leistungsfähigkeit spielen, werden die Gedächtnisprobleme darauf zurückgeführt (Bartus *et al.*, 1982). In späten Stadien der AD kann sich die Menge an ACh um bis zu 85 % verringern (Perry *et al.*, 1978). Eine andere Hypothese betrachtet die Rolle der Glykogensynthase-Kinase-3. Eine Überaktivität dieses Enzyms bedingt die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen, eine erhöhte A β -Produktion, Entzündungsprozesse im Gehirn und Gedächtnisverlust (Hooper *et al.*, 2008). Da Amyloid-Peptide diese Kinase *in vivo* aktivieren und somit über die Phosphorylierungsreaktionen eine Tauopathie provozieren können, wird die Glykogensynthase-Kinase-3 oft als wichtiges Verbindungsglied zwischen A β und Tau gesehen (Terwel *et al.*, 2008). Weitere potentielle Ursachen bzw. Prozesse, die in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung mitwirken, aber nicht spezifisch für diese neurodegenerative Erkrankung sind, wie etwa Neuroinflammation, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, fehlerhafte Autophagie und weitere Veränderungen, werden im Kapitel 1.1.4 beschrieben.

Die Heilung der Alzheimer-Erkrankung ist zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, was sich aufgrund der Komplexität der beteiligten Mechanismen wahrscheinlich auch nicht in den nächsten Jahren ändern wird. Alle zurzeit zur Verfügung stehenden Medikamente zur Behandlung von AD zielen darauf ab, die Progression zu verlangsamen oder bestimmte Symptome zu bekämpfen. Die Gruppe der Acetylcholinesterase-Hemmer umfasst z. B. Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) und Galanthamin (Reminyl®) (Rote Liste, 2017) und soll über einen verminderten Abbau des ACh eine Erhöhung dessen Konzentration im synaptischen Spalt bei leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Demenz bewirken. Bei moderater bis schwerer Alzheimer-Demenz ist Memantin verfügbar, ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, welcher der exzitatorischen Wirkung von Glutamat entgegenwirken soll, die toxisch für die Gehirnzellen sein kann (Matsunaga *et al.*, 2015). Weiterhin gibt es verschiedene Nootropika (*Ginkgo biloba*-Extrakte, Piracetam), die über meist mehrere verschiedene Wirkmechanismen die nachlassenden kognitiven Leistungen unterstützen sollen (Rote Liste, 2017). Einige Substanzen, die in Produktion, Aggregation und Abtransport von A β eingreifen sollen, befinden sich noch in klinischen Studien. Targets sind hier u. a. die β - und γ -Sekretase (Mikulca *et al.*, 2014; Vassar *et al.*, 2014). Da zum Teil aber

schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten oder die Primär- und Sekundärziele der Studien nicht erreicht wurden, hat es bis heute kein Inhibitor der beiden Enzyme auf den Markt geschafft. Auch einige Anti-A β -Antikörper, wie Solanezumab, sind in der klinischen Phase 3 gescheitert. 2016 startete die 3. Phase für Aducanumab und Crenezumab; die Ergebnisse werden in ein paar Jahren erwartet (Sevigny *et al.*, 2016).

1.1.2 Parkinson-Erkrankung

Die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung ist *Morbus Parkinson* (Parkinson's disease, PD). Die Krankheit wurde vom englischen Arzt James Parkinson 1817 zum ersten Mal beschrieben; er hielt das typische Schütteln und Zittern der Patienten (Tremor) für eine Störung im Rückenmark. Erst ungefähr 150 Jahre später wurde die Erkrankung auf einen Dopaminmangel im Gehirn zurückgeführt (Carlsson, 1964; Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Hornykiewicz, 1962; Parkinson, 1817). Heute weiß man, dass dieser Mangel durch die Zerstörung dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra (pars compacta)* entsteht (Burns *et al.*, 1983). Dies bedingt einerseits die Bewegungsarmut (Bradykinesie, Hypokinesie) der Patienten, welche auch im „Maskengesicht“ deutlich wird, als auch das generelle Ungleichgewicht der Neurotransmitter in den Basalganglien. Die Plussymptomatik, nämlich der Tremor, Rigor (Muskelsteifigkeit durch erhöhten Tonus) und die Sprachstörungen, ist auf die exzitatorische Auswirkung eines relativen Acetylcholin- und Glutamat-Überschusses zurückzuführen (Albin *et al.*, 1989; Calabresi *et al.*, 2006; Miller und DeLong, 1987). Die kausalen Erklärungen für vegetative Störungen wie erhöhter Speichel- und Tränenfluss, verstärkte Talgproduktion (Salbengesicht) sowie psychische Störungen wie Depressionen, Schlafstörungen und Demenz sind recht diffus und bis heute nicht vollständig. Die medikamentösen Behandlungsmethoden zielen im Wesentlichen auf die Förderung der dopaminergen Transmission oder auf die Hemmung der cholinergen bzw. glutamatergen Wirkung ab. Mit der Gabe von L-Dopa (Levodopa), einer Vorstufe des Dopamins (DA), welches die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, wird versucht in Kombination mit den Decarboxylasehemmern Carbidopa und Benserazid (verhindern peripheren Abbau) eine Erhöhung der DA-Konzentration im ZNS zu erreichen. Auch Inhibitoren der Monoaminoxidase-B (MAO-B) wie Selegilin und Rasagilin und der Catechin-O-Methyltransferase (COMT) wie Entacapon und Tolcapon sollen den DA- bzw. L-Dopa-Abbau verhindern. Auch Dopaminagonisten, z. B. Bromocriptin, Pramipexol oder Apomorphin kommen zum Einsatz. Anticholinergika (Biperiden) und NMDA-Antagonisten (Amantadin) werden seltener verwendet (Rote Liste, 2017; Mutschler *et al.*, 2008).

1.1.2.1 α -Synuclein

Keine der verfügbaren Behandlungsmethoden zielt jedoch auf das Protein α -Synuclein ab, welches in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde. Neben oxidativem Stress, entzündlichen Vorgängen und mitochondrialer Dysfunktion (Kapitel 1.1.4), wird ihm eine besondere Rolle beim Untergang der dopaminergen Nervenzellen zugeschrieben. α -Synuclein ist ein 140 Aminosäuren großes Protein (2 kleinere Isoformen sind ebenfalls bekannt), welches physiologisch im menschlichen Gehirn, v. a. in den Synapsen und in geringeren

Mengen auch in Muskeln und anderen Gewebearten vorkommt. Codiert wird das Protein im *SNCA*-Gen (Nuytemans *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2010). Die physiologische Funktion von α -Synuclein ist noch nicht exakt verstanden; es wird jedoch vermutet, dass es für die reibungslose Funktion von synaptischen Vesikeln, die die Neurotransmitter zur präsynaptischen Membran transportieren, wichtig ist. Auch eine Regulation der Dopaminproduktion und -ausschüttung sowie eine ähnliche Aktivität wie Tau als Mikrotubulus-assoziiertes Protein sind denkbar (Alim *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2011; Diao *et al.*, 2013; Norris *et al.*, 2004). Für kognitive Prozesse scheint es jedoch unverzichtbar zu sein, denn Knockout-Mäuse zeigten deutliche Einschränkungen im räumlichen Denken und ein verschlechtertes Arbeitsgedächtnis (Kokhan *et al.*, 2012). Relativ gut erforscht ist allerdings die Interaktion mit Lipiden wie Fettsäuren und Phospholipiden, was auch für den Einfluss von α -Synuclein auf die Vesikel spricht (Ruiperez *et al.*, 2010; Shvadchak *et al.*, 2011). Eine erhöhte Menge an freiem und aggregiertem α -Synuclein ist jedoch assoziiert mit der Ausbildung von PD, der Lewy-Körperchen-Demenz und der Multisystematrophie. Es betrifft sowohl die sporadische, als auch die familiäre Form der PD. So können Mutationen, bei denen der Locus für das Protein als Duplikat oder Triplikat vorliegt, die Progression der Krankheit beschleunigen (Baba *et al.*, 1998; Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Singleton *et al.*, 2003). Aus den löslichen Monomeren können sich, v. a. bei erhöhten Konzentrationen, unlösliche Aggregate bilden, die sich in Form sogenannter Lewy-Körperchen (Abbildung 1.3) intraneuronal ablagern (Baba *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1997). Die neurodegenerativen Eigenschaften dieser Proteinablagerungen können die Ausbildung einer Demenz bewirken, z. B. der nach ihnen benannten Lewy-Körperchen-Demenz, der Parkinson-Demenz und auch in der Alzheimer-Demenz kann α -Synuclein beteiligt sein (Hurtig *et al.*, 2000; Yokota *et al.*, 2002). Wie schon bei A β und Tau wird auch bei α -Synuclein diskutiert, ob nicht die kleineren Oligomere im Vergleich zu den größeren, sichtbaren Aggregaten die stärkere Neurotoxizität aufweisen (Pountney *et al.*, 2005; Winner *et al.*, 2011). Darüber, wie es die toxische Wirkung vermittelt, ist jedoch sehr wenig bekannt. Wie so oft, werden inflammatorische oder oxidativen Stress-induzierende Eigenschaften in Betracht gezogen. In Bezug zu seiner physiologischen Funktion sind allerdings auch eine direkte Interaktion mit Zellmembranen bzw. deren Schädigung oder eine gestörte synaptische Funktion möglich (Cookson und van der Brug, 2008; Maguire-Zeiss, 2008; Xu *et al.*, 2002).

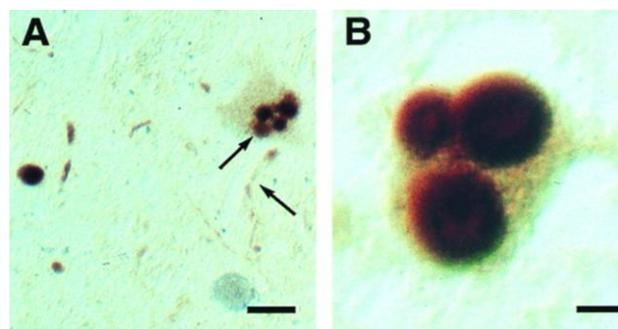


Abbildung 1.3: Ablagerungen von α -Synuclein in Form von Lewy-Körperchen. In Nervenzellen der *Substantia nigra* können diese durch Immunfärbung (α -Synuclein-Antikörper) sichtbar gemacht werden. Die Größe der Maßstabsbalken beträgt 30 μ M (A) bzw. 10 μ M (B). Der obere Pfeil zeigt auf die Lewy-Körperchen; der untere auf Lewy-Neuriten, eine weitere Form, die die Aggregate annehmen können. Quelle: Spillantini *et al.* (1998)

1.1.2.2 6-OHDA

6-Hydroxydopamin (Oxidopamin, 6-OHDA) ist ein Neurotoxin, welches selektiv dopaminerge und noradrenerge Neuronen zerstört. Chemisch gesehen unterscheidet es vom Dopamin (DA) nur eine zusätzliche Hydroxylgruppe am 6. C-Atom (Abbildung 1.4). Neben MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), einem Prodrug des Neurotoxins MPP+, ist es eine der am häufigsten genutzten Substanzen um in verschiedenen Tiermodellen, darunter Primaten, Parkinsonismus auszulösen (Schober, 2004). In der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung selbst scheint 6-OHDA ebenfalls eine Rolle zu spielen. Angestoßen wurde diese Hypothese durch den Nachweis des Dopamin-Derivates im Urin von PD-Patienten (Jellinger *et al.*, 1995). Da die Menge an 6-OHDA bei der Patientengruppe, die mit L-Dopa behandelt wurde, sogar noch größer war als in der Patientengruppe ohne Behandlung, ist der Beitrag von 6-OHDA zum Untergang der dopaminergen Neuronen bei PD-Patienten unter L-Dopa-Therapie von besonderer Bedeutung (Andrew *et al.*, 1993; Borah und Mohanakumar, 2012). Es wird angenommen, dass 6-OHDA über die Dopamin- bzw. Noradrenalin-Transporter in die Nervenzellen gelangt, über die auch DA und NA aus dem synaptischen Spalt wiederaufgenommen werden. Über welche Mechanismen es genau seine neurodegenerativen Eigenschaften ausübt, ist noch nicht ausreichend geklärt; eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies wird jedoch schon lange diskutiert (Blum *et al.*, 2001; Glinka *et al.*, 1997; Kostrzewa und Jacobowitz, 1974; Latchoumycandane *et al.*, 2011).

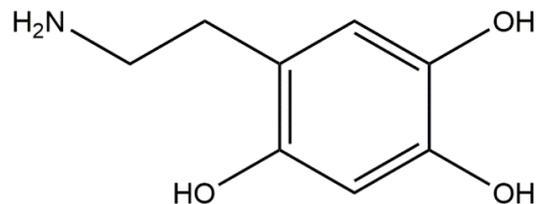


Abbildung 1.4: Strukturformel von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

1.1.3 Huntington-Erkrankung

Chorea Huntington (Huntington's disease, HD), immer noch bekannt unter dem Namen Veitstanz, welcher sich auf die Bewegungsstörungen im fortgeschrittenen Stadium bezieht, ist der wohl wichtigste Vertreter der sog. Trinukleotid- bzw. Polyglutamin (PolyQ)-Erkrankungen. Weitere Beispiele dafür sind die verschiedenen Typen der Spinozerebellären Ataxie. HD ist eine neurodegenerative Erbkrankheit und wurde 1872 zum ersten Mal vom amerikanischen Arzt George Huntington beschrieben (Huntington, 1872). Chorea Huntington wird autosomal-dominant vererbt, wobei 5 bis 10 % der Patienten eine Neumutation aufweisen (Dayalu und Albin, 2015). Die Prävalenz ist von Land zu Land sehr unterschiedlich; für Europa wurde sie 2012 mit 5,7 : 100.00 Menschen angegeben (Pringsheim *et al.*, 2012). Die ersten Symptome zeigen die Betroffenen meist ab dem 30. Lebensjahr. Dazu gehören affektive und kognitive Störungen, dadurch ausgelöste Depressionen und Hyperkinesien. Das sind für die Krankheit typische ungewollte

Bewegungen und eine unkontrollierbare Mimik (Grimassieren). Im späteren Verlauf kann es zur Entwicklung einer Hypokinesie und Demenz kommen (Walker, 2007; Zakzanis, 1998). Die Bewegungsstörungen sind auf die Degeneration von GABAergen und enkephalineren Neuronen in Teilen des *Corpus striatum* zurückzuführen, was schlussendlich zu einer geringeren Inhibition und damit zur Übererregung des Thalamus und des Cortex führt (DeLong, 2000). Eine wirksame Therapie für HD gibt es nicht. Es gibt Ansätze (Riluzol, Gabapentin), die die exzitotoxische Wirkung des Glutamats, z. B. durch verringerte Ausschüttung, vermindern sollen. Ansonsten wird nur symptomatisch behandelt, z. B. mit Dopaminantagonisten gegen die Hyperkinesien oder Neuroleptika bei psychischen Störungen. Des Weiteren rückt, ähnlich wie bei Parkinson, die tiefe Hirnstimulation ins Scheinwerferlicht (Cosentino *et al.*, 1996; Rosas *et al.*, 1999; Wojtecki *et al.*, 2016).

Die Pathogenese von Chorea Huntington basiert im Wesentlichen auf einem mutierten Protein namens Huntingtin. Das Gen für dieses über 3000 Aminosäuren große Protein weist normalerweise 16 bis 20 Wiederholungen des Basentriplets CAG, welches für Glutamin (Q) codiert, auf. Bei HD-Patienten findet man hingegen 36 bis 250 Wiederholungen (repeats), was zu einer großen Zahl an Glutaminresten im Protein führt (PolyQ-Protein) (Clabough, 2013; Nance *et al.*, 1999). Dabei steht die Anzahl der Q-Einheiten in direktem Zusammenhang mit der Progressionsgeschwindigkeit der Krankheit (Penney *et al.*, 1997). Huntingtin wird in allen kernhaltigen Zellen exprimiert; die höchste Konzentration wurde im Gehirn und in den Hoden gefunden. Die physiologische Funktion ist nur unbefriedigend geklärt. Eine Beteiligung am Transport von Vesikeln und Organellen (z. B. Mitochondrien), an der für das Langzeitgedächtnis wichtigen synaptischen Plastizität, am Schutz vor Apoptose und an der Hochregulation des BDNFs (brain derived neurotrophic factor) wurde beschrieben (Choi *et al.*, 2014; DiFiglia *et al.*, 1995; Hoffner *et al.*, 2002; Zuccato *et al.*, 2001). Jedenfalls scheint Huntingtin essentiell für die normale (embryonale) Entwicklung zu sein, da seine Abwesenheit in Mäusen zum Tod führte (Nasir *et al.*, 1995). Die Huntingtin-Proteine bzw. enzymatisch gebildete Fragmente davon können aggregieren und sich als Inklusionen in den Nervenzellen ablagern. Die größeren Glutamin-Abschnitte führen dabei dazu, dass sich die Proteine besser zusammenlagern können (Davies *et al.*, 1997; Ignatova und Gierasch, 2006). Analog den anderen in dieser Arbeit beschriebenen neurotoxischen Proteine, waren zunächst die Aggregate im Verdacht, den Tod der Nervenzellen zu verursachen, aber auch bei Huntingtin wird diskutiert, ob nicht Oligomere die größere Toxizität besitzen und die Ablagerungen eine Art Schutzmechanismus darstellen, die die Konzentration an kleineren Spezies verringern (Arrasate *et al.*, 2004; Rubinsztein und Carmichael, 2003). Über den Toxizitätsmechanismus hält sich das Wissen in Grenzen. Es wird berichtet, dass durch einen gestörten Glukosestoffwechsel in den Neuronen die Empfindlichkeit gegenüber Glutamat und oxidativem Stress steigt. Ausserdem ist Huntingtin in der Lage mit einer Vielzahl anderer Proteine zu interagieren. Die Beeinflussung von z. B. Chaperonen als Faltungshelfer, dem Proteasom als Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle und Caspasen als wichtigen Enzymen für die Apoptose könnte die schädliche Wirkung erklären (Bates *et al.*, 2015; Sadri-Vakili und Jang-ho, 2006; Serpionov *et al.*, 2017).

1.1.4 Gemeinsame Charakteristika neurodegenerativer Erkrankungen

Amyloido-, Tauo- und Synucleinopathien sowie PolyQ-Erkrankungen scheinen sich eine Vielzahl von Mechanismen und Faktoren zu teilen, die in der Pathogenese von all diesen Krankheiten vorkommen. Eine offensichtliche Gemeinsamkeit ist das Vorkommen von Proteinaggregaten. Das Zusammenlagern von Peptidmolekülen wird v. a. durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt, d. h. exponierte hydrophobe Bereiche der Proteine ziehen andere an. Normalerweise falten sich native Proteine derart, dass die unpolare Bereiche eher im Kern der Struktur liegen und von den hydrophileren Gruppen abgeschirmt werden. Das erklärt auch, warum gerade fehlgefaltete Proteine eine höhere Tendenz zur Aggregation haben, da diese in der Regel eine größere hydrophobe „Angriffsfläche“ aufweisen (Morales *et al.*, 2012; Roberts, 2007). Das Phänomen wird mit steigendem Alter der Zellen immer präsenter, da die Mechanismen zum Umfalten oder zum Abbau der Proteine schwächer werden (Tyedmers *et al.*, 2010). Heiß diskutiert wird, ob die fortschreitende Neurodegeneration bzw. Oligomerisierung und Aggregation auf Prionen-ähnliche Eigenschaften der Proteine zurückzuführen sei, also, ob sie andere Zellen „infizieren“ und bei interagierenden Peptiden Änderungen in deren Tertiärstruktur u. a. induzieren. So löst z. B. das Einbringen von A β -reichen Gehirnextrakten oder rekombinantem, reinem A β in Hirnregionen von verschiedenen Tieren eine Ausbreitung der amyloidopathischen Merkmale in angrenzende Gebiete aus (Baker *et al.*, 1994; Stöhr *et al.*, 2014). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Tau und α -Synuclein erzielt und es existiert eine starke Evidenz, dass alle beschriebenen neurotoxischen Peptide von Zelle zu Zelle transportiert werden können (Bourdenx *et al.*, 2017; Clavaguera *et al.*, 2013; Masuda-Suzukake *et al.*, 2013). Auch das Cross-seeding, also, dass ein für Neurodegeneration relevantes Protein die Aggregation eines anderen induzieren oder beschleunigen kann, wurde bereits beschrieben; siehe auch Kapitel 1.1.1.2 (Giasson *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2013). Obwohl bei allen in dieser Arbeit behandelten (Poly-) Peptide die kleineren Oligomere als potentiell neurotoxischer als die ausgereiften Aggregate angesehen werden und letztere teilweise sogar als Schutzmechanismus oder zumindest als Nebenprodukt des Degenerationsvorgangs betrachtet werden, sind die Ablagerungen dennoch nicht zu verharmlosen. Denn wie kürzlich gezeigt wurde, können Aggregate von A β , α -Synuclein, Tau und Huntingtin im Gegensatz zu ihren Oligomeren durch das Aufreißen von endozytotischen Vesikeln in die Zellen eindringen und sie schädigen (Flavin *et al.*, 2017). Ebenfalls wird hochaktuell an der Beteiligung der Asparaginendopeptidase an vielen neurodegenerativen Erkrankungen geforscht, da sie sowohl α -Synuclein als auch Tau spalten und so deren Aggregation und toxische Wirkung verstärken kann, als auch die Generation von A β begünstigt (Zhang *et al.*, 2014; 2015b; 2017). Auch die Discoidin domain-Rezeptoren (DDR), die in AD- und PD-Patienten überexprimiert vorliegen, könnten eine Verknüpfung zwischen den Krankheiten darstellen. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren verhindert die Beseitigung toxischer Protein-Deposite durch Ausschalten der Autophagie, wodurch die Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier, BBB) geschädigt werden kann (Georgetown University Medical Center, 2017).

In Abbildung 1.5 sind einige der bekannten Proteine und Prozesse zusammengetragen, die zu einer Neurodegeneration in den beschriebenen Erkrankungen führen können.

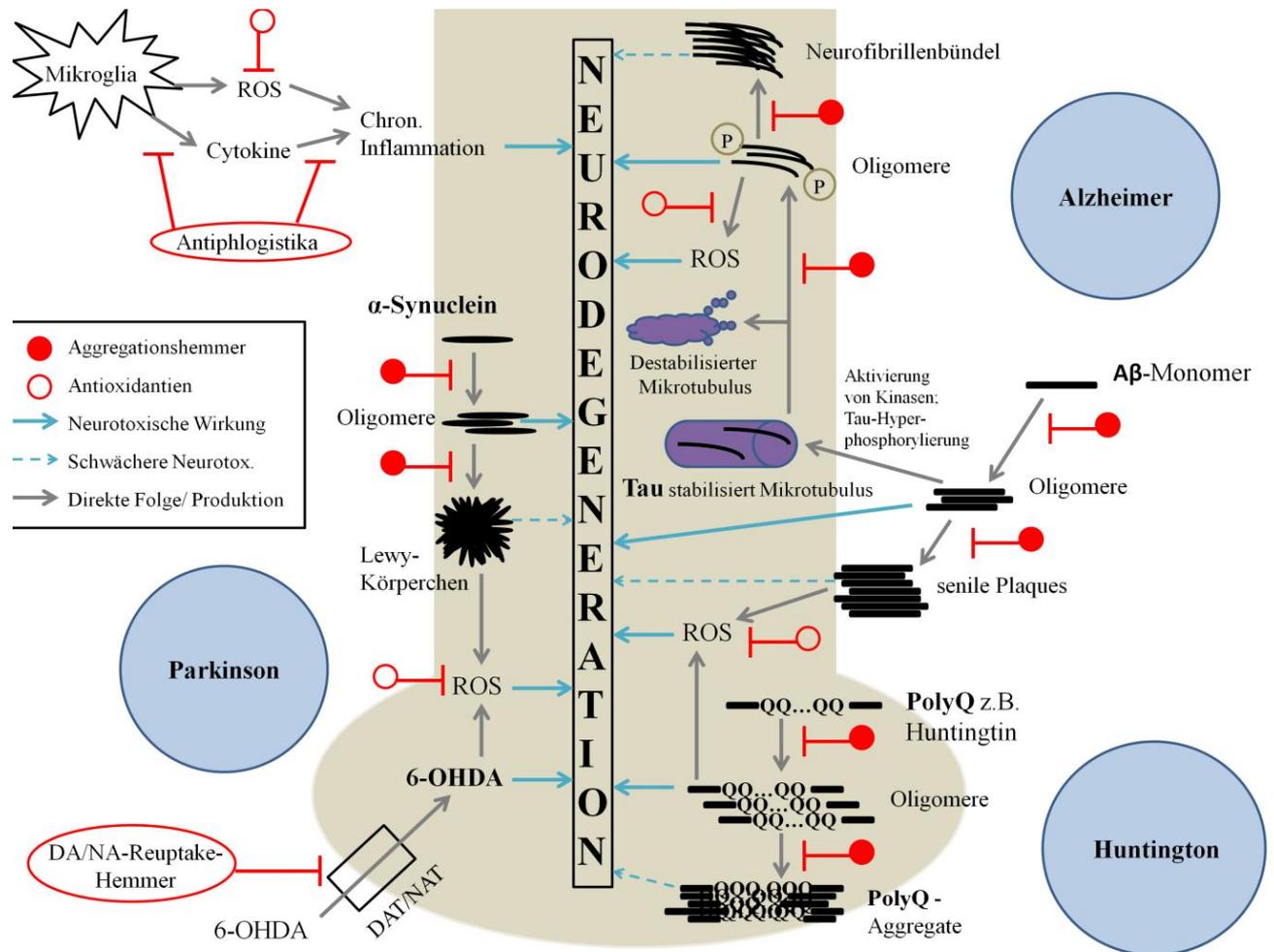


Abbildung 1.5: Überblick über einige bekannte Faktoren der Neurodegeneration. Abgebildet sind Pathomechanismen von Morbus Alzheimer, Parkinson und Huntington, auf die sich in der vorliegenden Arbeit bezogen wird. Da die ausgereiften Ablagerungen der beteiligten Proteine höchstwahrscheinlich eine geringere neurotoxische Wirkung als die Oligomere haben, wurde dies mit einem gestrichelten Pfeil deutlich gemacht. Die Neuroinflammation (oben links) scheint bei allen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Potentielle Wirkstoffe sind in Rot eingetragen. 6-OHDA: 6-Hydroxydopamin; β : β -Amyloid; DA(T)/NA(T): Dopamin(transporter)/Noradrenalin(transporter); P: Phosphatrest; PolyQ: Polyglutamin-Protein; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

1.1.4.1 Die Rolle von oxidativem Stress

Oxidativer Stress beschreibt den Zustand des Ungleichgewichts in einem biologischen System, bei dem die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) die Möglichkeiten des Systems zur Beseitigung dieser bzw. zur Verhinderung deren schädlichen Auswirkungen überfordert. ROS, wie H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ entstehen in den Zellen, v. a. in den Mitochondrien, als Nebenprodukt des regulären Metabolismus und als Reaktion auf externe Stimuli, etwa Strahlung oder Noxen und haben physiologisch die Funktion von Signalmolekülen. Die radikalisch vorliegenden Verbindungen sind jedoch hoch reaktiv und können verschiedenste Strukturen oxidativ angreifen, darunter Lipide (Lipidperoxidation bei Zellmembranen), Proteine und DNA. Das kann bei zu großen Konzentrationen zu

Mutationen, Enzymdefekten und anderen Dysfunktionen führen. ROS werden mit diversen Erkrankungen assoziiert, etwa Krebs, Herz-Kreislauf- und neurodegenerative Erkrankungen, Immundefekten und Alterungsprozessen allgemein (Alberts, 2015; Apel und Hirt, 2004; Finkel und Holbrook, 2000; Harman; Pham-Huy *et al.*, 2008; Shadel und Horvath, 2015). Der antioxidative Schutz vor den negativen Auswirkungen der ROS kann durch direkte (Radikalfänger und Reduktionsmittel: Glutathion, Ubichinol, Ascorbinsäure, Tocopherol, ...) und indirekte (Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase, Katalase, Hitzeschockproteine, ...) Mechanismen erfolgen (Birben *et al.*, 2012; Sies, 1993).

Die Rolle der ROS in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen fand in den letzten Jahren immer mehr Beachtung. Begonnen hat es mit der Entdeckung, dass in den Gehirnen von AD-Patienten überdurchschnittlich viele oxidierte Proteine und Lipide vorliegen (Abe *et al.*, 2002; Markesbery und Lovell, 1998; Smith *et al.*, 1991). Die Induktion von ROS scheint eine der toxischen Mechanismen zu sein, durch welche A β letztendlich zur Degeneration von Nervenzellen führt (Allan-Butterfield, 2002; Kadowaki *et al.*, 2005a; Shelat *et al.*, 2008). Hinzu kommt, dass A β mit mitochondrialen Proteinen interagieren und so zum Abbruch der Elektronentransportkette der Zellatmung und erhöhter ROS-Produktion führen kann (Cha *et al.*, 2012). Diese mitochondriale Dysfunktion bzw. die Induktion von ROS und oxidativem Stress allgemein wurden neben Alzheimer auch bei Parkinson, Huntington und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben, ausgelöst durch die sie charakterisierenden neurotoxischen Peptid-Verbindungen, also A β , Tau, α -Synuclein und PolyQ-Proteinen etc.. Dabei kann es zu synergistischen Verstärkungen der induzierenden Wirkung kommen, wenn mehr als ein Protein beteiligt ist (Amadoro *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2000; Lasagna-Reeves *et al.*, 2011; Lezi und Swerdlow, 2012; Niedzielska *et al.*, 2016; Quintanilla *et al.*, 2014). Auch 6-OHDA ist in der Lage, die Generation von ROS zu induzieren, was als potentieller Toxizitätsmechanismus betrachtet wird (Heikiila und Cohen, 1971; Perumal *et al.*, 1989). Dennoch gibt es auch skeptische Stimmen, die hinterfragen, ob der oxidative Stress eine kausale Ursache oder nur eine Konsequenz der Neurodegeneration ist, v. a. da die Behandlung mit Antioxidantien oft nur im Tiermodell, nicht aber in Patienten positive Wirkungen zeigt (van Raamsdonk *et al.*, 2017).

1.1.4.2 Die Rolle der Neuroinflammation

Weitere biochemische Veränderungen im ZNS von Patienten mit AD, PD, HD usw. sind inflammatorische Prozesse, die an der Neurodegeneration beteiligt zu sein scheinen. Hierbei spielen die Mikrogliazellen eine wichtige Rolle, welche rund 20 % aller Gliazellen ausmachen und physiologisch eine wichtige phagozytotische Funktion bei der innate Immunabwehr haben. Auch die Astrozyten (Astroglia) sind daran beteiligt. Bei neurodegenerativen Erkrankungen sind die Mikroglia permanent aktiviert, wahrscheinlich als Reaktion auf die Akkumulation fehlgefalteter Proteine, welche durch Phagozytose beseitigt werden sollen (El Khoury *et al.*, 2003; Lee und Landreth, 2010; Perry und Holmes, 2014). Die Mikrogliazellen produzieren u. a. proinflammatorische Cytokine wie TNF- α oder IL-1 und auch ROS. Die Entzündung, die eigentlich gegen die Noxen gerichtet ist und weiteren Schaden am ZNS verhindern soll, wirkt sich auf Dauer allerdings irgendwann negativ aus und trägt mutmaßlich zur Degeneration von Nervenzellen bei (Amor *et al.*, 2014; Colton *et al.*, 2000; Cunningham

et al., 2009; Cunningham *et al.*, 2005). Zudem begünstigt der geringere pH-Wert von entzündetem Gewebe die Aggregation von A β und anderen Proteinen (Atwood *et al.*, 1998). Jedenfalls wurden sowohl bei AD, als auch bei PD und HD schon solche entzündlichen Prozesse beobachtet und ihr Mitwirken an der Progression der Krankheiten wird debattiert (Heneka *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2009; Sawada *et al.*, 2006; Silvestroni *et al.*, 2009).

1.2 Griechischer Bergtee

Sideritis scardica Griseb. ist eine von über 150 Arten der Gattung *Sideritis* (Gliederkräuter) aus der Pflanzenfamilie der Lamiaceae (Salmaki *et al.*, 2013; Scheen *et al.*, 2010). Die Pflanze ist unter einer Reihe von Namen bekannt, von denen „Bergtee“ oder „Griechischer Bergtee“ als direkte Übersetzung aus mehreren Sprachen auftaucht. Als einige wichtige Namen seien genannt: Griechischer Bergtee, Griechisches Eisenkraut, Püringertee (Österreich), Mursalski- und Pirinski-Tee (Bulgarien). Im englischen Sprachgebrauch kennt man Greek mountain tea, Shepherd's tea oder Olympos tea (Feistel, 2013; Lim, 2014). In der vorliegenden Arbeit wird, neben dem lateinischen, ausschließlich der Name Griechischer Bergtee verwendet.

1.2.1 Botanische Beschreibung und traditionelle Anwendung

Die erste botanische Beschreibung der Pflanze geschah durch August Heinrich Grisebach, dessen botanisches Autorenkürzel „Griseb.“ den lateinischen Namen begleitet. Es handelt sich um einen mehrjährigen, verzweigten Halbstrauch, dessen Stängel krautig (nur an der Basis verholzt), vierkantig, wollig behaart und 15 bis 40 cm hoch sind (Abbildung 1.6 A). Die Grundblätter sind grau-filzig behaart, kreuzgegenständig und linealisch bis schmal lanzettlich. Da sich die Stängelblätter in regelmäßigem Abstand wiederholen, spricht man von „Gliedern“. Die ährenförmigen Blütenstände (Infloreszenzen) sind ca. 4 bis 9 cm lang und bestehen aus 8-17 zitronengelben, zygomorphen Blüten in Form von Scheinquirlen. Die Blütezeit von *S. scardica* ist von Juli bis August (Assenov, 1978; Evstatieva, 2011; Evstatieva *et al.*, 1990). Als Droge werden die zur Blütezeit gesammelten oder geernteten, getrockneten, oberirdischen Teile der Pflanze genutzt (Bojchinov, 1943; Nikolov, 2006) (Abbildung 1.6 B). *Sideritis scardica* ist endemisch auf der Balkan-Halbinsel. Man kann es in Süd-West Albanien, Mazedonien, Bulgarien, Serbien, Griechenland und der Türkei antreffen. Der Griechische Bergtee wächst in alpinen und subalpinen Vegetationsgürteln, v. a. auf offenen, steinigen und trockenen Hängen, die kalkhaltig, durchlässig und lange Zeit der Sonne ausgesetzt sind (Heywood, 1972; Todorova und Trendafilova, 2014). Inzwischen wird die Pflanze u. a. in Bulgarien kommerziell angebaut (Abbildung 1.7) (Feistel, 2013). Die Ernte erfolgt traditionell händisch durch Schneiden des Krautes; ebenso die Trocknung in Bündeln an der warmen Luft.

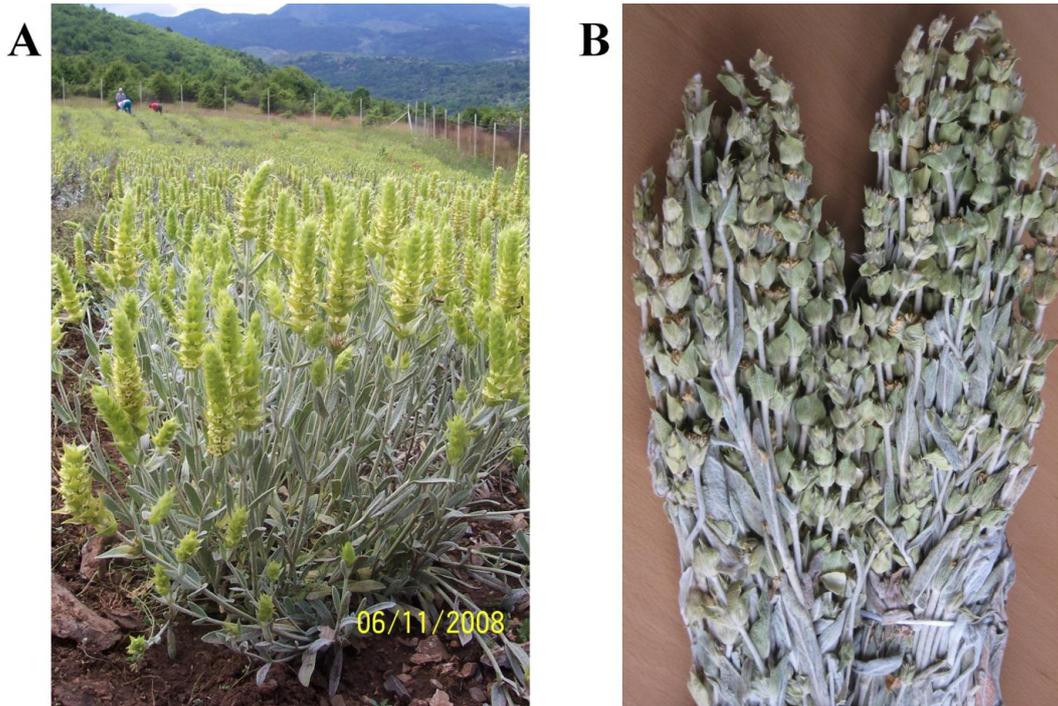


Abbildung 1.6: Bilder von *Sideritis scardica*. Anbau in Bulgarien (A). *Sideritidis scardicae herba totum* (B). Fotos aufgenommen von Dr. Björn Feistel, Fa. Finzelberg.

Volksmedizinisch wird der Griechische Bergtee in Form von Teeaufgüssen oder wässrigen bzw. alkoholischen Tinkturen gegen eine Vielzahl von Beschwerden eingenommen (Todorova und Trendafilova, 2014). Dazu gehört die Nutzung als Schleimlöser bei Bronchitis und bronchialem Asthma, gegen Erkältungen, Halsschmerzen und Husten, zur Behandlung von Entzündungen jeglicher Art, bei Magen-Darm-Beschwerden, bei Lungenemphysemen und zur Prävention einer Anämie. Auch bei Rhinitis, zur Entgiftung des Körpers, als Diaphoretikum, generelles Tonikum, bei Prostatahyperplasie und -entzündung, zur Wundheilungsförderung sowie bei Lippenherpes werden Zubereitungen vom Griechischen Bergtee angewendet. Auf chronische Nierenerkrankungen soll *Sideritis scardica* einen positiven Einfluss durch einen diuretischen Effekt haben. Alkoholische Tinkturen werden sowohl innerlich als auch äußerlich, z. B. als Antiseptikum nach dem Zähneziehen oder bei Infektionen des Mundraums genutzt. Eine lebensverlängernde Wirkung wird dem Kraut ebenfalls nachgesagt und neben medizinischen werden auch kosmetische Anwendungen beschrieben (Dordevic *et al.*, 1993; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011; Ivancheva und Stantcheva, 2000). Die beanspruchten Wirkungen und Anwendungsgebiete sind derzeit nicht ausreichend belegt, obschon einige der erforschten pharmakologischen Wirkungen manche der Einsatzgebiete plausibel erscheinen lassen (Kapitel 1.2.3). Das Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC, 2016) der EMA (European Medicines Agency) erstellte bereits die Monographie „*Sideritis herba*“ für die traditionelle Anwendung (traditional use) auf Grund langjähriger Erfahrung a) zur Linderung von Husten bei Erkältung und b) zur Linderung von leichten Beschwerden des Magen-Darm-Traktes (gastrointestinalen Beschwerden).



Abbildung 1.7: Kommerzieller Anbau von *Sideritis scardica* in Bulgarien. Foto aufgenommen von Dr. Björn Feistel, Fa. Finzelberg.

1.2.2 Phytochemie

Sideritis scardica Griseb. zeichnet sich vor allem durch die enthaltenen Polyphenole aus. Die oberirdischen Teile der Pflanze weisen einen Gesamt-Polyphenolgehalt von ca. 5 % auf, wobei während der Knospenbildung der höchste Gehalt an Flavonoiden (ca. 0,34 %) und zu Beginn der Vegetationsperiode der höchste Gehalt an Tanninen bzw. Lamiaceen-Gerbstoffen (bis 7,93 %) gemessen wurde (Evstatieva, 2002). Unter den Flavonoiden sind die 8-OH-Flavone Hypolaetin und Isoscutellarein bzw. ihre Methoxy-Derivate, welche meist in Form von 7-O-Glykosiden vorkommen, hervorzuheben (Alipieva *et al.*, 2010; Petreska *et al.*, 2011a; 2011b). Zudem wiesen Extrakte eine hohe Konzentration an 5,7-Dihydroxy-Flavonen wie Apigenin (Abbildung 1.8) und Luteolin auf (Tadic *et al.*, 2012). Zu den identifizierten Hydroxyzimtsäure-Derivaten gehören Ferulasäure, Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Caffeoylchinasäuren wie die Chlorogensäure (Abbildung 1.8) (Tadic *et al.*, 2012). Auch Phenylethanoid-Glykoside wie Acteosid (bzw. Verbascosid, Abbildung 1.8), Echinacosid oder Forsythosid waren in Auszügen aus dem Griechischen Bergtee vorhanden (Karapandzova *et al.*, 2013; Petreska *et al.*, 2011b). Im Vergleich zu anderen Lamiaceae enthalten die oberirdischen Teile der Pflanze nur geringe Konzentrationen an ätherischen Ölen (ca. 0,03 %). GC/MS-Analysen zeigten das Vorhandensein von Monoterpenen, Sesquiterpenen, Diterpenen, aliphatischen und aromatischen Substanzen sowie Fettsäuren und Oleylalkohol (Baser *et al.*, 1997; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011; Qazimi *et al.*, 2010; Todorova und Christov, 2000). Die genaue Zusammensetzung ist allerdings sehr abhängig vom Fundort (Bodenverhältnisse, Witterung) und der Jahreszeit (Todorova und Trendafilova, 2014). Hexan-Extrakte zeigen stets einen hohen Gehalt (mitunter ca. 60%) an Diterpenen (Kostadinova *et al.*, 2008; Trendafilova *et al.*, 2013). Diese sind hauptsächlich vom ent-Kauran-Typ: Siderol als das mengenmäßig prägendste, Isolinearol, Sideridiol, Sideroxol, Epoxysiderol, Eubol und 18-Acetoxy-Leucanthol (Taskova *et al.*, 1997; Venturella und Bellino, 1979). Im ätherischen Öl konnten Monoterpene wie Carvacrol, α - und β -Pinen (Baser *et al.*, 1997; Kokkalou, 1987)

sowie Sesquiterpene wie α -Cadinol, β -Caryophyllen und Nerolidol (Kostadinova *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Triterpene wie Amyrin kommen nur in geringem Ausmaß vor (Taskova *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde über Mineralstoffe (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn) im ppm-Bereich und Spuren von toxischen Inhaltsstoffen wie z. B. Blei, Cadmium und Arsen berichtet, welche jedoch in den traditionellen Zubereitungen, wie Tee oder Tinkturen, nicht nachweisbar sind (Karapandzova *et al.*, 2013; Zarkovic, 1993).

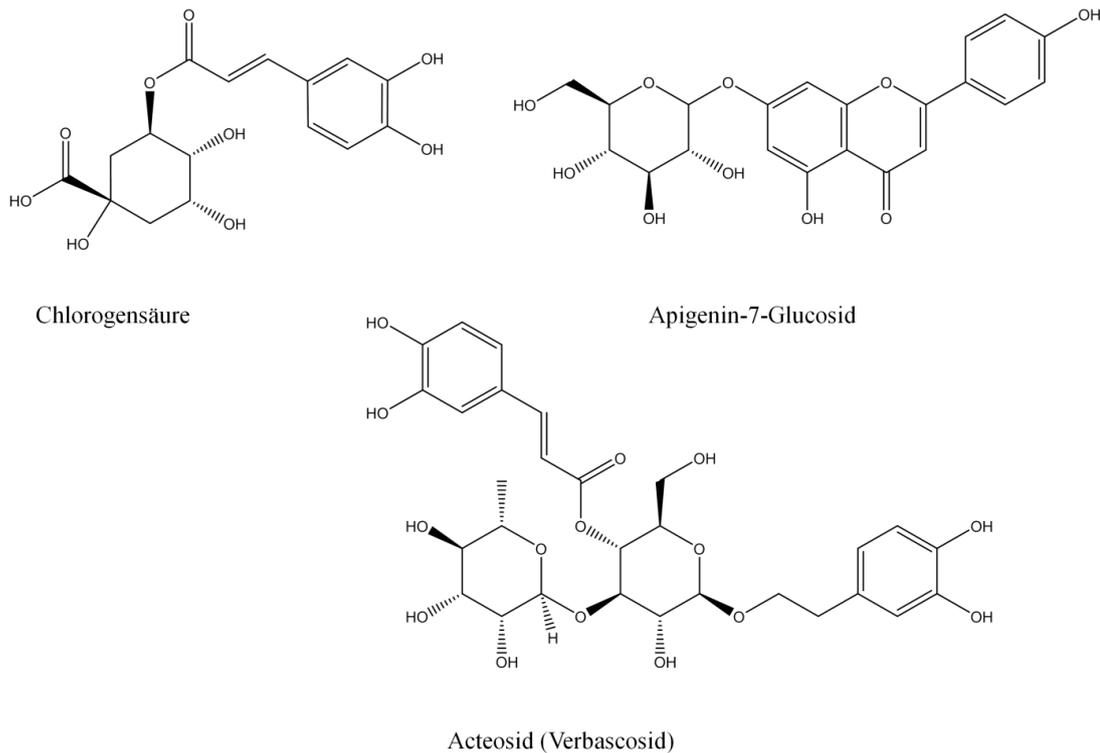


Abbildung 1.8: Ausgewählte polyphenolische Verbindungen aus *Sideritis scardica*.

1.2.3 Pharmakologische Eigenschaften

1.2.3.1 Antimikrobielle Wirkung

Abhängig vom Extraktionsmittel und der Extraktionsmethode zeigten Auszüge aus *S. scardica in vitro* eine antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien, wie z. B. gegen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Die gemessenen minimalen Hemm-Konzentrationen (MHK) umfassten einen Bereich von 0,04 bis zu > 2 mg/mL (Kostadinova *et al.*, 2008; Mihaylova *et al.*, 2014; Proestos *et al.*, 2013; Tadic *et al.*, 2007; 2012).

1.2.3.2 Antioxidative Wirkung

In verschiedenen *in vitro*-Assays zeigte sich, dass vor allem die stark lipophilen Extrakte aus *Sideritis scardica* eine antioxidative Wirkung besitzen. So glich die Radikalfänger-Kapazität eines Butanol-Extraktes im DPPH-Assay in etwa der der Rosmarinsäure (94,4 bzw. 94,5 %). Diese entsprach einem EC₅₀-Wert von 5,7 µg/mL (Koleva *et al.*, 2003; Tadic *et al.*, 2008). Ethanol-Extrakte hingegen zeigten Werte von bis zu 8,9 mg/mL (Karapandzova *et al.*, 2013). Der TEAC-Wert (Trolox-Äquivalent) von einem Infus aus dem Griechischen Bergtee betrug 0,86 mM (Ivanova *et al.*, 2005). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass ein 70 % methanolischer Extrakt trotz geringerem Phenolgehalt und geringerer antioxidativer Kapazität einem *Camellia sinensis*-Extrakt bezüglich der antioxidativen Wirkung in HepG2-Zellen ebenbürtig war (Danesi *et al.*, 2013). Zudem können die Extrakte zur Stabilisierung von Pflanzenölen beitragen (Mihaylova *et al.*, 2014).

1.2.3.3 Antiinflammatorische Wirkung

In vivo erreichten Ether- und n-Butanol-Fractionen eines 70 % ethanolischen Extraktes in Dosen von 200 bzw. 100 mg/kg den gleichen Effekt wie 4 mg/kg Indometacin (Carrageenan-induziertes Rattenpforten-Ödem) (Tadic *et al.*, 2007; 2012).

1.2.3.4 Gastroprotektive Wirkung

Verschiedene Fraktionen eines 70 % ethanolischen Extraktes zeigten *in vivo* eine dosisabhängige, mit Ranitidin vergleichbare Wirkung, wobei die n-Butanol-Fraktion die wirksamste und sogar signifikant effektiver als Ranitidin war (Ethanol-induzierter Stressulcus in Ratten) (Tadic *et al.*, 2012).

1.2.3.5 Osteoprotektive Wirkung

Weibliche, ovariectomierte Ratten, welche mit einem Ethanol-Auszug behandelt wurden, zeigten eine höhere Knochendichte, eine höhere mechanische Belastbarkeit der Knochen und verringerte kardiovaskuläre metabolische Risikofaktoren, die mit der Menopause assoziiert sind (Jeremic *et al.*, 2015).

1.2.3.6 Zytotoxische und Anti-Glioma-Wirkung

Es wurden dosisabhängige, zytotoxische *in vitro* Wirkungen gegen die Zelllinien HeLa, B16 und FemX und HL-60 beschrieben; vor allem Diethylether- und Ethylacetat-Extrakte waren aktiv (Tadic *et al.*, 2008; 2012). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass *S. scardica*-Auszüge die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Gliomazellen und primären Astrozyten von Ratten erhöhen; auch Zellzyklus-Arrest und Autophagie gehören zu den Wirkmechanismen. Diese werden den enthaltenen Flavonoiden Apigenin und Luteolin bzw. ihren 7-O-β-Glykosiden zugeschrieben (Jeremic *et al.*, 2013; Tadic *et al.*, 2009).

1.2.3.7 Antidepressive und psychostimulierende Wirkung

Wässrige und alkoholische Extrakte hemmten in Rattenhirn-Synaptosomen die Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin durch Inhibition der jeweiligen Neurotransmitter-Transporter mit EC₅₀-Werten von 30 bis 40 µg/mL. In humanen JAR-Zellen inhibierten sie den Serotonintransporter (reiner Methanolauszug: EC₅₀= 1,4 µg/mL). Ein 70 %

ethanolischer Extrakt war zudem in der Lage, die Wirkung des SSRIs Fluvoxamin zu verstärken (Knörle, 2012). In einem weiteren Versuch mit Rattenhirn-Synaptosomen und Auszügen mit Wasser, 20 %, 40 % und 60 % Ethanol (V/V) zeigte sich, dass die stärkste Wiederaufnahmehemmung bei Noradrenalin, gefolgt von Dopamin und Serotonin, stattfindet. Bei allen Neurotransmittern sanken die EC_{50} -Werte mit steigendem Anteil von Ethanol im Auszugsmittel. Der effektivste Extrakt war in jedem Fall der 60 % ethanolische mit einem EC_{50} -Wert von ca. 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Noradrenalin und Dopamin und 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Serotonin. Dieser lipophilste der getesteten Extrakte zeigte auch die stärkste Anreicherung von Flavonoiden (ca. 4 %) bzw. Polyphenolen (ca. 7 %) (Feistel und Appel, 2013).

Im Vergleich ähnelten die EEG-Frequenzmuster von mit *S. scardica*-Extrakt (AZM: 20 % Ethanol) behandelten Ratten denen von mit Methylphenidat (einem Psychostimulanz), Tramadol bzw. Paroxetin (beide haben antidepressive Eigenschaften), *Rhodiola rosea*- und *Ginkgo biloba*-Extrakt behandelten Ratten. Dabei zeigte *Sideritis euboa*, eine andere *Sideritis*-Art, sehr gegensätzliche Muster und wird deswegen nicht als (gedächtnis-) stimulierend eingeschätzt (Dimpfel, 2013; Dimpfel *et al.*, 2016b). Bei der positiven Wirkung des 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes auf die Gehirnfunktion ist höchstwahrscheinlich auch eine Modulation der AMPA-abhängigen Neurotransmission beteiligt, da eine *S. scardica*-induzierte elektrische Aktivität im Hippocampus von Ratten von einem Antagonisten dieses Glutamat-Rezeptors verhindert werden konnte. Andere Glutamat-Rezeptoren waren nicht beteiligt (Dimpfel *et al.*, 2016d).

1.2.3.8 Kognitive Leistungssteigerung und Anti-Alzheimer-Wirkung

Im Morris-Wasserlabyrinth fanden sowohl transgene Alzheimer-Mäuse, als auch gealterte, nicht-transgene Mäuse, die mit einem 20 % ethanolischen Extrakt behandelt wurden, signifikant schneller die rettende Plattform als die jeweiligen Kontrolltiere. Bei den nicht-transgenen Tieren ließ sich dieses Ergebnis zu jedem herangezogenen Zeitpunkt während des Langzeitversuchs (600 Tage) beobachten. Dies lässt auf eine Verbesserung des Kurzzeitgedächtnisses und der Kognition der Tiere in jedem Alter schließen. Weiterhin konnte eine gesteigerte phagozytische Aktivität der Mikroglia und eine erhöhte Expression der α -Sekretase ADAM10 ermittelt werden; beides kann potentiell die Last an für Alzheimer charakteristischen β -Amyloid-Peptiden verringern. Tatsächlich reduzierte die Behandlung mit *Sideritis scardica*-Extrakt die β -Amyloid-Plaques in den Maushirnen sowohl in Zahl, als auch in Größe (je ca. – 30 %). Auch die Menge an löslichem A β verringerte sich um mehr als die Hälfte (Hofrichter *et al.*, 2016).

In einer Pilotstudie mit 64 gesunden Probanden konnte eine Verbesserung der kognitiven Leistung unter Stressbedingungen nach der Einnahme eines Nahrungsergänzungsmittels mit 20 % ethanolischem *S. scardica*-Extrakt und B-Vitaminen gezeigt werden. Hierzu mussten Konzentrationstest vor und nach akuten Stressstimuli absolviert werden (Behrendt *et al.*, 2016). In einer Anwendungsbeobachtung, welche 10 Probanden mit MCI umfasste, wurden bessere Ergebnisse in einem d2-Konzentrationstest nach Behandlung mit *Sideritis scardica* allein und in Kombination mit *Bacopa monnieri* erzielt. Dabei zeigte sich während einer quantitativen EEG-Messung vor allem Aktivität in fronto-temporalen Hirnbereichen (Dimpfel *et al.*, 2016c). In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, zweiarmigen Doppelblindstudie mit Paralleldesign konnte anhand von 32 Probanden mit MCI festgestellt werden, dass nach der Einnahme eines

Kombinationspräparates aus *S. scardica* und *B. monnieri* verschiedene Konzentrations- und Gedächtnistests besser absolviert wurden. Dabei verstärkt es während der mentalen Forderung signifikant die Aktivität von Beta-Wellen im Gehirn, während es in Erholungsphasen, wie z. B. das Antidementivum Rivastigmin, die Aktivität von Delta- und Theta-Wellen dämpft (Dimpfel *et al.*, 2016a).

1.2.3.9 Bioverfügbarkeit und Unbedenklichkeit

In einer Bioverfügbarkeitsstudie an 10 Probanden (HPLC-MS-Messung von Urinproben 24 h nach Einnahme eines Dekokts) wurden etwa 5 % der aufgenommenen Polyphenole im Urin als Metabolite gefunden. Dabei handelte es sich um sulfatierte, glucuronidierte oder methylierte Flavonoide, Chinasäure- und Phenylpropanoid-Derivate. Die Flavonoid-Metaboliten machten den größten Anteil in den Urinproben aus (Petreska und Stefova, 2013). Das Gutachten des HMPC beruft sich auf unveröffentlichte Daten der Fa. Finzelberg bzgl. möglicher (geno-)toxischer Effekte verschiedener *S. scardica*-Extrakte. Dabei konnten keine Zeichen akuter oder subchronischer Toxizität nach peroraler Gabe an Ratten und kein genotoxisches Potential im AMES-Test in verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen (ohne und mit metabolischer Aktivierung durch S9-Mix) gefunden werden, was das günstige Sicherheitsprofil des Griechischen Bergtees unterstützt (Committee on Herbal Medicinal Products, 2016).

1.3 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein Fadenwurm (Nematoden) aus der Familie der Rhabditidae, der im Boden gemäßigter Klimazonen lebt, wo er sich von Bakterien ernährt. Die Tiere werden ca. 1 mm lang und lassen sich durch ihre transparente Kutikula hervorragend mikroskopieren (Abbildung 1.9). Die Anatomie der Nematoden ist relativ einfach, dennoch kommen die wichtigsten Gewebetypen vor, die auch bei höheren Organismen auftreten (wie Muskel-, Nerven-, Epidermis- und sekretorische Zellen) und sich ohne Dissektion untersuchen lassen. *C. elegans* besitzt zudem die Eigenschaft der Eutelie: die Hermaphroditen bestehen immer exakt aus 959 Zellen. Es gibt sowohl männliche Würmer, als auch selbstbefruchtende Hermaphroditen in einem Verhältnis von ca. 1 zu 700. Obwohl sie bevorzugt ist, kommt die Paarung mit Männchen deswegen nur selten vor; die hermaphroditischen Tiere können viele Generationen ohne sie überleben. Verschlechtern sich die Umweltbedingungen, häuft sich die Paarung wieder um den Genpool variabel zu halten. (Altun und Hall, 2009; Corsi, 2015). *C. elegans* war 1998 der erste multizelluläre Organismus, dessen komplettes Genom sequenziert wurde. Es besteht aus 6 Chromosomen (5 autosomale, 1 gonosomales) und einem mitochondrialem Genom. Insgesamt besitzt der Fadenwurm über 20.000 Gene (The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, 1998).

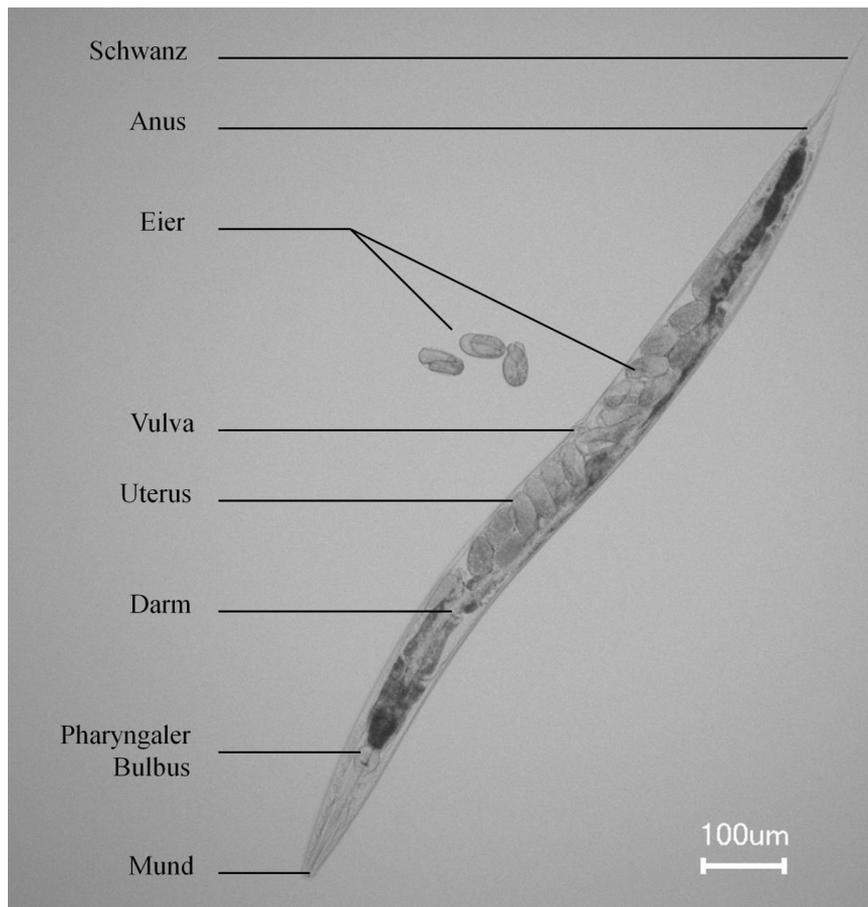


Abbildung 1.9: Anatomie eines adulten, hermaphroditischen *Caenorhabditis elegans*. Bild aufgenommen mit Keyence BZ-9000.

C. elegans hat eine kurze Lebensdauer von ca. 15 bis 20 Tagen (je nach Temperatur und Futtermenge) sowie einen kurzen Lebenszyklus von weniger als 3 Tagen vom Ei zum adulten Tier, welches wieder Eier legt (Byerly *et al.*, 1976; Klass, 1977). Nach dem Schlüpfen der Eier durchlaufen die Larven nacheinander die 4 Stadien L1 bis L4 (Abbildung 1.10). Die Zeiten zwischen diesen Stadien hängen ganz wesentlich von der Temperatur ab; nur ein paar Grad Celsius weniger führen zu verzögertem Wachstum und späterem Erreichen der Fertilität (Byerly *et al.*, 1976). L1-Larven können in diesem Stadium arrestiert werden, wenn sie kein Futter bekommen, was man sich bzgl. Synchronisationszwecken zu Nutze machen kann. Bei schlechten Umweltbedingungen können die Würmer alternativ auch den sog. Dauer-Zustand einnehmen, in dem sie inaktiv sind, nichts fressen und widerstandsfähiger gegen Austrocknung, Hitze und Noxen sind (Cassada und Russell, 1975). Bei sich verbessernden Bedingungen können die Würmer über das L4-Stadium wieder in den normalen Zyklus zurückkehren. Während der ersten Stunden produzieren die noch jungen, adulten Tiere Spermien; später werden Eizellen gebildet, welche beim Übergang vom Eierstock in den Uterus befruchtet werden. In seiner reproduktiven Phase legt ein Individuum um die 300 Eier, falls es auf die Selbstbefruchtung beschränkt ist.

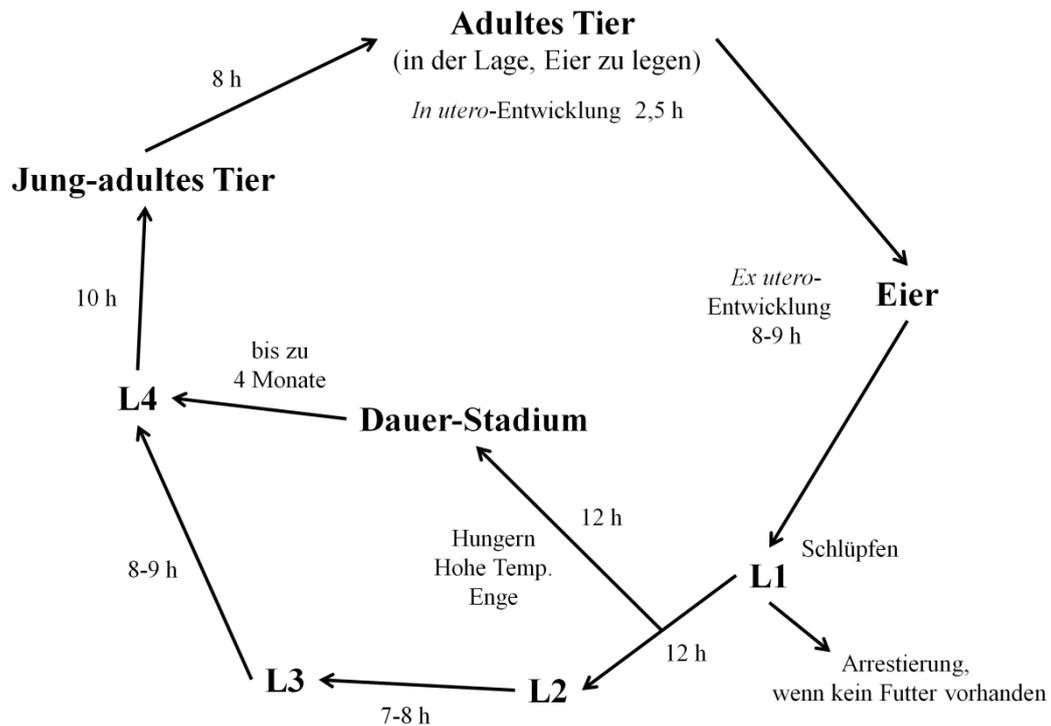


Abbildung 1.10: Lebenszyklus von *C. elegans* (Wildtyp) bei 20 °C. L1-L4: Larvenstadien. Nach Altun und Hall (2009), modifiziert.

1.3.1 Nervensystem

Das komplette Nervensystem der hermaphroditischen Fadenwürmer besteht aus 302 Neuronen (Männchen haben etwas mehr) und ist dabei aus 2 unabhängigen Teilen aufgebaut: einem größeren, somatischen und einem kleineren, pharyngalen Nervensystem. Außerdem wird es u. a. durch 56 Gliazellen unterstützt (White *et al.*, 1986). Andere Modellorganismen der biologischen Forschung und der Mensch haben deutlich mehr Nervenzellen: *Drosophila melanogaster* etwa 100.000, Mäuse ca. 70 Millionen und der Mensch über 86 Milliarden. Die meisten Neuronen sind in Ganglien im Kopf- und Schwanzbereich der Würmer organisiert (Abbildung 1.11). Sie können eingeteilt werden in sensorische, polymodale, Moto- und Interneuronen. Die Nerven kommunizieren über mehr als 6400 chemische Synapsen, 900 Gap Junctions und 1500 neuromuskuläre Endplatten (Hobert, 2005). Als Neurotransmitter nutzen die Nematoden Acetylcholin, Glutamat, GABA (γ -Aminobuttersäure) und biogene Amine wie Serotonin und Dopamin (Alkema *et al.*, 2005; Horvitz *et al.*, 1982; Sulston *et al.*, 1975). Trotz des überschaubaren, kompakten Nervensystems ist *C. elegans* zu einer Reihe von komplexen Verhaltensweisen fähig. Dazu gehört auch das Reagieren auf thermische, mechanische und chemische Stimuli. Das wichtigste chemosensorische Organ besteht aus einer Reihe von Neuronen in den Amphiden im vorderen Bereich des pharyngalen Bulbus, die zum Mund hin ziehen (Abbildung 1.11 **B**) (Inglis *et al.*, 2006). Jedes Amphid besteht dabei aus 12 Nervenzellen und 2 Gliazellen. Durch eine Pore in der Kutikula des Wurms haben die meisten Nervenenden Kontakt zum umgebenden Medium, was das Wahrnehmen von wasserlöslichen Molekülen und Ionen möglich macht. Drei der Neuronen sind verantwortlich für die

Chemotaxis zu volatilen Verbindungen, stellen also olfaktorische Nervenzellen dar. Das Wahrnehmen von Chemikalien ist notwendig, um potentielle Futterquellen, also Mikroorganismen, aufzuspüren bzw. um potentiell toxische Einflüsse zu meiden (Bargmann *et al.*, 1993; Bargmann und Horvitz, 1991).

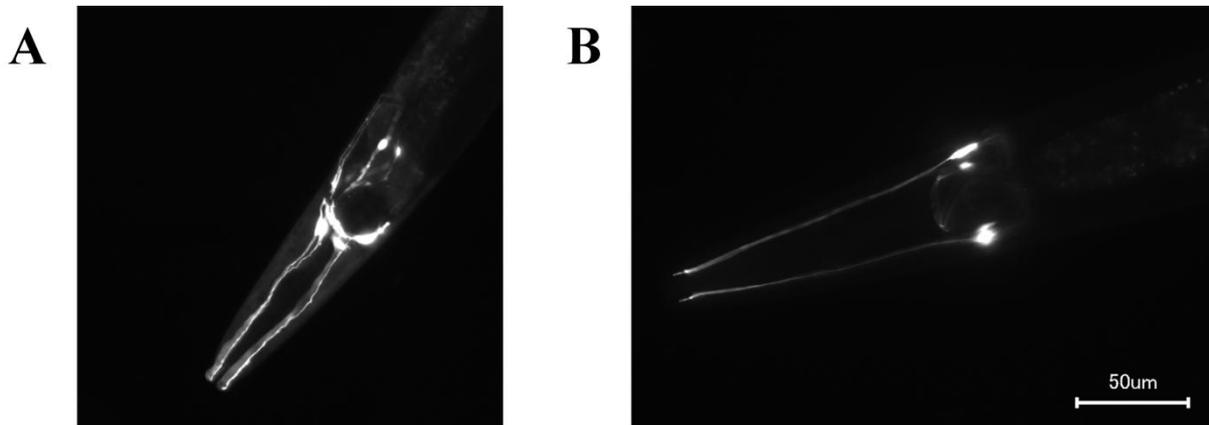


Abbildung 1.11: Ausgewählte Nervenstränge im Kopfbereich von *C. elegans*. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von dopaminergen Neuronen des Stammes BZ555 (Expression von YFP). **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von ASH-Neuronen in den Amphiden des Stammes HA759 (Expression von GFP und Huntingtin). Bilder aufgenommen mit Keyence BZ-9000.

1.3.2 *C. elegans* als Modellorganismus

1974 führte Sydney Brenner *C. elegans* als Modellorganismus für Entwicklungsbiologie und genetische Studien ein (Brenner, 1974). 2002 erhielt er den Nobelpreis für Medizin für seine Arbeit über Apoptose und Organentwicklung in den Nematoden. Allgemein eignet sich das Modell hervorragend für die zügige Generierung von *in vivo*-Daten, größer angelegte Screenings und sogar High-Throughput-Ansätze (O'Reilly *et al.*, 2014). Die Gründe dafür liegen in der praktischen Handhabbarkeit, da *C. elegans* sehr klein und transparent ist, über eine große Brutzahl, eine kurze Lebenszeit und einen kurzen Lebenszyklus verfügt sowie keine hohen Ansprüche an die Laborausstattung stellt (Kapitel 2.2.5). Außerdem verlangt die Arbeit mit den Fadenwürmern keine Tierversuchsanträge und transgene Stämme sind kommerziell einfach und günstig zu erhalten. Es füllt eine wichtige Lücke zwischen *in vitro*-Versuchen, wie an Zellkulturen, und den Vertebraten-Modellen. Naturgemäß lassen sich Ergebnisse im Fadenwurm nur bedingt auf die Wirksamkeit in Wirbeltieren oder im Menschen übertragen; das Gleiche gilt allerdings für sämtliche Tiermodelle. Allerdings weist *C. elegans* viele konservierte Gene und molekulare Mechanismen auf, die so oder ähnlich auch in höheren Organismen vorkommen. Ca. 40 % aller im Wurmgenom codierten Proteine haben Homologe in *Homo sapiens*, darunter eine Vielzahl bekannter menschlicher Krankheitsgene (Culetto und Sattelle, 2000; The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, 1998). Außerdem zeigen viele Substanzen und pflanzliche Extrakte, bei denen eine klinische Wirkung belegt ist, auch in den Würmern eine ähnliche Aktivität, darunter

Resveratrol, Grüntee und Ginkgo (Abbas und Wink, 2009; Luo, 2006; Morselli *et al.*, 2010). Ein weiterer Vorzug gegenüber *in vitro*-Versuchen ist, dass pharmakologisch aktive Substanzen ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen müssen, die nötig sind, um in anderen Tiermodellen und im Menschen bioverfügbar und damit wirksam zu sein. Für die Aufnahme vom Verdauungstrakt in das umliegende Gewebe und von dort in die Nervenzellen müssen die Verbindungen beispielsweise ausreichend lipophil sein, um durch die Membranen diffundieren zu können. Zheng *et al.* (2013) postulierten, dass die absorbierte Menge an Substanzen in *C. elegans* und Mäusen ähnlich ist.

Im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen gibt es eine große Zahl an transgenen Stämmen, die pathogene Merkmale der jeweiligen Krankheit aufweisen und damit zwar vom Gesamtbild der Erkrankung abkoppeln. Jedoch ermöglicht dies eine gezieltere Suche nach einzelnen pharmakologischen Aktivitäten und Mechanismen. *C. elegans* besitzt zwar Homologe zum menschlichen APP (APP-like 1) (Daigle und Li, 1993), α - und γ -Sekretase, aber es zeigt keine BACE1-Aktivität (β -Sekretase) und APP-like 1 beinhaltet nicht die charakteristische A β -Sequenz (Alexander *et al.*, 2014). Deswegen werden die Gene für humanes A β (1-42) und andere neurotoxische Peptide erst in den Wurm eingebracht, die er dann exprimiert. Das bedingt unter anderem, dass Aggregate wie A β , die physiologisch eigentlich extrazellulär anzutreffen wären im Wurm intrazellulär auftreten. Zudem findet die Expression der für neurodegenerative Erkrankungen relevante Peptide bei einigen Stämmen nicht neuronal, sondern in den Muskelzellen statt, wie A β in Stamm CL2006, α -Synuclein in NL5901 und das Polyglutamin-Peptid Q40 in AM141 (Kapitel 2.1.7). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich Reaktionen wie das Zusammenlagern der Peptide in Muskel- und Nervenzellen unterscheiden, ist zwar gering und die Stämme sind generell als Modell für Neurodegeneration akzeptiert (Li und Le, 2013); genau genommen lassen sich aber aus diesen Ergebnissen nur allgemeinere Aussagen über weiter gefasste Krankheitsbilder und -gruppen ableiten. So können z. B. Amyloidose oder Polyglutaminerkrankungen auch die Muskeln betreffen. Nichtsdestotrotz sind auch transgene Stämme mit neuronaler Expression verfügbar, deren Neurotoxin-induzierte Verhaltensänderungen quantifizierbar sind und Effekte auf die Neurotransmission abbilden. Oftmals sind typische Begleiterscheinungen der simulierten Erkrankungen auch im Fadenwurm nachweisbar, wie etwa A β -abhängiger, oxidativer Stress (Drake *et al.*, 2003). Weiterhin induziert A β sowohl in *C. elegans*, als auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten die Expression von Hitzeschockproteinen (Link *et al.*, 2003), welche die Toxizität von A β -Oligomeren auch in den Würmern reduzieren können (Fonte *et al.*, 2008) und auch eine fehlerhafte Autophagie wurde beobachtet (Florez-McClure *et al.*, 2007). Trotz dieser Gemeinsamkeiten hat *C. elegans* als Modell für Alzheimer und weitere Krankheiten natürlich Schwächen und Grenzen. Neben der fehlenden APP-Prozessierung fehlt es an verschiedenen anatomischen und zellbiologischen Merkmalen (Blutkreislauf, BBB, Mikroglia, Astrozyten) und an der Komplexität der Mechanismen zum Abbau der neurotoxischen Peptide. Es ist ein *in vivo*-Modell für die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen, nicht mehr und nicht weniger.

1.4 Zielsetzung

In einer Gesellschaft, in der immer mehr Menschen ein hohes Alter erreichen, wird die Suche nach pharmakotherapeutischen aber auch prophylaktischen Behandlungsmethoden von neurodegenerativen Erkrankungen immer wichtiger. Obwohl die Degeneration von Nervenzellen multikausal ist, teilen sich viele neurodegenerative Erkrankungen diverse Merkmale wie Proteinaggregation, oxidativen Stress oder Neuroinflammation. Pflanzliche Zubereitungen stellen hier aufgrund ihres „Multitarget“-Charakters wichtige Forschungsobjekte dar. Zudem bietet die Phytotherapie durch oft hervorragende Wirksamkeits-Nebenwirkungsprofile und der damit einhergehenden, hohen Akzeptanz in der Bevölkerung große Chancen. Der Griechische Bergtee ist Gegenstand intensiver Erforschung, insbesondere der pharmakologischen Wirkungen im ZNS, wie die Verbesserung kognitiver Fähigkeiten und der Einfluss auf Pathomechanismen der Alzheimer-Krankheit. Um diesen Pfad fortzuführen, wurde das Tiermodell *Caenorhabditis elegans* gewählt, mit welchem solide *in vivo*-Daten in kurzem Zeitraum generiert werden können. Damit sollten weitere Effekte auf Charakteristika von *Morbus Alzheimer* untersucht sowie der Fokus auf weitere neurodegenerative Erkrankungen ausgedehnt werden. Die konkreten Ziele der vorliegenden Arbeit lauten wie folgt:

- **Testen verschiedener *Sideritis scardica*-Extrakte auf ihre neuroprotektive Aktivität**

Mit verschiedenen Auszugsmitteln hergestellte Extrakte aus dem Griechischen Bergtee werden in verschiedenen Konzentrationen in *C. elegans* getestet. Der Fokus liegt hierbei auf die Auswirkung auf neurotoxische Peptide, die bei Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington eine Rolle spielen. Zusätzlich werden die Auszüge phytochemisch auf Leitsubstanzen analysiert.

- **Untersuchen des wirksamen Prinzips durch Testung von Fraktionen eines aktiven Extraktes und Reinsubstanzen**

Die aus einem der aktivsten *S. scardica*-Extrakte hergestellten Fraktionen werden in den gleichen Experimenten getestet und phytochemisch charakterisiert. Daran orientierend werden ausgewählte Reinstoffe getestet, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der Extrakt als gesamtwirksames Prinzip vorliegt oder die Wirkung auf einzelnen Inhaltsstoffen beruht.

- **Messung der antioxidativen Aktivität**

Da oxidativer Stress ein wichtiger Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen ist, werden die Extrakte ebenfalls auf antioxidative Eigenschaften getestet. Dies geschieht sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* mit dem Modellorganismus *C. elegans*. Weil auch die Lebensspanne u. a. von der antioxidativen Abwehr abhängt, wird auch diese bei den Würmern unter Einwirkung von *S. scardica* gemessen.

- **Vergleich der Wirkung von *Sideritis scardica* und etablierten Extrakten ZNS-aktiver Arzneipflanzen**

Um zu prüfen, wie die Auszüge bzw. Inhaltsstoffe aus dem Griechischen Bergtee im Vergleich zu etablierten Arzneipflanzen im Bereich kognitive Fähigkeiten und Neuroprotektion abschneiden, werden handelsübliche Extrakte aus Ginkgo, Rosenwurz, Johanniskraut und dem Kleinen Fettblatt (Brahmi) einbezogen. Auch wird ein auf dem Markt befindliches Kombinationspräparat von *S. scardica* und Brahmi (memoLoges®) getestet.

- **Prüfen des Einflusses von *E. coli* OP50 auf die Inhaltsstoffe und Wirkung von *S. scardica*-Extrakten und Überprüfung der Resorption der Extraktivstoffe in den Fadenwurm**

Der *Escherichia coli*-Stamm OP50 stellt die verwendete Futterquelle für die Nematoden dar. Da diese in den Experimenten lebend vorliegen, stellt sich die Frage, ob sie einen metabolischen Einfluss auf die verwendeten Extrakte haben und eventuell die Wirkung mindern oder verbessern (Abbau von Wirkstoffen oder Aktivierung von Prodrugs). Ausserdem soll überprüft werden, ob und in welcher Menge potentielle Wirkstoffe in den Würmern ankommen. Dazu werden phytochemische Analysen durchgeführt und in verschiedenen Experimenten die Wirkung von Extrakt mit lebenden und Extrakt mit toten Bakterien verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labormaterial

6- / 24- / 96-Well-Platten	Greiner Bio-One
Braunglasfläschchen	Hycultec
Antifect®	Schülke
CELLSTAR® Tubes (Falcontubes 15 und 50 mL)	Greiner Bio-One
CELLSTAR® Einmalpipetten 10 und 25 mL	Greiner Bio-One
Deckgläschen	Th. Geyer
Einweghandschuhe Latex	Satra Technology Centre
Einmalküvetten 1,6 mL	Sarstedt
Einmalspritzen BD Discardit™ II 2 mL	Becton, Dickinson and Company
Laborglasflaschen	Duran Group
Mikroliterpipetten	Gilson
Objektträger	Roth
Parafilm	Bemis Inc.
Petrischalen 35 x 10; 60 x 15; 100 x 20 mm	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 1-10 µL	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 10-200 und 100-1000 µL	Sarstedt
Poly-Prep-Slides	Sigma-Aldrich
(Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger)	
Reagiergefäß 1,5 mL	Sarstedt
Rundfilter Grad 595	Schleicher & Schuell
Rundkolben	Duran Group
Safe-Lock tubes (1,5 und 2 mL)	Eppendorf
Sterilfilter Whatman® 0,2 µm	Whatman

2.1.2 Instrumente

Analysenwaage Sartorius Basic	Sartorius AG
Brutschrank HettCube 200	Hettich
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence
Fluoreszenzmikroskop Labophot-2	Nikon
Gasprofi 2 SCS	WLD-TEC
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C (TT80)	Fryka
HPLC-System (Autosampler SIL-10A, Pumpe LC-10AS, Diodenarraydetektor SPD-M20A)	Shimadzu
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer mit Heizplatte MR Hei-Standard	Heidolph
Mikrotiterplattenleser Infinite M200Pro	Tecan

Mikrotiterplattenschüttler MTS 4
NanoPhotometer
Omni-Ruptor 4000
Peltier-Kühlbrutschrank IPP 30
Peltier-Kühlbrutschrank IPP 55plus
Peltier-Kühlbrutschrank IPP 400
pH-Meter MP120
Rotationsvakuumverdampfer
Sicherheitswerkbank
Sicherheitswerkbank
Stereomikroskop DM-143
Stereomikroskop SM 22-AD 24
Tischautoklav
Tischwaage
Tischzentrifuge Haraeus pico
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H
Zentrifuge Rotina 380R

IKA
Implen
OMNI
Memmert
Memmert
Memmert
Mettler-Toledo
Heidolph
Labortechnik Fröbel
Cearg Schirp Reinraumtechnik
Motic
Hund
CertoClav
VWR International
Thermo Fisher Scientific
Bandelin
Hettich

2.1.3 Software

AtmoControl
BZ-II Analyzer
BZ-II Viewer
ChemDraw Professional 15.1
GraphPad Prism 6
ImageJ 1.43u
SigmaPlot 11.0

Memmert
Keyence
Keyence
PerkinElmer
Statcon
NIH
Systat Software

2.1.4 Chemikalien

β -Mercaptoethanol
(-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
2',7'-Dichlorfluoresceindiaceat (H_2DCFDA)
5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FUDR)
6-Hydroxydopaminhydrobromid (6-OHDA)
Acteosid (Verbascosid)
Amberlite® XAD7
Ampicillin Natriumsalz
Apigenin-7-glucosid
Ascorbinsäure
Bacto™ Agar
Bacto™ Tryptone
Bacto™ Yeast Extract

Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
PhytoLab
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
PhytoLab
Roth
Becton, Dickinson and Company
Becton, Dickinson and Company
Becton, Dickinson and Company

Benzaldehyd	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Cavamax® W8 Curcumin Cyclodextrin	Wacker
Chlorogensäure	PhytoLab
Cholesterol	Sigma-Aldrich
Citronensäure Monohydrat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Chemicals
Echinacosid	PhytoLab
Eisensulfat Heptahydrat (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz Dihydrat	Appllichem
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma-Aldrich
Forsythosid A	PhytoLab
Gallussäure	Roth
Glycerol	AppliChem
Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphtochinon)	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumcitrat Monohydrat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Kaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Kupfersulfat Pentahydrat (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	Grüssing
Luna® C18/2 HPLC-Säule	Phenomenex
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Maldex® G190 Pharma (Maltodextrin Ph. Eur.)	Tereos
Manganchlorid Tetrahydrat (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumhypochlorit (NaOCl)	Grüssing
Natriummonohydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Neochlorogensäure	PhytoLab
Nilrot	Life Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Resazurin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	AnalaR Normapur
Scutellarin	PhytoLab
Serotonin-Creatinin-sulfat Monohydrat	Sigma-Aldrich
SIPERNAT® 160 PQ (Gefälltes Siliciumdioxid Ph. Eur.)	Evonik
Stickstoff (Grad 4.0; technisch)	Air Liquide
Thioflavin S	Sigma-Aldrich
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth

Triton® X-100	Fluka
Wasser, monodestilliert (H ₂ O)	-
Zinksulfat Heptahydrat (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Merck

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

NGM-Agar (Nematode growth medium)

- 17 g Bacto™ Agar
- 2,5 g Bacto™ Tryptone
- 3 g NaCl
- 975 mL H₂O

Nach 15 min Autoklavieren bei 125 °C und Abkühlen auf ca. 65 °C wurden folgende (wässrige) autoklavierte Lösungen unter keimarmen Bedingungen hinzugegeben:

- 1 mL 1 M CaCl₂
- 1 mL 1 M MgSO₄
- 25 mL 1M Phosphatpuffer (K₃PO₄)
- 1 mL 5 mg/mL Cholesterol in Ethanol

Für bestimmte Experimente wurde eine wässrige FUDR-Lösung während des Gießens der Agarplatten in die Petrischalen gegeben um NGM-Agar mit 0,04 mg/mL FUDR zu erhalten (jeweils in den Methoden erwähnt).

Testagar für Chemotaxis

- 19 g Bacto™ Agar
- 975 mL H₂O

Nach 15 min Autoklavieren bei 125 °C und Abkühlen auf ca. 65 °C wurden folgende (wässrige) autoklavierte Lösungen unter keimarmen Bedingungen hinzugegeben:

- 1 mL 1 M CaCl₂
- 1 mL 1 M MgSO₄
- 25 mL 1M Phosphatpuffer (K₃PO₄)

LB-Agar

- 15 g Bacto™ Agar
- 10 g Bacto™ Tryptone
- 5 g Bacto™ Yeast Extract
- 10 g NaCl
- 960 mL H₂O

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

S-Medium

- 5,8 g NaCl
- 1 g K₂HPO₄
- 6 g KH₂PO₄
- 1 mL 5 mg/mL Cholesterol in Ethanol
- H₂O ad 1 L

Nach 15 min Autoklavieren bei 125 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur wurden folgende (wässrige) autoklavierte Lösungen unter keimarmen Bedingungen hinzugegeben:

- 3 mL 1 M CaCl₂
- 3 mL 1 M MgSO₄
- 10 mL 1 M Kaliumcitrat
- 10 mL Spurenelementlösung

M9-Puffer

- 3 g KH₂PO₄
- 6 g Na₂HPO₄
- 5 g NaCl
- 1 mL 1 M MgSO₄
- H₂O ad 1 L

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

PBS 1x (Phosphate buffered saline)

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,42 g Na₂HPO₄
- 0,27 g KH₂PO₄
- H₂O ad 1 L

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

S-Puffer

- 1,47 g K₂HPO₄
- 5,92 g KH₂PO₄
- 5,85 g NaCl

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert. Zum Aufbewahren der *C. elegans*-Stämme bei -80 °C wurde ein S-Puffer mit 15 % (V/V) Glycerol verwendet.

LB-Medium

- 10 g Bacto™ Tryptone
- 5 g Bacto™ Yeast Extract
- 10 g NaCl
- 975 mL H₂O

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

Spurenelementlösung

- 1,86 g EDTA Dinatriumsalz
- 0,69 g FeSO₄·7H₂O
- 0,2 g MnCl₂·4H₂O
- 0,29 g ZnSO₄·7H₂O
- 0,025 g CuSO₄·5H₂O
- H₂O ad 1 L

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

Kaliumcitratlösung 1 M pH=6

- 20 g Citronensäure Monohydrat
- 293,5 g Kaliumcitrat Monohydrat
- H₂O ad 1 L

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

Phosphatpuffer (K₃PO₄) 1 M pH=6

- 35,6 g K₂HPO₄
- 108,3 g KH₂PO₄
- H₂O ad 1 L

Die Lösung wurde 15 min bei 125 °C autoklaviert.

Paraformaldehydlösung 4% (PFA)

50 mL H₂O wurden auf ca. 60°C erwärmt und unter Rühren wurde das PFA hinzugegeben; es entstand eine milchige Suspension. Es wurde tropfenweise NaOH hinzugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen und Filtrieren wurden 10 mL 10 x PBS hinzugegeben und mit H₂O *ad* 100 mL aufgefüllt. Mittels einer pH-Elektrode wurde so lang HCl hinzugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 7 bis 8 aufwies.

Permeabilisierungslösung (Aβ-Plaques)

5 % β-Mercaptoethanol und 1 % Triton® X-100 in 125 mM Tris-Pufferlösung.

2.1.6 Pflanzenmaterial

Die Droge *Sideritidis scardicae herba* wurde von der Martin Bauer GmbH, Vestenbergsgreuth bezogen und stammt aus Anbau in Bulgarien (Art. 2232000; Ch. 10018839). Diese wurde für die Herstellung eines methanolischen Auszugs verwendet (MeOH; Kapitel 2.2.1). Zudem stellte die Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach aus derselben Drogencharge weitere Extrakte (Wasser; Ethanol 20, 40, 50 und 70 %) her und stellte sie freundlicherweise zur Testung bereit. Die Produktionsschritte sind ebenfalls in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Das Pflanzenmaterial wurde an der Universität von Athen, Griechenland in der Abteilung Pharmakognosie und Naturproduktchemie der Fakultät für Pharmazie als *Sideritis scardica* Griseb. identifiziert und unter der Specimen-No. PAS101 hinterlegt. Weitere Proben der genutzten Droge sind am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg in der Abteilung Biologie unter der Registrierungsnummer P8562 verfügbar.

Vom 40 % ethanolischen Extrakt (EtOH40) wurden ebenfalls von der Fa. Finzelberg 6 verschiedene Fraktionen gewonnen und bereitgestellt. Es handelt sich um die Butanol- und Wasser-Phase einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (Fl-Fl BuOH und Fl-Fl H₂O), die lösliche Überstand- und die unlösliche Bodensatz-Fraktion einer Rücklösung des Extraktes in 70 % Ethanol (V/V) (Umlös Lös und Umlös Satz) und die Ethanol- und Wasser-Fraktion der Auftrennung über eine Amberlite® XAD7-Adsorbersäule (Ionenaustauscherharz; Adsorb EtOH und Adsorb H₂O).

Weiterhin wurden folgende handelsübliche Trockenextrakte, welche als Referenz herangezogen wurden, freundlicherweise von der Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach und der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe bereitgestellt:

Tabelle 2.1: Übersicht Referenzextrakte. N/A: nicht zutreffend

Pflanze	Droge	AZM	Weitere Informationen	Hilfsstoffe	Artikel / Charge	Bezug
<i>Bacopa monnieri</i>	Herba	40 % Ethanol (V/V)	Min. 40 % Bacoside; Adsorber-behandelt	100 % nativ	Ch. KP/BM/038/14	Finzelberg
<i>Ginkgo biloba</i>	Folium	60 % Aceton (m/m)	Spezialextrakt EGb 761 in Tebonin®	N/A	Ch. 454	Schwabe
<i>Hypericum perforatum</i>	Herba	80 % Ethanol (V/V)	DEV 3-6 : 1 Extrakt in Laif®	1 % SiO ₂	Art. 0155384 Ch. 14013087	Finzelberg
<i>Rhodiola rosea</i>	Radix	70 % Ethanol (V/V)	Perkolation 45 °C DEV 3,4 : 1 min. 1 % Salidrosid min. 2 % Rosavin	2 % Maltodextrin 1 % SiO ₂	UB 2015-36	Finzelberg

Das Fertigpräparat memoLoges® von der Dr. Loges + Co. GmbH enthält u. a. eine Kombination eines *Sideritis scardica*- und eines *Bacopa monnieri*-Trockenextraktes im Verhältnis von ca. 3:1. Der Kapselinhalt wurde als (potentiell) gesamtwirksames Prinzip getestet. Eine Kapsel des Nahrungsergänzungsmittels enthält laut Beipackzettel:

- 60 mg *Bacopa monnieri* (Brahmi)
- 190 mg *Sideritis scardica*
- 9 mg Pantothersäure
- 10 mg Pyridoxin
- 750 µg Zink
- 200 µg Folsäure
- 250 µg Cobalamin

Die vollständigen Zutaten sind laut Beipackzettel: Extraktzubereitung aus *Sideritis scardica* (enthält Maltodextrin), Hydroxypropylmethylcellulose (Kapselmaterial), *Bacopa monnieri*-Extrakt, Cellulose (Füllstoff), Pyridoxinhydrochlorid, Calcium-D-Pantothenat, Siliciumdioxid-Silicate (Trennmittel), Magnesiumsalze der Speisefettsäuren, Zinkgluconat, Methylcobalamin, 5-Methyltetrahydrofolsäure Calciumsalz, kupferhaltige Komplexe der Chlorophylle und Chlorophylline (Farbstoff).

2.1.7 *C. elegans*-Stämme

Sämtliche *C. elegans*-Stämme sowie der *E. coli*-Stamm OP50 als Futterquelle wurden vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC) der University of Minnesota bezogen. Gefördert wird dieses von den National Institutes of Health – Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Zum Teil wurde auch mit Würmern des Stammes Cl4176 gearbeitet, die freundlicherweise direkt von Dr. Christopher D. Link bezogen werden konnten (University of Colorado).

Tabelle 2.2: Genutzte *Caenorhabditis elegans*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Experiment	Beschreibung / Phänotyp
AM141	<i>rmIs133</i>	PolyQ-Plaques	<i>rmIs133[unc-54p::Q40::YFP]</i> . Expression von YFP-gekoppeltem Q40 in den Muskelzellen. Zuerst löslich, dann während des Alterns zunehmend aggregierend.
BA17	<i>fem-1(hc17) IV</i>	Lifespan	Steril bei 25 °C.
BZ555	<i>egIs1</i>	Neuroprotektion 6-OHDA	<i>egIs1 [dat-1p::GFP]</i> . Expression von GFP in dopaminergen Neuronen.
CL2006	<i>dvIs2</i>	Aβ-Plaques	<i>dvIs2 [pCL12(unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene) + pRF4]</i> . Expression von Aβ (1-42) in den Muskelzellen. Bildet Aggregate.

Tabelle 2.2 - Fortsetzung

CL2122	<i>dvIs15</i>	Chemotaxis, 5HT-Hypersensibilität (Kontrollstamm)	<i>dvIs15 [(pPD30.38) unc-54(vector) + (pCL26) mtl-2::GFP]</i> . Phänotypisch dem Wildtyp entsprechend.
CL2355	<i>smg-1(cc546) dvIs50 I</i>	Chemotaxis, 5HT-Hypersensibilität	<i>dvIs50 [pCL45 (snb-1::Abeta 1-42::3' UTR(long) + mtl-2::GFP] I</i> . Pan-neuronale Expression von humanem Aβ. Defizitär bzgl. Chemotaxis und assoziativem Lernen. Partiell steril.
CL4176	<i>smg-1(cc546) I; dvIs27 X</i>	Paralyse	<i>dvIs27 [myo-3p::A-Beta (1-42)::let-851 3'UTR) + rol-6(su1006)] X</i> . Temperaturinduzierbare Expression von Aβ (1-42) in den Muskelzellen. Paralyziert aufgrund von Aβ-Toxizität.
CL802	<i>smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II</i>	Paralyse (Kontrollstamm)	Kontrolle für CL4176. Keine Expression von Aβ.
GE24	<i>pha-1(e2123) III</i>	Tau (Kontrollstamm)	Phänotypisch bei 16 °C dem Wildtyp entsprechend. 25 °C lethal für Embryos.
HA759	<i>pqe-1(rt13) III; rtIs11 V</i>	PolyQ-Neurotoxizität	<i>rtIs11 [osm-10p::GFP + osm-10p::HtnQ150 + dpy-20(+)]</i> . Expression von GFP und Huntingtin-Fragment Htn-Q150 in ASH-Neuronen. Nervenzelltod durch PolyQ-Toxizität.
N2	Entspricht dem Wildtyp	Resorption, Wachstum, Toxizität, ROS, Survival	<i>C. elegans</i> var. <i>Bristol</i> . Isoliert aus Pilz-Kompost aus der Nähe von Bristol, England.
NL5901	<i>pkIs2386</i>	α-Synuclein	<i>pkIs2386 [unc-54p::alphasynuclein::YFP + unc-119(+)]</i> . Expression von humanem, YFP-gekoppeltem α-Synuclein in den Muskelzellen.
TJ356	<i>zIs356 IV</i>	DAF-16 Translokation	<i>zIs356 [daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6]</i> . GFP gekoppelt an Transkriptionsfaktor DAF-16.
TJ375	<i>gpIs1</i>	HSP-16.2	<i>gpIs1 [hsp-16.2p::GFP]</i> . GFP gekoppelt an Hitzeschockprotein HSP-16.2.
VH254	<i>pha-1(e2123) III; hdEx81</i>	Tau	<i>hdEx81 [F25B3.3::tau352(PHP) + pha-1(+)]</i> . Expression von humanem, hyperphosphoryliertem Tau in den Motorneuronen.

2.2 Methoden

Alle fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, am Keyence BZ-9000 unter Verwendung einer Quecksilberdampflampe und eines GFP-Filters (Grün fluoreszierendes Protein) durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 480 nm; die Emissionswellenlänge 510 nm. In der Software ImageJ wurden die zu messenden Bereiche der Nematoden einzeln markiert und deren mittlere Pixelhelligkeit bestimmt, welche mit der mittleren Fluoreszenzintensität korreliert.

2.2.1 Extraktion der Droge und Rücklösen der Auszüge

5 hydroethanolische Sideritis-Extrakte wurden von der Fa. Finzelberg wie folgt hergestellt: Pro Lösungsmittel wurden je 2 Auszüge mittels bewegter Mazeration (erschöpfende Extraktion) gewonnen, filtriert und 3 s bei 120 °C uperisiert. Nach Vereinigung zu einem Extrakt und Eindampfung wurden sie auf einen fixen Nativanteil von 70 % eingestellt, in einem Vakuumtrockner getrocknet und zu Pulver vermahlen (Korngröße < 0,315 mm). Diese Trockenextrakte, sowie der selbst hergestellte methanolische Extrakt (folgender Absatz), wurden hausintern, in der Abteilung Qualitätskontrolle, auf den Gehalt von analytischen Leitsubstanzen untersucht (Tabelle 3.1).

5,0 g *Sideritis scardicae herba* (Kapitel 2.1.6) wurden in 100 mL Methanol 24 h lang bei ca. 50 °C unter Rühren mazeriert (Magnetrührer mit Heizplatte). Nach Filtration wurde das Pflanzenmaterial nochmals mit 100 mL Methanol versetzt und unter den gleichen Bedingungen extrahiert. Die filtrierten Auszüge wurden vereinigt und mittels eines Rotationsvakuumverdampfers eingeeengt. Anschließend wurde so lange Stickstoff über das Spissum geleitet, bis Massekonstanz erreicht war. Laut Analyse der Fa. Finzelberg betrug der Trockensubstanzgehalt 79,3 %. Diese Extraktionsmethode sowie Methanol als Auszugsmittel sind in der Arbeitsgruppe üblich, weswegen dieser Extrakt, neben den bereitgestellten hydroethanolischen, in die Testung einbezogen wurde.

Sämtliche Extrakte und Fraktionen wurden unter Berücksichtigung des Trockensubstanzgehaltes oder des Gehaltes an Hilfsstoffen je in DMSO und in 50 % Ethanol (V/V) auf einen Nativanteil von 100 mg/mL rückgelöst. Die Lösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Um Abbauprozesse durch eventuelle Instabilitäten in Lösung zu vermeiden, wurden regelmäßig neue Rücklösungen angefertigt. Die Extrakte an sich wurden unter Ausschluss von Licht bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2 Phytochemische Analyse (durch Fa. Finzelberg)

Die phytochemische Charakterisierung der bereitgestellten Rohextrakte, des selbst hergestellten Methanol-Extraktes sowie der Extraktfraktionen wurde von Mitarbeitern der Finzelberg GmbH & Co. KG durchgeführt. Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde mit einer UV-Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt, welche im Europäischen Arzneibuch (2017), Kapitel 2.8.14 beschrieben ist. Spezifische Polyphenole bzw. -gruppen als analytische Markersubstanzen (Flavonoide, Acteosid, Caffeylchinasäuren) wurden mittels HPLC quantifiziert. Dazu wurde in einem Shimadzu-HPLC-System (Kapitel 2.1.2) eine Luna® C18/2-Säule (250 mm lang; 4,6 mm innerer Durchmesser; 5 µm Partikelgröße) auf 40 °C temperiert. Es wurden je 10 µL auf ca. 5 mg/mL eingestellte Probe injiziert. Die mobile Phase

bestand aus Wasser + 0,1 % H_3PO_4 (H_2O) und Acetonitril + 0,1 % H_3PO_4 (ACN) mit folgendem Gradienten: Von 95 % H_2O / 5 % ACN (0 min) hin zu 50 % H_2O / 50 % ACN in 41 min; 100 % ACN von der 45. bis zur 50. Minute und zurück auf 95 % H_2O / 5 % ACN bis zur 52. Minute. Die Gesamtdauer betrug 65 min mit einer Flussrate von 1,0 mL/min. Die Verbindungen wurden mit Hilfe eines Diodenarraydetektors bei 330 nm detektiert und die Peaks auf Scutellarin, Acteosid oder Chlorogensäure als Kalibriersubstanz berechnet. Zusätzlich wurden die Extrakte bzw. Fraktionen einer Dünnschichtchromatographie (DC) unterzogen. Dazu wurde eine Platte mit Kieselgel 60 F_{254} als stationäre Phase mit Ethylacetat/ Methanol 50:50 (V/V) gereinigt und aktiviert. Nach 30 min Trocknung bei 105 °C und Abkühlen wurden je 10 μL einer Probenlösung aus 1g *S. scardica*-Extrakt in 10 mL 50 % Ethanol (10 min bei 65 °C, Filtrierung) aufgetragen. Die mobile Phase bestand aus Dichlormethan/ Essigsäure/ Methanol/ Wasser 50:25:15:10 (V/V/V/V) und die Laufstrecke betrug 15 cm. Nach der Trocknung im Kaltluftstrom wurde die Platte mit Anisaldehyd-Reagenz (Europäisches Arzneibuch, 2017) besprüht und 3 min bei 120 °C getrocknet.

Die Proben, welche für die Untersuchung des metabolischen Einflusses durch *E. coli* OP50 und der Resorption durch *C. elegans* hergestellt wurden (Kapitel 2.2.6), wurden ebenfalls mit den beschriebenen Methoden via HPLC analysiert. Der einzige Unterschied war die Konzentration der injizierten Extraktlösungen. Diese betrug protokollbedingt maximal 1 mg/mL (in S-Medium) bei der Kontrolle.

2.2.3 Messung des Gesamt-Polyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu)

Für die Untersuchung des metabolischen Einflusses durch *E. coli* OP50 auf die *S. scardica*-Extrakte und der Resorption durch *C. elegans*, wurden die dafür hergestellten Proben (Kapitel 2.2.6) mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz (Lösung aus Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure) kolorimetrisch auf ihren Gesamt-Polyphenolgehalt getestet. Der Test basiert darauf, dass Polyphenole im alkalischen Milieu Elektronen an Molybdato- bzw. Wolframatophosphorsäurekomplexe abgeben, welche spektrophotometrisch erfasst werden (Ainsworth und Gillespie, 2007). Die Reaktion mit anderen reduzierenden Substanzen muss dabei berücksichtigt werden. In eine 96-Well-Platte wurden sowohl je 20 μL einer Gallussäure-Verdünnungsreihe von 5 bis 0 mg/mL als Duplikat, als auch der sterilfiltrierten Proben (so, wie sie vorlagen; 1 mg/mL und weniger) als Triplikat pipettiert. Die Blank-Werte jeder Probe wurden als Duplikate geführt. 5 min nach der Zugabe von 100 μL Folin-Ciocalteu-Reagenz (bzw. Wasser für die Blank-Werte) wurden 80 μL 7,5 % Na_2CO_3 -Lösung in jede Vertiefung gegeben, 60 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 750 nm vermessen. Nur Rohwerte im linearen Bereich des Mikrotiterplattenlesers wurden einbezogen und von jedem Absorptionsmittelwert wurde der Blank-Wert abgezogen um eine mögliche Eigenabsorption der Extraktverdünnungen auszugleichen. Diese Werte wurden anschließend in die Geradengleichung der Gallussäure eingesetzt und die Gallussäure-Äquivalente in [mg GA/g Extrakt] bzw. [mg GA/g Würmer] berechnet.

2.2.4 DPPH-Assay

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) ist ein freies, stabiles Radikal mit dunkelvioletter Farbe und einer starken Lichtabsorption bei 517 nm. Wenn es mit Radikalfängern (Wasserstoffdonatoren) reagiert, wird es zu seiner Hydrazin-Form reduziert, welche bei dieser Wellenlänge nicht mehr absorbiert. Somit ist diese Reaktion photometrisch quantifizierbar. Das sog. DPPH•Scavenging-Assay wurde nach der Methode von Blois (Blois, 1958) mit leichten Modifikationen v. a. im Hinblick auf die 96-Well-Platte durchgeführt. Außerdem wurde für den wässrigen und den 20 % ethanolschen *S. scardica*-Extrakt im gesamten Prozess 50 % Methanol (V/V) an Stelle von reinem Methanol als Lösungsmittel gewählt. Die noch lipophileren Extrakte konnten aus Löslichkeitsgründen überhaupt nicht getestet werden. Als Positivkontrolle wurden Ascorbinsäure und EGCG herangezogen. Gleiche Volumina von Extraktlösung in verschiedenen Konzentrationen und 0,2 mM DPPH-Lösung wurden gemischt (ebenso gleiche Volumina von Extraktlösung und (50 %) Methanol als Blindwert) und nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss von einem Mikrotiterplattenleser bei 517 nm ausgelesen. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde der prozentuale DPPH•Scavenging-Effekt wie folgt ermittelt:

$$\text{DPPH} \bullet \text{ Scavenging} - \text{Effekt [\%]} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} * 100$$

A₀: Absorption von DPPH• ohne Testsubstanz

A₁: Absorption von DPPH• mit Testsubstanz

2.2.5 *C. elegans*: Kultivierung und Alterssynchronisation

Mit den Fadenwürmern wurde in einem S1-Labor gearbeitet, welches in regelmäßigen Abständen gereinigt und dessen Oberflächen mindestens vor und nach jedem Arbeiten mit Antifect® desinfiziert wurde. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde an Sicherheitswerkbänken gearbeitet, die durch einen Luftstrom eine keimarme Umgebung ermöglichen; wenn auch durch die komplett offene Front keine komplett sterilen Bedingungen herrschten. Die temperaturempfindlichen Stämme CL2355, CL2122, CL4176 und CL802 wurden in Brutschränken bei 16 °C aufbewahrt, alle anderen bei 20 °C. Zusätzlich wurden von jedem Stamm sofort nach Empfang der Lieferung Glycerol-Stocks angelegt, welche bei -80 °C lagerten (Stiernagle, 1999). Um mögliche Degenerationen der transgenen Stämme in den Kulturen bei 16 bzw. 20 °C zu vermeiden, wurden regelmäßig und spätestens vor Beginn einer neuen Versuchsreihe die jeweiligen Stämme aus den Kryo-Stocks aufgetaut und mit diesen weitergearbeitet.

Die Würmer wurden auf NGM-Agarplatten (nematode growth medium) kultiviert, auf welche *E. coli* OP50 als Futterquelle gegeben wurde. Hierbei handelt es sich um einen Uracil-auxotrophen *Escherichia coli*-Stamm (Brenner, 1974). Dieser wurde in LB-Medium kultiviert. Eine Übernachtskultur bei 37 °C wurde für den weiteren Gebrauch bei 4 °C

aufbewahrt und auch hier wurden Glycerol-Stocks bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und mindestens aller 3 Monate aufgetaut, um die Gefahr potentieller Kontaminationen zu minimieren. Aliquote der Übernachtskultur wurden auf LB-Agar übertragen, ausplattiert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert um einen gleichmäßigen Bakterienrasen zu erhalten, der in S-Medium resuspendiert wurde (Kapitel 2.2.6). In manchen Versuchen wurde mit abgetöteten, statt mit lebenden Bakterien gearbeitet. In diesem Fall wurden sie in S-Medium für 30 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde stets mit 2 Methoden überprüft, ob das Abtöten erfolgreich war: Im Gegensatz zu lebenden *E. coli* OP50 als Kontrolle, durfte ein über Nacht gebildeter Bakterienrasen auf LB-Agar bei Zugabe eines Tropfens 3 %igen Wasserstoffperoxids keine Blasenbildung zeigen. Zudem wurde der Bakteriensuspension 0,002 % Resazurin zugesetzt und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Im Vergleich zur pinken bis blassrosa Lebendkontrolle musste die Suspension immer noch eine bläuliche Färbung aufweisen. Nur wenn diese beiden Proben erfolgreich waren, wurde die Suspension genutzt.

Um in den Versuchen stets mit Würmern gleichen Alters zu arbeiten, wurden zunächst Eier aus adulten, graviden Tieren mit der „Bleaching“-Methode isoliert. Hierfür wurden sie in 1 % Natriumhypochlorit und 0,5 M Natriumhydroxid in Wasser behandelt bis alle Würmer lysiert waren (max. 10 min). Die Eier wurden mit 1300 U/min 40 s zentrifugiert, mit sterilem Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Versuche starteten entweder mit den so gewonnenen Eiern oder mit synchronisierten L1-Larven. Dafür wurden die Eier 24 h in M9-Puffer ohne Nahrung inkubiert, was sie im L1-Stadium arrestierte.

2.2.6 Behandlung von *C. elegans*

Die Behandlung der Würmer mit den Testsubstanzen erfolgte entweder auf festem oder in flüssigem Medium. Wann immer möglich, wurde die Behandlung aufgrund der Hydrophobie mancher zu testender Extrakte auf NGM-Agar durchgeführt. Dazu wurde die gewünschte Menge Stammlösung der Testsubstanz in eine Suspension von *E. coli* OP50 in S-Medium mit einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} \approx 1$ (entspricht einer Konzentration von ca. $5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^9$ Bakterien/mL) gegeben, kurz homogenisiert und anschließend auf NGM-Agarplatten verteilt. Über Nacht diffundierten die gelösten Stoffe gleichmäßig in den Agar, während darauf ein feiner Bakterienrasen als Futterquelle für die Fadenwürmer zurückblieb. Die Protokolle mancher Versuche ließen diese Methode jedoch nicht zu (da z. B. nachträglich Substanzen ergänzt werden mussten). In diesen Fällen wurden die Würmer über den Versuchsverlauf in einer Flüssigkultur von S-Medium mit *E. coli* OP50 ($\text{OD}_{600} \approx 1$) gehalten, in welche direkt die gewünschte Menge Stammlösung gegeben wurde. Das geschah stets nach 24 h nach der Isolation der Eier; zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Larven im L2-Stadium. In manchen Versuchen wurden die Bakterien vorher, wie oben beschrieben, abgetötet.

Wann immer möglich wurde DMSO als Lösemittel für die Stammlösungen der Extrakte und Substanzen gewählt. In Versuchen, bei denen DMSO in Orientierungsversuchen selbst schon eine Wirkung zeigte, wurde auf 50 % Ethanol (V/V) zurückgegriffen. In keinem Fall und unabhängig von der Behandlungsmethode betrug die maximale Konzentration von DMSO in den Kulturen über 1 % (V/V). Bei Ethanol gilt selbiges für $> 0,5\%$. In welchen Versuchen welche Methode der Behandlung bzw. welches Lösemittel genutzt wurde, ist entsprechender Stelle zu entnehmen (Methoden bzw. Ergebnisse). In jedem Versuch wurden verschiedene Negativkontrollen getestet, um auszuschließen, dass irgendein Bestandteil der

Extraktzubereitungen bereits eine Wirkung zeigt. Diese Kontrollen leiten sich von den Hilfsstoffen der Extrakte ab: unbehandelt, Lösemittelkontrolle, Lösemittel mit Maltodextrin und Lösemittel mit Maltodextrin und SiO₂ (Tabelle 3.1). Die Hilfsstoffe wurden entsprechend in DMSO oder 50 % Ethanol gelöst und in einer Konzentration getestet, die dem Gehalt an Hilfsstoffen in der höchsten getesteten Extraktkonzentration in der Kultur entsprach.

Um den metabolischen Einfluss auf die Sideritis-Extrakte durch *E. coli* OP50 zu untersuchen, wurden folgende Proben hergestellt: Reines S-Medium als Kontrolle, 1 mg/mL des 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes (EtOH20) in S-Medium, 1 mg/mL EtOH20 mit lebenden oder abgetöteten *E. coli* OP50 (OD₆₀₀≈1). Nach 2 Tagen Inkubation bei 20 °C (typisch für die meisten durchgeführten *C. elegans*-Assays) wurden die Ansätze 1 min mit Ultraschall (OmniRuptor) behandelt, um die Bakterien aufzubrechen, damit resorbierte, aber noch nicht verstoffwechselte Substanzen nicht verloren gingen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13.000 U/min für 5 min wurden die Überstände sterilfiltriert. Für die Untersuchung der Resorption der Extraktivstoffe durch *C. elegans* wurden zusätzlich folgende Proben hergestellt: Wurmlysat aus Agar-Behandlung (L1-Larven des Stammes N2 für 2 Tage bei 20 °C auf NGM-Agar mit 1 mg/mL EtOH20 + *E. coli* OP50), Wurmlysat aus Flüssig-Behandlung (N2-Eier in S-Medium + *E. coli* OP50 OD₆₀₀=1, am 2. Tag Behandlung mit EtOH20 1 mg/mL für 2 Tage bei 20 °C) und das übrige Medium aus dieser Flüssig-Behandlung. Die Würmer wurden nach der Inkubation je 3 Mal mit H₂O gewaschen, unter N₂ bis zur Massekonstanz (ca. 3 h) getrocknet, gewogen, in S-Medium aufgenommen (10 mg/mL) und mit Ultraschall behandelt bis keine Wurmfragmente unter dem Stereomikroskop mehr sichtbar waren, danach 2 Mal für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Das von den Würmern befreite S-Medium + EtOH20 + *E. coli* aus der Flüssig-Behandlung wurde ebenfalls ultraschallbehandelt, zentrifugiert und sterilfiltriert. Tote *E. coli* führten bei diesem Versuchsaufbau zu kleineren Fadenwürmern und deutlich geringerer Trockenmasse, weswegen sie nicht einbezogen wurden. Sämtliche Proben wurden auf ihren Gesamt-Polyphenolgehalt hin (Kapitel 2.2.3) und mittels HPLC (Kapitel 2.2.2) analysiert.

2.2.7 Wachstumskontrolle

Um sicherzustellen, dass die getesteten Substanzen in den gewählten Konzentrationen keine negativen Effekte auf die Fadenwürmer bzw. deren Entwicklung haben (z. B. antimikrobielle oder toxische Eigenschaften), wurde das Wachstum der Würmer in Gegenwart der Testsubstanzen bewertet. Im Vorfeld wurden bereits Orientierungsversuche unternommen, um die höchst mögliche Konzentration (= für Würmer noch verträglich) jeder Testsubstanz abzuschätzen. Diese Maximalkonzentrationen wurden in diesem Experiment verwendet, um einen möglichen, statistisch signifikanten, Einfluss auf die Größe der Tiere festzustellen.

Untersucht wurden beide Verfahren der Behandlung. Für die Methode im Flüssigmedium wurden die isolierten Eier des Stammes N2 in S-Medium mit *E. coli* OP50 gegeben, nach 24 h bei 20 °C die gewünschten Volumina der Stammlösungen (in 50 % Ethanol) der zu testenden Stoffe hinzugefügt und nach weiteren 72 h wurden die Würmer gewaschen, mit 10 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Mikroskop mit der BZ-II Analyser-Software von Keyence vermessen (Körperlänge). Für die Methode mit festem Medium wurden die Eier 24 h bei 20 °C in M9-Puffer kultiviert, die L1-Larven dann auf

vorbereitete NGM-Agarplatten transferiert und nach 72 h wie beschrieben ausgewertet. Die Inkubationszeiten entsprechen der typischen Aufenthaltsdauer der Würmer im bzw. auf dem Medium in den meisten durchgeführten Experimenten.

Zusätzlich wurde versucht, in Agardiffusionstests eine antibakterielle Wirkung auf die Futterquelle der Würmer auszuschließen. Dafür wurden Petrischalen mit LB-Agar mit 250 µL einer *E. coli* OP50-Suspension in LB-Medium ($OD_{600} = 0,1$) bedeckt. Nach Ausstanzen von Löchern mit einer Pasteurpipette wurden je 50 µL Lösung der Testsubstanzen in die Vertiefungen gegeben. Diese Lösungen wurden zuvor durch Verdünnen der DMSO-Stammlösungen in S-Medium hergestellt und wiesen ebenfalls die höchsten in den *C. elegans*-Experimenten verwendeten Konzentrationen auf. Nach 24 h bei 37 °C wurden die LB-Platten begutachtet. Der Durchmesser der Hemmhöfe um die Löcher wurde gemessen; als Positivkontrolle diente Ampicillin (500 µg/mL), welches pro Versuch mindestens als Triplikat auf verschiedenen LB-Platten aufgetragen wurde.

2.2.8 Toxizitätskontrolle

In diesem Versuch wurden sehr hohe Konzentrationen (bis 5 mg/mL) der *Sideritis scardica*-Extrakte auf potentielle letale Effekte auf *C. elegans* untersucht. Würmer im L2-Stadium wurden im Flüssigmedium mit den Extrakten behandelt und nach 24 h bei 20 °C wurden die überlebenden Tiere gezählt. Die Würmer wurden als tot deklariert, wenn sie auf mehrmalige physische Reize mit einem Platindraht nicht reagierten. Als Positivkontrollen wurden 80 µM Juglon (einem Prooxidans aus dem Walnussbaum, *Juglans regia*) und Nicotin als bekanntes Toxin für den Menschen verwendet.

2.2.9 Intrazelluläre ROS-Belastung

Der Begriff „oxidativer Stress“ beschreibt den Zustand der Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies bei unzureichender antioxidativer Verteidigung. Aber auch unter physiologischen Bedingungen ist immer eine gewisse Menge ROS in den Zellen vorhanden. Der Einfluss von Testsubstanzen auf dieses basale, intrazelluläre ROS-Level kann durch Einsatz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (H_2DCFDA) quantifiziert werden. Dieser Farbstoff ist in seiner reduzierten Form farblos, stabil und membranpermeabel. Innerhalb der Zelle wird die Diacetat-Gruppe durch Hydrolyse abgespalten (H_2DCF verbleibt in Zelle) und durch oxidative Vorgänge entsteht schließlich das fluoreszierende DCF (*Kalyanaraman et al.*, 2012).

L2-Larven des Stammes N2 wurden im Flüssigmedium mit den Extrakten in den jeweiligen Maximalkonzentrationen (Kapitel 2.2.7) bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle behandelt. Nach 48 h bei 20 °C wurde H_2DCFDA in einer Konzentration von 50 µM hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde bei 20 °C im Dunklen wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 10 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden ca. 20 Tiere pro Behandlungsgruppe fotografiert und mit Hilfe der ImageJ-Software die mittleren Fluoreszenzintensitäten der gesamten Wurmkörper bestimmt.

2.2.10 Einfluss auf die Expression von HSP-16.2

Das Hitzeschockprotein HSP-16.2 ist ein Chaperon, welches unter Stressbedingungen exprimiert wird. Der transgene *C. elegans*-Stamm TJ375 bildet durch das *hsp-16.2::GFP*-Konstrukt ein an GFP gekoppeltes Protein, wodurch die Expression unter Stressbedingungen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden kann. Oxidativer Stress wurde hier mit Juglon induziert. Bei der gleichzeitigen Behandlung mit antioxidativ wirksamen Substanzen kann das Ausmaß der Expression sinken.

L2-Larven des Stammes TJ375 wurden im Flüssigmedium mit den Extrakten in den jeweiligen Maximalkonzentrationen (Kapitel 2.2.7) bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle behandelt. Nach 48 h bei 20 °C wurde 20 µM Juglon hinzugegeben und nach weiteren 24 h wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 10 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden ca. 20 Tiere pro Behandlungsgruppe fotografiert und mit Hilfe der ImageJ-Software die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Kopfbereiche bestimmt.

Um zu prüfen, ob *Sideritis scardica* selbst die Expression von HSP-16.2 induziert und somit evtl. über prooxidative oder hormetische Eigenschaften verfügt, wurde dieses Experiment dahingehend abgewandelt, dass die Würmer statt im L2-Stadium, erst am ersten Tag des Erwachsenseins behandelt wurden (anstelle der Zugabe von Juglon). Getestet wurden die mittelpolaren Extrakte, nämlich 200 µg/mL EtOH50 und 1000 µg/mL EtOH20 sowie 20 µM Juglon als Positivkontrolle gegen eine unbehandelte Negativkontrolle. Nach 24 h wurde dann verfahren, wie oben beschrieben.

2.2.11 Translokation von DAF-16

DAF-16 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression vieler Stressresistenzgene reguliert. Normalerweise liegt er im Cytoplasma vor. Wird der Wurm jedoch gestresst bzw. induziert eine Substanz den Signalweg, wandert DAF-16 in die Zellkerne. Im transgenen *C. elegans*-Stamm TJ356 ist dies fluoreszenzmikroskopisch sichtbar, da durch ein *daf-16::GFP*-Konstrukt das grün fluoreszierende Protein an den Transkriptionsfaktor gekoppelt ist. Es sind dann entweder eine gleichmäßige grüne Färbung der Würmer (DAF-16 im Cytoplasma) oder kleine Punkte (Zellkerne) sichtbar (Henderson und Johnson, 2001).

Eier des transgenen Stammes wurden in S-Medium mit *E. coli* OP50 gegeben und nach 24 h bei 20 °C mit den Extrakten in den maximal möglichen Konzentrationen (Kapitel 2.2.7) behandelt. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Dunkeln bei 20 °C wurden die Würmer gesammelt, mit 10 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. 20 bis 25 Würmer pro Behandlungsgruppe wurden bewertet. Waren die Zellkerne deutlich zu sehen, wurden die Würmer als positiv gewertet; bei gleichmäßiger Grünfärbung als negativ. Würmer in einem Zwischenzustand wurden ebenfalls erfasst. Als Positivkontrollen wurden 20 µM Juglon, 100 µg/mL EGCG und thermischer Stress genutzt. Dazu wurde die Kultur bei 37 °C für 15 min inkubiert.

2.2.12 Survival-Assay

In diesem Experiment wurden die Fadenwürmer einer tödlichen Dosis Juglon ausgesetzt; die gleichzeitige Behandlung mit antioxidativ wirksamen Verbindungen kann die Überlebensrate

erhöhen. L2-Larven des Stammes N2 wurden im Flüssigmedium mit den Extrakten in den jeweiligen Maximalkonzentrationen (Kapitel 2.2.7) bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle behandelt. Nach 48 h bei 20 °C wurde 80 µM Juglon hinzugegeben und nach weiteren 24 h wurden die überlebenden Tiere gezählt. Die Würmer wurden als tot deklariert, wenn sie auf mehrmalige physische Reize mit einem Platindraht nicht reagierten.

2.2.13 Lifespan-Assay

Um zu überprüfen, ob hydroalkoholische *S. scardica*-Extrakte einen allgemeinen Einfluss auf die Lebenserwartung von *C. elegans* haben, wurden die Würmer über ihre gesamte adulte Lebensphase damit behandelt und gegen eine Lösemittelkontrolle verglichen.

Isolierte Eier des Stammes BA17 wurden in S-Medium mit *E. coli* OP50 gegeben und nach 72 h bei 25 °C entweder mit 800 µg/mL EtOH20, 200 µg/mL EtOH50 oder 0,4 % Ethanol behandelt. Jede Population bestand aus 100 Individuen. Alle 48 h wurden die noch lebenden Tiere jeder Population in frisches Medium, entsprechend ihrer Behandlung, transferiert. Die Würmer wurden als tot deklariert, wenn sie auf mehrmalige physische Reize mit einem Platindraht nicht reagierten. Tiere, die nicht eines natürlichen Todes starben (z. B. Verletzungen durch Platindraht), wurden gesondert gewertet. Als Vergleichswert wurde die mittlere Lebensdauer herangezogen.

2.2.14 Quantifizierung von A β -Plaques

Der transgene *C. elegans*-Stamm CL2006 exprimiert konstitutiv A β (1-42) in den Muskelzellen. Die Peptide bilden Aggregate, welche angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden können.

Die isolierten Eier wurden in S-Medium mit *E. coli* OP50 gegeben und die geschlüpften Larven nach 48 h bei 16 °C auf verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen, bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle, enthaltende NGM-Platten transferiert. Dort verblieben sie für 4 Tage bei 16 °C, dann wurden sie mit einer 4 %igen Paraformaldehydlösung von den Agarplatten in Reagiergefäße gespült und für 24 h bei 4 °C aufbewahrt. Nach Ersetzen dieser Lösung durch eine Permeabilisierungslösung (5 % β -Mercaptoethanol, 1 % Triton® X-100) und 24 h bei 37 °C wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit PBS 1x gewaschen, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger transferiert und luftgetrocknet. Die Plaques wurden daraufhin mit 0,0125 % Thioflavin S (m/V) in 50 % Ethanol (V/V) 1 min lang angefärbt. Es bindet an die Amyloidfibrillen, nicht jedoch an Monomere. Die überschüssige Lösung wurde durch zweimaliges Entfärben in 50 % Ethanol für je 1 min entfernt. Dann wurden die A β -Aggregate im Kopfbereich von 20-25 Individuen pro Behandlungsgruppe unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt.

2.2.15 Paralyse-Assay (A β -Toxizität)

Um die Wirkung auf die A β -Toxizität zu testen, wurde der von Dostal und Link (2010) beschriebene Paralyse-Assay genutzt. Der transgene *C. elegans*-Stamm CL4176 exprimiert, ähnlich wie CL2006, humanes A β (1-42) in den Muskelzellen, aber nicht konstitutiv, sondern temperaturinduzierbar durch eine *smg-1*-Mutation. Der Kontrollstamm CL802 besitzt ebenfalls diese Mutation am *smg-1*-Gen, aber kein A β -Minigen. Er dient dazu, aufzuzeigen,

dass die Paralyse der Würmer ausschließlich auf der schädigenden Wirkung von A β beruht und nicht auf etwaigen Effekten durch die Behandlung der Würmer oder Verbindungen in den Extrakten.

Je ca. 100 isolierte Eier wurden auf NGM-Agarplatten transferiert, die mit den Extrakten bzw. EGCG (100 μ g/mL) als Positivkontrolle behandelt und mit *E. coli* OP50 bedeckt waren. Nach 48 h Inkubation bei 16 °C (Larvenstadium L3-L4) wurde die Temperatur auf 25 °C angehoben. Am nächsten Tag wurden über einen Zeitraum von 12 h mindestens alle 2 h die paralytisierten Würmer gezählt und entfernt, um ein erneutes Werten zu vermeiden. Die Tiere wurden als paralytisiert deklariert, wenn sie auf mehrmalige physische Reize mit einem Platindraht nicht oder nur teilweise reagierten (z. B. nur den Kopf bewegten). Als Vergleichswert wurde der Median (PT₅₀) herangezogen, also der Zeitpunkt, an dem exakt 50 % der Fadenwürmer paralytisiert waren.

2.2.16 Chemotaxis-Assay und Einfluss auf die Serotonin-Hypersensibilität

Degenerative A β -Spezies können Nervenzellen schädigen und eine Dysfunktion von neuronal kontrolliertem Verhalten auslösen. Der transgene *C. elegans*-Stamm CL2355 exprimiert temperaturinduzierbar pan-neuronal humanes A β (1-42). Das führt u. a. zu Störungen im chemotaktischen Verhalten der Würmer sowie in der Serotonin (5HT)-vermittelten Neurotransmission. Der Kontrollstamm CL2122 exprimiert keine β -Amyloidpeptide und zeigt keine Verhaltensstörungen.

Für den Chemotaxis-Assay wurden die isolierten Eier auf verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen, bzw. 100 μ g/mL EGCG als Positivkontrolle, enthaltende NGM-Platten transferiert. Nach 36 h bei 16 °C (*C. elegans* noch im Larvenstadium) wurde die Temperatur auf 23 °C angehoben und weitere 36 h inkubiert. Die Würmer wurden gesammelt und 3 Mal sorgfältig mit M9-Puffer gewaschen, um sicherzugehen, dass keine verbleibenden *E. coli*-Bakterien das Verhalten der Würmer beeinflussen. Ca. 20 Würmer pro Behandlungsgruppe wurden dann auf die Mitte einer 100 mm großen Testagarplatte (enthalten kein NaCl, Trypton und Cholesterin, um Störungen der chemotaktischen Bewegung zu vermeiden) pipettiert. Auf gegenüberliegende Punkte wurde 1 μ L 1 M Natriumazid gegeben um die Würmer zu immobilisieren, sobald sie dieses Gebiet erreichten. Sobald die Flüssigkeit um die Würmer herum verdunstet bzw. vom Agar aufgenommen wurde, wurde auf einen der genannten Punkte 1 μ L 0,1 % (V/V) Benzaldehyd (BA) in Ethanol als Anlockungsmittel und auf den anderen 1 μ L Ethanol als Kontrolle gegeben. Die Agarplatten wurden dann umgedreht und bei 23 °C für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Würmer auf beiden Seiten gezählt. Gewertet wurden die Würmer für eine Seite, wenn sie sich in einem Radius von 2 cm um die Punkte des Attraktans bzw. von Ethanol befanden:

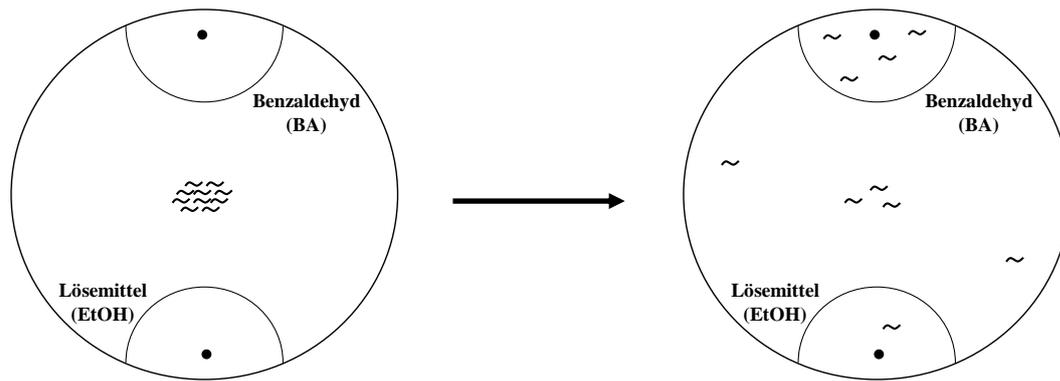


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Verteilung der Würmer im Chemotaxis-Assay.

Der Chemotaxis-Index (CI) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$CI = \frac{\text{Wurmanzahl bei BA} - \text{Wurmanzahl bei EtOH}}{\text{Gesamtzahl Würmer auf der Platte}}$$

Der Stamm CL2355 zeigt neben dem gestörten chemotaktischen Verhalten noch eine weitere Besonderheit: Er reagiert überempfindlich auf exogenes Serotonin, welches *C. elegans* aus der Umgebung aufnehmen kann (Sawin *et al.*, 2000). CL2122 reagiert nicht hypersensibel und paralyisiert in geringerem Ausmaß.

Für dieses Experiment wurde zunächst exakt so verfahren wie im Chemotaxis-Assay (siehe oben). Nach dem Waschen der Würmer wurden dann ca. 20 Individuen pro Behandlungsgruppe in 1 mM Serotonin-Lösung in M9-Puffer gegeben und nach 5 min der Anteil an aktiven Wümmern bestimmt. Die Würmer wurden als paralyisiert (nicht aktiv) deklariert, wenn sie sich mindestens 5 s nicht bewegten.

2.2.17 Beeinflussung von Tau-induzierter Bewegungsstörung

Die Expression von humanem, hyperphosphoryliertem Tau-Protein in den Motorneuronen des *C. elegans*-Stammes VH254 führt zu unkoordinierten Bewegungen der Würmer (uncoordinated movement, Unc). Die pharmakologische Beeinflussung des Ausmaßes dieser Verhaltensstörung wurde in diesem Experiment untersucht. Als Kontrollstamm wurde GE24 herangezogen, welcher kein Tau exprimiert.

Synchronisierte L1-Larven beider Stämme wurden auf NGM-Platten gegeben, welche mit *E. coli* OP50 als Futterquelle bedeckt waren. Am nächsten Tag, als die Würmer sich etwa im Stadium L3/ L4 befanden, wurden sie auf NGM-Platten transferiert, welche neben den Testsubstanzen in den gewünschten Konzentrationen noch 0,04 mg/mL FUDR enthielten, was die Produktion von Nachwuchs verminderte. So konnte ein Verwechseln der Generationen verhindert werden. Die Würmer wurden so insgesamt 10 Tage lang bei 20 °C inkubiert, wobei sie aller 3 Tage (im letzten Schritt 4 Tage) auf frische NGM-Platten mit Testsubstanz und FUDR transferiert wurden. Dann wurden pro Behandlungsgruppe etwa 30 – 40 Individuen nach dem Bewegungsverhalten bewertet. Zeigten sie eine partielle Paralyse (z. B. ausschließliche Bewegung des Kopfes oder Schwanzes) oder andere Auffälligkeiten (z. B.

keine typische sigmoidale Fortbewegung), wurden sie als unkoordiniert gewertet. Tote Würmer wurden von der Wertung ausgeschlossen.

2.2.18 Einfluss auf die Aggregation von α -Synuclein und dadurch bedingte Fettablagerungsstörungen

Der transgene Stamm NL5901 exprimiert humanes α -Synuclein, an welches YFP (gelb fluoreszierendes Protein) gekoppelt ist, in den Muskelzellen. Dies ermöglicht eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Aggregation dieses Proteins. Synchronisierte L1-Larven dieses Stammes wurden auf NGM-Platten transferiert, welche verschiedene Konzentrationen der Extrakte enthielten. Die Fadenwürmer verblieben dort für 96 h bei 20 °C, wurden danach gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 100 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden ca. 20 Tiere pro Behandlungsgruppe fotografiert und mit Hilfe der ImageJ-Software die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Kopfbereiche bestimmt.

Die aggregierten α -Synuclein-Proteine interagieren auf vielfältige Art und Weise mit Lipiden und können Einfluss auf Fettablagerungen haben (Ruiperez *et al.*, 2010). Diese können mit Nilrot angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden. Für dieses Experiment wurde ähnlich verfahren, wie oben erwähnt. Die NGM-Agarplatten enthielten aber neben den verschiedenen Konzentrationen an *Sideritis scardica*-Extrakten noch Nilrot. Dafür wurde bei der Vorbereitung der Platten neben dem gewünschten Volumen an Extraktlösung eine Nilrot-Stammlösung (0,5 mg in 1 mL Aceton) in die *E. coli* OP50-Suspension im Verhältnis 1 : 250 gegeben, bevor sie auf dem NGM-Agar verteilt wurde. Die Würmer nahmen es also während der viertägigen Inkubationszeit auf. Beim Life-Imaging unter dem Keyence BZ-9000-Fluoreszenzmikroskop wurde dann statt des GFP-Filters ein Texas-Red-Filter gewählt (Anregungswellenlänge: 580 nm; Emissionswellenlänge: 610 nm). Es wurden ca. 20 Tiere pro Behandlungsgruppe fotografiert und mit Hilfe der ImageJ-Software die mittleren Fluoreszenzintensitäten der gesamten Wurmkörper bestimmt.

Da die Würmer (auch neu bestellte Chargen) später begannen, Verhaltensänderungen, wie das „bagging“, zu zeigen und dem durch keine Protokolländerungen bzw. alternativen transgenen Stämme begegnet werden konnte, konnten diese Versuche nicht mehr zur Testung von Extraktfraktionen und Reinstoffen herangezogen werden.

2.2.19 Protektion dopaminerger Neuronen vor 6-OHDA-induzierter Degeneration

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) schädigt dopaminerge Neuronen und wird in verschiedenen Tiermodellen genutzt, um Parkinsonismus zu induzieren. Das ist auch in *C. elegans* möglich (Nass *et al.*, 2002). Der transgene Stamm BZ555 exprimiert GFP in den dopaminergen Neuronen; so lässt sich die 6-OHDA-induzierte Neurodegeneration, bzw. die Verminderung dieser, fluoreszenzmikroskopisch quantifizieren.

Arrestierte L1-Larven dieses Stammes wurden auf NGM-Platten transferiert, die verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen enthielten. Nach 24 h (L3-Stadium) bei 20 °C wurden die Würmer gesammelt und in 24-Well-Platten transferiert, die eine *E. coli*

OP50-Suspension in S-Medium mit den Testsubstanzen in den gleichen Konzentrationen wie die NGM-Platten enthielten. Außerdem wurden 6-OHDA (50 mM) und Ascorbinsäure (20 mM) hinzugefügt. Zusätzlich zu den verschiedenen Negativkontrollen (unbehandelt/ Lösemittel/ Hilfsstoffe, je + 6-OHDA und Ascorbinsäure) wurde eine weitere Kontrolle hinzugefügt: Diese Würmer blieben unbehandelt und wurden auch nicht dem 6-OHDA ausgesetzt; nur die Ascorbinsäure wurde dem Flüssigmedium hinzugefügt. Die Würmer wurden dann unter Ausschluss von Licht für 3 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt (Mikrotiterplattenschüttler MTS 4, Geschwindigkeit 100). Die Tiere wurden wieder gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen und auf frische NGM-Platten transferiert, die neben den verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen auch 0,04 mg/mL FUDR (5-Fluoro-2'-deoxyuridin) enthielten. Dieser Thymidylatsynthasehemmer (Antimetabolit) sorgt dafür, dass sich die *C. elegans*-Embryonen bzw. Larven nicht mehr entwickeln können. Somit wurde eine Verwechslung der ursprünglich behandelten Tiere mit deren Nachwuchs vermieden. Nach 72 h bei 20 °C wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 100 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden 10-15 Tiere pro Behandlungsgruppe fotografiert und mit Hilfe der ImageJ-Software die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Kopfbereiche mit dopaminergen Neuronen bestimmt. Die absoluten Werte wurden dann mit Hilfe der komplett unbehandelten Kontrolle in Relation gesetzt.

2.2.20 Quantifizierung von PolyQ-Plaques

Der transgene *C. elegans*-Stamm AM141 exprimiert Q40, an welches YFP gekoppelt ist, in den Muskelzellen. Das ist ein Peptid aus 40 Glutamin-Einheiten. Zunächst löslich, aggregiert es während der Alterung der Würmer zunehmend. Die sich klar abgrenzenden Aggregate können fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden.

Synchronisierte L1-Larven wurden auf verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen, bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle, enthaltende NGM-Platten transferiert. Nach 48 h bei 20 °C wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 100 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die gebildeten polyQ-Plaques im gesamten Körper von ca. 15 Tieren pro Behandlungsgruppe wurden gezählt.

2.2.21 Bewertung der PolyQ-Neurotoxizität

Um eine Wirkung auf die Neurotoxizität von PolyQ-Peptiden zu prüfen, wurde der transgene *C. elegans*-Stamm HA759 genutzt, welcher GFP und das Huntingtin-Fragment Htn-Q150 (150 Glutamin-Wiederholungen) in den ASH-Neuronen (Amphid-Neuronen, sensorisch) exprimiert. So lässt sich der Zustand der Nervenzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilen.

Synchronisierte L1-Larven wurden auf verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen, bzw. 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle, enthaltende NGM-Platten transferiert. Nach 72 h bei 16 °C wurden die Würmer gesammelt, 2 Mal mit M9-Puffer gewaschen, mit 100 mM Natriumazid immobilisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Pro Behandlungsgruppe wurden 25-30 Tiere bzgl. des Zustandes der ASH-Neuronen im Kopfbereich bewertet. Zeigte sich eine bilaterale Fluoreszenz der ASH-

Neuronen, wurden diese als nicht geschädigt gezählt. Zeigte sich eine unilaterale Fluoreszenz, wurden sie als tot gewertet (Zhang *et al.*, 2012).

2.2.22 Prüfung auf Korrelation der Ergebnisse

Die gemessenen Endwerte der *C. elegans*-Experimente, die die Aggregation von verschiedenen Peptiden bewerten, wurden graphisch gegeneinander aufgetragen. Hinzugezogen wurden, insofern vorhanden, die Ergebnispaare der unbehandelten Negativkontrolle, der *Sideritis scardica*-Trockenextrakte in sämtlichen getesteten Konzentrationen und die der Extraktfraktionen. Ziel war dabei, herauszufinden, ob die Behandlung mit einer Zubereitung aus *S. scardica* die Aggregation eines Peptids umso stärker inhibiert, je stärker sie es bei einem anderen Peptid tut. Im Programm SigmaPlot wurde in einem linearen Regressionsmodell das Bestimmtheitsmaß R^2 bzw. der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. War dieser bei einem Konfidenzintervall von 95 % signifikant, wurde eine Korrelation zwischen den beiden betrachteten Effekten deklariert.

2.2.23 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens 3 Mal in unabhängiger Art und Weise wiederholt. Alle aufgezeigten Daten stellen den Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) dar. Die Behandlungen wurden mit der jeweiligen Negativkontrolle in einem Student-t-Test (zweiseitige Verteilung, ungepaart, gleiche Varianz) bzw. einer ANOVA (one-way analysis of variance) mit Bonferroni-Korrektur verglichen (je nach Eignung). Die Ergebnisse wurden als „signifikant“ (*) gewertet, wenn der p-Wert $< 0,05$ betrug. Als weitere Stufen wurden „sehr signifikant“ (**; $p < 0,01$) und „hochsignifikant“ (***; $p < 0,001$) unterschieden. Eine Dosis- bzw. Konzentrationsabhängigkeit wurde nur dann deklariert, wenn sich die Mittelwerte von mindestens 2 verschiedenen Konzentrationen von mindestens einer Testsubstanz signifikant unterschieden. Die relativen EC_{50} -Werte des DPPH-Assays wurden in SigmaPlot mit Hilfe einer logistischen Regressionskurve mit 4 Parametern berechnet. Die Mediane im Paralyse-Assay (PT_{50}) sowie die mittlere Lebensdauer im Lifespan-Assay wurden durch eine Kaplan-Meier-Analyse der Rohdaten in SigmaPlot berechnet (Kaplan-Meier survival analysis; log-rank test). Die so erhaltenen Werte wurden dann, wie beschrieben, mit einem t-Test auf Signifikanz geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Phytochemische Analyse (Fa. Finzelberg)

Die analytischen Untersuchungen der *S. scardica*-Extrakte sowie Fraktionen wurden von der Finzelberg GmbH & Co. KG durchgeführt. Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde mit einem Verfahren nach Folin-Ciocalteu bestimmt; die Konzentration an Flavonoiden, Acteosid und Caffeoylchinasäuren mittels einer HPLC-Methode (Kapitel 2.2.2). Zusätzlich konnten unterschiedliche Gehalte mittels Dünnschichtchromatographie visualisiert werden.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der bereitgestellten und selbst hergestellten *S. scardica*-Extrakte. N/A: nicht vorhanden bzw. nicht gemessen; TS: Trockensubstanzgehalt

Abkürzung	H ₂ O	EtOH20	EtOH40	EtOH50	EtOH70	MeOH
Auszugs- mittel	Wasser	20 % Ethanol (V/V)	40 % Ethanol (V/V)	50 % Ethanol (V/V)	70 % Ethanol (V/V)	Methanol
Menge / Temperatur	1+18 und 1+8, 80 °C	1+18 und 1+8, 50 °C	1+14 und 1+8, 45 °C	1+14 und 1+8, 45 °C	1+14 und 1+8, 45 °C	2x(1+20), 50 °C
DEV nativ	5,8 : 1	5,8 : 1 (7,2 : 1 nach zusätzlicher Umfällung)	4,7 : 1	5,7 : 1	5,7 : 1	7,3 : 1
Zusammen- setzung	70 % nativ 30 % Maltodextrin	70 % nativ 30 % Maltodextrin	70 % nativ 25 % Maltodextrin 5 % SiO ₂	70 % nativ 25 % Maltodextrin 5 % SiO ₂	70 % nativ 25 % Maltodextrin 5 % SiO ₂	100% nativ
ChargenNr.	UB 2013-96	UB2013-108	UB 2015-70	UB 2013-94	UB 2013-95	N/A
Wasser- gehalt [%] nach KFT	5,4	1,9	4,3	1,8	2,5	N/A (79,3 % TS)
Poyphenole [%] UV nach Folin	5,07	6,25	9,28	6,23	7,37	13,05
Flavonoid- Derivate [%] HPLC	0,59	1,18	2,42	2,03	2,82	7,00
Acteosid [%] HPLC	0,12	0,41	1,41	0,94	1,54	1,60
Caffeoyl- chinasäuren [%] HPLC	0,24	0,47	0,39	0,38	0,49	Nicht nachweisbar

In der Reihe der hydroethanolischen Extrakte stieg prinzipiell der Gehalt aller quantifizierten Verbindungen mit steigendem Anteil an Ethanol (sinkender Polarität) des Auszugsmittels (Tabelle 3.1). Auffällig war dabei allerdings der hohe Gesamtpolyphenolgehalt des 40 % ethanolischen Extraktes im Vergleich zu 50 und 70 %. Die stärkste Aufkonzentrierung von Wasser zu 70 % Ethanol als Extraktionsmittel war bei Acteosid zu erkennen. Hier stieg die Konzentration um fast das 13fache. Auch dünn-schichtchromatographisch ließ sich der höhere Gehalt an polyphenolischen Verbindungen (Flavonoide Rf 0,3 – 0,5 und Lamiaceen-Gerbstoffe Rf 0,7 – 0,8) in den lipophileren Extrakten nachvollziehen (Abbildung 3.1, **A**). Reines Methanol entspricht ungefähr der Lipophilie von 40-50 % Ethanol. Die hohen Konzentrationen der Polyphenole im entsprechenden Auszug erscheinen daher im Vergleich zu EtOH40 und EtOH50 überraschend. Obwohl versucht wurde, ähnliche Extraktionsbedingungen zu schaffen, ist dieser Extrakt keineswegs vergleichbar mit den hydroethanolischen, welche von der Fa. Finzelberg in industriellen Maßstäben, mit einem anderen Verfahren, mit anderer Ausrüstung usw. produziert wurde. Nichtsdestotrotz wies der methanolische *S. scardica*-Extrakt den größten Gehalt an Flavonoiden, Acteosid und Polyphenolen insgesamt auf, während Caffeoylchinasäuren nicht quantifiziert werden konnten. Beispielhaft dargestellt ist ein Chromatogramm des 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes (Abbildung 3.2). Zu erkennen ist, dass zuerst die CCS-Verbindungen eluiert werden, gefolgt von Acteosid und den Flavonoiden. Abgesehen von absoluten Peakhöhen und -flächen ähnelten die Chromatogramme der anderen Sideritis-Auszüge diesem immens, was einerseits die Reproduzierbarkeit der Methode, andererseits den kontinuierlichen Konzentrationsanstieg aller analysierten Verbindungen (Relation zueinander) mit steigender Lipophilie des AZMS unterstreicht.

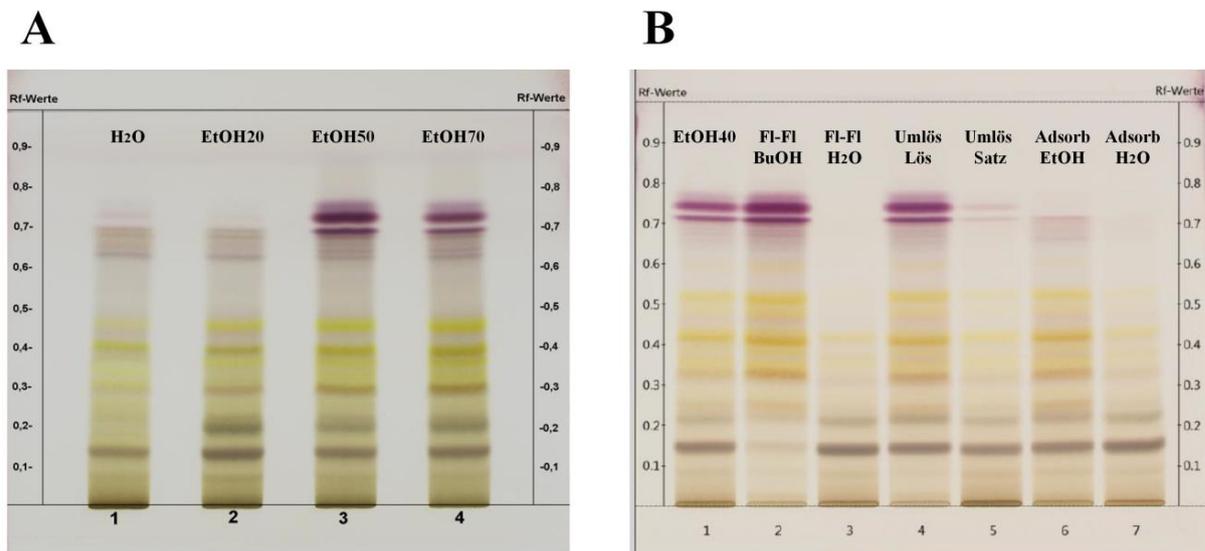
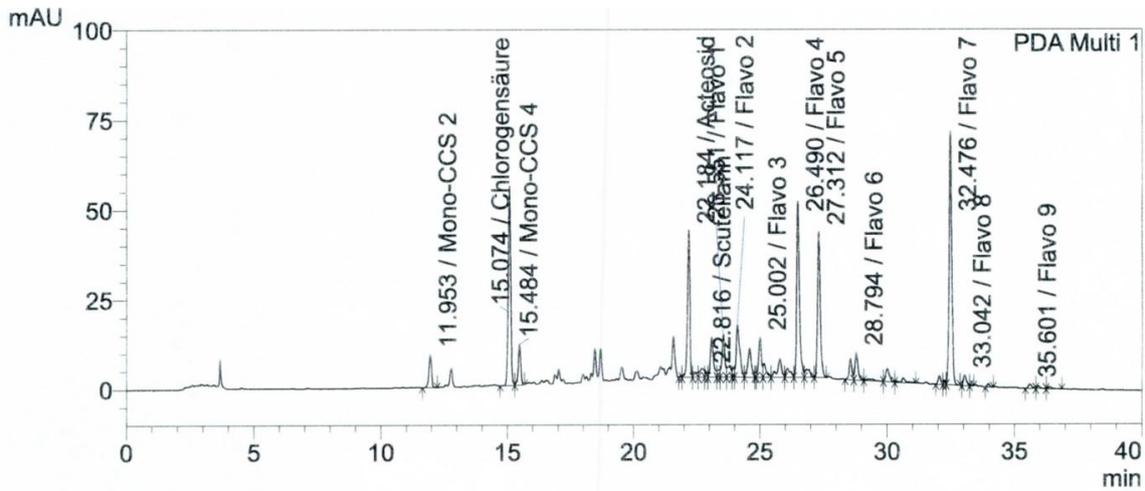


Abbildung 3.1: Dünnschichtchromatogramme der *S. scardica*-Extrakte und Fraktionen (Testung auf polare Inhaltsstoffe). Nach dem Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz unter Weißlicht. **A** Vergleich der Extrakte mit Wasser (1), 20 % (2), 50 % (3) und 70 % Ethanol (4) als Auszugsmittel. **B** Vergleich des 40 % ethanolischen Extraktes (1) mit daraus gewonnenen Fraktionen: Butanol- (2) und Wasserphase (3) der Flüssig-Flüssig-Extraktion, lösliche Fraktion (4) und Bodensatz (5) aus Umlösung in 70 % Ethanol, Ethanol- (6) und Wasserfraktion (7) aus Auftrennung via Adsorberharz.



1 PDA Multi 1 / 330nm,3nm

PDA Ch1 330nm

ID#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Name	Tailing Factor
1	11.95	66317	9123	0.0562	%	Mono-CCS 2	0.9
2	15.07	382274	51945	0.3237	%	Chlorogensäure	1.1
3	15.48	82570	10761	0.0699	%	Mono-CCS 4	0.8
4	22.18	273833	39359	0.4028	%	Acteosid	1.0
5	22.82	11386	2076	0.0082	%	Scutellarin	--
6	23.55	98957	11455	0.0716	%	Flavo 1	--
7	24.12	143165	14563	0.1037	%	Flavo 2	--
8	25.00	85791	10894	0.0621	%	Flavo 3	--
9	26.49	373710	46980	0.2706	%	Flavo 4	1.6
10	27.31	300840	39903	0.2178	%	Flavo 5	1.4
11	28.79	59784	7442	0.0433	%	Flavo 6	--
12	32.48	520474	67434	0.3768	%	Flavo 7	1.1
13	33.04	24328	2968	0.0176	%	Flavo 8	--
14	35.60	11604	1156	0.0084	%	Flavo 9	--

Abbildung 3.2: HPLC-Chromatogramm des 20 % ethanolischen *Sideritis scardica*-Auszuges. Alle hydroalkoholischen Sideritis-Extrakte sowie die Fraktionen wurden so auf den Gehalt von Acteosid, Flavonoiden (ber. als Scutellarin) und Caffeoylchinasäuren (ber. als Chlorogensäure) hin analysiert. Für die Ergebnisse siehe Tabelle 3.1.

Die lipophileren Fraktionen des 40 % ethanolischen Sideritis-Extraktes (Fl-FI BuOH, Umlös Lös, Adsorb EtOH) zeigten einen höheren Gehalt an Gesamtpolyphenolen, Acteosid und Caffeoylchinasäuren als die hydrophilen Gegenstücke (Fl-FI H₂O, Umlös Satz, Adsorb H₂O) und auch verglichen mit dem Primärextrakt EtOH40 (Abbildung 3.3). Insbesondere die Butanolfraction der Flüssig-Flüssig-Extraktion zeigte hohe Ausbeuten an polyphenolischen Verbindungen. Sie wies ungefähr die dreifache Acteosid- und Flavonoidkonzentration des Primärextraktes auf. Wenn man die Massenverteilung in Betracht zieht, scheint sich vor allem Acteosid selektiv in den unpolaren Lösungsmitteln anzureichern. Der Eindruck der generell höheren Gehalte der getesteten Polyphenole in den lipophilen Extraktfraktionen konnte bezüglich der Flavonoide nur bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion und bei der Fest-Flüssig-Auftrennung über Adsorberharz bestätigt werden. Denn bei der Umlösung des Primärextraktes in 70 % Ethanol wurde eine höhere Flavonoidkonzentration in der hydrophilen Fraktion, dem ausgefallenen Bodensatz, nachgewiesen. Dennoch spiegelte die DC den wesentlichen Trend der gehaltvolleren lipophilen Extraktfraktionen im Vergleich zu den hydrophileren Fraktionen und zum Primärextrakt konsistent wider (Abbildung 3.1 B).

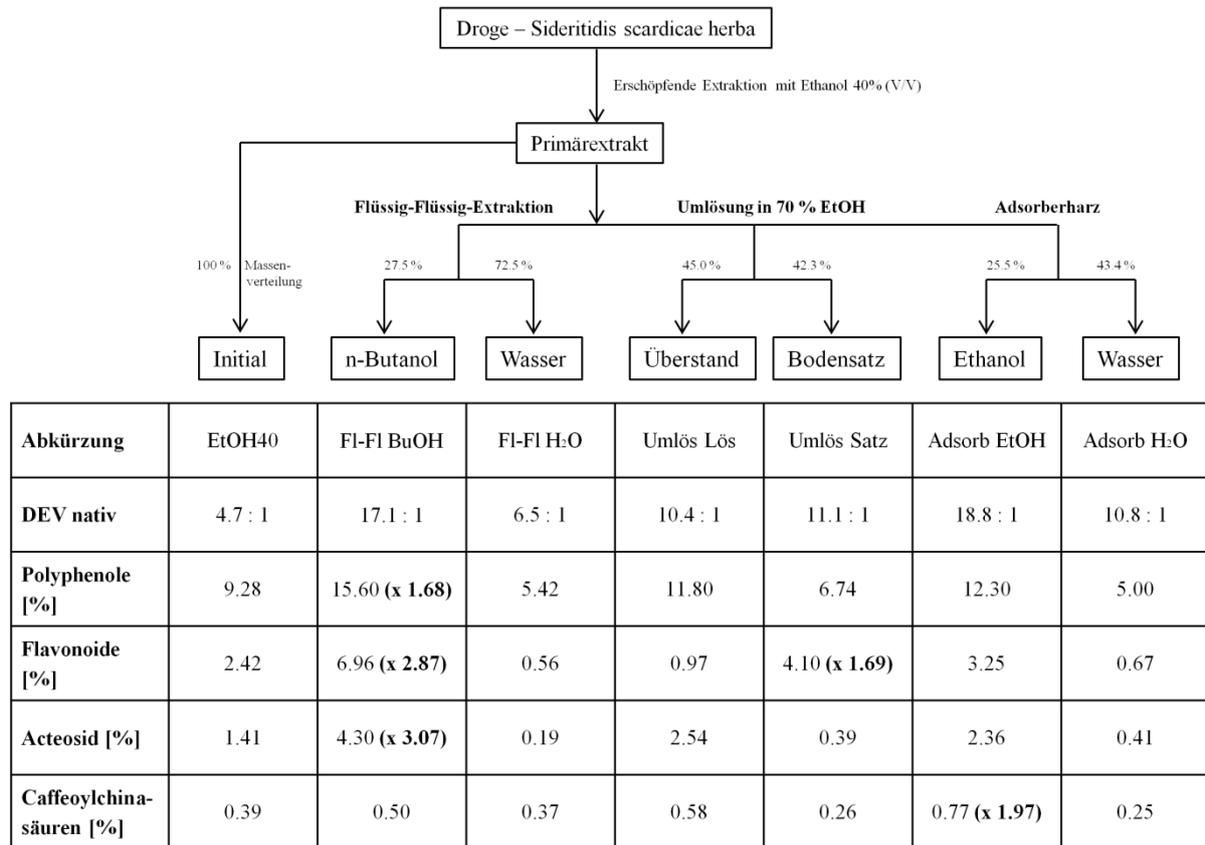


Abbildung 3.3: Überblick über die Fraktionen des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes. Die prozentuale Massenverteilung vom Primärextrakt auf die Fraktionen ist für jedes Fraktionspaar im Flowchart angegeben. Von 100 % abweichende Werte spiegeln den präparativen Verlust wider. Die hervorgehobenen Zahlen sind ausgewählte Anreicherungsfaktoren der analysierten Verbindungen im Vergleich zum Primärextrakt.

3.2 Wachstumskontrollen

Um sicherzugehen, dass keine der gewählten Maximalkonzentrationen in den *C. elegans*-Versuchen negative Effekte auf die Würmer hat (toxisch oder antimikrobiell bzw. verklumpend auf die Futterquelle *E. coli* OP50), wurde das Wachstum der Würmer des Wildtyp-Stammes N2 in Gegenwart aller genutzten Substanzen bewertet. Bei keiner der beiden verwendeten Behandlungsmethoden führte eine Behandlung zu einer signifikant geringeren Körperlänge (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Wachstumskontrollen. N/A: nicht gemessen bzw. nicht zutreffend; n.s.: nicht signifikant zu „Unbehandelt“; Sre: Säure

Substanz	Behandlung in Flüssigmedium				Behandlung mittels NGM-Agar			
	Konzentration [µg/mL]	Körperlänge [mm]	SEM [mm]	Signifikanz	Konzentration [µg/mL]	Körperlänge [mm]	SEM [mm]	Signifikanz
Unbehandelt	N/A	1097,8	29,8	N/A	N/A	1149,9	30,0	N/A
H ₂ O	400	1067,7	47,9	n.s.	600	1138,8	21,0	n.s.
EtOH20	1000	1057,9	24,3		1000	1136,6	38,9	
EtOH40	600	1058,1	33,0		600	1180,5	69,2	
EtOH50	200	1055,1	41,0		600	1161,6	33,7	
EtOH70	200	1113,5	30,1		600	1197,2	50,8	
MeOH	600	1056,0	40,9		600	1159,0	19,3	
Fl-Fl BuOH	400	1086,5	12,1		400	1175,7	32,4	
Fl-Fl H ₂ O	400	1046,2	10,6		400	1169,9	54,6	
Umlös Lös	400	1069,4	32,0		400	1151,1	32,6	
Umlös Satz	400	1103,8	26,4		400	1162,0	32,7	
Adsorb EtOH	400	1074,4	15,9		400	1131,6	18,9	
Adsorb H ₂ O	400	1096,1	19,0		400	1113,5	21,0	
Acteosid	200	1106,5	31,8		200	1101,4	24,6	
Echinacosid	200	1074,3	18,4		200	1115,9	12,1	
Forsythosid A	200	1087,6	38,7		200	1104,0	21,5	
Scutellarin	200	1039,6	34,0		200	1097,2	18,9	
Apigenin-7-Glc	200	1082,4	20,0		200	1080,6	12,4	
Chlorogensre	200	1127,0	27,3		200	1110,9	17,1	
Neochlorogensre	200	1071,7	12,4		200	1118,5	5,1	
EGb 761	200	1106,8	3,9		200	1129,0	3,3	
<i>B. monnieri</i>	200	1083,7	34,2		400	1154,2	26,9	
<i>R. rosea</i>	100	1047,7	33,1		400	1165,8	43,0	
<i>H. perforatum</i>	600	1104,7	31,6		600	1189,0	42,4	
memoLoges	600	1065,4	42,7		600	1097,2	13,4	
EGCG	100	1051,6	42,2		100	1172,6	6,0	
Bupropion	100	1123,5	20,4		100	1094,7	14,8	
Curcumin	N/A	N/A	N/A	N/A	10	1112,5	10,8	

Auch in den durchgeführten Agardiffusionstests zeigte keine der in den *C. elegans*-Versuchen verwendeten Behandlungen eine antimikrobielle Wirkung gegen den *E. coli*-Stamm OP50, welcher als Futterquelle dient. Der Durchmesser des Hemmhofes von Ampicillin betrug $2,73 \pm 0,06$ cm, während keine der Testsubstanzen überhaupt einen Hemmhof aufwies (Abbildung 3.4).



Abbildung 3.4: Bild des ersten durchgeführten Agardiffusionstests (*E. coli* OP50). Oben links die hydroalkoholischen Extrakte aus *S. scardica* (600 µg/mL bzw. 1000 µg/mL bei EtOH20), unten links die Extraktfraktionen (400 µg/mL), mittig die Referenzextrakte (200-600 µg/mL, siehe Foto), unten rechts die Reinsubstanzen (200 µg/mL), oben rechts diverse Behandlungen. 500 µg/mL Ampicillin dienen als Positivkontrolle.

3.3 Toxizitätskontrolle

Um zu prüfen, ob die verwendeten *S. scardica*-Extrakte einen akut toxischen, letalen Effekt auf *C. elegans* haben, wurden die Würmer für 24 h mit den Auszügen behandelt. Die verwendeten Konzentrationen überstiegen dabei den Arbeitsbereich (EtOH20 maximal 1 mg/mL) um ein Vielfaches. Als Positivkontrolle wurden 80 µM Juglon (letale, prooxidative Dosis für *C. elegans*) und Nicotin als bekanntes und relevantes Toxin für den Menschen gewählt.

50 % Ethanol als Lösemittel für die Trockenextrakte (max. Endkonzentration 2,5 % mit 98,8 % Überlebensrate) sowie die Hilfsstoffe Maltodextrin und Siliciumdioxid (beide 100,0 % bei Mengen entsprechend 5 mg/mL Extrakt) wiesen keinen toxischen Einfluss auf. 80 µM Juglon lies 83,0 % der Würmer sterben. Die Überlebensrate der mit Nicotin behandelten Würmer sank stetig bis auf 9,8 % bei 5 mg/mL, wobei bereits bei 250 µg/mL mit 93,1 % ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Negativkontrolle bestand (Abbildung 3.5). Im Arbeitsbereich bis 1 mg/mL zeigte keiner der getesteten *S. scardica*-Extrakte eine signifikante Verringerung der Überlebensrate. Ab 2 mg/mL ergaben sich zwar zum Teil statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle, ob diese jedoch toxikologische Relevanz

haben, ist anzuzweifeln. In einer Konzentration von 5 mg/mL starben maximal 9,8 % der Würmer (EtOH70), wobei ab 3 mg/mL eine Verzerrung durch löslichkeitsbedingte Ausfällungen und die damit einhergehende erschwerte Auszählung und Bewertung der Fadenwürmer nicht ausgeschlossen werden kann.

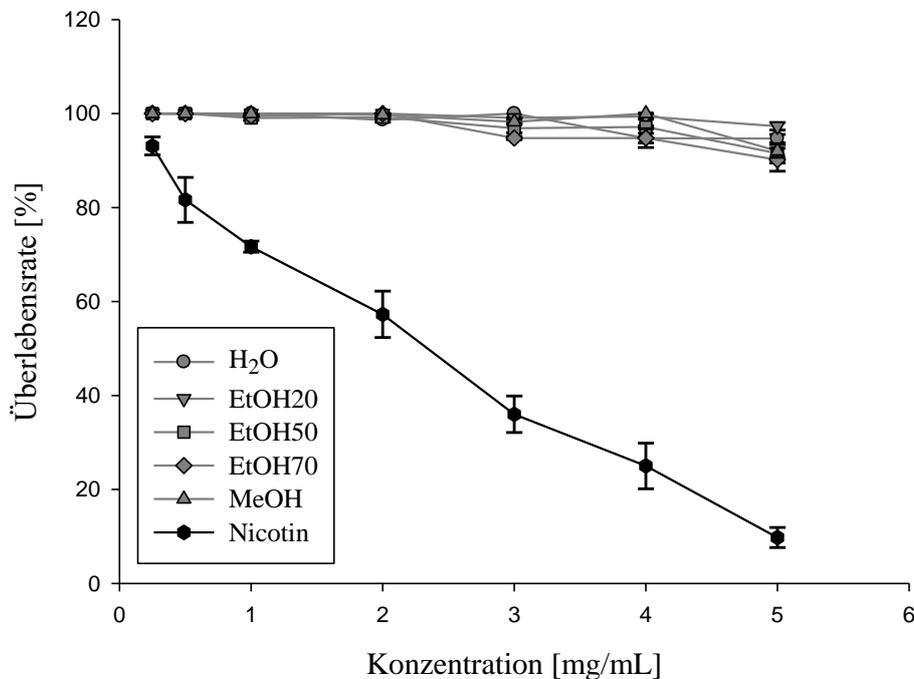


Abbildung 3.5: Akute Toxizität von *S. scardica* auf *C. elegans*. Würmer des Stammes N2 wurden 24 h in verschiedenen Konzentrationen der hydroalkoholischen Extrakte inkubiert und auf Lebenszeichen geprüft. Nicotin diente neben 80 µM Juglon (nicht dargestellt, 17,0 % Überlebensrate) als Positivkontrolle.

3.4 Metabolischer Einfluss der Bakterien und Resorption der Polyphenole

Um zu prüfen, ob die Futterquelle der Fadenwürmer, der *E. coli*-Stamm OP50, die extrahierten Polyphenole aus *Sideritis scardica* verstoffwechselt und wie viel davon vom Wurm aufgenommen wird, wurden verschiedene Proben mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz auf ihren Gesamt-Polyphenolgehalt getestet und weiterhin einer HPLC-Analyse durch Mitarbeiter der Fa. Finzelberg unterzogen. Die Proben wurden anlehnend an die verschiedenen *C. elegans*-Assays protokollnah hergestellt. Es handelte sich um 1 mg/mL-Verdünnungen des 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes (EtOH20) ohne, mit lebenden oder mit abgetöteten Bakterien, mit oder ohne *C. elegans* (Kapitel 2.2.6). Sowohl die Bakterien, als auch die Würmer wurden mit Ultraschall lysiert. Mit toten Bakterien gefütterte Nematoden konnten nicht mit einbezogen werden, da dies in dieser Versuchsanordnung zu kleineren Wurmern mit zu geringer Trockenmasse führte.

Die Messung des Gesamt-Polyphenolgehaltes ergab, dass abgetötete *E. coli*, wie erwartet, keinen metabolischen Einfluss mehr haben (Tabelle 3.3). Lebende Bakterien senkten

den Gehalt an polyphenolischen Substanzen nur um ca. 5 %, was sich nicht signifikant von der Extraktverdünnung ohne Bakterien unterschied. S-Medium als Träger störte die Bestimmung nicht, da kein, durch potentiell reduzierende Substanzen vorgetäuschter, Polyphenolgehalt gemessen werden konnte. In den Würmern konnten die Polyphenole nachgewiesen werden, wobei sich ihre Gallussäure-Äquivalente mit 3,1 mgGA/gWurmtrockenmasse für die Behandlung auf NGM-Agar und 2,7 mgGA/g für die Behandlung im Flüssigmedium kaum unterschieden (n.s.). Selbst der Gehalt des verbrauchten Mediums, in dem sowohl lebende *E. coli* als auch die Fadenwürmer 2 Tage Zeit hatten, den zugegebenen Extrakt zu verstoffwechseln, unterschied sich nicht signifikant vom Bezugswert EtOH20 1 mg/mL (ca. 9 %). Die Ergebnisse dieses Folin-Ciocalteu-Assays müssen jedoch mit Bedacht betrachtet werden, da der Gesamt-Polyphenolgehalt den Polymerisationsgrad der Verbindungen nicht berücksichtigt (d. h. die Polyphenole könnten metabolisch gespalten worden sein, aber der Gesamtgehalt erscheint gleich) und auch andere reduzierend wirkende Substanzen als Polyphenole selbst können nicht unterschieden werden. Deswegen wurde zusätzlich eine HPLC-Analyse durch Mitarbeiter der Fa. Finzelberg durchgeführt, welche vor Ort begleitet wurde.

Tabelle 3.3: Polyphenolgehalte der Proben für die Überprüfung der Extraktresorption durch *C. elegans* und des metabolischen Einflusses durch *E. coli* OP50.

Bezeichnung	Erklärung	Polyphenolgehalt in mgGA/gExtrakt ^a bzw. mgGA/gWürmer
S-Medium	Reines S-Medium als Kontrolle	0,0 ± 0,0
EtOH20 1 mg/mL	20 % ethanol. <i>S. scardica</i> -Extrakt 1 mg/mL in S-Medium	40,3 ± 1,7
EtOH20 + OP50 lebend	20 % ethanol. <i>S. scardica</i> -Extrakt 1 mg/mL in S-Medium + <i>E. coli</i> (OD ₆₀₀ =1)	38,2 ± 2,7
EtOH20 + OP50 tot	20 % ethanol. <i>S. scardica</i> -Extrakt 1 mg/mL in S-Medium + abgetötete <i>E. coli</i> (OD ₆₀₀ =1)	40,1 ± 2,8
Wurmlysate Agar	Lysierte Fadenwürmer in S-Medium, 10 mg/mL; aus Behandlung auf NGM-Agar mit 1 mg/mL EtOH20	3,1 ± 0,9 ^a
Wurmlysate Flüssig	Lysierte Fadenwürmer in S-Medium, 10 mg/mL; aus Behandlung mit 1 mg/mL EtOH20 in Flüssigmedium	2,7 ± 0,8 ^a
Überstand Flüssig	Von Würmern abgetrenntes Flüssigmedium aus der Behandlung mit 1 mg/mL EtOH20 in Flüssigmedium	36,9 ± 3,6

Die HPLC lieferte trotz der geringen Konzentrationen der Ansätze und dem potentiell störenden S-Medium klare Ergebnisse, die im Wesentlichen die der Polyphenolgehaltsmessung mit Folin-Ciocalteu widerspiegeln. Die HPLC-Methode der Fa. Finzelberg ermöglichte es, in einem Lauf den Gehalt an Acteosid, an Flavonoiden (berechnet als Scutellarin) und an Caffeoylchinasäuren (CCS, berechnet als Chlorogensäure) zu bestimmen (Kapitel 2.2.2). Im Einzelnen ergaben sich für die Proben die in Tabelle 3.4 aufgeführten Gehalte.

Tabelle 3.4: Mit HPLC gemessene Gehalte analytischer Leitsubstanzen in EtOH20-Ansätzen mit und ohne *E. coli* OP50 bzw. *C. elegans*. Die Werte stellen den prozentualen Anteil an Trockenextrakt dar. Für die Erklärung der Bezeichnungen siehe Tabelle 3.3.

Bezeichnung	Acteosid [%]	Favonoide ber. als Scutellarin [%]	Caffeoylchinasäuren ber. als Chlorogensäure [%]
S-Medium	0,0000	0,0000	0,0000
EtOH20 1 mg/mL	0,4429	0,7284	0,6501
EtOH20 + OP50 lebend	0,4130	0,9656	0,6364
EtOH20 + OP50 tot	0,4201	0,8603	0,6502
Wurmlysate Agar	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Überstand Flüssig	0,3746	0,8034	0,5890

* Gesamt-Gehalt an UV-detektierbaren Metaboliten: 0,0094 %

Vor allem an den Konzentrationen von Acteosid und Caffeoylchinasäure-Derivaten lässt sich nachvollziehen, dass lebende *E. coli*-Bakterien, wenn überhaupt, nur einen kleinen und abgetötete gar keinen Einfluss auf die gemessenen Gehalte haben (Tabelle 3.4). Im verbrauchten Flüssigmedium, in dem sowohl *E. coli* OP50 als auch die Fadenwürmer den Extrakt aus dem Griechischen Bergtee verstoffwechselten, waren die Gehalte der Polyphenole 10 bis 15 % geringer. In den aufgelösten Würmern konnten weder Acteosid, noch in der HPLC-Methode einbezogene Flavonoide oder CCS-Verbindungen quantifiziert werden, was nicht zuletzt an der niedrigen Konzentration in nur 10 mg Wurm trockenmasse lag. Dennoch lagen unbekannte, UV-detektierbare Substanzen vor, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Metaboliten handelt. Ihr addierter Gehalt betrug 0,0094 % der eingewogenen Menge an verfüttertem Trockenextrakt. Die Gehalte an Flavonoiden zeigten größere Abweichungen, welche auf eine potentiell größere Schwankung dieser, viele Einzelsubstanzen umfassende (und in der Methode einbezogenen), Polyphenolgruppe zurückgeführt werden kann. Obwohl der größere Schwankungsbereich die erfahrungsgemäß kleinen Unterschiede der Proben maskierte und damit das Nachvollziehen des Metabolismus bzw. der Absorption der Extraktbestandteile erschwert, widersprechen die Werte zumindest nicht der Logik der Ergebnisse für Acteosid, CCS-Verbindungen und dem Gesamt-Polyphenolgehalt.

3.5 Antioxidative Eigenschaften

3.5.1 Radikalfänger-Aktivität *in vitro*: DPPH-Assay

Die radikalfangenden Eigenschaften des Griechischen Bergtees wurden *in vitro* mittels Reaktion mit dem freien Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) untersucht. Durch die Reduktion zum Hydrazin, welches bei 517 nm nicht mehr so stark absorbiert, konnte die Reaktion mit Radikalfängern photometrisch quantifiziert werden (DPPH•Scavenging). Da andere *S. scardica*-Auszüge als die mit Wasser, Ethanol 20 % und Methanol sich nicht

ausreichend in den für DPPH geeigneten Lösungsmitteln lösten, waren sie für eine photometrische Messung nicht geeignet. Deswegen konnten nur diese 3 Extrakte sowie Ascorbinsäure und EGCG als Vergleichskontrollen untersucht werden.

Die ermittelten EC₅₀-Werte sanken mit der Polarität des Auszugsmittels (Tabelle 3.5). Dennoch erreichte kein Extrakt die Wirksamkeit der beiden bekannten Antioxidantien. Insgesamt lässt sich bei *Sideritis scardica* jedoch von einer moderaten Radikalfänger-Eigenschaft *in vitro* reden. Nennenswert ist der relativ große Standardfehler, v. a. beim wässrigen Auszug (ca. 15 %), welcher auf beginnende Löslichkeitsprobleme zurückgeführt werden kann.

Tabelle 3.5: EC₅₀-Werte der getesteten *S. scardica*-Extrakte im DPPH-Assay.

Substanz	<i>S. scardica</i> H ₂ O	<i>S. scardica</i> EtOH20	<i>S. scardica</i> MeOH	Ascorbinsäure	EGCG
EC ₅₀ [µg/mL]	61,3	43,0	31,3	4,3	3,5
S.E.M [µg/mL]	9,5	4,0	2,0	0,1	0,2

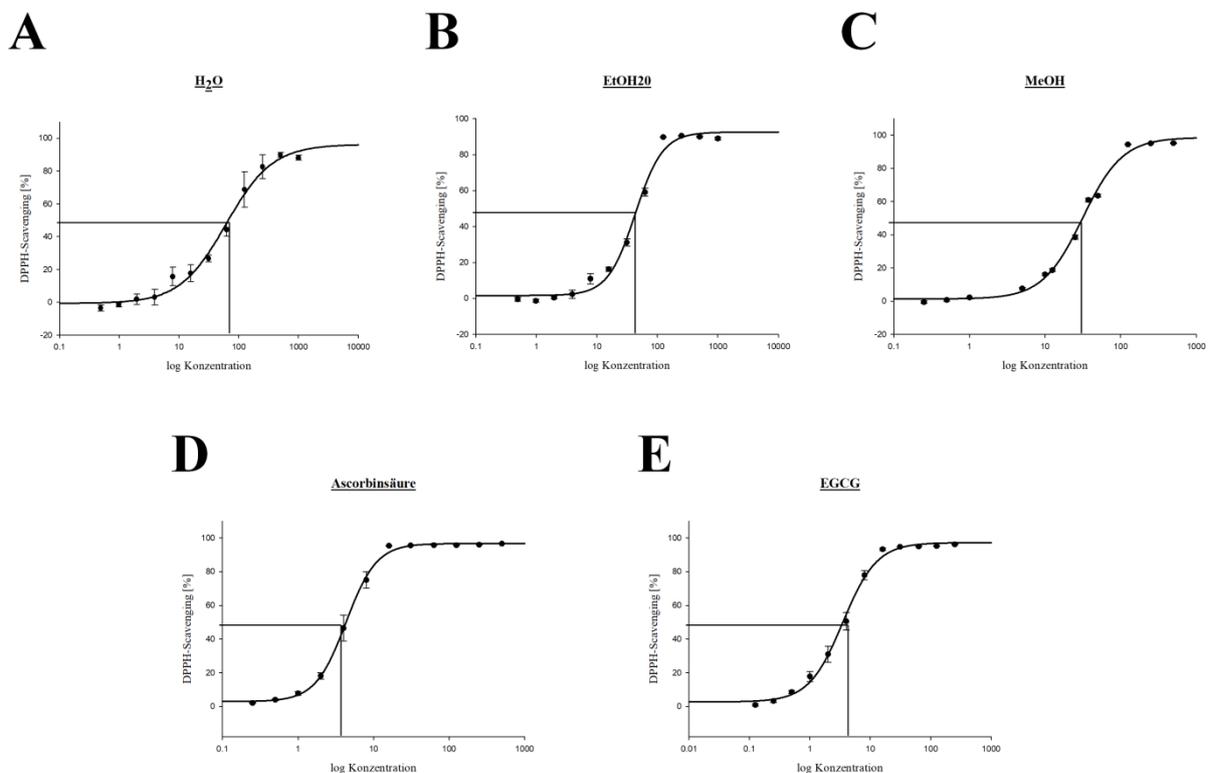


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Ergebnisse des DPPH-Assays. Kurven des wässrigen *S. scardica*-Extraktes (A), des 20 % ethanolextrahierten (B) und des Methanolextraktes (C). Ascorbinsäure (D) und EGCG (E) wurden für Vergleichszwecke herangezogen.

3.5.2 Antioxidative Eigenschaften im *C. elegans*-Modell

3.5.2.1 Intrazelluläre ROS-Belastung

Das basale, intrazelluläre ROS-Level von Würmern des Stammes N2 wurde durch Einsatz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (H₂DCFDA) quantifiziert. Innerhalb der Zellen wurde die Diacetat-Gruppe abgespalten und durch oxidative Vorgänge entstand das fluoreszierende DCF. Sämtliche getestete Extrakte und Substanzen wurden in der für *C. elegans* maximal möglichen Konzentration im Flüssigmedium getestet (Kapitel 2.2.7). Diese schwankten bei den Sideritis-Auszügen zwar recht stark von 200 (z. B. EtOH50) bis 1000 µg/mL (EtOH20); so konnte aber auch ein breiter Bereich potentiell wirksamer Konzentrationen abgedeckt werden. Die Fraktionen von EtOH40 wurden mit 400 µg/mL, die Reinsubstanzen mit 200 µg/mL getestet.

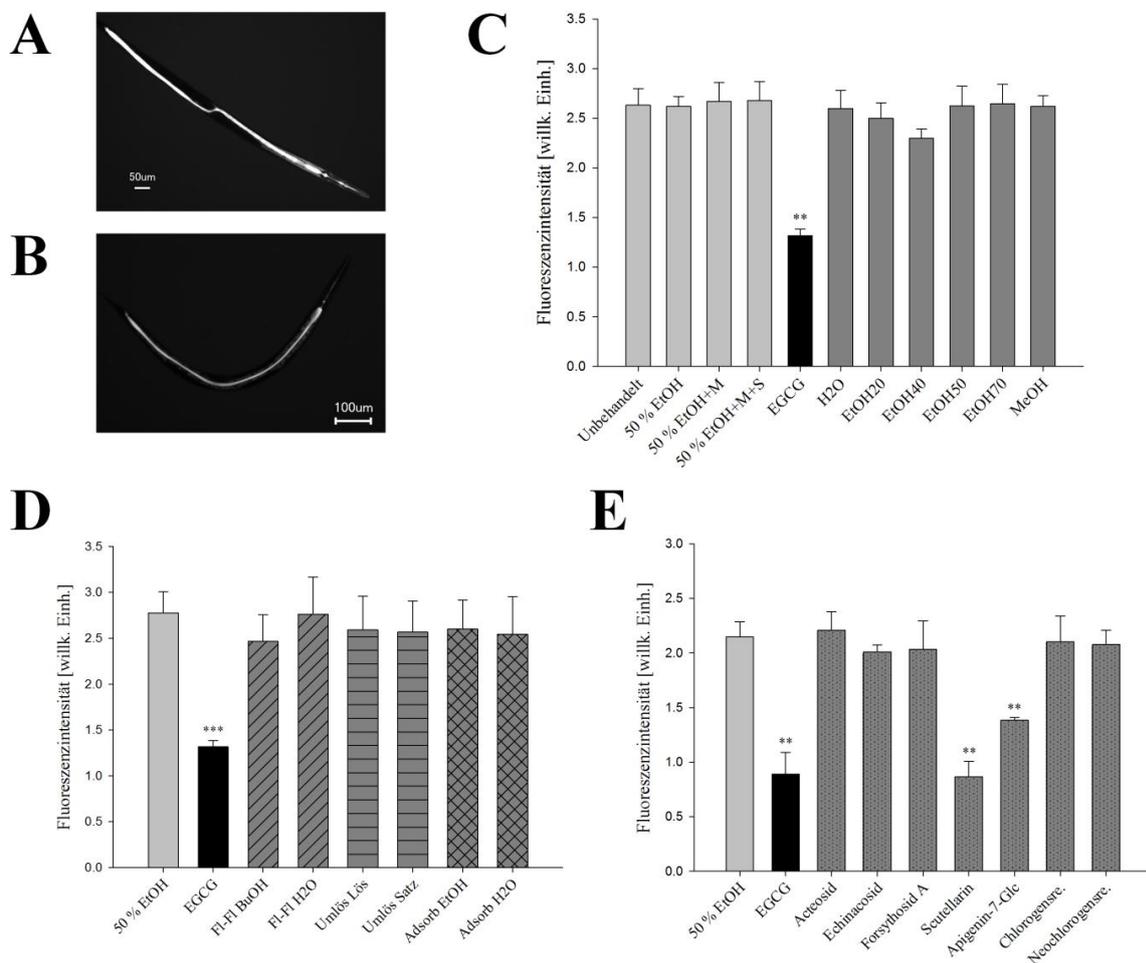


Abbildung 3.7: Wirkung von *S. scardica* auf die intrazelluläre ROS-Belastung. **A**, **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Würmern des Stammes N2, welche mit H₂DCFDA behandelt wurden. Während die Negativkontrollen durch oxidative Vorgänge eine stärkere Verstoffwechslung zu DCF und damit eine hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen (**A**), zeigten mit antioxidativ wirksamen Substanzen behandelte Würmer ein geringeres ROS-Level (**B**). **C**, **D**, **E** Graphische Darstellung der ROS-Belastung. Weder die Behandlung mit den verschiedenen *S. scardica*-Extrakten (**C**), noch Fraktionen des 40 % ethanolschen Auszuges (**D**) zeigte antioxidative Effekte. Von den getesteten Reinsubstanzen waren nur die beiden Flavonoide aktiv (**E**). EGCG diente als Positivkontrolle. Sre.: Säure; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Je nach der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies erschienen die Würmer unter dem Fluoreszenzmikroskop heller oder dunkler (Abbildung 3.7 **A, B**). Im Gegensatz zu 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle konnte weder eine Behandlung mit den verschiedenen Auszügen aus dem Griechischen Bergtee (**C**), noch mit den 6 Extraktfraktionen (**D**) der basalen ROS-Belastung entgegenwirken (auch 50 % Ethanol als Rücklösemittel und die bei der Herstellung der Extrakte verwendeten Hilfsstoffe Maltodextrin und Siliciumdioxid hatten keinen Einfluss). Von den isolierten Reinsubstanzen konnten nur die Flavonoide dem oxidativen Metabolismus des H₂DCFDA entgegenwirken und damit die Fluoreszenzintensität senken (**E**). 200 µg/mL Scutellarin war dabei so wirksam wie 100 µg/mL EGCG (ca. 60 % Verringerung). Von den Referenzextrakten zeigten Brahmi, Rosenwurz und Johanniskraut einen vergleichbaren antioxidativen Effekt, jedoch nicht der Ginkgo-Spezialextrakt (Abbildung 3.8 **A**). Trotz der Wirksamkeit von *B. monnieri* zeigte das Kombinationspräparat memoLoges® keinen signifikanten Effekt (**B**). Auch 100 µg/mL Bupropion senkten die ROS-Belastung nicht ($1,97 \pm 0,14$ willk. Einh. bei $2,15 \pm 0,14$ der Negativkontrolle; ohne graphische Darstellung).

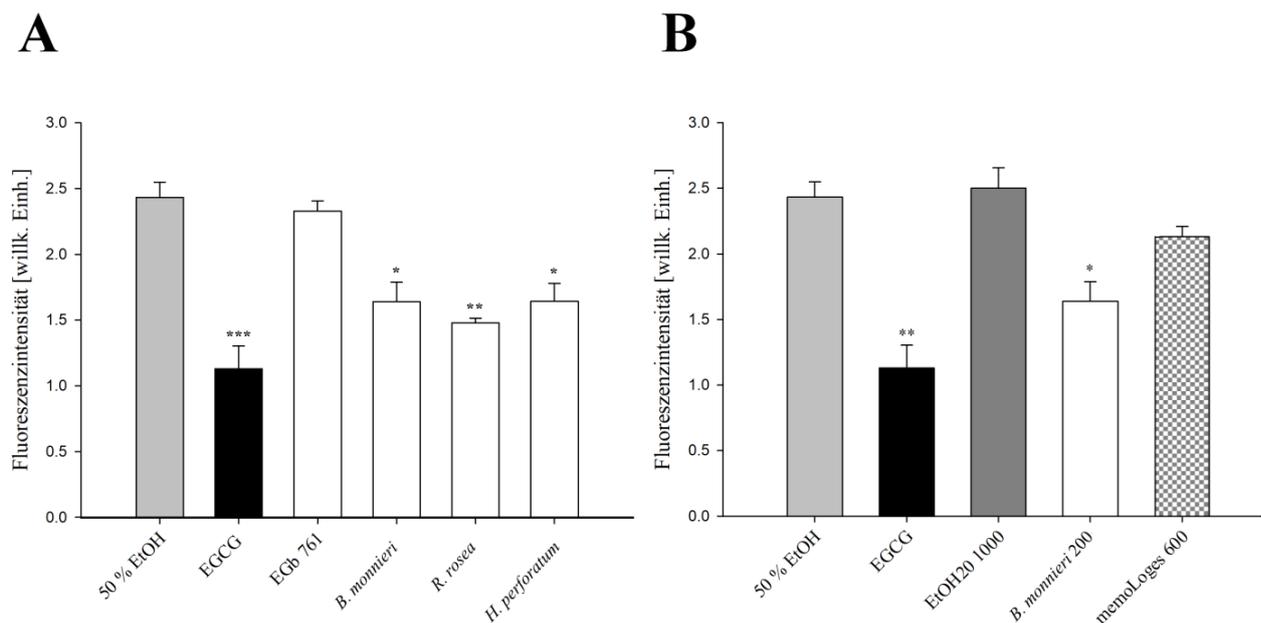


Abbildung 3.8: Wirkung der Referenzextrakte und memoLoges® auf die intrazelluläre ROS-Belastung. Getestet wurden 200 µg/mL EGb 761 und *B. monnieri*, 100 µg/mL *R. rosea* und 600 µg/mL *H. perforatum* gegen 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle (**A**). 1000 µg/mL *Sideritis scardica* EtOH20, 200 µg/mL *Bacopa monnieri* vergleichend mit 600 µg/mL Kapselinhalt memoLoges® (**B**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.5.2.2 Einfluss auf die Expression von HSP-16.2

Eine niedrige Dosis Juglon induziert die Expression des Hitzeschockproteins HSP-16.2, welche im Stamm TJ375 durch GFP-Kopplung quantifizierbar ist. Antioxidativ wirksame Substanzen mindern den oxidativen Stress, was zu einer geringeren Expression des HSPs führt (Abbildung 3.9 A, B).

Die getesteten *Sideritis scardica*-Extrakte wurden in der jeweils höchstmöglichen Konzentration im Flüssigmedium (H₂O 400; EtOH20 1000; EtOH50 und EtOH70 200; MeOH 600 µg/mL) eingesetzt und zeigten keinen Effekt auf die Expression von HSP-16.2 (C). 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle hingegen wies nur ein Zehntel der Expressionsstärke (Fluoreszenzintensität) auf. Auch die Referenzextrakte wurden in den Maximalkonzentrationen getestet. Während 200 µg/mL EGb 761 keinen signifikanten Effekt hatten, reduzierten 200 µg/mL *B. monnieri*, 100 µg/mL *R. rosea* und 600 µg/mL *H. perforatum* die Expressionsrate des Hitzeschockproteins und damit die Fluoreszenzintensität deutlich (Abbildung 3.10).

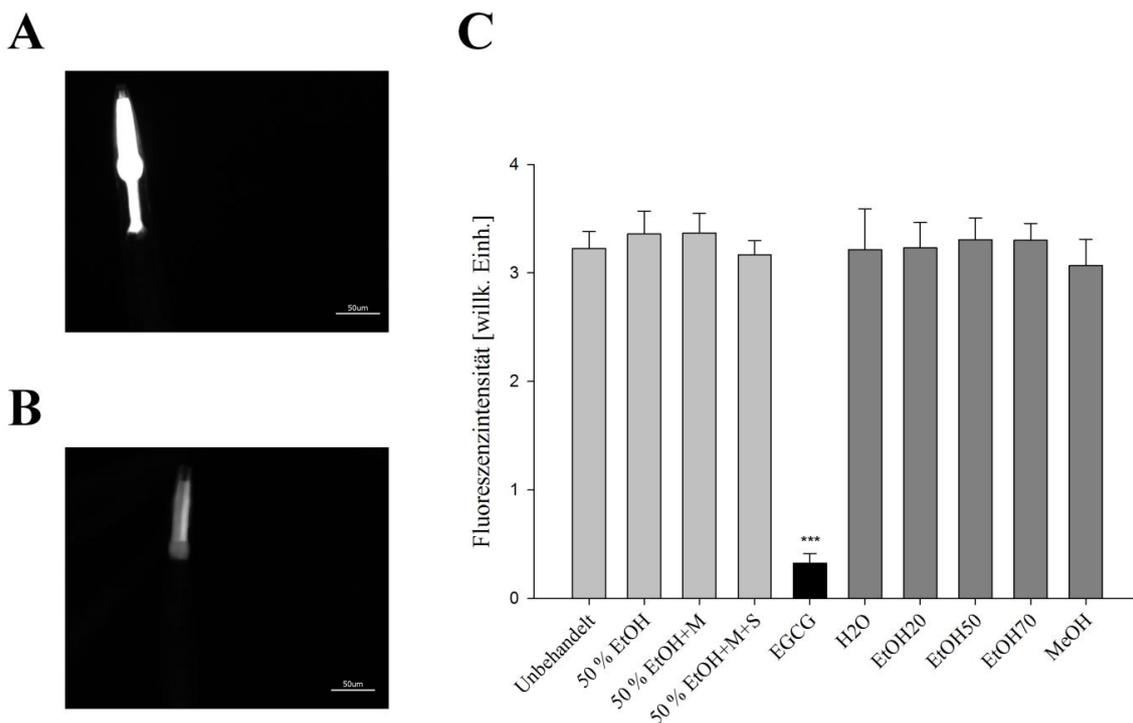


Abbildung 3.9: Einfluss von *S. scardica* auf die Juglon-induzierte Expression von *hsp-16.2p::GFP*. **A, B** Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Kopfbereiche von Fadenwürmern des Stammes TJ375. Werden die Würmer mit dem Prooxidans Juglon behandelt, wird HSP-16.2 vermehrt exprimiert (**A**). Antioxidantien wie EGCG können diesen oxidativen Stress mindern, was zu einer geringeren Expression des Hitzeschockproteins führt (**B**). **C** Keiner der getesteten Extrakte zeigte eine verminderte Fluoreszenzintensität, welche mit dem Ausmaß der HSP-Expression korreliert. *** p < 0,001

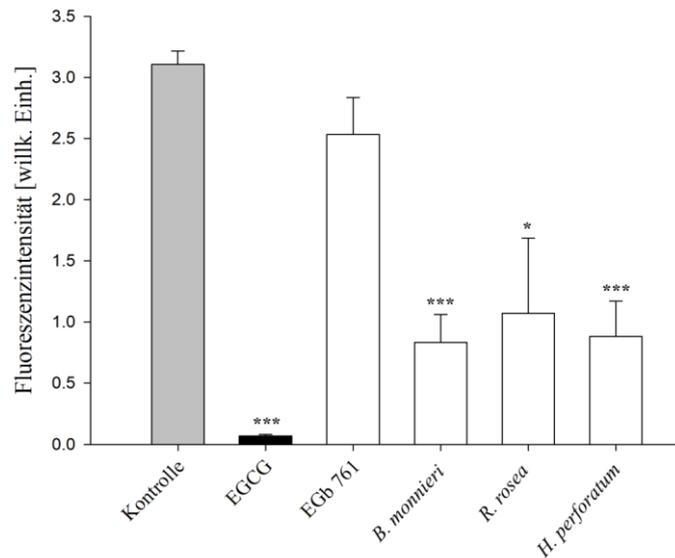


Abbildung 3.10: Wirkung der Referenzextrakte auf die Juglon-induzierte Expression von *hsp-16.2p::GFP*. Auszüge aus Brahmi, Rosenwurz und Johanniskraut konnten die Fluoreszenzintensität senken. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Um zu prüfen, ob die *S. scardica*-Extrakte allein eine induzierende Wirkung auf die Expression von HSP-16.2 haben und damit prooxidative oder hormetische Eigenschaften besitzen, wurde die Behandlung mit Juglon weggelassen. Stattdessen wurden die Würmer des Stammes TJ375 nur mit 1000 $\mu\text{g/mL}$ EtOH20 und 200 $\mu\text{g/mL}$ EtOH50 behandelt. 20 μM Juglon allein diente in diesem Fall als Positivkontrolle. Die Extrakte erhöhten die Fluoreszenzintensität nicht (Abbildung 3.11).

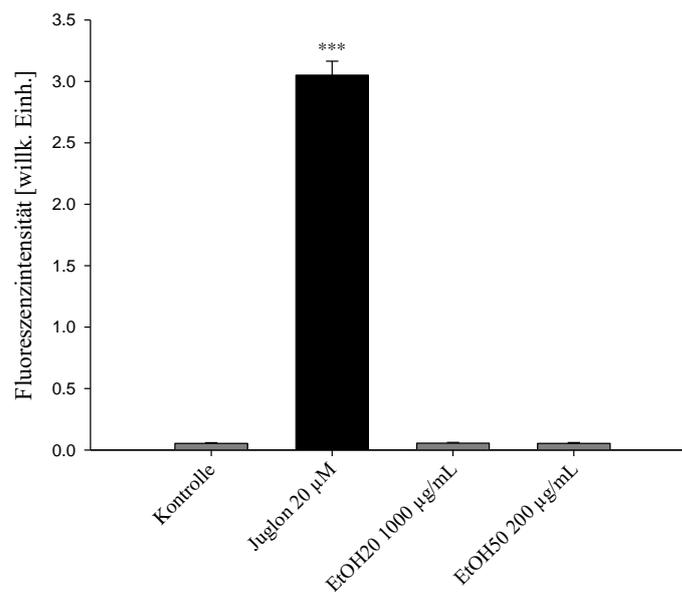


Abbildung 3.11: Einfluss von *S. scardica* auf die Expression von *hsp-16.2p::GFP*. Die Extrakte zeigten keinen Effekt auf die Expressionsrate und damit auf die Fluoreszenzintensität. *** $p < 0,001$

3.5.2.3 Translokation von DAF-16

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors DAF-16, welcher die Expression von Stressresistenzgenen induziert, kann u. a. durch toxisch (echter Stress) oder hormetisch (Schutzfaktor) wirkende Stoffe ausgelöst werden. Im *C. elegans*-Stamm TJ356 ließ sich dank GFP-Kopplung die Lokalisation von DAF-16 nachvollziehen. So erschienen die Würmer gleichmäßig grün (negativ), wenn der Signalweg nicht aktiviert wurde oder gepunktet (positiv), wenn sich der Transkriptionsfaktor in den Zellkernen befand (Abbildung 3.12 **A**, **B**).

Die getesteten *Sideritis scardica*-Extrakte wurden in der jeweils höchstmöglichen Konzentration im Flüssigmedium (H₂O 400; EtOH20 1000; EtOH40 600; EtOH50 und EtOH70 200; MeOH 600 µg/mL) eingesetzt und zeigten keinen Effekt auf die Translokation (**C**). Der Anteil an positiven Würmern war mehr als 4 Mal so groß, wenn sie mit 20 µM Juglon gestresst oder mit 100 µg/mL EGCG behandelt wurden. Bei thermischem Stress betrug der Anteil 80 %. 600 µg/mL *H. perforatum* und 100 µg/mL *R. rosea* zeigten einen signifikanten Effekt auf die Translokation (Abbildung 3.13). Die Behandlung mit Rosenwurz steigerte den Anteil an positiven Fadenwürmern dabei auf mehr als das Dreifache. 200 µg/mL EGb 761 und 200 µg/mL *B. monnieri* induzierten die Wanderung des Transkriptionsfaktors in den Zellkern nicht.

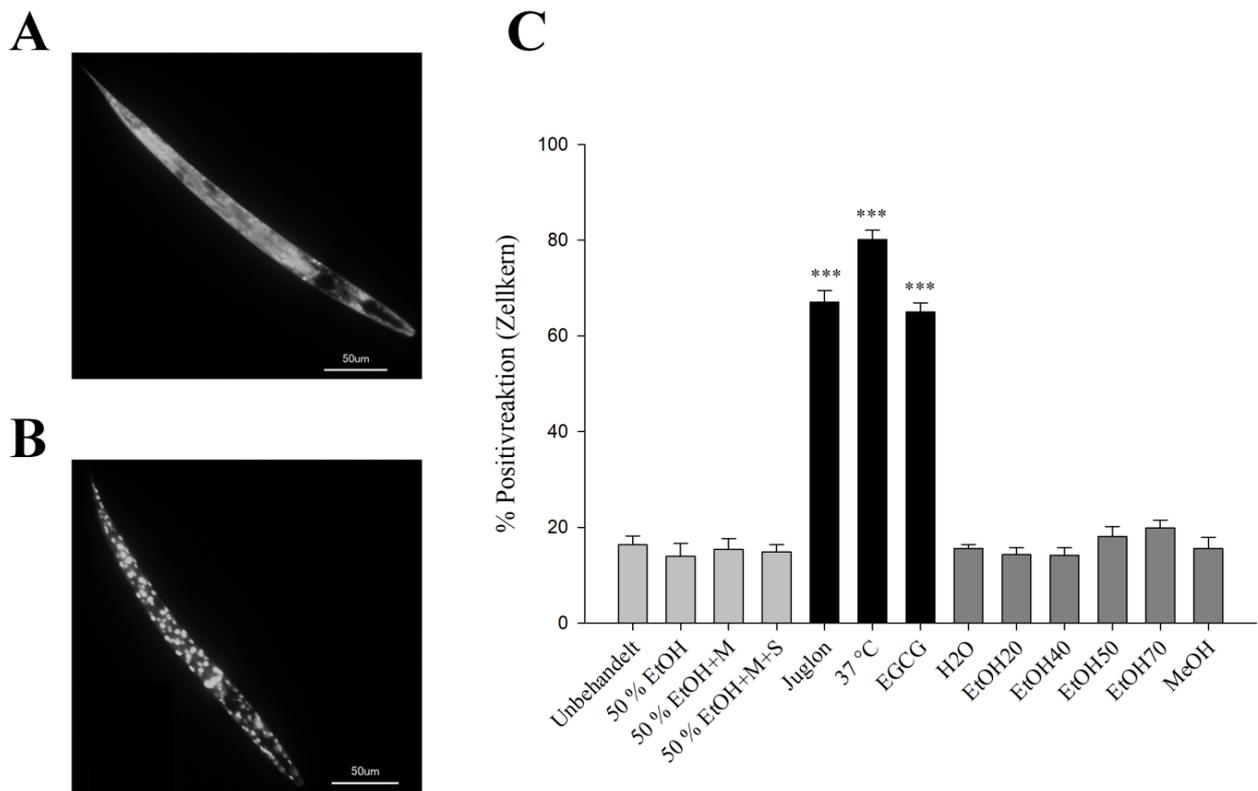


Abbildung 3.12: Einfluss von *Sideritis scardica* auf die Translokation von DAF-16. **A**, **B** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Larven des Stammes TJ356. Unter normalen Bedingungen befindet sich DAF-16 im Cytoplasma (negativ, **A**); durch Stress oder hormetische Effekte wandert der Transkriptionsfaktor in die Zellkerne (positiv, **B**). **C** Keiner der getesteten Extrakte aus dem griechischen Bergtee induzierte die Bewegung des Transkriptionsfaktors vom Cytoplasma in die Zellkerne. *** $p < 0,001$

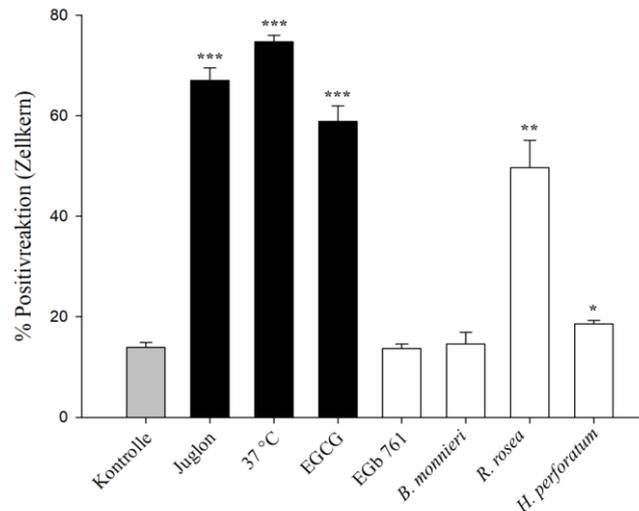


Abbildung 3.13: Einfluss der Referenzextrakte auf die Translokation von DAF-16. Auszüge aus Rosenwurz und Johanniskraut induzierten die Wanderung des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.5.2.4 Survival-Assay

Antioxidativ wirksame Substanzen können die Überlebensrate von *C. elegans* steigern, die einer tödlichen Dosis (80 μM) Juglon, einem Prooxidans, ausgesetzt wurden.

Die *Sideritis scardica*-Auszüge wurden in der jeweils höchstmöglichen Konzentration im Flüssigmedium eingesetzt (H₂O 400; EtOH20 1000; EtOH50 und EtOH70 200; MeOH 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die getesteten Extrakte hatten keinen Einfluss auf die Überlebensrate und entsprachen mit ca. 25 % den Negativkontrollen (Abbildung 3.14). 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGCG als Positivkontrolle verdreifachte fast den Anteil an überlebenden Würmern.

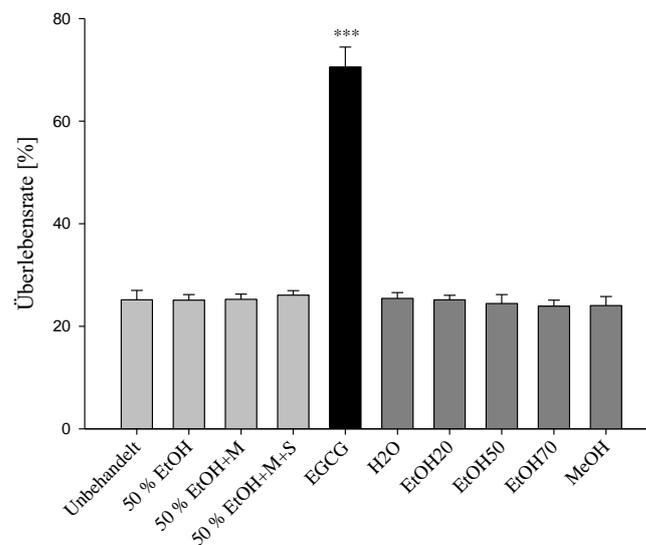


Abbildung 3.14: Ergebnisse des Survival-Assays. Keiner der getesteten *S. scardica*-Extrakte steigerte die Überlebensrate von Fadenwürmern, die 80 μM Juglon ausgesetzt waren. *** $p < 0,001$

3.6 Lifespan-Assay

Um zu prüfen, ob *Sideritis scardica* einen lebensverlängernden Effekt auf *C. elegans* hat, wurden Würmer des Stammes BA17 über ihre gesamte Lebensdauer mit 200 µg/mL EtOH50 oder 800 µg/mL EtOH20 behandelt. Die Negativkontrolle wurde nur mit der entsprechenden Menge Ethanol 50 % behandelt. Von Tag 5 bis 15 war der Anteil toter Würmer bei den Extrakt-behandelten Gruppen sogar etwas größer (Abbildung 3.15). Die durch eine Kaplan-Meyer-Analyse berechnete mittlere Lebensdauer unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle ($17,2 \pm 0,2$ d gegen EtOH20 mit $17,0 \pm 0,3$ d und EtOH50 mit $16,6 \pm 0,3$ d).

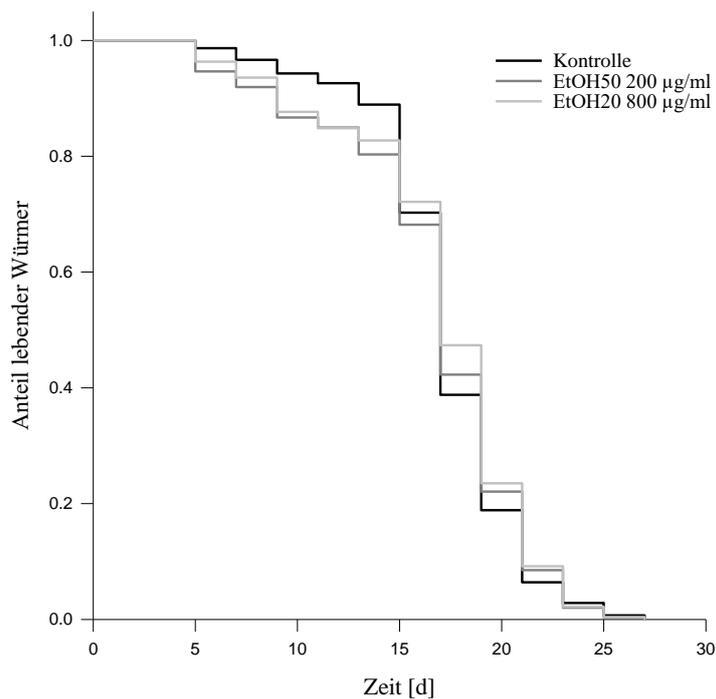


Abbildung 3.15: Ergebnisse des Lifespan-Assays. Weder die Behandlung mit 20 % noch mit 50 % ethanolischem *S. scardica*-Extrakt verlängerte die Lebensspanne von Würmern des Stammes BA17 im Vergleich zur Kontrolle.

3.7 Einfluss auf Alzheimer-assoziierte Pathomechanismen

3.7.1 Wirkung auf A β -bedingte Störungen

3.7.1.1 Aggregation von A β

Im A β -exprimierenden *C. elegans*-Stamm CL2006 wurde *Sideritis scardica* auf die Fähigkeit getestet, die Aggregation der gebildeten β -Amyloidpeptide zu vermindern. Die mit Thioflavin S angefärbten Plaques waren unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich sicht- und zählbar (Abbildung 3.16, A).

Die verschiedenen *S. scardica*-Extrakte wurden vergleichend in einer Konzentration von 600 µg/mL getestet und 100 µg/mL EGCG wurde als Positivkontrolle genutzt. Sämtliche

Negativkontrollen unterschieden sich nicht von der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.16 **B**). Somit hatte weder 50 % Ethanol als Lösemittel, noch 50 % Ethanol mit Maltodextrin oder 50 % Ethanol mit Maltodextrin und Siliciumdioxid (Trocknungshilfsstoffe, Kapitel 2.2.6) einen Einfluss auf die Aggregation. EGCG konnte die Anzahl an Plaques um ca. 20 % hoch signifikant verringern, weswegen der Versuch als geeignet betrachtet wurde. Im Vergleich fällt auf, dass v. a. bei der Behandlung mit 40, 50 und 70 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakten die Aggregatzahlen sinken; EtOH40 ist ähnlich aktiv wie die Positivkontrolle. Der wässrige sowie 20 % ethanolische Extrakt war weniger effektiv (11 % Reduktion), dennoch war ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (50 % EtOH und Maltodextrin) beobachtbar. Der methanolische Auszug zeigte keine statistisch belastbare Wirkung.

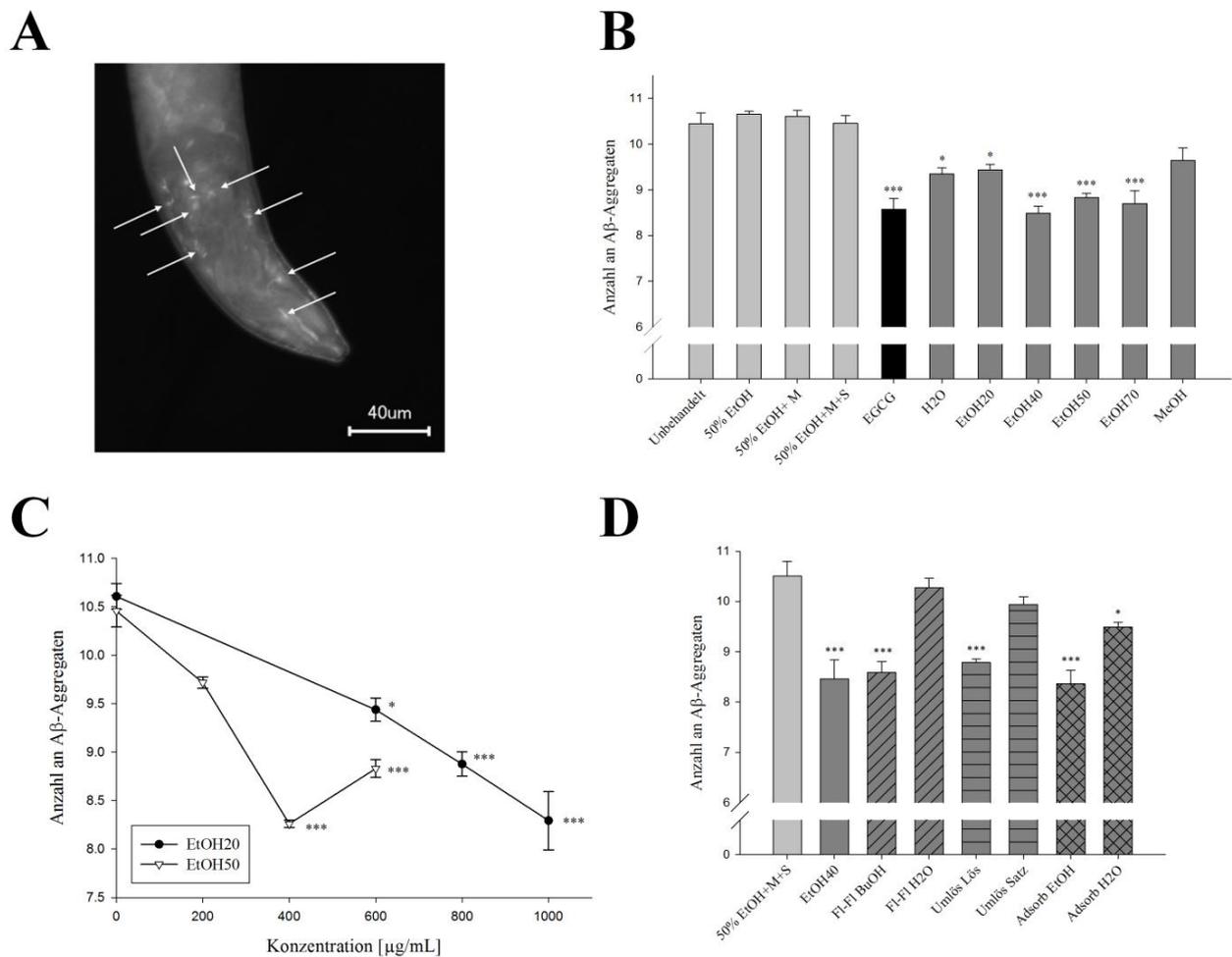


Abbildung 3.16: Wirkung von *S. scardica* auf die Aβ-Aggregation. **A** Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Kopfbereiches eines *C. elegans*-Wurmes des Stammes CL2006. Die Pfeile zeigen auf die Aβ-Aggregate, welche zuvor mit Thioflavin S angefärbt wurden. **B, C, D** Reduktion der Anzahl an Aβ-Plaques. Die Würmer wurden mit 600 µg/mL Extrakt, 100 µg/mL EGCG oder dem Lösemittel bzw. Lösemittel mit Hilfsstoffen behandelt. Die angefärbten Aβ-Plaques wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt (**B**); die mittelpolaren *S. scardica*-Auszüge zeigten eine konzentrationsabhängige Aggregationshemmung (**C**); Behandlung mit 400 µg/mL 40 % ethanolischem *S. scardica*-Primärextrakt oder dessen Extraktfraktionen (**D**); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Die Würmer wurden weiterhin mit EtOH20 und EtOH50 in je 3 verschiedenen Konzentrationen behandelt. Diese richteten sich nach der Verträglichkeit für die Würmer und war für beide Extrakte unterschiedlich (Kapitel 2.2.7). EtOH20 konnte in Konzentrationen von 600, 800 und 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ getestet werden; bei EtOH50 waren es 200, 400 und 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es zeigte sich eine klassische Konzentrationsabhängigkeit (Dosisabhängigkeit) der aggregationshemmenden Wirkung bei EtOH20; bei EtOH50 stieg die Plaquezahl bei der Behandlung mit 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Vergleich zu 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wieder leicht an (Abbildung 3.16, C), was an einer U-förmigen Dosis-Wirkungsbeziehung liegen kann (Calabrese und Baldwin, 2001). 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtOH20 und 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtOH50 waren mit einer Reduktion der Plaquezahl von ca. 22 % die effektivsten getesteten Behandlungen ($p < 0,001$). Die 6 Extraktfraktionen sowie der originale 40 % ethanolische *S. scardica*- Primärextrakt wurden vergleichend in einer Konzentration von 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ getestet. Alle lipophileren Fraktionen (Butanolphase der Flüssig-Flüssig-Extraktion, lösliche Fraktion aus der Umlösung in 70 % Ethanol, Ethanolphase der Adsorberbehandlung) konnten, wie der Primärextrakt, die Anzahl an Plaques hochsignifikant senken (Abbildung 3.16, D). Dabei unterscheiden sie sich in ihrer Wirkung untereinander kaum (alle etwa 20 % Reduktion). Von den polaren Fraktionen war nur die Wasserphase der Adsorberbehandlung in der Lage, eine signifikante Verminderung von ca. 10 % zu erreichen.

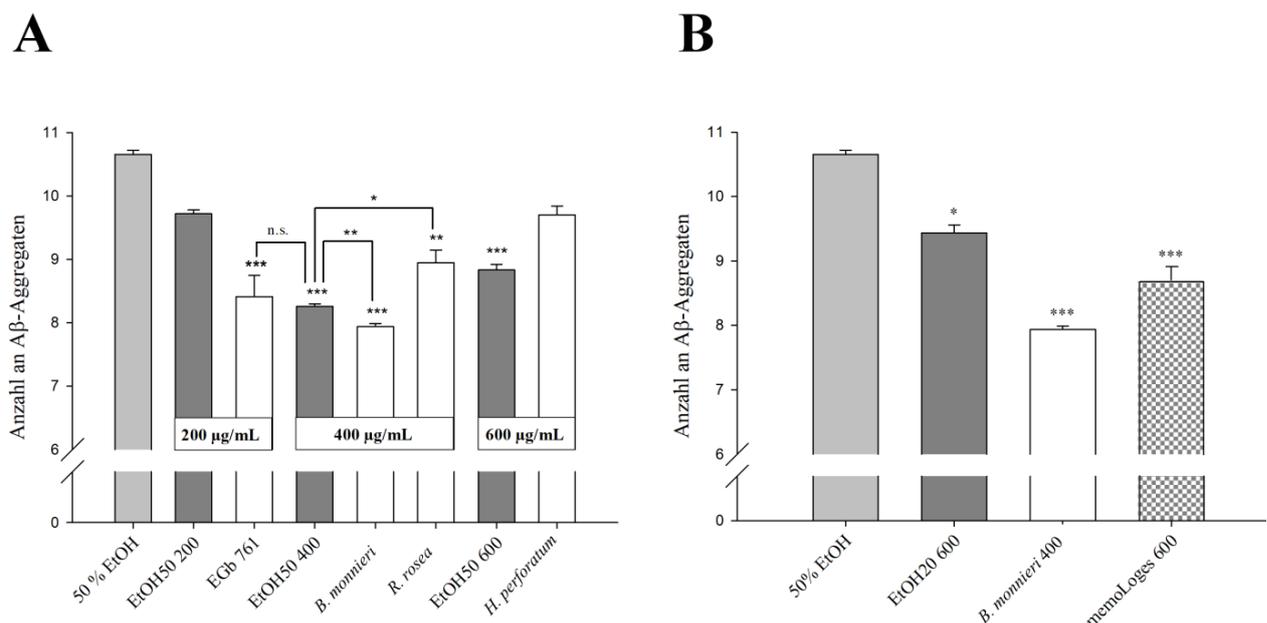


Abbildung 3.17: Wirkung der Referenzextrakte und memoLoges® auf die A β -Aggregation im Vergleich zu *S. scardica*. **A** Würmer des Stammes CL2006 wurden mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGb 761; 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Bacopa monnieri* bzw. *Rhodiola rosea* oder 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Hypericum perforatum* behandelt. Vergleichend dazu die Anzahl an A β -Plaques von mit der entsprechenden Konzentration 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes behandelten Würmern. **B** Behandlung mit 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Sideritis scardica* EtOH20, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Bacopa monnieri* oder 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kapselinhalt memoLoges®. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant

Vergleichend zu den Ergebnissen von *Sideritis scardica* wurden die Referenzextrakte und der Kapselinhalt des Präparates memoLoges® in den jeweils für *C. elegans* verträglichen Dosen getestet. Leider waren so nicht alle direkt untereinander mit 600 µg/mL vergleichbar (Standardkonzentration für alle Sideritis-Extrakte), weswegen die Extrakte immer mit der jeweiligen Konzentration an *S. scardica*-Auszug verglichen wurden (Abbildung 3.17). 200 µg/mL des Ginkgo-Spezialextraktes EGb 761 konnten die Zahl der β-Amyloid-Ablagerungen so stark senken, wie 400 µg/mL des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes, welcher mit 200 µg/mL noch keinen signifikanten Effekt erkennen ließ. Der *Bacopa monnieri*-Auszug zeigte mit 400 µg/mL sogar eine noch größere Aktivität. Im Gegensatz zum Johanniskraut konnte auch *Rhodiola rosea* die Aggregation der Aβ-Peptide verringern (etwa 13 % weniger Plaques). 600 µg/mL des Kapselinhaltes von memoLoges®, welches Auszüge aus Sideritis und Bacopa im Verhältnis von ca. 3 : 1 enthält, war wirksamer als die gleiche Konzentration 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes, aber weniger potent als 400 µg/mL *B. monnieri*. Dabei machen von den 600 µg/mL des Präparates etwa 340 µg Sideritis und 105 µg Bacopa aus.

Für eine weitere Fragestellung wurden die Fadenwürmer entweder, wie üblich, mit lebenden oder mit bei 65 °C abgetöteten *E. coli* OP50 gefüttert (Kapitel 2.2.5). In jedem Fall wurden sie aber mit 600 µg/mL des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes behandelt. Einen pharmakologischen Einfluss auf die Würmer hatte der Zustand der Bakterien jedoch nicht; beide Methoden führten zu einer ca. 20 % kleineren Zahl an sichtbaren Aβ-Ablagerungen (Abbildung 3.18).

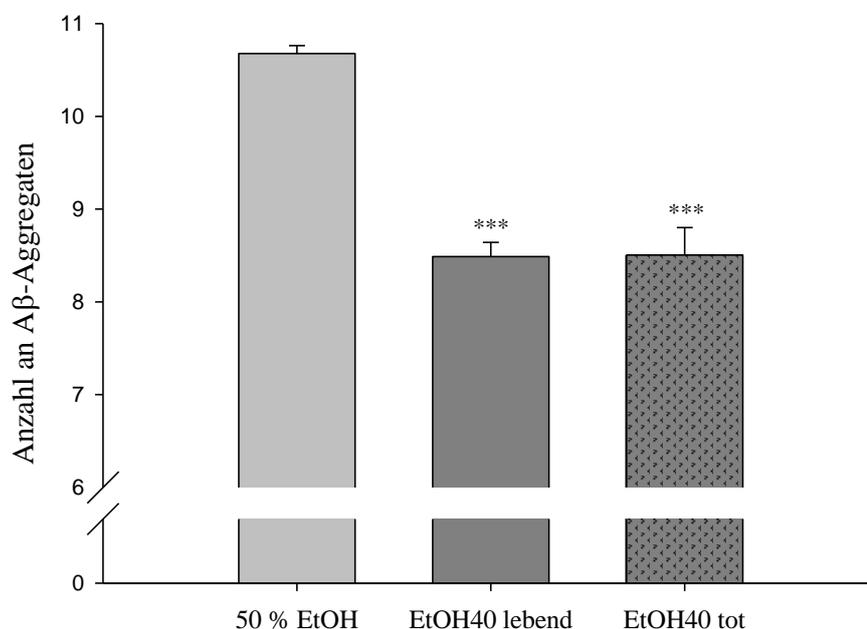


Abbildung 3.18: Einfluss des Zustandes der Futterquelle auf die Wirkung von *S. scardica* auf die Aβ-Aggregation. Die Würmer wurden für diesen Versuch auf NGM-Platten gehalten, die 600 µg/mL 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakt und entweder lebende oder abgetötete *E. coli* OP50 enthielten. Die mit Thioflavin S angefärbten Plaques wurden wie üblich ausgezählt. *** p < 0,001

3.7.1.2 A β -Toxizität (Paralyse-Assay)

Um zu prüfen, ob auch die toxische Wirkung der gebildeten A β -Peptide in *C. elegans* vermindert wird, wurden Würmer des Stammes CL4176, welche durch die temperaturinduzierbare Expression von A β mit der Zeit paralisieren, mit den Extrakten behandelt. Um sicherzustellen, dass die Paralyse ausschließlich den β -Amyloiden zuzuschreiben war, wurden auch Würmer des Kontrollstammes CL802 mit den jeweils höchsten verwendeten Konzentrationen der Substanzen ausgesetzt.

Wurden die Würmer mit 600 $\mu\text{g/mL}$ der *S. scardica*-Extrakte behandelt, verzögerte sich die Paralyse deutlich, was in einer Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Kontrolle resultierte (Abbildung 3.19, A). Der 50 % ethanolische Auszug war dabei am effektivsten. Dieser und der 20 % ethanolische Extrakt zeigten, wie bei der Anzahl an Plaques, eine Konzentrationsabhängigkeit (B, C). Verglichen wurden die Extrakte mit der jeweils passenden Kontrolle (Lösungsmittel und Hilfsstoffe, Kapitel 2.2.6). In keinem Fall zeigten Würmer des Kontrollstammes CL802 eine A β -bedingte Paralyse. Beim Vergleich der Fraktionen des 40 % ethanolischen Primärextraktes waren die lipophileren (Fl-FI BuOH, Umlös Lös und Adsorb EtOH) den polaren überlegen (Abbildung 3.20 A, B, C). Von den getesteten Reinstoffen verschoben nur 200 $\mu\text{g/mL}$ der Phenylethanoide sowie von Scutellarin die Kurve deutlich nach rechts (D, E, F).

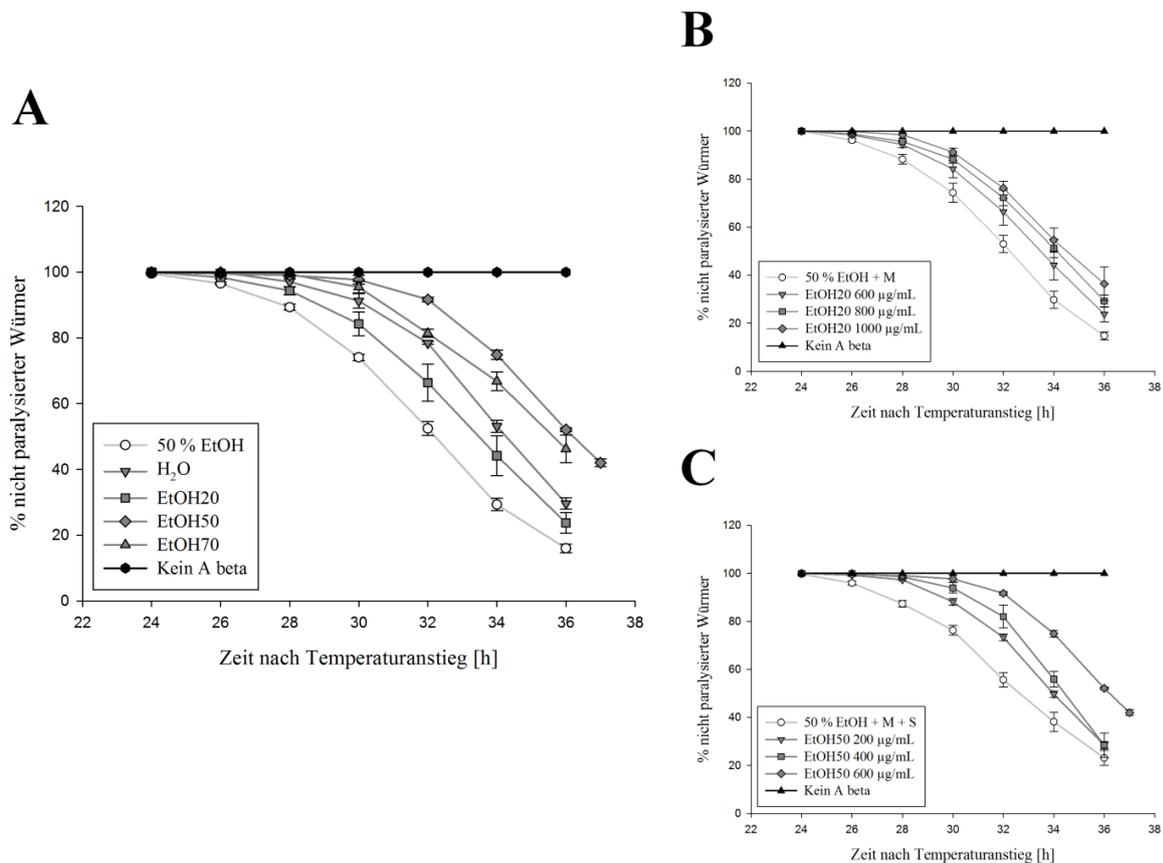


Abbildung 3.19: Wirkung der *S. scardica*-Extrakte auf die A β -induzierte Paralyse. Die Behandlung mit 600 $\mu\text{g/mL}$ der Auszüge verlangsamte die Progression der Paralyse von Würmern des Stammes CL4176 im Vergleich zur Kontrolle (A). Der Kontrollstamm CL802 exprimiert kein A β . Der 20 % (B) sowie der 50 % ethanolische Extrakt (C) aus dem Griechischen Bergtee zeigten eine Abhängigkeit der Wirkung von der eingesetzten Konzentration.

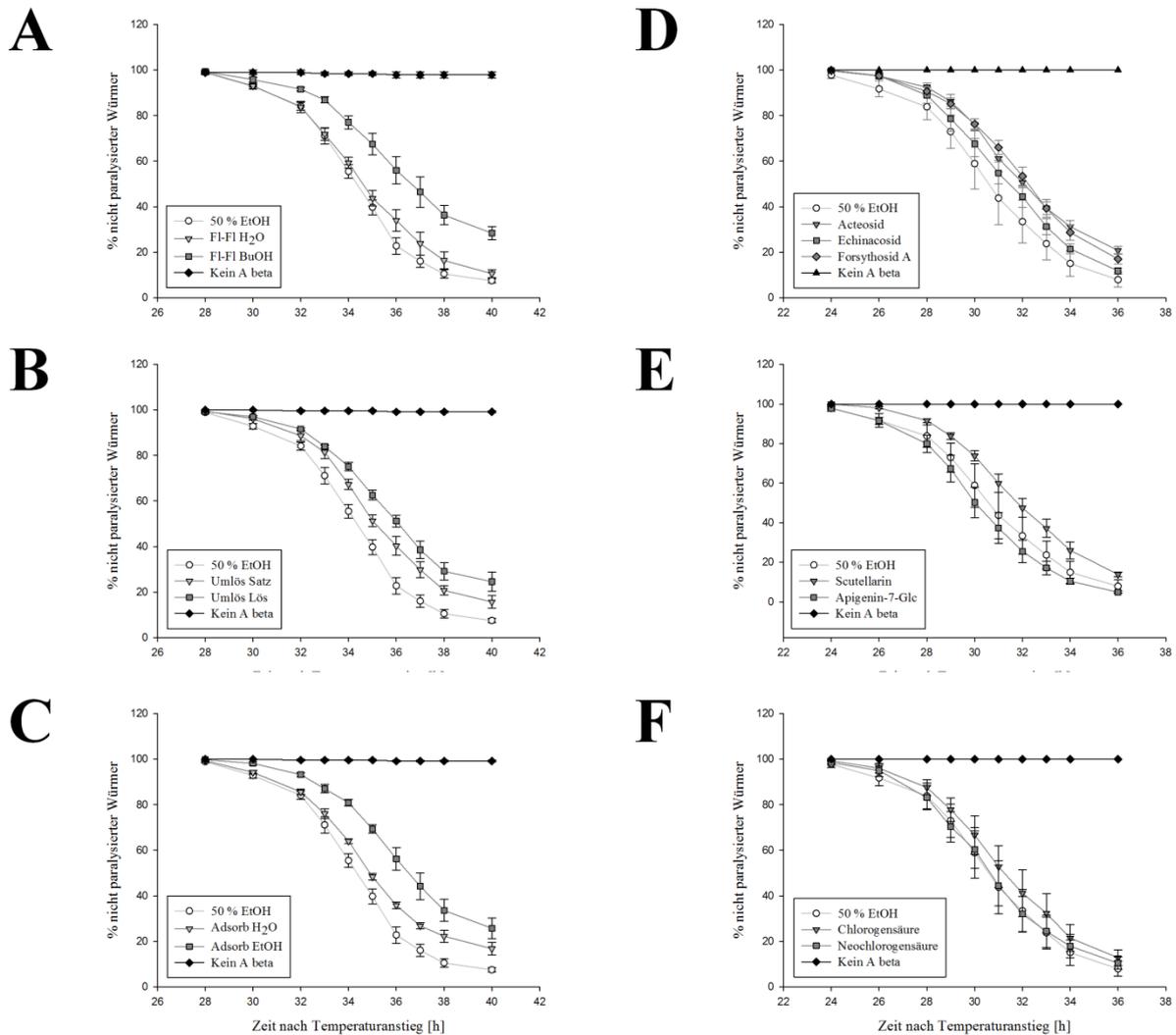


Abbildung 3.20: Wirkung der Extraktfraktionen und Reinsubstanzen auf die A β -induzierte Paralyse. **A, B, C** Verzögerung der Paralyse durch die Fraktionen des 40 % ethanolischen Primärextraktes (400 μ g/mL). Dargestellt sind im direkten Vergleich die Wirkung der Butanol- und Wasserphase aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion (**A**), die lösliche – und Bodensatzfraktion aus der Umlösung des Primärextraktes in 70 % Ethanol (**B**) und die Ethanol- und Wasserfraktion aus der Adsorberaufreinigung (**C**). **D, E, F** Verzögerung der Paralyse durch die Reinsubstanzen (200 μ g/mL). Im direkten Vergleich die getesteten Phenylethanoide (**D**), Flavonoide (**E**) und Caffeoylchinasäuren (**F**).

Als Vergleichswert wurde der PT₅₀-Wert gewählt. Er stellt den Median dar, also den Zeitpunkt, an dem exakt 50 % der Würmer paralytisch waren. Sämtliche PT₅₀ sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Da das Verhalten der Würmer von vielen Faktoren abhängig ist und sich auch in den verschiedenen Versuchsreihen die Startzeitpunkte und der Verlauf der Paralyse stets leicht unterschieden, ist ein direkter Vergleich der Mediane nicht zielführend, weswegen sie den Testreihen nach geordnet sind. Auch die Angabe von Relativwerten (% der jeweiligen Kontrolle) führt nicht dazu, dass man die Werte verschiedener Versuchsreihen untereinander unbedingt vergleichen kann, da der Paralyseverlauf und das –ausmaß sich unterschieden. So konnte z. B. 600 μ g/mL EtOH50 (Testserie 1, Start der Paralyse 24 h nach Anhebung der Temperatur) den Median um über 10 % verschieben; in Testserie 3 startete die Paralyse erst

nach 28 h und die effektivsten Behandlungen verschoben den PT_{50} um max. 6,5 % (Fl-Fl BuOH). Trotzdem funktionieren Negativ- und Positivkontrollen stets, weswegen die Behandlungen innerhalb der Versuchsreihen verglichen werden können. Insgesamt lässt sich aus den PT_{50} -Werten ablesen, dass die mittelpolaren *S. scardica*-Extrakte, die lipophilen Extraktfraktionen, die Phenylethanoide und von den Referenzextrakten EGb 761, *B. monnieri* und *H. perforatum* (Abbildung 3.21 **A, B**) am potentesten waren und sich signifikant von den Kontrollen unterschieden. Auch die Behandlung mit memoLoges® führte zu einem verlangsamten Fortschritt der Paralyse (**C**). Wurden die Fadenwürmer mit abgetöteten, statt lebenden *E. coli* OP50 gefüttert, unterschied sich das Wachstum (deutlich kleiner) sowie das gesamte Verhalten komplett (Abbildung 3.22). Sie fingen ca. 8 h später an zu paralisieren und taten dies auch deutlich langsamer. Ein Trend zur Wirksamkeit des 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes konnte auch in diesem Modus beobachtet werden; da der PT_{50} -Wert aber während der 12 h nicht erreicht wurde, kann keine Aussage über eine statistische Signifikanz getroffen werden.

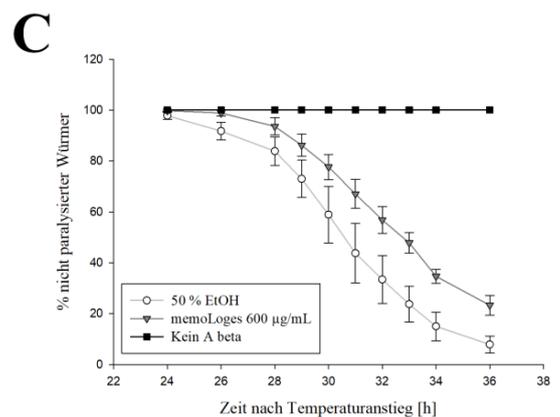
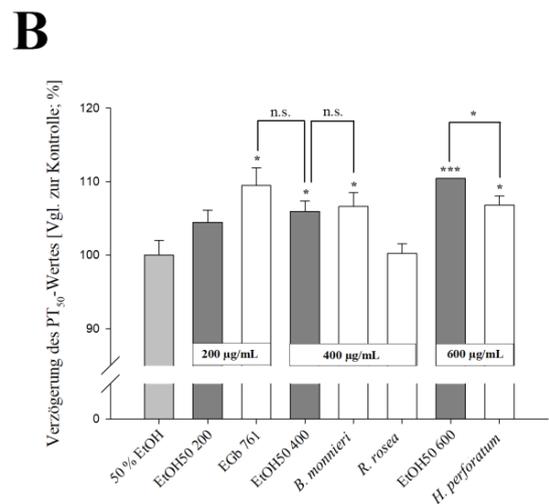
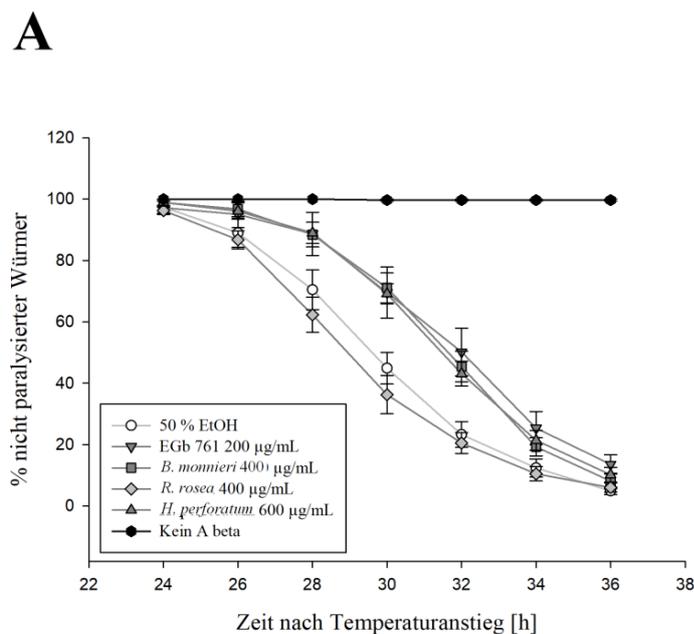


Abbildung 3.21: Wirkung der Referenzextrakte auf die $A\beta$ -induzierte Paralyse. Die Behandlung mit dem Ginkgo-Spezialextrakt, Brahmi und Johanniskraut verzögerten die Paralyse, während Rosenwurz keine Wirkung zeigte (**A**). Vergleich der Wirkung (PT_{50}) der Referenzextrakte mit den entsprechenden Konzentrationen des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes (**B**). Auch die Behandlung der Fadenwürmer mit dem Kapselinhalt von memoLoges® in einer Konzentration von 600 $\mu\text{g/mL}$ verschob die Kurve nach rechts (**C**). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant

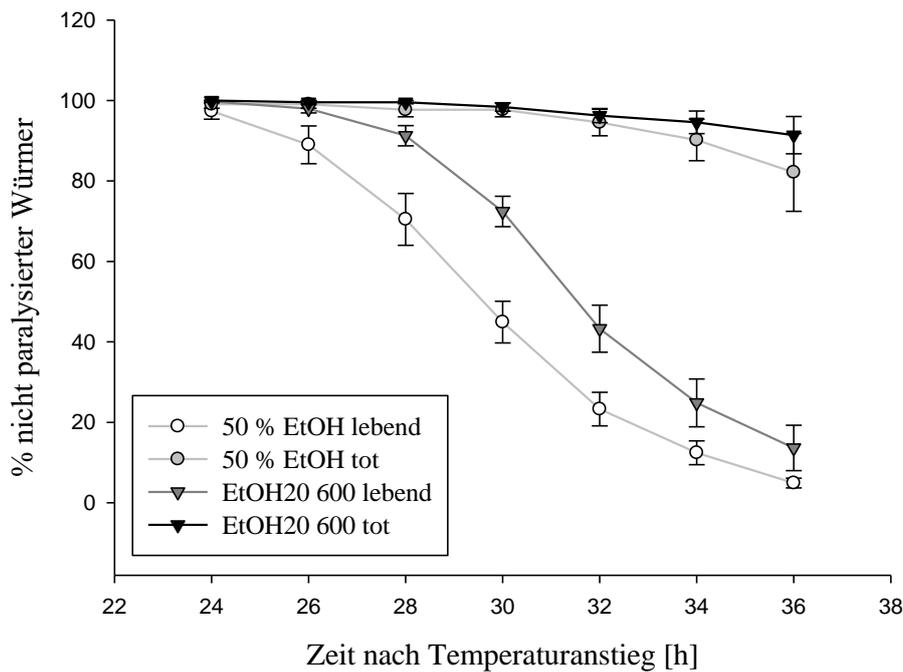


Abbildung 3.22: Einfluss des Zustandes der Futterquelle auf die Wirkung von *S. scardica* auf die A β -induzierte Paralyse. Würmer des Stammes CL4176 wurden entweder mit lebenden oder mit abgetöteten *E. coli* OP50 gefüttert. Zusätzlich wurden sie im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit 600 $\mu\text{g/mL}$ 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakt behandelt. Würmer, die sich von toten Bakterien ernährten, verhielten sich gänzlich anders.

Tabelle 3.6: PT₅₀-Werte aller Behandlungen aus dem Paralyse-Assay; geordnet nach Versuchsreihen.

Testreihe	Behandlung	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	PT ₅₀ \pm SEM [h]	Signifikanz
Reihe 1	Unbehandelt		33,5 \pm 0,5	
	50 % EtOH	Entsprechend 1000	33,5 \pm 0,5	
	50 % EtOH + M	Entsprechend 1000	33,0 \pm 0,6	
	50 % EtOH + M + S	Entsprechend 1000	33,5 \pm 0,5	
	EGCG	100	35,5 \pm 0,5	p < 0,05
	H ₂ O	600	35,5 \pm 0,5	p < 0,05
	EtOH20	600	35,0 \pm 0,6	p < 0,05
		800	35,5 \pm 0,5	p < 0,05
		1000	35,8 \pm 0,6	p < 0,05
	EtOH50	200	35,0 \pm 0,6	
		400	35,5 \pm 0,5	p < 0,05
		600	37,0 \pm 0,0	p < 0,001
EtOH70	600	36,3 \pm 0,3	p < 0,01	
MeOH	600	35,0 \pm 1,0		

Tabelle 3.6 - Fortsetzung

Reihe 2	50 % EtOH	Entsprechend 600	30,3 ± 0,6	
	50 % EtOH OP50 tot	Entsprechend 600	Nicht erreicht	
	EtOH20	600	32,8 ± 0,5	p < 0,05
	EtOH20 OP50 tot	600	Nicht erreicht	
	EGb 761	200	33,2 ± 0,8	p < 0,05
	<i>B. monnieri</i>	400	32,3 ± 0,6	p < 0,05
	<i>R. rosea</i>	400	30,4 ± 0,4	
	<i>H. perforatum</i>	600	32,4 ± 0,4	p < 0,05
Reihe 3	50 % EtOH	Entsprechend 600	34,8 ± 0,3	
	EtOH40	400	35,5 ± 0,3	
		600	36,5 ± 0,3	p < 0,01
	Fl-Fl BuOH	400	37,0 ± 0,6	p < 0,05
	Fl-Fl H ₂ O	400	35,3 ± 0,3	
	Umlös Lös	400	36,8 ± 0,3	p < 0,01
	Umlös Satz	400	35,5 ± 0,3	
	Adsorb EtOH	400	37,0 ± 0,4	p < 0,01
Adsorb H ₂ O	400	35,3 ± 0,3		
Reihe 4	50 % EtOH	Entsprechend 600	31,0 ± 0,4	
	memoLoges	600	33,5 ± 0,5	p < 0,01
	Acteosid	200	32,8 ± 0,3	p < 0,05
	Echinacosid	200	32,3 ± 0,5	
	Forsythosid A	200	32,8 ± 0,3	p < 0,05
	Scutellarin	200	32,0 ± 0,4	
	Apigenin-7-Glc	200	30,8 ± 0,5	
	Chlorogensäure	200	31,8 ± 0,8	
Neochlorogensäure	200	31,0 ± 0,4		

3.7.1.3 A β -induzierte neuronale Dysfunktion (Chemotaxis und 5-HT-Sensibilität)

Um zu prüfen, ob die durch den Griechischen Bergtee verminderte A β -Toxizität auch wirklich die Neurodegeneration vermindert und somit vor der Beeinträchtigung von neuronal kontrolliertem Verhalten und kognitiven Fähigkeiten schützen kann, wurde der transgene *C. elegans*-Stamm CL2355 genutzt. Dieser exprimiert pan-neuronal humanes β -Amyloid, was durch Nervenschädigungen zu neuronalen Dysfunktionen führt. Das ist zum einen das schlechtere Ansprechen auf Benzaldehyd als chemischen Stimulus (Chemotaxis; durch Degeneration der ASH-Neuronen), zum anderen das hypersensible Ansprechen auf exogen zugesetztes Serotonin (5HT-Hypersensibilität). In beiden Experimenten wurde der Kontrollstamm CL2122 genutzt, der kein A β exprimiert und deswegen keine Beeinträchtigung dieser neuronal gesteuerten Verhaltensweisen aufweist.

Im Chemotaxis-Assay bewegten sich Würmer des Stammes CL2355, die nur mit den entsprechenden Mengen 50 % Ethanol und den Hilfsstoffen behandelt wurden, in einem deutlich geringeren Ausmaß zum Benzaldehyd als die Würmer des Kontrollstammes ohne A β -Expression, zeigten also einen niedrigen Chemotaxis-Index (Abbildung 3.23 A). Tiere, die mit 100 μ g/mL EGCG oder 600 μ g/mL *S. scardica*-Extrakt mit 20; 40 oder 50 % Ethanol

als AZM behandelt wurden, wiesen einen signifikant höheren CI auf, als die Negativkontrollen. EtOH50 war der wirksamste Extrakt mit einem fast 5 Mal so großem Chemotaxis-Index als die Kontrolle, was etwa 88 % des Kontrollstammes ausmacht, der gar kein A β exprimiert. Dies ist auf die verminderte A β -induzierte Degeneration der für diese kognitive Fähigkeit wichtigen Nervenzellen zurückzuführen. Um zu testen, ob *S. scardica* die chemotaktische Bewegung des Kontrollstammes beeinflusst, wurde auch dieser mit 600 $\mu\text{g/mL}$ EtOH50 (potenteste Behandlung im Teststamm) behandelt. Hier zeigte sich jedoch kein Effekt. Der 20 und 50 % ethanolische Auszug aus *S. scardica* zeigte auch in diesem Experiment eine Dosisabhängigkeit der Wirkung (B). Wie die Ergebnisse der A β -Plaqueszahl und des Paralyse-Assays vermuten ließen, wirkten die lipophilen Fraktionen aus dem 40 % ethanolischen Primärauszug sowie dieser selbst in einer Konzentration von 400 $\mu\text{g/mL}$ besser als die polaren Extraktfraktionen (C). Wurden die Würmer mit 200 $\mu\text{g/mL}$ der Phenylethanoide oder Scutellarin behandelt, wurden mehr von ihnen vom Benzaldehyd angelockt als die Negativkontrolle, jedoch reichte es nur bei den Phenylethanoiden zu einer statistischen Signifikanz (D). Acteosid und Forsythosid A erreichten dabei fast den Wert von 600 $\mu\text{g/mL}$ EtOH50 und ähnelten damit dem CI des undegenerierten Kontrollstammes.

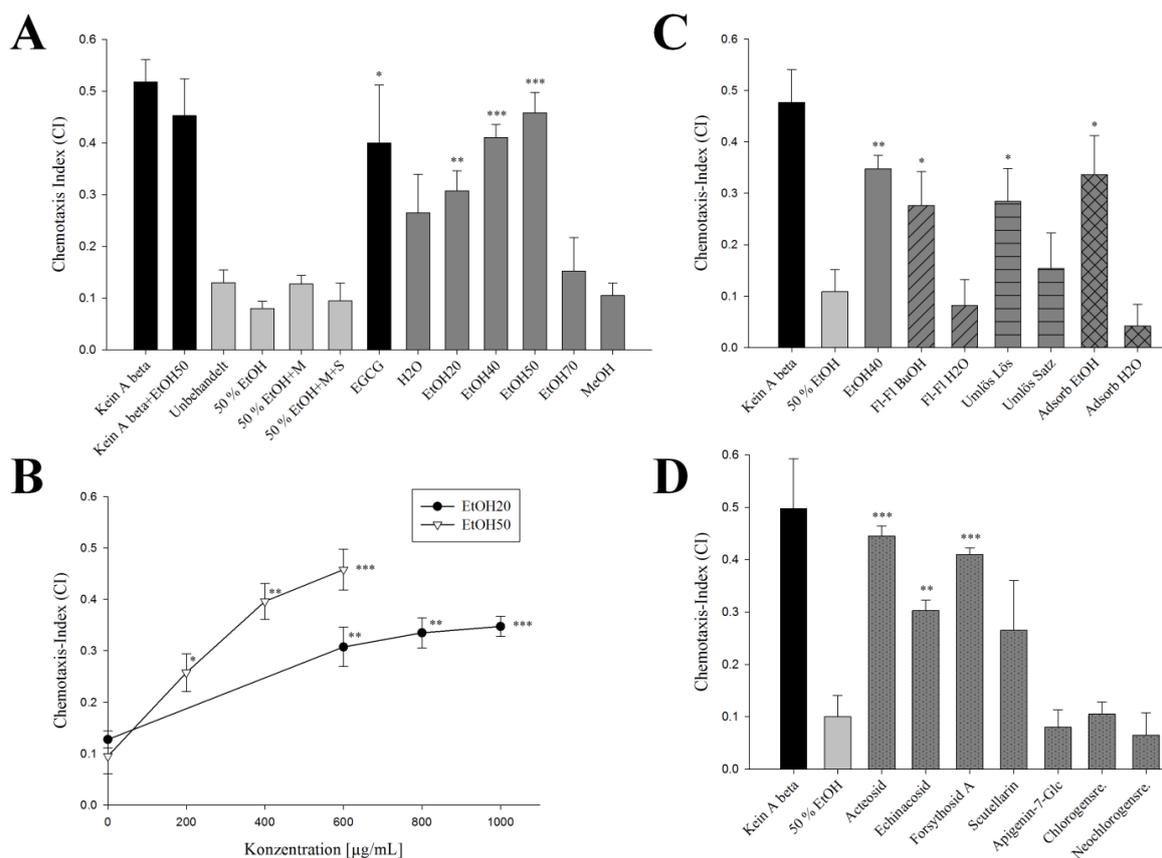


Abbildung 3.23: Wirkung von *S. scardica* auf die A β -induzierte neuronale Dysfunktion (Chemotaxis). Würmer des Stammes CL2355, welche durch die pan-neuronale Expression von A β im geringeren Maße einem Anlockungsmittel folgen, wurden mit 600 $\mu\text{g/mL}$ der *S. scardica*-Extrakte oder 100 $\mu\text{g/mL}$ EGCG als Positivkontrolle behandelt (A). Der Kontrollstamm CL2122 exprimiert kein A β und zeigte deswegen einen hohen Chemotaxis-Index. Die 20 und 50 % ethanolischen Auszüge zeigten eine dosisabhängige Wirkung (B). Der 40 % ethanolische Primärauszug wurde vergleichend mit den aus ihm gewonnenen Fraktionen in einer Konzentration von 400 $\mu\text{g/mL}$ getestet (C) und die Reinsubstanzen mit je 200 $\mu\text{g/mL}$ (D). Sre.: Säure; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Um Vergleiche ziehen zu können, wurden auch die ZNS-aktiven Referenzextrakte in den für die Würmer verträglichen Konzentrationen getestet. Hierbei blieben Rosenwurz und Johanniskraut unwirksam, während 200 µg/mL des Ginkgo-Spezialextraktes und 400 µg/mL Brahmi-Extrakt, wie in den Experimenten zuvor, dem Effekt der A β -Peptide entgegenwirkten (Abbildung 3.24, **A**). Dabei unterschied sich der Chemotaxis-Index jeweils nicht von dem der entsprechenden Konzentration an 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakt. Auch das Fertigpräparat memoLoges® wirkte in diesem Experiment neuroprotektiv, und zwar stärker als seine Einzelkomponenten (**B**). Dabei konnte der *B. monnieri*-Extrakt leider nicht in derselben Konzentration wie das Kombipräparat bzw. EtOH20 getestet werden.

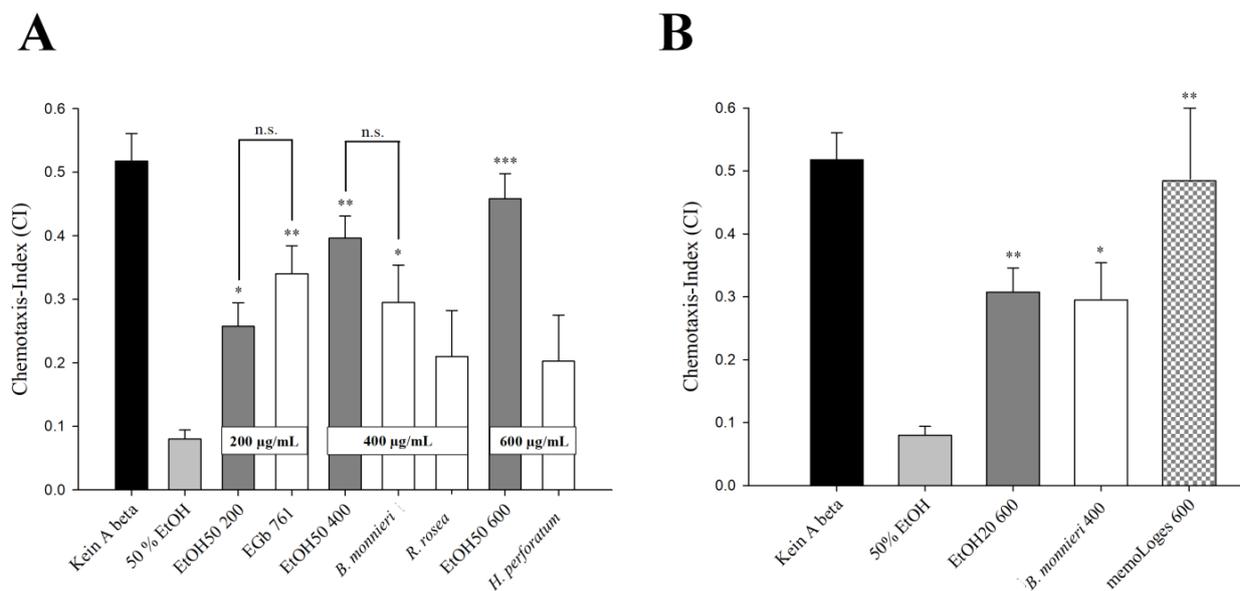


Abbildung 3.24: Wirkung der Referenzextrakte und memoLoges® auf die A β -induzierte neuronale Dysfunktion (Chemotaxis). 200 µg/mL des Ginkgo-Extraktes EGb 761 sowie 400 µg/mL des *Bacopa monnieri*-Extraktes konnten das Ausmaß der chemotaktischen Bewegung im Vergleich zur Kontrolle ähnlich stark erhöhen, wie die entsprechenden Konzentrationen des 50 % ethanolischen Auszuges aus dem Griechischen Bergtee (**A**). Behandlung mit 600 µg/mL *Sideritis scardica* EtOH20, 400 µg/mL *Bacopa monnieri* oder 600 µg/mL Kapselinhalt memoLoges® (**B**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant; Konzentrationen in µg/mL

Da die Testung auf die 5HT-Hypersensibilität dem gleichen Protokoll folgt, entsprachen die Ergebnisse hier im Wesentlichen denen des Chemotaxis-Assays. Im Gegensatz zu Würmern des Kontrollstammes paralyisierten fast die Hälfte der Tiere des Stammes CL2355, wenn sie in eine 1 mM Serotonin-Lösung gegeben wurden (Abbildung 3.25 **A**). 100 µg/mL EGCG und 600 µg/mL der polaren bis mittelpolaren *S. scardica*-Extrakte konnten den Anteil an aktiven (= nicht paralyisierten) Würmern aufrechterhalten, was wie bei der Chemotaxis auf eine reduzierte Neurodegeneration und damit auf eine ungestörtere Signalübertragung zurückzuführen ist. Der 50 % ethanolische Extrakt war wieder der potenteste und entsprach mit 85 % aktiven Würmern fast dem Kontrollstamm ohne A β -Expression. Diesmal hatte auch

der wässrige Auszug eine statistisch signifikante Wirkung. Desweiteren zeigten EtOH20 und EtOH50 wieder eine konzentrationsabhängige Wirkung (B), die lipophilen Extraktfraktionen aus EtOH40 waren wirksamer als die hydrophilen (C) und von den Reinsubstanzen aus dem Griechischen Bergtee wirkten wieder nur die 3 getesteten Phenylethanoid-Glykoside neuroprotektiv (D).

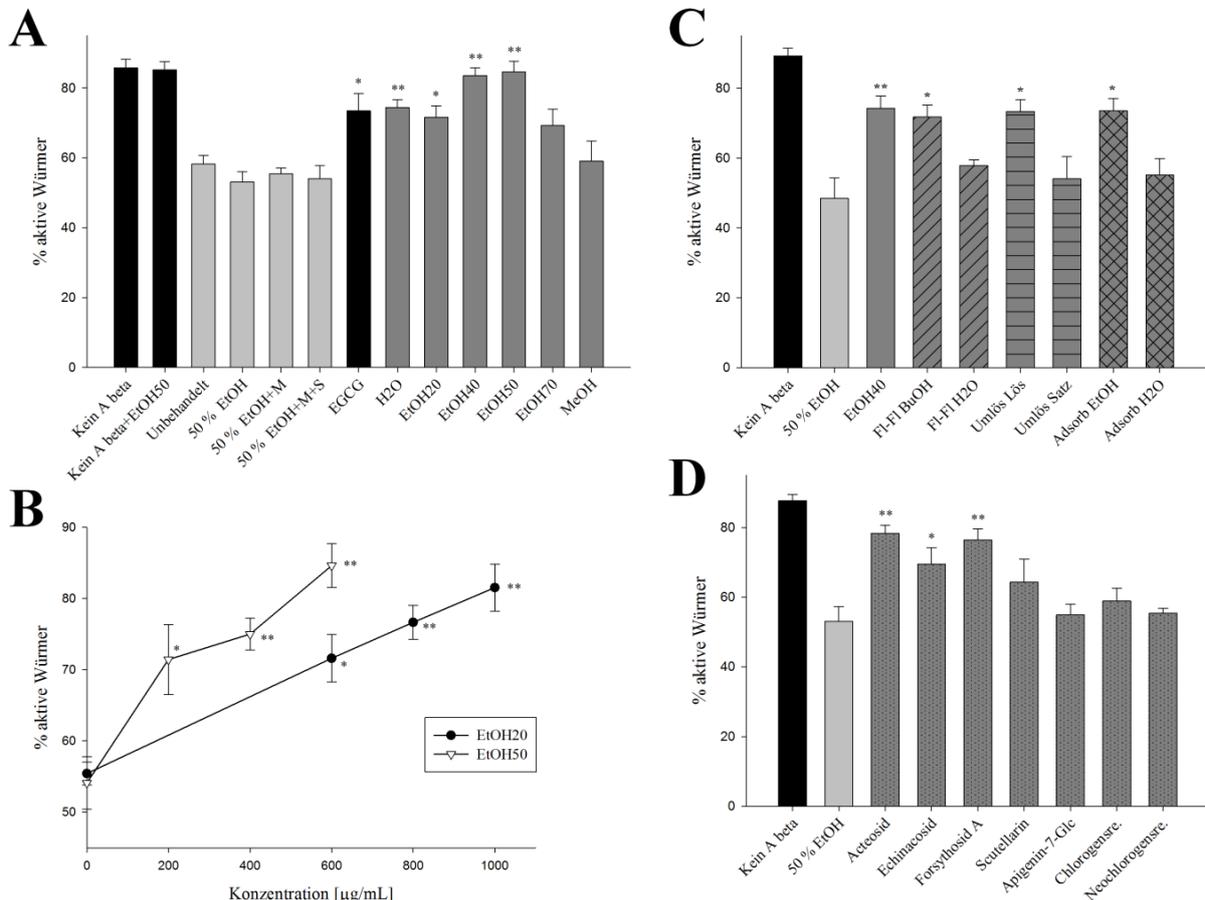


Abbildung 3.25: Wirkung von *S. scardica* auf die A β -induzierte neuronale Dysfunktion (5HT-Hypersensibilität). Würmer des Stammes CL2355, welche durch die pan-neuronale Expression vermehrt durch exogenes Serotonin paralisieren, wurden mit 600 μ g/mL der *S. scardica*-Extrakte oder 100 μ g/mL EGCG als Positivkontrolle behandelt (A). Der Kontrollstamm CL2122 exprimiert kein A β und wies deswegen viele aktive Tiere auf. Die 20 und 50 % ethanolischen Auszüge zeigten eine dosisabhängige Wirkung (B). Der 40 % ethanolische Primärextrakt wurde vergleichend mit den aus ihm gewonnenen Fraktionen in einer Konzentration von 400 μ g/mL getestet (C) und die Reinsubstanzen mit je 200 μ g/mL (D). Sre.: Säure; * p < 0,05; ** p < 0,01

Bei den Referenzextrakten ergab sich im Wesentlichen auch das gleiche Bild wie beim Chemotaxis-Versuch, nur das jetzt 600 μ g/mL des Johanniskraut-Extraktes eine ähnlich starke Effektivität wie EtOH50 aufwies (Abbildung 3.26 A). Dies ist womöglich nicht auf eine Reduktion der A β -induzierten Neurodegeneration zurückzuführen, sondern auf eine direkte Beeinflussung der Serotonin-Transmission, was den Wirkmechanismus des antidepressiv wirkenden *Hypericum perforatum* ausmacht (siehe Diskussion). Die Wirkung von 600 μ g/mL Kapselinhalt aus memoLoges® entsprach exakt der der gleichen Konzentration an EtOH20 und 400 μ g/mL *Bacopa monnieri* (B).

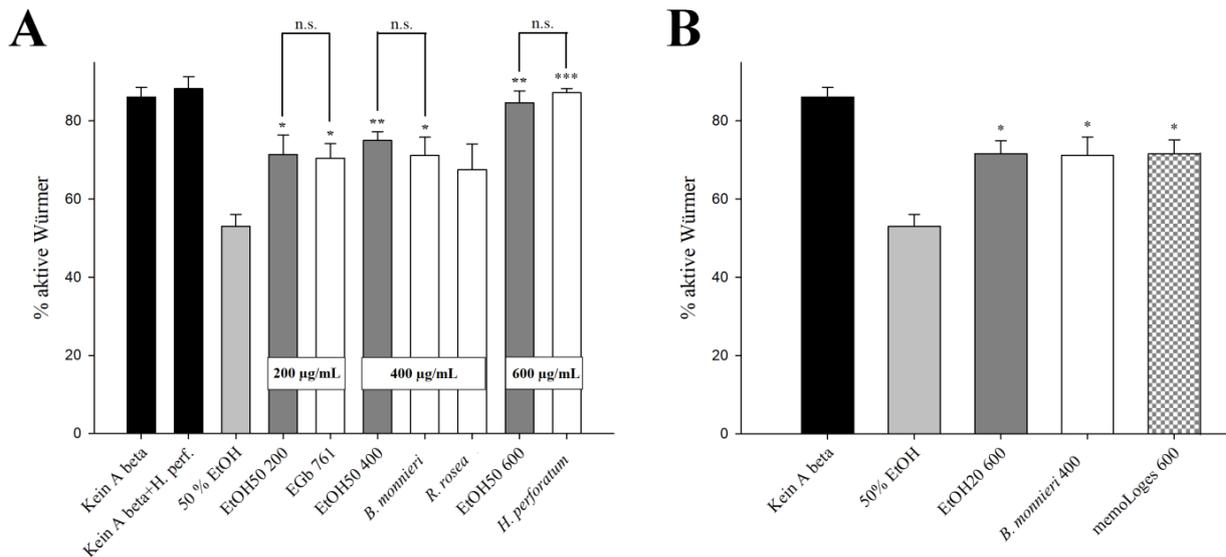


Abbildung 3.26: Wirkung der Referenzextrakte und memoLoges® auf die Aβ-induzierte neuronale Dysfunktion (5HT-Hypersensibilität). 200 µg/mL des Ginkgo-Extraktes EGb 761, 400 µg/mL des *Bacopa monnieri*-Extraktes und 600 µg/mL *Hypericum perforatum* konnten die Prozentzahl an Tieren, die nicht durch exogenes 5HT paralisieren, genau so stark erhöhen, wie die entsprechenden Konzentrationen des 50 % ethanologischen Auszuges aus dem Griechischen Bergtee (A). Behandlung mit 600 µg/mL *Sideritis scardica* EtOH20, 400 µg/mL *Bacopa monnieri* oder 600 µg/mL Kapselinhalt memoLoges® (B). * p < 0,05; ** p < 0,01; n.s. nicht signifikant; Konzentrationen in µg/mL

3.7.2 Wirkung auf Tau-bedingte Störungen

Die potentielle Wirkung des Griechischen Bergtees auf Tau-Proteine wurde mit Hilfe des *C. elegans*-Stammes VH254 untersucht. Dieser exprimiert hyperphosphoryliertes Tau in den Motorneuronen, was durch dessen toxische Wirkung zu unkoordinierten Bewegungen führt. Als Kontrollstamm ohne Tau-Expression diente GE24. Weder das Lösungsmittel 50 % Ethanol, noch die Hilfsstoffe Maltodextrin oder Siliciumdioxid zeigten einen Einfluss, während Curcumin als Positivkontrolle die Prozentzahl an Würmern mit unkoordinierter Bewegung halbierte (Abbildung 3.27 A). Eine Behandlung mit 600 µg/mL der *S. scardica*-Extrakte resultierte beim 20; 40; und 50 % ethanologischen sowie beim methanolischen Extrakt in einer signifikant verringerten Prozentzahl an Fadenwürmern mit Bewegungsstörungen, wobei die beiden mittelpolaren Auszüge etwa so effektiv wie die Positivkontrolle waren. EtOH20 wurde in weiteren, höheren Konzentrationen getestet und EtOH50 in niedrigeren. Beide zeigten eine klassische Konzentrationsabhängigkeit (B).

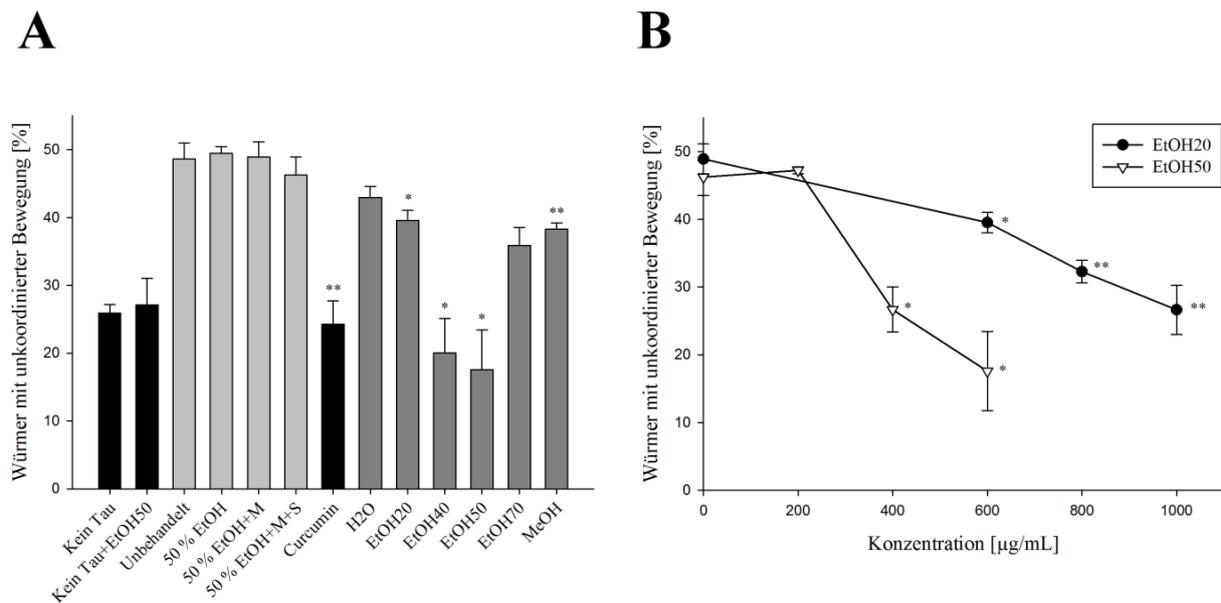


Abbildung 3.27: Wirkung von *S. scardica* auf die Tau-Toxizität. Würmer des Stammes VH254, welche Tau-bedingte Bewegungsstörungen aufzeigten, wurden mit 600 $\mu\text{g/mL}$ der Extrakte oder 10 $\mu\text{g/mL}$ Curcumin als Positivkontrolle behandelt (A). Als Kontrollstamm ohne Tau-Expression diente GE24. Der 20 und 50 % ethanolische Auszug zeigte eine konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungs-Beziehung (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.8 Einfluss auf Parkinson-assoziierte Pathomechanismen

3.8.1 Wirkung auf α -Synuclein-bedingte Störungen

3.8.1.1 Aggregation von α -Synuclein

Ob die Auszüge aus *Sideritis scardica* auch die Aggregation von α -Synuclein hemmten, wurde mit dem *C. elegans*-Stamm NL5901 getestet, welcher ein α -Synuclein::YFP-Konstrukt exprimiert. Das zunächst lösliche Peptid aggregiert mit der Zeit, was zu einer hohen Fluoreszenzintensität im Kopfbereich der Würmer führt (Abbildung 3.28 A).

Wurden die Fadenwürmer vorher 600 $\mu\text{g/mL}$ der hydroalkoholischen *S. scardica*-Extrakte ausgesetzt, sank die mittlere Fluoreszenzintensität, welche mit der Menge an aggregiertem und abgelagertem α -Synuclein korreliert (B, C). Dabei hatte der 50 % ethanolische Auszug den größten Effekt mit einer Minderung auf 63 % der ursprünglichen Intensität. Weder das gewählte Rücklösungsmittel für die Trockenextrakte (DMSO), welches eine finale Konzentration von 1 % in der Kultur hatte, noch DMSO in Kombination mit den Trocknungshilfsstoffen hatte einen Einfluss auf die Aggregation. Die Wirkung von EtOH20 und EtOH50 war auch hier wieder konzentrationsabhängig (D).

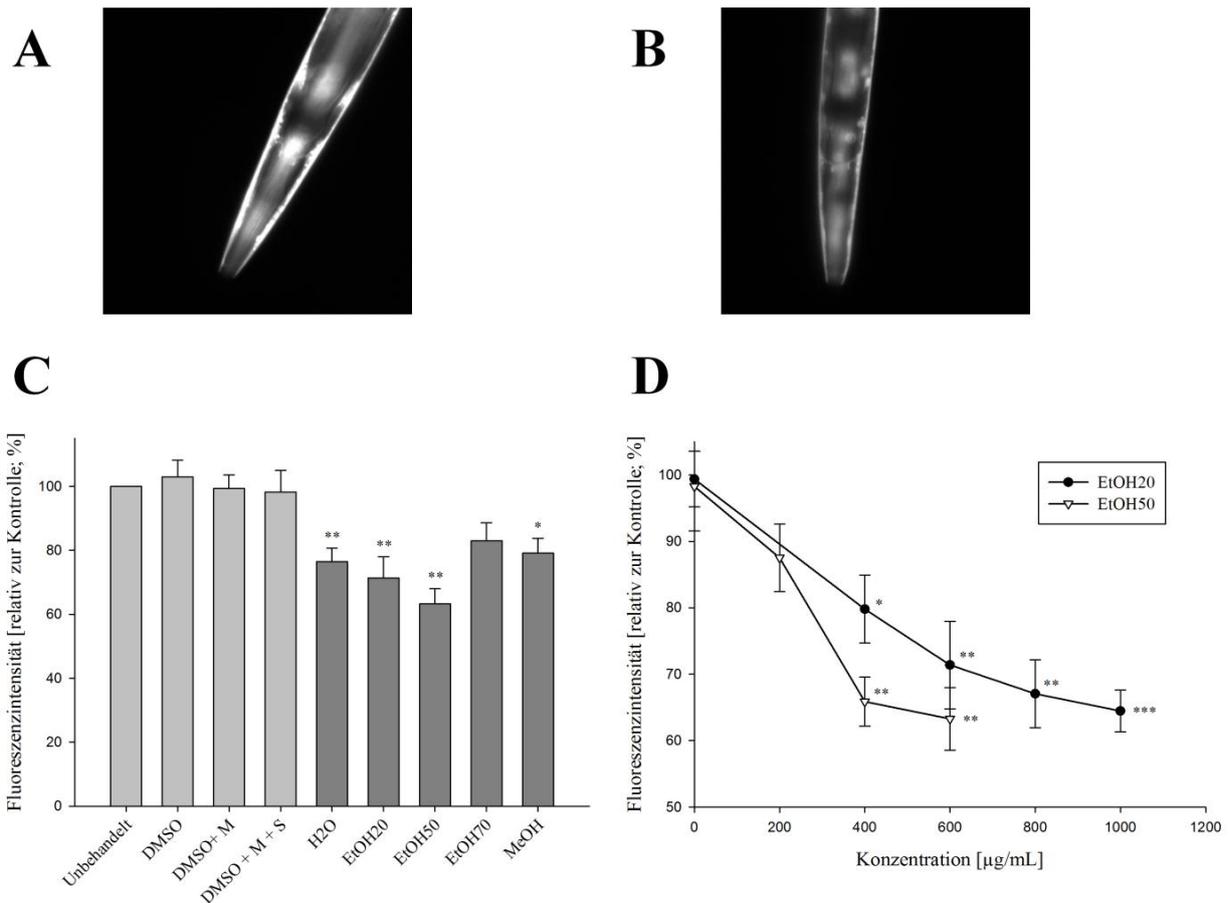


Abbildung 3.28: Wirkung von *S. scardica* auf die Aggregation von α -Synuclein. **A, B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Würmern des Stammes NL5901. Die Kontrollen zeigten eine hohe Fluoreszenzintensität im Kopfbereich durch das aggregierte und abgelagerte α -Synuclein, an welches YFP gekoppelt ist (**A**). Mit 600 $\mu\text{g/mL}$ EtOH50 behandelte Würmer erschienen deutlich dunkler (**B**). **C, D** Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität. 600 $\mu\text{g/mL}$ der *S. scardica*-Extrakte wirkten der α -Synuclein-Aggregation entgegen, welche mit der Intensität korreliert (**C**). Die Auszüge aus *S. scardica* mit 20 bzw. 50 % Ethanol reduzierten die Aggregation umso stärker, je höher die Konzentration gewählt wurde (**D**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Von den Referenzextrakten wirkten *Bacopa monnieri* und *Rhodiola rosea* der Aggregation von α -Synuclein ebenfalls entgegen, nicht jedoch der Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761 und *Hypericum perforatum* (Abbildung 3.29). Die Wirkung von Brahmi und Rosenwurz unterschied sich dabei nicht signifikant von der des Griechischen Bergtees in der gleichen Konzentration (50 % Ethanol als Auszugsmittel). Weitere Substanzen wie die Extraktfraktionen oder die Reinsubstanzen konnten leider nicht getestet werden, da der Stamm NL5901 nach diesen Versuchen unwiederbringlich degenerierte. Auch frische Chargen oder transgene Stämme mit ähnlichem Phänotyp brachten keine Lösung des Problems.

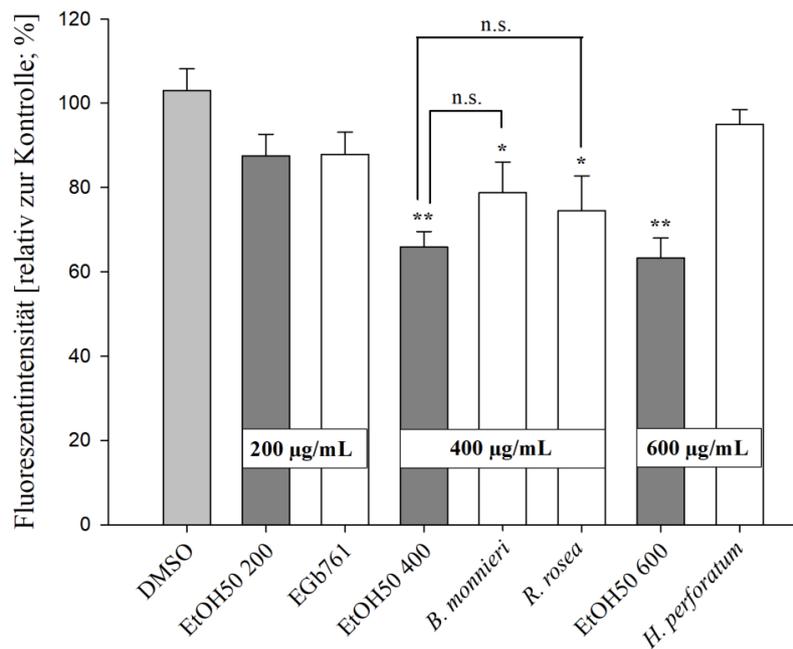


Abbildung 3.29: Wirkung der Referenzextrakte auf die Aggregation von α -Synuclein. Die Würmer wurden mit 200 $\mu\text{g/mL}$ Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761, 400 $\mu\text{g/mL}$ Auszug aus *Bacopa monnieri* bzw. *Rhodiola rosea* oder 600 $\mu\text{g/mL}$ *Hypericum perforatum* behandelt. Im direkten Vergleich sind die jeweiligen Konzentrationen des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.8.1.2 α -Synuclein-bedingte Fettablagerungsstörung

Das oben genannte Experiment (0) wurde leicht abgeändert, indem die Würmer des transgenen Stammes NL5901 (und N2 als Wildtyp-Kontrollstamm) zusätzlich zu den Extrakten oder den Kontrollen Nilrot im Verhältnis 1 : 250 in ihre Futterquelle gemischt bekamen. Dies färbte die Fettablagerungen in den Würmern an und konnte fluoreszenzmikroskopisch bei einer anderen Wellenlänge, als die für α -Synuclein::YFP benutzte, quantifiziert werden. Fadenwürmer des Wildtyp-Stammes N2 wiesen eine hohe Fluoreszenzintensität auf (Abbildung 3.30 **A, D**). Die α -Synuclein-Peptide störten die Ablagerung der Lipide, was sich durch eine niedrigere Intensität bemerkbar machte (**B**). Wurden die Würmer jedoch gleichzeitig mit z. B. 600 $\mu\text{g/mL}$ des 50 % ethanolischen *Sideritis scardica*-Extraktes behandelt, konnte der Fettgehalt der Würmer erhalten werden (**C**). Im Gegensatz zum Aggregationsassay (siehe oben) erzielten nur wenige Behandlungen eine signifikante Wirkung, was daran liegen kann, dass hier die Fluoreszenz des gesamten Wurmkörpers und nicht nur der Kopfbereich gemessen wurde. Denn so hatte u. a. die Anzahl der Eier in den Würmern einen erheblichen Einfluss (Eier fluoreszierten nicht). 400 und 600 $\mu\text{g/mL}$ EtOH50 und 800 $\mu\text{g/mL}$ EtOH20 konnten die Fluoreszenzintensität jedenfalls statistisch signifikant erhöhen (**D, E**). Von einer gesicherten Dosis-Wirkungs-Beziehung lässt sich anhand der Ergebnisse allerdings nicht sprechen.

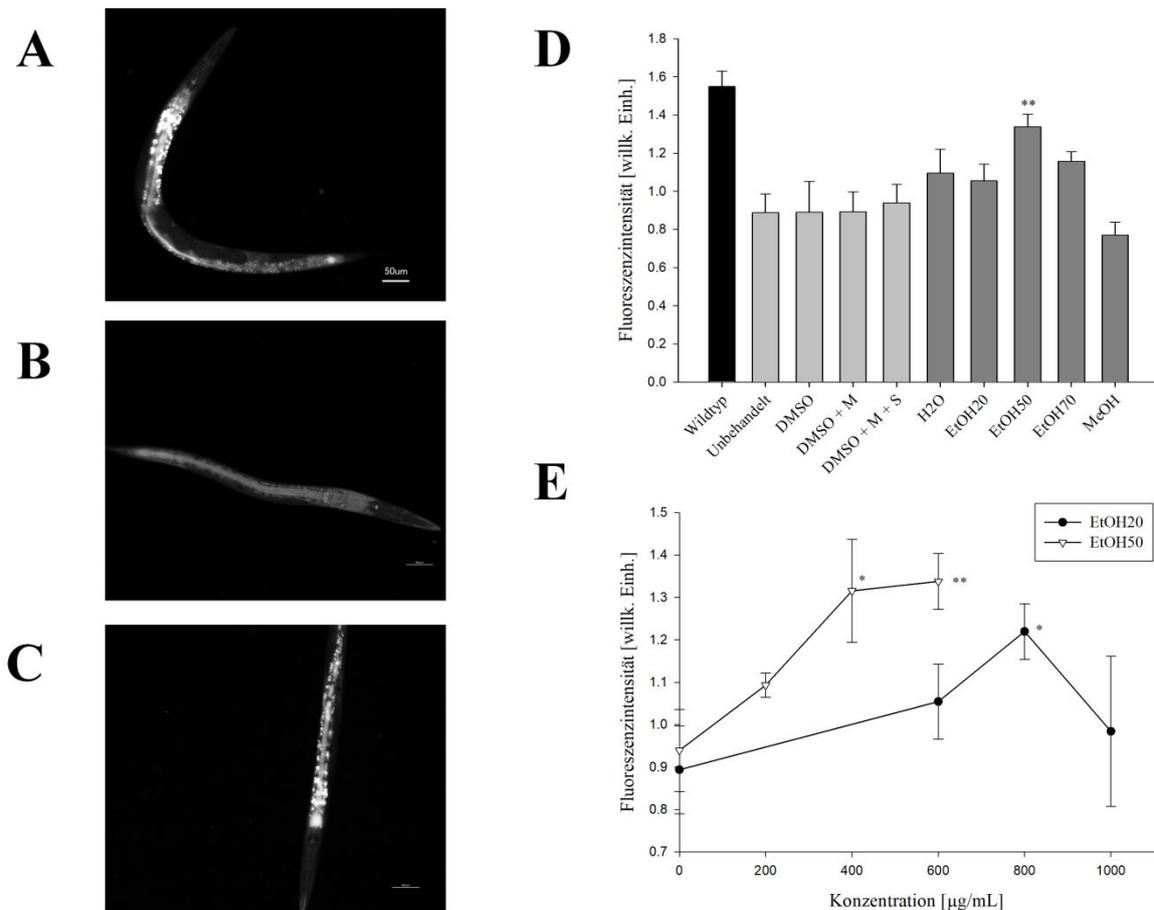


Abbildung 3.30: Wirkung von *S. scardica* auf α -Synuclein-bedingte Fettablagerungsstörungen. **A, B, C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Würmern, dessen Fettablagerungen mit Nilrot angefärbt wurden: Wildtyp-Stamm N2 (**A**), α -Synuclein-exprimierender Stamm NL5901 unbehandelt (**B**), NL5901 mit *S. scardica* (EtOH50 600 μ g/mL) behandelt (**C**). **D, E** Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Alle Würmer wurden mit Nilrot gefüttert und die Fluoreszenzintensität der Fettablagerungen gemessen. Zusätzlich wurden die Würmer vergleichend mit 600 μ g/mL *S. scardica*-Extrakt (**D**) oder mit verschiedenen Konzentrationen der mittelpolaren Auszüge (**E**) behandelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.8.2 Protektion vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration

Das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) kann auch im *C. elegans*-Modell genutzt werden, um Charakteristika der Parkinson-Erkrankung hervorzurufen. Im transgenen Stamm BZ555, der in den dopaminergen Neuronen GFP exprimiert, konnte das Ausmaß der Degeneration dieser Nervenzellen durch 6-OHDA, bzw. der Effekt von Neuroprotektiva, quantifiziert werden. Im Normalzustand zeigten die dopaminergen Nervenzellen eine starke Fluoreszenz (Abbildung 3.31 **A**), während 50 mM 6-OHDA die Neuronen stark angriffen (**B**). Eine gleichzeitige Behandlung mit den *S. scardica*-Extrakten reduzierte die Auswirkungen des Neurotoxins sichtbar (**C**).

Jeder getestete Extrakt konnte unabhängig vom Auszugsmittel in einer Konzentration von 600 μ g/mL die Neurodegeneration durch 6-OHDA vermindern (**D**). Dabei waren alle

ähnlich wirksam; der 40 % ethanolische Auszug erscheint in der Graphik etwas schwächer, was aber daran liegt, dass er in einer späteren Versuchsreihe (mit den Fraktionen) getestet wurde, bei der die Werte allgemein etwas niedriger waren (etwas stärkere Neurodegeneration, evtl. durch neue Charge 6-OHDA). Die Behandlung mit dem Extrakt mit 50 % Ethanol als AZM verhinderte die Wirkung des Neurotoxins fast gänzlich (96 % der Fluoreszenzintensität von Würmern, die nicht 6-OHDA ausgesetzt waren). Wieder waren weder die 1 % DMSO, noch die Hilfsstoffe an der pharmakologischen Wirkung beteiligt. Insgesamt war auffällig, dass die Extrakte schon in sehr niedrigen Konzentrationen eine Wirkung zeigten (E). V. a. der Methanolextrakt stach hier heraus, der schon bei 50 µg/mL einen signifikanten neuroprotektiven Effekt zeigte. Eine weitere Erhöhung der Konzentration schützte aber nicht viel besser vor der Neurodegeneration. Auch bei EtOH20 und EtOH50 konnte keine signifikante Dosisabhängigkeit beobachtet werden; beim 20 % ethanolischen Extrakt sank die Wirksamkeit mit 1000 µg/mL sogar stark ab.

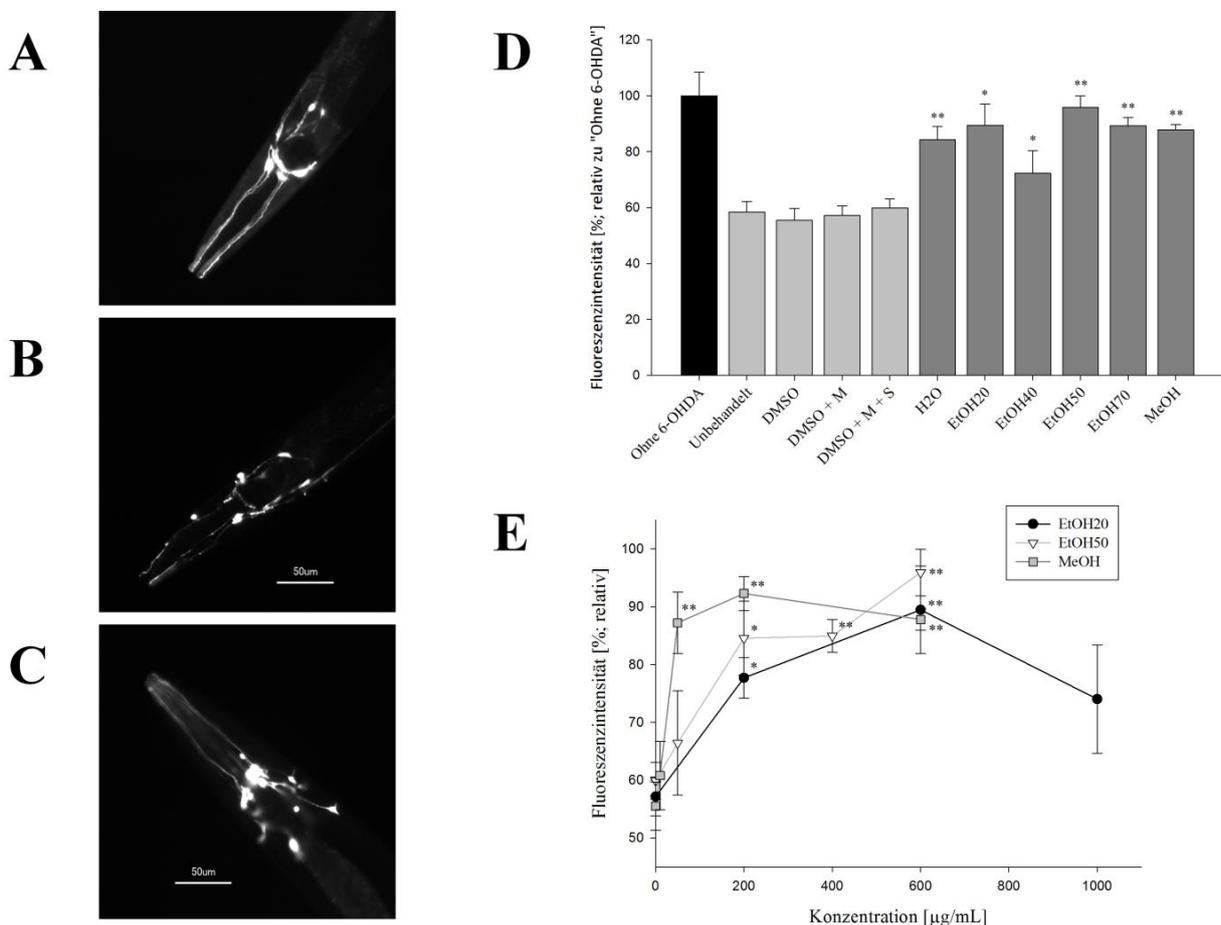


Abbildung 3.31: Protektive Wirkung von *S. scardica* vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration. **A, B, C** Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Kopfbereiche von Würmern des Stammes BZ555. Intakte dopaminerge Neuronen mit starker GFP-Expression (**A**); 50 mM 6-OHDA schädigen diese Nervenzellen (**B**); gleichzeitige Behandlung mit *S. scardica* verringert die Degeneration (**C**). **D, E** Aufrechterhaltung der Fluoreszenzintensitäten. Alle Auszüge aus dem Griechischen Bergtee wirkten in einer Konzentration von 600 µg/mL neuroprotektiv (**D**). Verschiedene Konzentrationen der *S. scardica*-Extrakte mit Methanol, 20 und 50 % Ethanol (**E**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Fraktionen des 40 % ethanolischen Primärextraktes wurden alle vergleichend in einer Konzentration von 400 $\mu\text{g/mL}$ getestet. Hier konnten nur die lipophileren der Fraktionierungspaare das Ausmaß der Nervenschädigung verringern (Abbildung 3.32 A) und zwar etwas besser als 400 $\mu\text{g/mL}$ des Primärextraktes selbst. Am potentesten war die Butanolphase der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit ca. 74 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität (etwas stärkere Degeneration in dieser Serie, siehe oben). Die Wasserphasen der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der Adsorber-Behandlung sowie die Bodensatzfraktion aus der Umlösung des Primärextraktes in 70 % Ethanol, also die polaren Fraktionen, zeigten keine protektiven Eigenschaften für die dopaminergen Nervenzellen. 200 $\mu\text{g/mL}$ Acteosid, Echinacosid und Forsythosid A zeigten einen signifikanten Effekt (B). In dieser Versuchsreihe wurde auch 100 $\mu\text{g/mL}$ Bupropion getestet, was nur wenig wirksamer war als die genannten Phenylethanoide. Bupropion ist ein selektiver Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (Norepinephrine-/dopamine reuptake inhibitor, NDRI). Die getesteten Flavonoide und Caffeoylchinasäuren zeigten keinen Effekt.

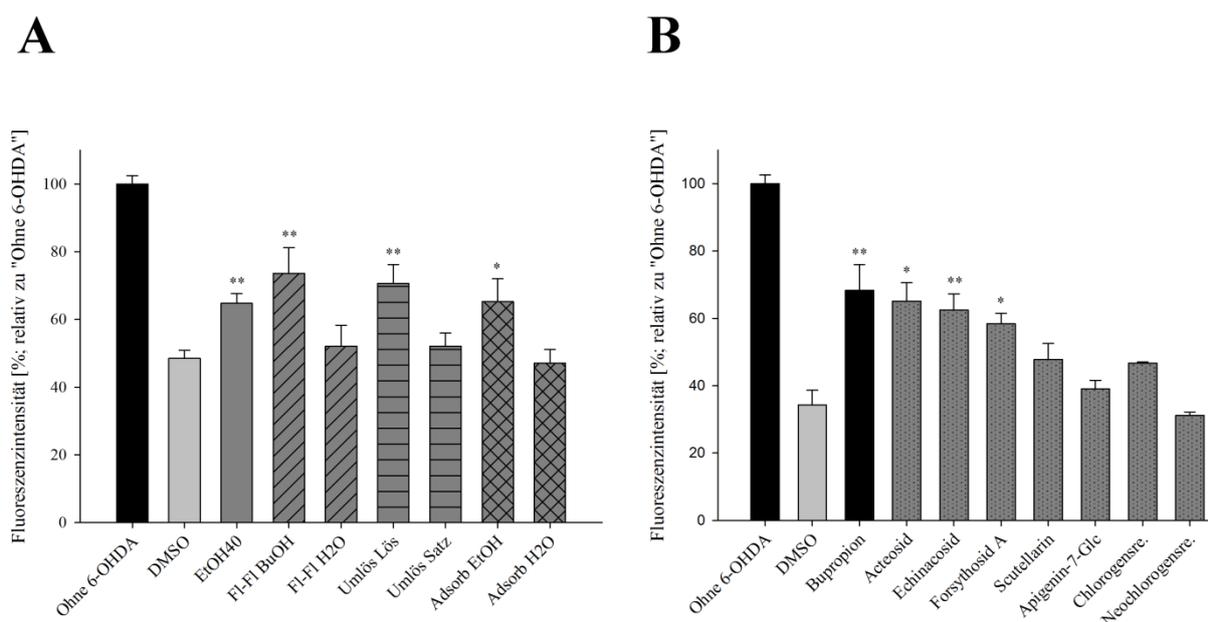


Abbildung 3.32: Protektive Wirkung der Extraktfraktionen und Reinsubstanzen aus *S. scardica* vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration. In einer Konzentration von 400 $\mu\text{g/mL}$ minderten nur der 40 % ethanolische Primärextrakt und dessen lipophilen Fraktionen das Ausmaß der Degeneration der Nervenzellen (A). Die Phenylethanoide wirkten in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/mL}$ ähnlich stark neuroprotektiv wie 100 $\mu\text{g/mL}$ Bupropion, einem NDRI. Sre.: Säure; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Während der Spezialextrakt aus *Ginkgo biloba* und der 70 % ethanolische Rosenwurzextrakt keine Wirkung gegen 6-OHDA zeigten, konnten 400 $\mu\text{g/mL}$ *Bacopa monnieri* und 600 $\mu\text{g/mL}$ *Hypericum perforatum* die Schädigung der dopaminergen Neuronen reduzieren (Abbildung 3.33 A). 600 $\mu\text{g/mL}$ des Kapselinhaltes von memoLoges® wirkte etwas weniger neuroprotektiv als die gleiche Konzentration EtOH20, aber ähnlich wie 400 $\mu\text{g/mL}$ *B. monnieri* (B), was leider nicht in der selben Konzentration getestet werden konnte. Dabei entspricht memoLoges® hier etwa 340 $\mu\text{g/mL}$ 20 % ethanolischem *S. scardica*-Extrakt und 105 $\mu\text{g/mL}$ *B. monnieri*.

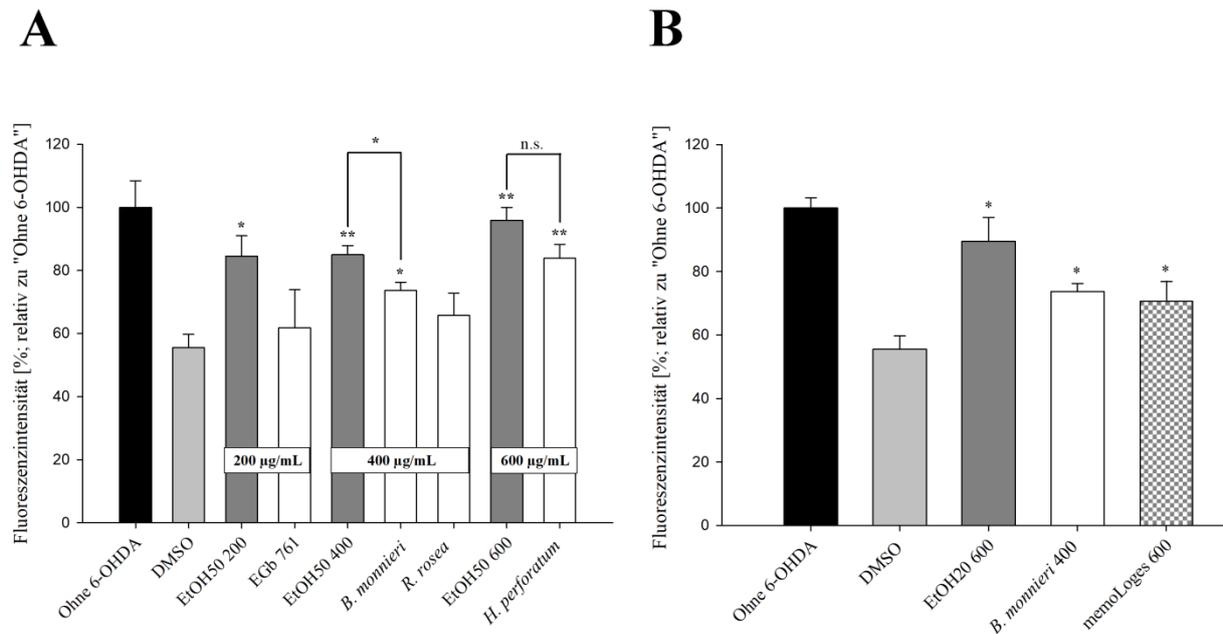


Abbildung 3.33: : Protektive Wirkung der Referenzextrakte und memoLoges® vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration. Würmer des Stammes BZ555 wurden zusätzlich zum 6-OHDA mit 200 µg/mL Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761, 400 µg/mL Auszug aus *Bacopa monnieri* bzw. *Rhodiola rosea* oder 600 µg/mL *Hypericum perforatum* behandelt. Im direkten Vergleich sind die jeweiligen Konzentrationen des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes dargestellt (A). Behandlung mit 600 µg/mL *Sideritis scardica* EtOH20, 400 µg/mL *Bacopa monnieri* oder 600 µg/mL Kapselinhalt memoLoges® (B). * p < 0,05; ** p < 0,01; Konzentrationen in µg/mL

3.9 Einfluss auf Huntington-assoziierte Pathomechanismen

3.9.1 Aggregation von PolyQ

Um zu prüfen, ob der Griechische Bergtee die Aggregation von Polyglutaminpeptiden (PolyQ) hemmt, wurde in Würmern des Stammes AM141, welcher ein Peptid aus 40 Glutamin-Einheiten, gekoppelt an YFP, exprimiert, die Anzahl der gebildeten Plaques gezählt (Abbildung 3.34 A).

Weder 50 % Ethanol (V/V) als Rücklösemittel für die Trockenextrakte, noch die für die Herstellung selbiger genutzten Hilfsstoffe Maltodextrin und Siliciumdioxid beeinflussten die Zahl der Aggregate, während 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle diese um ca. 17 % reduzierte (B). Der Methanolauszug aus *S. scardica* sowie die hydroethanolischen Extrakte ab Ethanol 40 % konnten in einer Konzentration von 600 µg/mL die Anzahl der PolyQ-Aggregate signifikant senken. Die beiden mittelpolaren Auszüge waren dabei ähnlich aktiv wie die Positivkontrolle. Die Zahl der aggregierten Peptide sank zwar tendenziell mit steigenden Konzentrationen von EtOH20 und EtOH50 (C), dennoch waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen statistisch nicht signifikant.

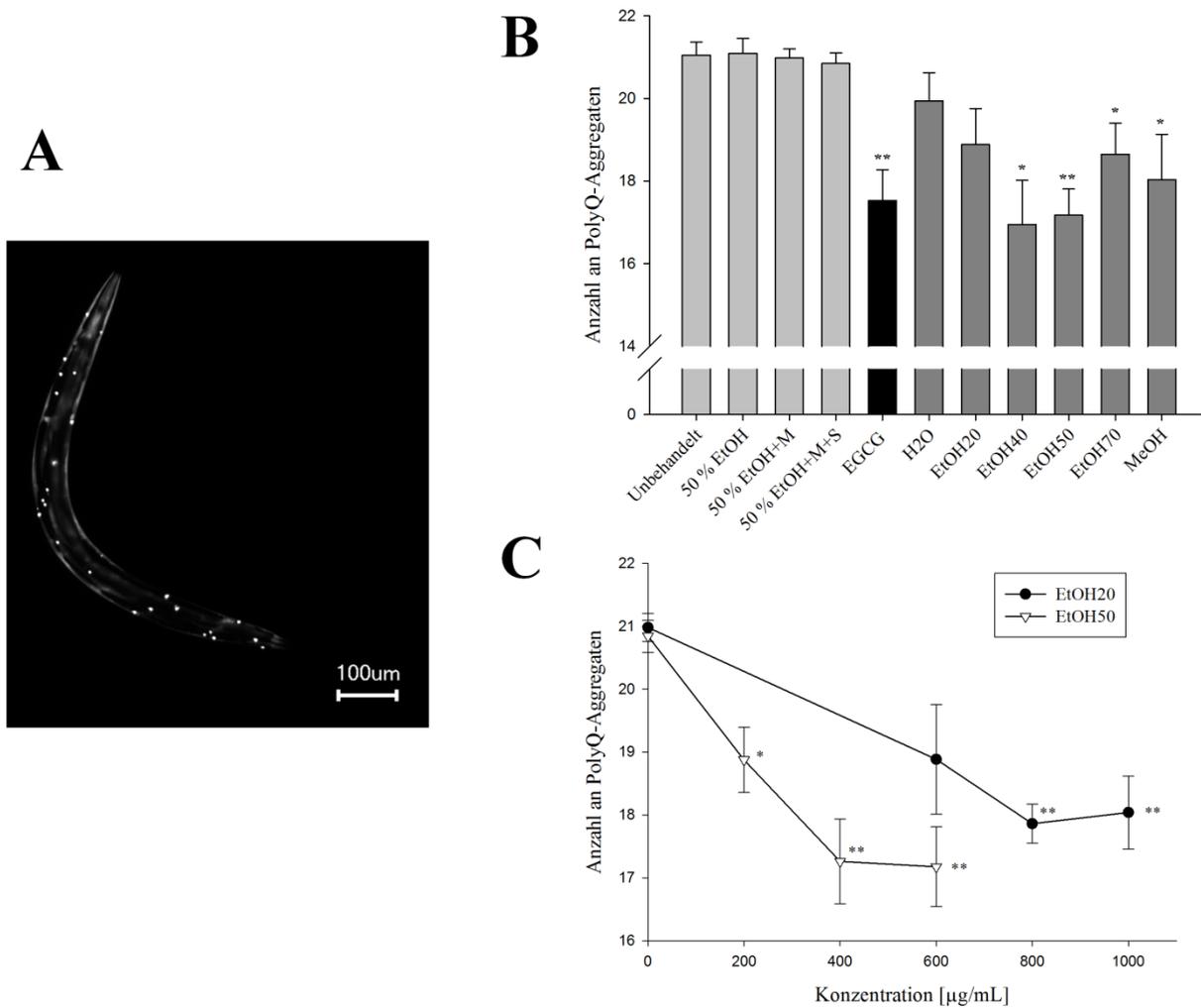


Abbildung 3.34: Wirkung von *S. scardica* auf die Aggregation von PolyQ-Peptiden. Würmer des Stammes AM141 zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop Aggregate von YFP-gekoppelten Peptiden, die aus 40 Glutamineinheiten bestehen (A). Wurden sie zuvor mit 600 μg/mL der verschiedenen Extrakte aus dem Griechischen Bergtee behandelt, sank die Zahl dieser Plaques (B). 100 μg/mL EGCG diente als Positivkontrolle. Der 20 % und 50 % ethanolische Auszug wurde zusätzlich in weiteren Konzentrationen getestet (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Fraktionen des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes wurden vergleichend zu ihrem Primärextrakt in einer Konzentration von 400 μg/mL getestet. Die polaren Fraktionen (Fl-FI H₂O, Umlös Satz, Adsorb H₂O) zeigten keinen Effekt auf die PolyQ-Aggregation; ihre lipophilen Gegenstücke hingegen senkten die Plaquizahl um 14 – 20 % (Abbildung 3.35 A). Von den Reinsubstanzen konnten nur 200 μg/mL der getesteten Phenylethanoide Acteosid, Echinacosid und Forsythosid A die Anzahl der PolyQ-Aggregate signifikant senken (B); allerdings war auch bei den Flavonoiden, insbesondere Scutellarin, eine Tendenz bemerkbar. 200 μg/mL Forsythosid A hemmte mit 33 % Reduktion der Plaquizahl die Aggregation der Q40-Peptide in *C. elegans* von allen getesteten Substanzen am stärksten.

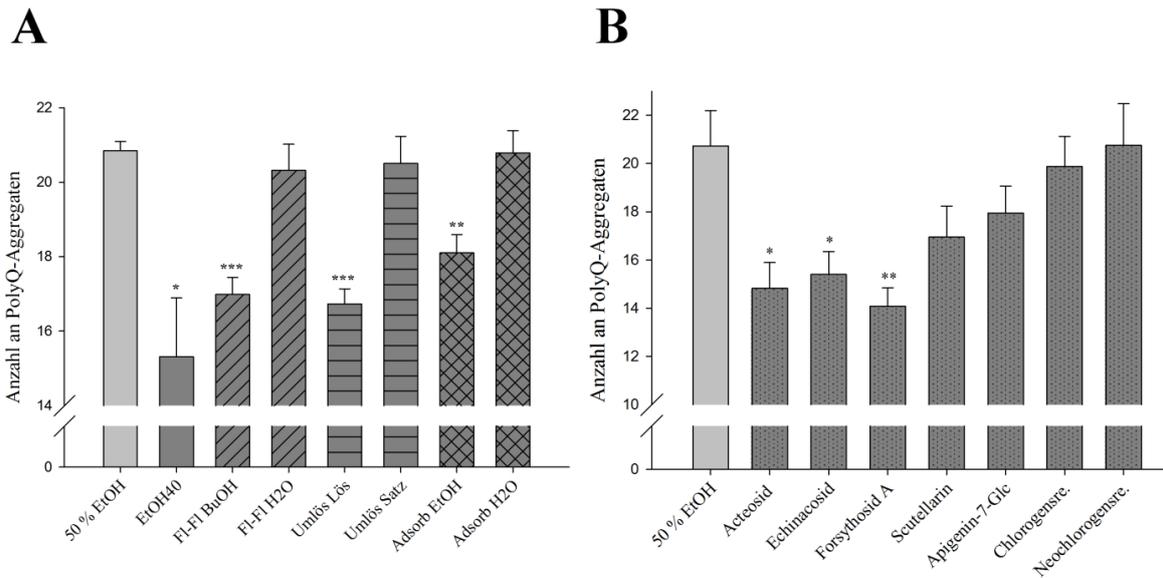


Abbildung 3.35: Wirkung der Extraktfraktionen und Reinsubstanzen aus *S. scardica* auf die Aggregation von PolyQ-Peptiden. 400 µg/mL des 40 % ethanolischen Primärextraktes aus dem Griechischen Bergtee sowie die aus ihm gewonnenen lipophilen Fraktionen reduzierten die Anzahl der aggregierten Polyglutaminpeptide (A). Auch die getesteten Phenylethanoid-Glykoside hemmten die Aggregation in einer Konzentration von 200 µg/mL (B). Sre.: Säure; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

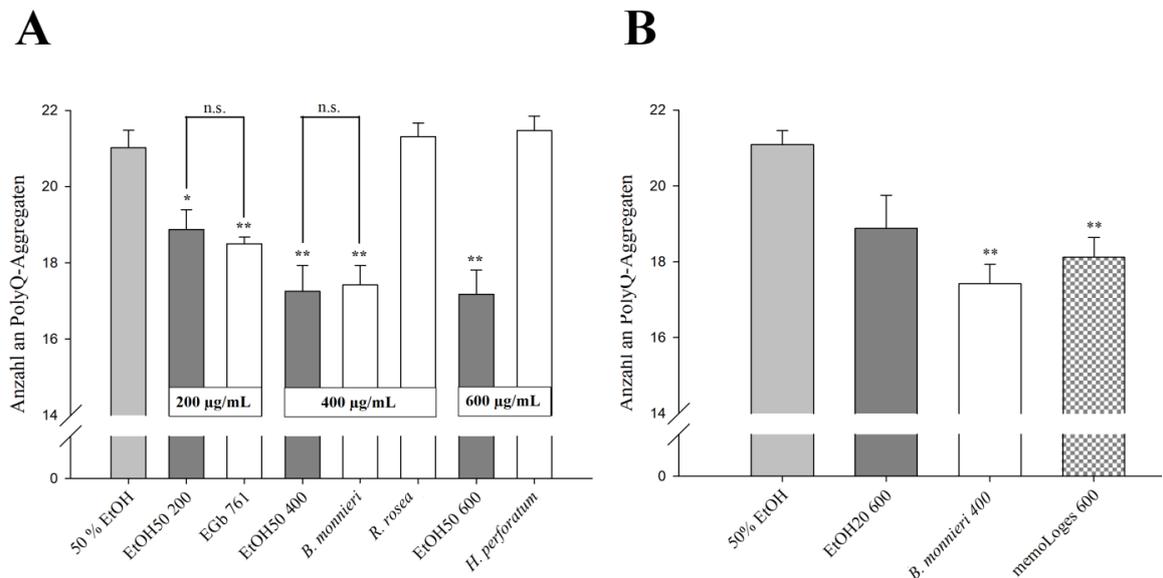


Abbildung 3.36: Wirkung der Extraktfraktionen und memoLoges® auf die Aggregation von PolyQ-Peptiden. Würmer des Stammes AM141 wurden mit 200 µg/mL Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761, 400 µg/mL Auszug aus *Bacopa monnieri* bzw. *Rhodiola rosea* oder 600 µg/mL *Hypericum perforatum* behandelt. Im direkten Vergleich dazu sind die jeweiligen Konzentrationen des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes dargestellt (A). Behandlung mit 600 µg/mL *Sideritis scardica* EtOH20, 400 µg/mL *Bacopa monnieri* oder 600 µg/mL Kapselinhalt memoLoges® (B). * p < 0,05; ** p < 0,01; Konzentrationen in µg/mL

Auch *Ginkgo biloba* und *Bacopa monnieri* waren in der Lage, die Aggregation von PolyQ zu vermindern (Abbildung 3.36, **A**). Dabei unterschieden sie sich beide nicht von der Wirkung der gleichen Konzentration von 50 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakt. Die Zahl der Aggregate von mit *R. rosea* und *H. perforatum* behandelten Würmern unterschied sich nicht zur Negativkontrolle. In einer Konzentration von 600 µg/mL zeigte der 20 % ethanolische Extrakt aus dem Griechischen Bergtee noch keine signifikante Wirkung; der Kapselinhalt aus memoLoges® konnte jedoch die Zahl der Q40-Aggregate um ca. 14 % senken (**B**). Dabei sind darin etwa 340 µg/mL EtOH20 und 105 µg/mL *B. monnieri* enthalten.

3.9.2 PolyQ-Neurotoxizität

Auch die Polyglutaminpeptide haben eine neurotoxische Wirkung. Im *C. elegans*-Stamm HA759 lässt sich dies fluoreszenzmikroskopisch beobachten, da er in den sensorischen ASH-Neuronen (Amphid-Neuronen ASHL und ASHR) sowohl ein Huntingtin-Fragment mit 150 Glutamineinheiten (Htn-Q150) als auch GFP exprimiert. Im Normalzustand ließ sich so eine bilaterale Fluoreszenz der ASH-Neuronen beobachten (Abbildung 3.37 **A**). In den Negativkontrollen degenerierten über den Verlauf des Experiments jedoch immer mehr dieser Nervenzellen aufgrund der PolyQ-Neurotoxizität, was zum Verlust der bilateralen Fluoreszenz führte (**B**).

Wurden die Fadenwürmer dabei mit 600 µg/mL der *Sideritis scardica*-Extrakte behandelt, war der Anteil an Nervenzellen, die nicht abgestorben sind, größer (**C**). Während bei den Negativkontrollen (Lösungsmittel und Hilfsstoffe) etwa die Hälfte der ASH-Neuronen degeneriert vorlag, konnte eine Behandlung mit 100 µg/mL EGCG den Anteil um 17 % erhöhen; ähnlich aktiv waren 600 µg/mL EtOH40 und EtOH50. Auch der Auszug mit 20 % Ethanol (V/V) und Methanol wirkten neuroprotektiv. Eine signifikante Dosisabhängigkeit der Wirkung konnte hingegen nicht festgestellt werden (**D**). Bei den Extraktfraktionen des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes ergab sich das gleiche Bild wie bei der PolyQ-Aggregationshemmung: Sowohl der Primärextrakt an sich, als auch die lipophilen Fraktionen konnten in einer Konzentration von 400 µg/mL den Anteil an abgestorbenen Neuronen senken (**E**). Dabei waren sie auch ähnlich potent wie 100 µg/mL EGCG.

Von den Referenzextrakten wirkten nur 200 µg/mL EGb 761 und 400 µg/mL Brahmi protektiv vor dem degenerierenden Effekt des Huntingtin-Fragments und zwar ebenso stark wie 400 µg/mL des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes (Abbildung 3.38). Ebenso wie die Kontrolle, zeigten die Extrakte aus Rosenwurz und Johanniskraut ein Verhältnis von toten zu überlebenden Neuronen von 1 : 1.

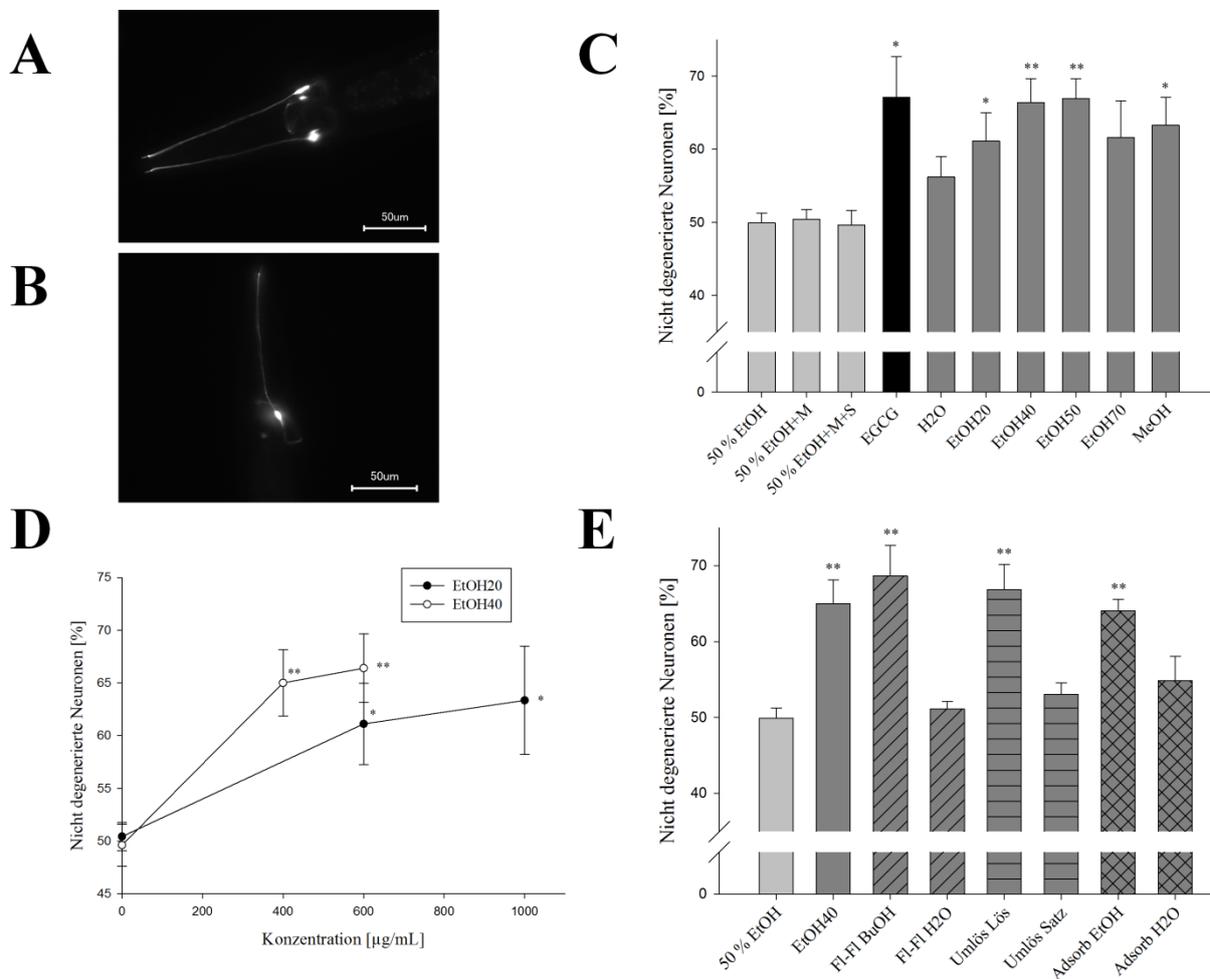


Abbildung 3.37: Wirkung von *S. scardica* auf die PolyQ-Neurotoxizität. **A, B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kopfbereiches von Würmern des Stammes HA759, welcher ein Huntingtin-Fragment und GFP in den ASH-Neuronen exprimiert. Normalerweise zeigen diese Neuronen eine bilaterale Fluoreszenz (**A**); mit der Zeit degenerieren jedoch immer mehr durch die Toxizität des Polyglutamins und zeigen eine unilaterale Fluoreszenz (**B**). **C, D, E** Steigerung des Anteils an ASH-Neuronen, die nicht degenerieren. Wurden die Würmer mit 600 µg/mL der *S. scardica*-Extrakte oder 100 µg/mL EGCG als Positivkontrolle behandelt, starben weniger Nervenzellen ab (**C**). EtOH20 und EtOH40 zeigten keine signifikante Dosisabhängigkeit (**D**). Der 40 % ethanolische Auszug aus dem Griechischen Bergtee im Vergleich zu seinen Extraktfraktionen in einer Konzentration von 400 µg/mL (**E**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

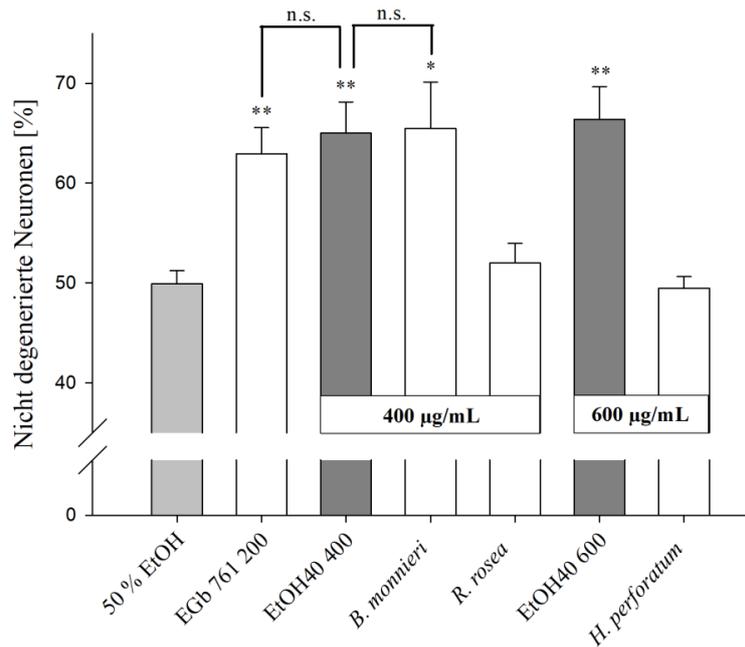


Abbildung 3.38: Wirkung der Referenzextrakte auf die PolyQ-Neurotoxizität. Würmer des Stammes HA759 wurden mit 200 µg/mL Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761, 400 µg/mL Auszug aus *Bacopa monnieri* bzw. *Rhodiola rosea* oder 600 µg/mL *Hypericum perforatum* behandelt. Im direkten Vergleich dazu der Anteil an überlebenden Neuronen der Behandlungen mit 400 bzw. 600 µg/mL des 40 % ethanolischen *S. scardica*-Extraktes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Konzentrationen in µg/mL

3.10 Korrelation der Ergebnisse

Da die Extrakte bzw. Fraktionen und Reinsubstanzen aus dem Griechischen Bergtee in den *C. elegans*-Versuchen eine Wirksamkeit gegen 4 verschiedene neurotoxische Peptide zeigte, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Genutzt wurden die Daten aus Experimenten, bei denen das Ausmaß der Aggregation direkt (Quantifizierung der A β - und PolyQ-Aggregate: 0 und 3.9.1, Fluoreszenzmessung des aggregierten α -Synucleins, an welches YFP gekoppelt ist: 0) und indirekt (Paralyse-Assay: 0, Tau-Toxizität: 3.7.2; siehe Diskussion) gemessen werden konnte. Die Wertepaare der *S. scardica*-Extrakte in den verschiedenen Konzentrationen und, wenn möglich, die der Extraktfraktionen wurden graphisch aufgetragen, einer linearen Regression unterzogen und der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt.

Je besser eine Behandlung mit den *S. scardica*-Zubereitungen die Aggregation von β -Amyloid-Peptiden hemmte, je niedriger also die Zahl der A β -Plaques war, desto weniger Würmer waren in einem anderen Versuch von einer Tau-induzierten Bewegungsstörung betroffen (Abbildung 3.39 A); desto weniger aggregiertes α -Synuclein konnte gemessen werden (B) und desto weniger PolyQ-Plaques wurden gezählt (C). Die Korrelationskoeffizienten waren hier stets signifikant, weswegen diese Aussagen getroffen werden können.

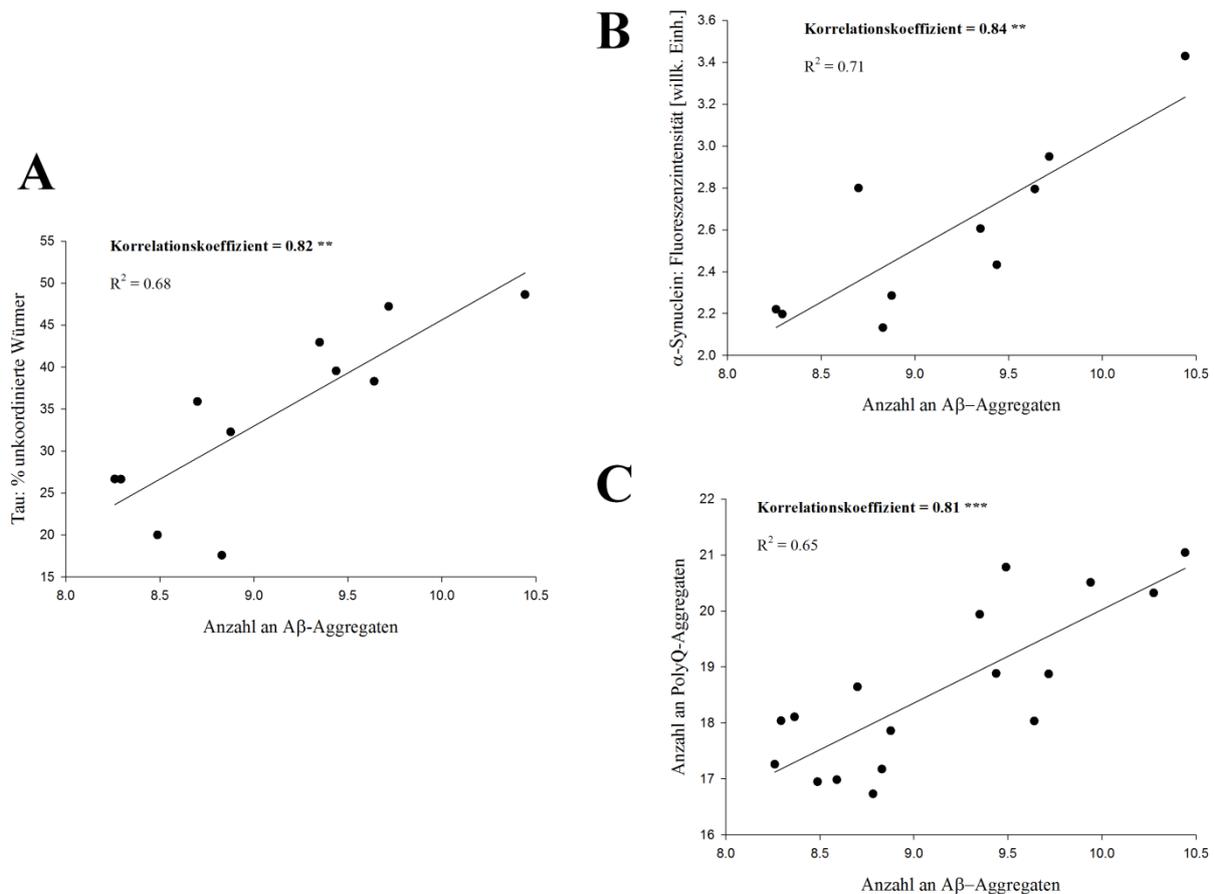


Abbildung 3.39: Korrelation der Aβ-Plaques mit den Endwerten anderer *C. elegans*-Experimente. Graphisch aufgetragen ist jeweils die Anzahl der gezählten Aβ-Aggregate gegen die Prozentzahl an Tau-exprimierenden Würmern mit unkoordinierter Bewegung (**A**); gegen die Fluoreszenzintensität von YFP-gekoppeltem α-Synuclein (**B**) und gegen die gezählten Polyglutamin-Plaques (**C**). Angegeben sind der Pearson-Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß aus der linearen Regression (R²).

Wurden dieselben Endwerte nicht gegen die Anzahl an Aβ-Plaques, sondern gegen die Mediane aus dem Paralyse-Assay (PT₅₀; Aβ-Toxizität) aufgetragen, resultierte auch das in signifikanten, nun negativen, Korrelationskoeffizienten (Abbildung 3.40). Je höher also der PT₅₀ war (geringere Aβ-Toxizität), desto weniger Würmer waren von einer Tau-induzierten Bewegungsstörung betroffen (**A**); desto weniger aggregiertes α-Synuclein wurde gemessen (**B**) und desto weniger PolyQ-Plaques waren vorhanden (**C**).

Ebenso korrelierten die Ergebnisse aus den Versuchen, die sich auf andere Peptide als Aβ bezogen. Je besser ein *S. scardica*-Extrakt die Aggregation von α-Synuclein hemmte, desto stärker reduzierte er auch die Tau-Toxizität (Abbildung 3.41 **A**) und desto stärker hemmte er auch die Aggregation von Polyglutamin-Peptiden (**C**). Und je stärker die Behandlung mit *S. scardica* die Zahl der PolyQ-Plaques senkte, desto besser verhinderte sie auch die toxischen Auswirkungen der Tau-Proteine (**B**).

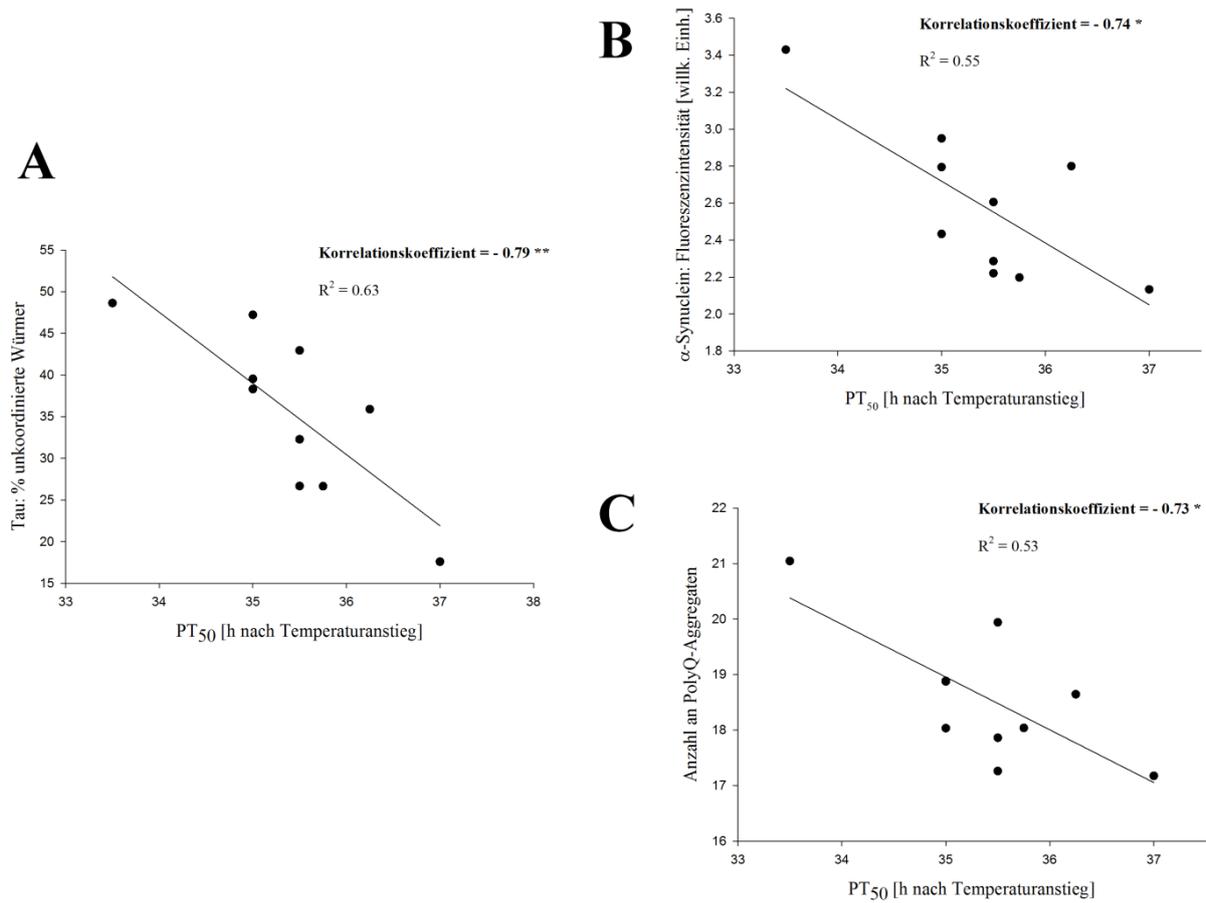


Abbildung 3.40: Korrelation der PT₅₀-Werte aus dem Paralyse-Assay mit den Endwerten anderer *C. elegans*-Experimente. Graphisch aufgetragen ist jeweils der PT₅₀ gegen die Prozentzahl an Tau-exprimierenden Würmern mit unkoordinierter Bewegung (**A**); gegen die Fluoreszenzintensität von YFP-gekoppeltem α-Synuclein (**B**) und gegen die gezählten Polyglutamin-Plaques (**C**). Angegeben sind der Pearson-Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß aus der linearen Regression (R^2).

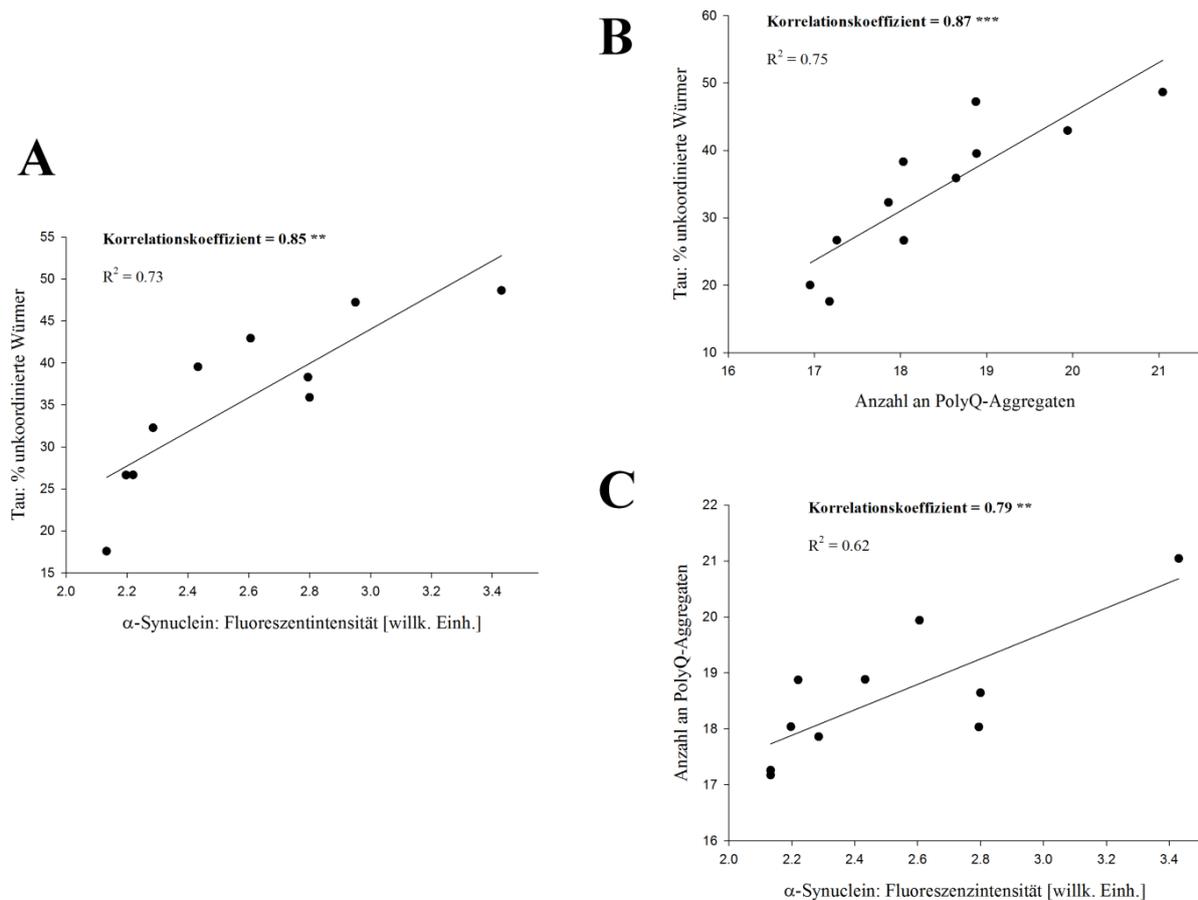


Abbildung 3.41: Korrelation verschiedener Endwerte aus den *C. elegans*-Experimenten. Graphisch aufgetragen sind die Fluoreszenzintensität von YFP-gekoppeltem α -Synuclein (**A**) und die gezählten PolyQ-Plaques (**B**) jeweils gegen die Prozentzahl an Tau-exprimierenden Würmern mit unkoordinierter Bewegung; sowie die Fluoreszenzintensität von α -Synuclein::YFP gegen die PolyQ-Plaques (**C**). Angegeben sind der Pearson-Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß aus der linearen Regression (R^2).

Zusammenfassend lassen sich wegen der durchgehend signifikanten Korrelationskoeffizienten folgende Aussagen treffen: Je stärker eine Behandlung mit einer bestimmten Konzentration eines *S. scardica*-Auszuges (bzw. Extraktfraktion) im *C. elegans*-Modell die Aggregation bzw. Oligomerisierung von β -Amyloid-Peptiden hemmt, desto stärker reduziert sie auch die Aggregation bzw. toxischen Einflüsse von Tau, α -Synuclein und PolyQ und umgekehrt. Dieselbe Beziehung gilt für die Wirkung von *Sideritis scardica* gegen Tau und α -Synuclein/PolyQ und für die Wirkung gegen α -Synuclein und PolyQ. Je stärker der Griechische Bergtee in diesem Modell also einem der untersuchten neurotoxischen Peptide entgegenwirkte, desto besser wirkte er auch den anderen entgegen. Dies stützt die Hypothese, dass der Wirkmechanismus von *S. scardica* in diesem Modell unspezifisch ist (Kapitel 4.4).

4 Diskussion

In jedem der Versuche, in denen *C. elegans* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen diente, zeigten die *S. scardica*-Extrakte in Abhängigkeit des gewählten Auszugsmittels und der Konzentration eine Wirkung; ebenso die lipophilen Extraktfraktionen und die Phenylethanoidglykoside als isolierte Reinstoffe. Um sicherzugehen, dass es sich dabei wirklich um pharmakologische Effekte der Extraktivstoffe aus dem Griechischen Bergtee handelt, wurden verschiedene Experimente und Kontrollen durchgeführt: Die Eignung der gewählten Extraktkonzentrationen wurde durch die Wachstumskontrollen sichergestellt (Kapitel 3.2). Keine einzige Konzentration hatte einen Einfluss auf die Länge der Würmer, die empfindlich auf verschiedene Störfaktoren reagieren. So konnte ausgeschlossen werden, dass die *E. coli* OP50 als Futterquelle durch antimikrobielle Wirkmechanismen (zusätzlich durch Agardiffusionstest ausgeschlossen) abgetötet wurden oder, induziert durch Gerbstoffe, verklumpt vorlagen, was beides zu einer ungenügenden Nahrungsaufnahme hätte führen können. Eine Kalorienrestriktion allein bewirkt schon unzählige biochemische Mechanismen, die die pharmakologischen hätte verschleiern oder überdecken können (Gelino *et al.*, 2016; Zhang und Mair, 2017). Eine potentielle Wirkung gegen diesen Stamm wäre durchaus denkbar gewesen, da manche, v. a. sehr lipophile, Auszüge aus *S. scardica* bereits einen Einfluss auf *E. coli* zeigten (Kapitel 1.2.3.1). Ausserdem hätte das verringerte Wachstum ein Zeichen von direkter Toxizität der gewählten Substanzen sein können (Qiao *et al.*, 2014), welche zusätzlich durch eine fehlende Stressantwort (DAF-16) und die Messung der letalen Toxizität ausgeschlossen werden konnte (Kapitel 3.5.2.3 und 3.3). Obwohl man bei letzterem zwischen nematizider und generell toxischer Wirkung nicht unterscheiden kann, sprechen die Ergebnisse insgesamt jedoch für das günstige Sicherheitsprofil, welches bereits in der HMPC-Monografie (2016) festgehalten ist. Die eingesetzten Trocknungshilfsstoffe Maltodextrin bzw. Maltodextrin + Siliciumdioxid, die in den Extraktzubereitungen enthalten waren sowie die zur Rücklösung der Trockenextrakte verwendeten Lösungsmittel DMSO und 50 % Ethanol in H₂O (V/V) zeigten selbst in den höchsten eingesetzten Mengen nie einen Effekt in den Versuchen, weshalb sie als für die Wirkung der Extrakte nicht relevant oder beteiligt betrachtet werden.

4.1 Antioxidative Wirkung und Bioverfügbarkeit

Die *S. scardica*-Auszüge mit Methanol, 20 % Ethanol (V/V) und Wasser (weitere konnten aus Löslichkeitsgründen nicht photometrisch vermessen werden) zeigten *in vitro* eine gute antioxidative Wirksamkeit (DPPH, EC₅₀ von 31; 43; 61 µg/mL). Im Vergleich zu alkoholischen Auszügen aus anderen stark polyphenolhaltigen Pflanzen wie *Camellia sinensis* (Grüntee) und *Cistus incanus* (Zistrose) liegen die Werte, laut Literatur, in der gleichen Dimension bzw. sind nur wenig kleiner (Bastos *et al.*, 2007; Dimcheva und Karsheva, 2017; Khalaf *et al.*, 2008). Natürlich sind Daten verschiedener Publikationen nur schwer zu vergleichen, da die verwendete Droge, die Extraktionsmethode, das genaue AZM etc. einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis haben; dennoch lassen sich zumindest Trends erkennen. Verglichen mit den Publikationen, die die antioxidative Aktivität des Griechischen Bergtees

beschreiben, schnitten MeOH, EtOH20 und H₂O im DPPH-Assay deutlich besser ab als die meisten hydroethanolischen Extrakte; nur Auszüge mit viel höherer Lipophilie, z. B. ein Butanolextrakt, weisen niedrigere effektive Konzentrationen auf (Kapitel 1.2.3.2). Obwohl für eine umfassendere Einschätzung der direkten, antioxidativen Wirksamkeit *in vitro* neben dieser radikalfangenden Eigenschaft weitere Kenngrößen wie das Trolox-Äquivalent bzw. die Reduktionskapazität ermittelt werden müssten, lässt sich jedoch erkennen, dass die vorliegenden *S. scardica*-Extrakte außerhalb eines biologischen Systems potente Radikalfänger darstellen, was höchst wahrscheinlich auf ihren Gehalt an Polyphenolen zurückzuführen ist (van Wyk *et al.*, 2016).

Nichtsdestotrotz kam von dieser antioxidativen Aktivität *in vivo* nichts an, denn weder die Extrakte verschiedener Polarität, noch die Extraktfraktionen konnten in den verwendeten Konzentrationen die basale ROS-Belastung in den Fadenwürmern verringern, den Juglon-induzierten oxidativen Stress abmildern (HSP-16.2 und Survival-Assay) oder, durch etwaige hormetische Effekte, den Transkriptionsfaktor DAF-16 aktivieren, welcher die Expression verschiedenster Enzyme reguliert, die für die antioxidative Abwehr nötig sind (Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2003). Weil für die Versuche eine nachträgliche Zugabe von u. a. Juglon als ROS-Generator (Heidler *et al.*, 2010) notwendig war, konnten sie nur im Flüssigmedium durchgeführt werden, was bedingt, dass die hydrophoberen Extrakte EtOH50 und EtOH70 nicht in höheren Konzentrationen als 200 µg/mL getestet werden konnten. Mögliche Effekte, die erst bei einer größeren Konzentration auftreten, könnten protokollbedingt also unterschlagen worden sein. Dennoch ist dies als relativ unwahrscheinlich einzuschätzen, da selbst 1000 µg/mL von EtOH20, welches *in vitro* antioxidativ wirksam war und in den allermeisten *C. elegans*-Experimenten eine sehr gute aggregationshemmende Wirkung zeigte, in den *in vivo*-Versuchen zur antioxidativen Aktivität statistisch stets der Negativkontrolle entsprach. Die Messung der Lebensspanne wurde einbezogen, da dem Griechische Bergtee volksmedizinisch oft lebensverlängernde Eigenschaften nachgesagt wurden und weil Antioxidantien bzw. Substanzen, die DAF-16 aktivieren, diese in den Nematoden nachweislich verlängern können (Ogg *et al.*, 1997; Pietsch *et al.*, 2011). Konsistenterweise zeigten die getesteten Extrakte hier ebenfalls keine Wirkung, was die anderen Ergebnisse untermauert. Von den Reinsubstanzen zeigten einzig und allein die beiden glykosidisch vorliegenden Flavone Scutellarin und Apigenin-7-Glucosid *in vivo* ein verringertes intrazelluläres ROS-Level. Obwohl beide Flavonoide in *Sideritis*-Extrakten und Fraktionen vorkommen (Kapitel 1.2.2; 3.1 und 4.3), zeigten diese als Vielstoffgemisch keine Wirkung. Dazu müssen aber die Konzentrationen in Betracht gezogen werden: Die isolierten Flavon-Glykoside wurden je mit 200 µg/mL vermessen, die Extraktfraktionen mit 400 µg/mL und die Auszüge an sich von 200 bis 1000 µg/mL. In keinem Fall waren also so große Mengen von den beiden aktiven Verbindungen enthalten.

Der Tatsache, dass die *Sideritis scardica*-Extrakte *in vitro* Radikalfängereigenschaften aufwiesen, die in *in vivo* nicht ersichtlich waren, können verschiedene Ursachen zugrunde liegen, wobei die Bioverfügbarkeit (BV) der aktiven Substanzen wohl den wesentlichen Beitrag dazu liefert. Die generelle Diskrepanz zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität wurde schon unzählige Male bei verschiedenen Substanzklassen beschrieben (Amidon *et al.*, 1995; Emami, 2006). Die BV gibt an, welcher Anteil eines applizierten Wirkstoffes im biologischen System ankommt und am Wirkort zur Verfügung steht. Um gut bioverfügbar zu sein, muss eine Substanz also gut resorbierbar sein. In der Regel sind lipophile Stoffe besser resorbierbar

als hydrophile, da sie in größerem Ausmaß passiv durch die Zellmembranen diffundieren können. Die Permeation von Phospholipidmembranen ist allerdings nicht nur darauf beschränkt; so können beispielsweise Peptide oder Saccharide über Aminosäure- bzw. Zuckertransporter aufgenommen werden (Matthews, 1975; Wright *et al.*, 2003). Die BV wird jedoch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst, wie dem pKa-Wert und der Löslichkeit der Substanz, der Interaktion mit Nahrungsbestandteilen, dem Efflux durch z. B. P-Glykoprotein und der Inhibition oder Induktion von Enzymen des Metabolismus (Langner *et al.*, 2011). Der Wissensstand zur BV von Polyphenolen ist relativ übersichtlich. Man geht im Wesentlichen davon aus, dass Aglyka (weil sie entweder als solche vorliegen oder Glykoside durch Hydrolyse gespalten wurden) bzw. Metabolite davon im Dünndarm passiv resorbiert werden, während eine gewisse Menge polyphenolischer Glucoside beispielsweise über natriumabhängige Glucosetransporter wie SGLT-1 aktiv in die Zellen transportiert werden kann. Insgesamt werden die meisten Polyphenole aber schlecht resorbiert (Hänsel und Sticher, 2009; Nemeth *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008). Jedenfalls scheint ein bedeutender Anteil der Extraktivstoffe, die die antioxidativen Eigenschaften des Griechischen Bergtees *in vitro* ausmachen, nicht im gewählten Modellorganismus anzukommen. Da die beiden Flavon-Glykoside als isolierte Reinsubstanzen auch *in vivo* wirkten, müssen sie demzufolge zu einem gewissen Grad bioverfügbar sein und der Grund, warum sie in den Extrakten ihre Wirkung nicht entfalten konnten, liegt höchstwahrscheinlich in der geringeren Konzentration im Vielstoffgemisch. Denn auch die Möglichkeit, dass die aktiven Substanzen im Extrakt Di- oder gar Polymere gebildet haben, wofür Polyphenole besonders anfällig sind (Kobayashi und Higashimura, 2003; Toscano *et al.*, 2003) und was die BV herabsetzen könnte, ist laut Orientierungsversuchen mit LC/MS unwahrscheinlich. Zwar konnten Di- und Trimere in den Massenspektrogrammen identifiziert werden. Da diese aber, hätten sie nativ in der Extraktlösung vorgelegen, im Flüssigchromatogramm als 2 unterschiedliche Peaks hätten wahrgenommen werden müssen, bildeten sie sich wahrscheinlich in der Ionisationsquelle, denn sie entstammten aus nur einem Peak des Chromatogramms. Man könnte bei den beiden anderen Substanzgruppen, die als Reinstoffe getestet wurden, nun annehmen, dass sie entweder nicht ausreichend bioverfügbar sind oder einfach nicht antioxidativ *in vivo* wirken. Für die Chlorogen- bzw. Neochlorogensäure reichen die Daten für eine Schlussfolgerung nicht aus, da aber die Phenylethanoide sehr aktive Neuroprotektoren darstellten (Kapitel 4.3) und somit von den Würmern in die Muskeln und Nervenzellen aufgenommen worden sein müssen, ist ihre fehlende Wirkung im ROS-Assay ziemlich sicher nicht auf eine geringe BV, sondern auf fehlende antioxidative Wirksamkeit zurückzuführen.

Um im ZNS von Menschen eine pharmakologische Wirkung hervorzurufen, müssten die extrahierten Substanzen nicht nur die Zellmembran der Darmepithelzellen u. a., sondern auch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) überwinden, also zentral bioverfügbar sein. Prinzipiell müssen die Verbindungen dazu ähnliche Eigenschaften besitzen, die notwendig sind um vom Darm ins Blut zu gelangen. Dennoch sind hier weitere Aspekte von Bedeutung; so scheint der Einfluss von ABC-Transportern als Efflux-Pumpen eine viel größere Rolle zu spielen (Begley, 2004; Schinkel *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2008). In welchem Umfang verschiedene polyphenolische Pflanzenstoffe die BBB zu überwinden vermögen, ist kaum untersucht. Es gibt Hinweise, dass lipophilere Polyphenole dies besser können als ihr hydrophileren Pendant, z. B. Naringenin und Hesperitin im Vergleich zu ihren Glykosiden und Glucuroniden oder methylierte Flavonoide im Vergleich zu phenolischen (Youdim *et al.*,

2003; 2004a; 2004b). Aber auch polarere Polyphenole wie EGCG und Anthocyanidine aus Heidelbeeren können das Gehirn erreichen (Milbury und Kalt, 2010; Suganuma *et al.*, 1998). Zur potentiellen Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den *C. elegans*-Versuchen auf den Menschen muss die zentrale BV der Inhaltsstoffe des Griechischen Bergtees einkalkuliert werden. In welchem Ausmaß sie die BBB überwinden können, ist nicht bekannt. Dass sie es aber tun, ist an den berichteten zentralen Effekten in Wirbeltier und Mensch abzusehen (Kapitel 1.2.3.7 und 1.2.3.8).

4.2 Neuroprotektive Wirkung der Sideritis-Extrakte

In allen durchgeführten Experimenten, in denen *C. elegans* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen genutzt wurde, zeigten mindestens einige, oftmals fast alle getesteten *S. scardica*-Extrakte eine signifikante Wirkung in einer Konzentration von 600 µg/mL. Über alle Versuche hinweg waren die Auszüge mit 40 und 50 % Ethanol (V/V) am effektivsten und ihre Wirksamkeit stets vergleichbar. Der 20 % ethanolische Extrakt zeigte ebenfalls eine gute Effektivität; in hohen Konzentrationen bis 1000 µg/mL erreichte er häufig fast die Aktivität von 600 µg/mL EtOH40 oder EtOH50. Anhand von zwei ausgewählten Auszügen, nämlich EtOH20 und EtOH50, ließ sich außerdem in den meisten Assays eine signifikante Konzentrations-Wirkungsbeziehung beobachten. Obwohl nicht alle *C. elegans*-Stämme die relevanten Peptid-Verbindungen in Nerven- sondern Muskelzellen exprimierten (Kapitel 2.1.7), lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit auf eine neuroprotektive Wirkung der hydroalkoholischen *Sideritis scardica*-Extrakte *in vivo* schließen, die auf folgenden Effekten im Einzelnen beruht: der Aggregationshemmung von A β , α -Synuclein und PolyQ-Peptiden, einer Reduzierung der Toxizität bzw. negativer Auswirkungen (neuronale Dysfunktion und Viabilität) dieser Proteine sowie von Tau und auf der verminderten Degeneration von dopaminergen Nervenzellen durch 6-OHDA.

Die Diskussion, warum nun die mittelpolaren Extrakte im Vergleich zu dem rein wässrigen Auszug und zu den hydrophoberen Auszügen mit Methanol und 70 % Ethanol die größere Aktivität aufwiesen, obwohl sie nicht den höchsten Gehalt an polyphenolischen Verbindungen aufzeigten (Tabelle 3.1), ist von recht spekulativer Art. Die Korrelation von Gehalt und Ausmaß der Wirkung funktioniert nur in der Reihe von H₂O über EtOH20 bis EtOH40. Natürlich stellen Acteosid, Caffeoylchinasäuren (berechnet als Chlorogensäure) und Flavonoide (berechnet als Scutellarin) zunächst erst einmal nur analytische Marker- oder Leitsubstanzen dar, die wichtig für die Analytik in der phytopharmazeutischen Industrie und eine gleichbleibende Qualität der Produkte sind, die aber nicht unbedingt die pharmakologischen Effekte ausüben müssen. Anzunehmen, die Polyphenole würden keinen wesentlichen Anteil an der Wirkung der Extrakte haben, wäre jedoch unlogisch. Zum einen ist der Polyphenolgehalt ein hervorstechendes Merkmal von *Sideritis scardica* und viele der in Bioassays gezeigten Effekte werden von den Autoren selbst auf diese Substanzklasse zurückgeführt, sollten nicht gerade terpenreiche, superlipophile Extrakte oder ätherische Öle getestet worden sein (Kapitel 1.2.3). Zum anderen ist die einzige größere Diskrepanz, vergleicht man die Literatur zur Phytochemie (Kapitel 1.2.2) mit den Markersubstanzen, der Gehalt an (Di-)Terpenen. Diese sind v. a. im ätherischen Öl akkumuliert und wurden bisher nur in Extrakten mit sehr unpolaren Auszugsmitteln, wie etwa Hexan, gefunden (Kostadinova

et al., 2008; Qazimi *et al.*, 2010). Laut Aussage der Fa. Finzelberg sind in den hydroalkoholischen Extrakten keine Terpenoide nachweisbar und kommen deswegen nicht als wirksame Substanzen in Frage. Und zu guter Letzt sind viele der beschriebenen neuroprotektiven Effekte schon bei einer Vielzahl isolierter Polyphenole bzw. polyphenolreicher Pflanzen beobachtet worden (Kapitel 4.3 und 4.4). Warum nun Auszüge mit einem größeren Gehalt dieser potentiell wirkungsbestimmenden Stoffe eine geringere Wirkung auf *C. elegans* zeigten, könnte an der Verträglichkeit für die Würmer liegen. Publikationen zu dieser Thematik liegen leider nicht vor, dennoch wurde u. a. in dieser Arbeitsgruppe die Erfahrung gemacht (z. B. bei Versuchen der Gaststudentin Kalika Puri mit *Cistus incanus*), dass ein hoher Gehalt an Gerbstoffen oft mit Problemen bei Modellorganismen und Zellen einhergeht, was eventuell auf die Interaktion mit Membranproteinen zurückzuführen ist. So konnte ein Polyphenol-angereicherter Extrakt, obwohl er keine toxischen oder sonstigen negativen Auswirkungen zeigte, nicht mit der Wirksamkeit des gleichen, nicht-angereicherten, Rohextraktes mithalten (Ergebnisse nicht publiziert). Empirisch bestünde also die Möglichkeit, dass EtOH70 und MeOH, die durch den höheren Gesamt-Polyphenolgehalt höchstwahrscheinlich auch mehr gerbende Substanzen (Lamiaceen-Gerbstoffe: Hydroxyzimtsäurederivate) enthalten, weniger verträglich für die Nematoden waren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Substanzen der mittelpolaren Auszüge besser bioverfügbar waren, obwohl ja i.d.R. lipophilere Stoffe besser resorbiert werden. Es sind durchaus schon synergistische Mechanismen bekannt, durch welche die BV von potentiellen Wirkstoffen gesteigert werden kann, z. B. das Absättigen von ABC-Transportern (z. B. Chinin), einer Enzyminhibition (z. B. Cytochrom P450) oder gar die Resorptionsverbesserung durch eine erhöhte Permeabilität von Darmmembranlipiden, die beispielsweise mit oberflächenaktiven Di- und Triterpenen interagiert haben (Langner *et al.*, 2011; Watzl und Leitzmann, 2005). Terpen-Verbindungen sind laut Fa. Finzelberg ja in den bereitgestellten *S. scardica*-Extrakten nicht nachweisbar, dennoch könnten Spuren für einen solchen Synergismus reichen oder andere Substanzklassen wie Iridoide (von Finzelberg mittels DC nachgewiesen) dafür bedeutsam sein. Der Methanolextrakt wurde zudem nie auf Terpenoide usw. getestet. Denkbar wäre eine die BV-erhöhende Wirkung von polaren Extraktivstoffen auf unpolare. Das könnte die Effektivität der mittelpolaren Auszüge erklären. Dazu könnten auch eine geringere Konzentration an wirkungsbestimmenden Inhaltsstoffen durch das unspezifischere Lösen anderer Substanzen durch Methanol und 70 % Ethanol sowie ein pharmakodynamischer Synergismus zwischen polaren und unpolaren Substanzen beitragen (Kapitel 4.3).

4.3 Beurteilung des wirksamen Prinzips

Um der Frage nachzugehen, welche der in den Extrakten enthaltenen Substanzen bzw. Substanzgruppen die neuroprotektive Wirkung ausmachen oder ob evtl. nur der Auszug an sich als gesamtwirksames Prinzip aktiv ist, wurden 6 Fraktionen aus EtOH40, einem der wirksamsten Extrakte, gewonnen und getestet sowie nach dessen Auswertung 7 ausgewählte Reinsubstanzen. Mittels 3 verschiedener Verfahren wurde je ein Pärchen aus hydrophilerer und lipophilerer Extraktfraktion gewonnen (Kapitel 2.1.6). Durchweg zeigten die lipophilen Partner in einer Konzentration von 400 µg/mL eine signifikante Wirkung, die stets stärker als

die der hydrophilen Fraktionen, aber selten stärker als die von 400 µg/mL des Originalextraktes waren. Dabei stach untereinander keiner besonders hervor, obwohl die Fraktionspärchen ja unterschiedlich selektiv getrennt wurden. Auf die Generierung von ROS hatte weiterhin keiner einen Einfluss. Die hydrophileren Fraktionen zeigten oft einen kleinen Effekt, der sich aber nur in einem einzigen Fall statistisch signifikant von der Negativkontrolle unterschied (Adsorb H₂O bei den A β -Plaques). Die phytochemische Analyse (Kapitel 3.1) zeigte, dass die lipophilen Fraktionen immer einen höheren Gehalt an Acteosid, CCS und Gesamt-Polyphenolen sowie meist auch an Flavonoiden (Ausnahme: Umlösung in 70 % Ethanol) im Vergleich zum hydrophilen Partner und zum Originalextrakt hatten. Der Konzentrationsverlauf in den Extrakten mit lipophiler werdenden AZM und die Gehalte in den lipophilen Fraktionen mögen auf den ersten Blick für das Vorliegen von Flavonoid-Aglyka (unpolarer) sprechen, dem ist aber nicht so. Es ist zwar bekannt, dass glykosidisch gebundene Naturstoffe durch (Luft-)Trocknung, Mahlung und abhängig von der Extraktionsmethode von ihren Zuckern gespalten werden können (Katsube *et al.*, 2009; Lindroth und Pajutee, 1987). Dennoch berichten Publikationen über *S. scardica* von glykosidisch vorliegenden Flavonoiden etc., obwohl auch dort keine Frischpflanzen, sondern die Luft-getrocknete Droge zum Einsatz kam (Alipieva *et al.*, 2010; Petreska *et al.*, 2011a; 2011b; Tadic *et al.*, 2012). Die relativ großen Massen aus den LC/MS-Orientierungsversuchen sprechen ebenfalls für Zuckerverbindungen und nach der Expertise der Fa. Finzelberg im Bereich Extraktion lösen sich Glykoside am besten in Auszugsmitteln, deren Polarität ungefähr 50 bis 70 % Ethanol entspricht, was den Konzentrationsverlauf in der hydroethanolischen Reihe bestens erklärt. Dasselbe Phänomen ließ sich bereits in anderen Arbeiten erkennen (Feistel und Appel, 2013). Warum sich nun gerade bei der Fraktionierungsmethode der Umlösung in 70 % Ethanol die Anreicherung der Flavonoide im Vergleich zu den anderen Methoden gegensätzlich zu verhalten scheint, ist der Selektivität geschuldet. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist immer etwas Wasser im Butanol gelöst (gesättigt) und umgekehrt, weswegen man nicht von der Unpolarität reines Butanols ausgehen kann. Gerade durch den Wassergehalt ist die Butanolphase recht selektiv für glykosidische Polyphenole. Die Selektivität dafür ist in der Fest-Flüssig-Extraktion noch größer, da das Polymer XAD-7 durch seinen polaren Acrylesterkern polar-lipophile Polyphenole sehr gut adsorbieren kann (Dominguez *et al.*, 2011; Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1998). Da die Säule zuerst mit Wasser versetzt wurde, um die polaren Substanzen zu eluieren (Adsorb H₂O) und danach Ethanol zugegeben wurde, wurden die in Adsorb EtOH enthaltenen Stoffe über einen sich entwickelnden Ethanol-Wasser-Gradienten eluiert; die Lipophilie entspricht also nicht der reinen Ethanols. Da bei der Umlösung des Originalextraktes, welches die unselektivste der durchgeführten Fraktionierungsmethoden darstellt, die Realkonzentration zu Beginn größer als 70 % Ethanol ist (wässrig gelöster Extrakt wird zu 96 % Ethanol gegeben bis 70 % erreicht sind), können Zuckerverbindungen zunächst ausfallen und sich nicht wieder rüchlösen sobald die Zielkonzentration erreicht ist. Dies ist bei den Flavonoid-Glykosiden höchstwahrscheinlich geschehen, weswegen sie vermehrt in der Bodensatzfraktion verblieben und nicht im lipophileren Überstand, was der Logik zunächst widersprach.

Wie dem auch sei, die Massenverteilungen der Fraktionen einkalkuliert, tat sich besonders Acteosid als Vetrter der Phenylethanoide als potentiell wirkungsbestimmender Bestandteil der Extrakt(fraktionen) hervor. Aus diesem Grund wurden Acteosid (=Verbascosid) und zwei weitere Phenylethanoid-Derivate namens Forsythosid A und

Echinacosid, basierend auf einer Literaturrecherche zur Phytochemie (Kapitel 1.2.2) ausgewählt, als isolierte Reinstoffe im *C.elegans*-Modell getestet zu werden. Um den anderen Substanzklassen Rechnung zu tragen, wurden ebenfalls die zwei Flavone Scutellarin und Apigenin-7-Glucosid sowie die zwei CCS-Verbindungen Chlorogensäure und Neochlorogensäure gewählt. Dies geschah auf der Basis der phytochemischen Analyse, vorhandener Literatur und Verfügbarkeit.

In einer Konzentration von 200 µg/mL zeigten die 3 Phenylethanoid-Glykoside signifikante Effekte gegen die A β - und 6-OHDA-Toxizität sowie die Aggregation von PolyQ-Peptiden, wohingegen *in vivo* keine antioxidativen Eigenschaften ersichtlich waren. Acteosid und Forsythosid A waren oft ähnlich protektiv, während Echinacosid meist etwas schwächer wirkte. Weitere Experimente konnten leider nicht mehr durchgeführt werden; dennoch ist es wahrscheinlich, dass, ausgehend vom Vergleich zu den anderen Behandlungen und vom postulierten Wirkmechanismus (siehe unten), die drei Hydroxyzimtsäure-Derivate auch in den übrigen Versuchen eine ähnliche Aktivität wie die mittelpolaren *S. scardica*-Extrakte oder die lipophilen Fraktionen gehabt hätten. Die beiden CCS-Derivate waren durchweg unwirksam, obwohl ihre Realkonzentration etwas höher war, wenn man bedenkt, dass sie als einzige der verwendeten Reinsubstanzen nicht als Glykoside vorlagen. D. h. von 200 µg/mL machten 100 % die Verbindungen an sich aus, während bei den Flavonoiden und Phenylethanoiden die anhängenden Saccharide die Massenkonzentration der Aglyka reduzierten. Außer Acht gelassen, weil nicht bekannt, wurde dabei, ob die Verbindungen hier, in diesem speziellen Fall, als Aglykon oder Glykosid wirksamer wären bzw. ob die Glykoside einen Prodrug-Charakter haben. 200 µg/mL der Flavon-Glykoside senkten als einzige Testsubstanzen das intrazelluläre ROS-Level in *C. elegans*, erzielten aber nie einen direkten neuroprotektiven Effekt, auch wenn v. a. Scutellarin z.T. knapp an der Signifikanz-Schwelle scheiterte. Möglicherweise basiert dieser Trend hin zu einer gewissen protektiven Wirkung auf der Reduktion von oxidativem Stress, der durch A β oder 6-OHDA ausgelöst wurde, was weiterer Untersuchung bedarf.

In der bestehenden wissenschaftlichen Literatur gibt es bereits Belege von neuroprotektiven Eigenschaften der Phenylethanoide. Acteosid schützt verschiedene Zelllinien vor neurotoxischen Einflüssen wie dem MPP+, wobei hier auch antioxidative und antiinflammatorische Wirkmechanismen diskutiert werden (Deng *et al.*, 2008; Esposito *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2002). Zudem erwies sich der Naturstoff als hochpotenter Inhibitor der Aggregation von A β und schützte auch vor A β -induzierter Zytotoxizität, was die erhaltenen Ergebnisse erklären könnte und stützt. Es wird angenommen, dass die funktionellen Brenzcatechin-Gruppen dafür ausschlaggebend sind (Alipieva *et al.*, 2014; Kurisu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009). Ob Acteosid auch die Aggregation von Tau, α -Synuclein und PolyQ-Proteinen hemmt, ist bzw. war bisher nicht bekannt. In einem Nervenzellmodell wirkte es sich jedoch positiv auf die Balance von nicht- und hyperphosphoryliertem Tau auf der Expressionsebene aus (Bai *et al.*, 2013). Im Tierversuch steigerte die Behandlung mit Acteosid die Gedächtnisleistung, was auf eine verbesserte cholinerge Transmission zurückgeführt werden könnte (Lee *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012). Für Forsythosid A und Echinacosid ist die Datenlage zwar dünner, dennoch wird über ganz ähnliche Effekte berichtet. Als Ursache der verminderten A β -induzierten Apoptose durch Forsythosid A wird auch eine Herunterregulierung der Acetylcholinesterase in Betracht gezogen und Echinacosid schützte dopaminerge Neuronen ebenfalls vor 6-OHDA, was nun in *C. elegans* bestätigt

werden konnte (Geng *et al.*, 2007; Koo *et al.*, 2005; Shiao *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015a; 2016). Die nervenzellschützenden Eigenschaften von Scutellarin und Apigenin werden ganz wesentlich mit ihren Eigenschaften als Antioxidantien und Entzündungshemmer assoziiert (Guo *et al.*, 2011a; Ha *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Dass die beiden Flavone eine signifikante antiamyloidogene Wirkung besitzen, die Oligomerisierung von α -Synuclein hemmen oder dopaminerge Nerven schützen, wozu es Hinweise gibt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden (Caruana *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011b; Patil *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2013). Über die Effekte auf Tau-Proteine oder Huntingtin scheint zum heutigen Zeitpunkt nichts bekannt. Im Hinblick auf die Chlorogensäure sind verschiedene neuroprotektive Effekte beobachtet worden, die z.T. durch ihre antioxidativen Eigenschaften bedingt sein sollen. Einen Einfluss auf die Aggregation und Toxizität von A β scheinen eher die Di- und Tri-Caffeoylchinasäuren zu haben, als die Verbindungen mit nur einer Kaffeesäure (Heitman und Ingram, 2017; Kwon *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008; Miyamae *et al.*, 2012). Interessant ist auch die Reduktion der Glutamat-Neurotoxizität durch Chlorogensäure (Mikami und Yamazawa, 2015), da eine Modulation des AMPA-Rezeptors durch einen 20 % ethanolischen *S. scardica*-Extrakt schon beobachtet wurde (Dimpfel *et al.*, 2016d).

Bezüglich des wirksamen Prinzips lässt sich aus den Ergebnissen folgendes schlussfolgern: Die enthaltenen Phenylethanoide tragen sicherlich einen großen Teil zur neuroprotektiven Wirkung der Extrakte aus dem Griechischen Bergtee bei. Dass sie die alleinigen Wirkstoffe sind, ist dennoch unwahrscheinlich, denn 200 $\mu\text{g/mL}$ zeigten nie viel höhere oder niedrigere Endwerte in den Assays als die aktivsten Extrakte (600 $\mu\text{g/mL}$) oder lipophilen Fraktionen (400 $\mu\text{g/mL}$), die bei einem Acteosidgehalt von ca. 1 - 4,3 % etwa 6 bis 17 $\mu\text{g/mL}$ der Substanz enthielten. Zu bedenken ist bei dieser Aussage jedoch, dass die Linearität der *C. elegans*-Versuche nur schwer eingeschätzt werden kann. Beispielsweise kam es, zumindest in dieser Arbeitsgruppe und in verschiedensten Publikationen, nie vor, dass eine Substanz die A β -Plaquezahl auf 1 oder 2 herabgesetzt hat etc., bestenfalls waren sie etwas aktiver als die Positivkontrolle; vielleicht schieden solch potente Substanzen oder Konzentrationen bisher auch immer aus der Testung aus, weil sie das Testsystem beeinflussten (z. B. Wachstumskontrolle). Das bedeutet, es muss hinterfragt werden, ob die verwendeten Assays zum perfekten Vergleich zwischen den Behandlungen taugen oder ob sie eher „nur“ zur qualitativen Ja- oder Nein-Aussage reichen. Nichtsdestotrotz sprechen die Daten dafür, dass die Extraktzubereitungen EtOH40 und EtOH50 eine ähnliche neuroprotektive Potenz wie 2/3 der Konzentration an angereicherter, lipophiler Fraktion und 1/3 der Konzentration an isolierten Phenylethanoid-Glykosiden haben, was nicht zuletzt vom pharmazeutisch-industriellen, ökonomischen Standpunkt aus interessant ist. Die Ergebnisse legen nahe, dass die lipophilen Bestandteile der Extrakte wirksamer sind, aber nur bis zu einem gewissen Punkt. Denn ansonsten hätten EtOH70 und MeOH aktiver sein müssen und eventuell ist das auch der Grund, warum die lipophilen Fraktionen nicht noch potenter als der Originalextrakt EtOH40 waren. Das und der erkennbare Trend der moderaten Wirkung der hydrophilen Fraktionen lassen einen pharmakologischen Synergismus zwischen polaren und unpolaren Extraktivstoffen plausibel erscheinen, der von pharmakodynamischer und/ oder -kinetischer Natur sein könnte. Um dies zu überprüfen, müssten in großem Umfang verschiedenste Kombinationen von Inhaltsstoffen des Griechischen Bergtees getestet werden.

4.4 Potentieller Wirkmechanismus

Eine der wichtigsten Fragen ist, wie genau die Inhaltsstoffe der *S. scardica*-Extrakte ihre neuroprotektive Wirkung entfalten. Um das mit absoluter Sicherheit zu sagen, reichen die Daten dieser Arbeit sicherlich nicht aus und es bedarf weiterer Aufklärung, dennoch sprechen die Ergebnisse eine sehr eindeutige Sprache und unter Einbeziehung existierender Literatur kann ein hypothetischer Wirkmechanismus (WM) postuliert werden. Zunächst ist festzuhalten, dass alle Ergebnisse von Versuchen, die entweder direkt oder indirekt eine Aggregation von neurotoxischen Peptiden bzw. deren Auswirkungen messen, signifikant miteinander korrelieren (Kapitel 3.10). Je stärker also eine Behandlung mit einer bestimmten Konzentration eines *S. scardica*-Extraktes oder einer –Fraktion β -Amyloid, Tau, α -Synuclein oder PolyQ entgegenwirkte, desto wirksamer war sie auch gegen die anderen Proteine. Das führt zur Hypothese, dass der WM unspezifisch ist, da es deutlich wahrscheinlicher ist, dass die Extrakte (selbst wenn sie als Multi-Target-Wirkstoffe betrachtet werden können) nicht eine Vielzahl von signifikanten Aktivitäten aufweisen, sondern all diese einzelnen Wirkungen über einen gemeinsamen Mechanismus ansteuern. Neurodegenerative Erkrankungen verfügen über viele Gemeinsamkeiten (Kapitel 1.1.4), von denen als potentieller WM der *S. scardica*-Extrakte viele ausscheiden. So konnte gezeigt werden, dass die Extrakte, Fraktionen etc. in den Konzentrationen, in denen sie eine deutliche neuroprotektive Aktivität aufwiesen, keine antioxidativen Effekte *in vivo* aufwiesen. Eine Verhinderung der Zelldegeneration über die Inhibition von $A\beta$ -induziertem ROS usw. kommt also nicht in Frage. Eine Beteiligung von antiinflammatorischen Eigenschaften des Griechischen Bergtees (Tadic et al., 2007; 2012) ist prinzipiell denkbar und wurde nicht direkt getestet, ist aber im Fadenwurmmmodell sehr fragwürdig, da *C. elegans* zwar über ein paar innate Infektionsabwehrmechanismen wie Lysozym verfügt, aber durch das Fehlen von Makrophagen, Astrozyten, einer Mikroglia und einem adaptiven Immunsystem die Komplexität einer (Neuro)-Inflammation nicht abbilden kann und die in den Säugetieren beobachteten entzündungshemmenden Mechanismen in den Würmern vermutlich gar nicht greifen (Gregory und Devitt, 2004; Mallo *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2010). Die von Hofrichter *et al.* (2016) gezeigte erhöhte phagozytotische Aktivität der Mikroglia kommt also bei *C. elegans* nicht in Betracht, ebensowenig die erhöhte Expression von ADAM10 als Grund für die verringerte $A\beta$ -Last; allgemein scheiden die Inhibition oder Induktion von Sekretasen als Ursache der Neuroprotektion im Wurmmmodell aus, da hier humanes $A\beta$ nicht durch Prozessierung von APP, sondern durch das Expressieren eines eingeschleusten Minigens produziert wird. Eine eventuelle Beeinflussung dieser Expression wurde zumindest für EGCG schon widerlegt; die Gesamtmenge an $A\beta$ blieb in den Würmern gleich, nur die Oligomerisierung der Monomere wurde verhindert (Abbas und Wink, 2010). Neben einer verringerten Produktion von $A\beta$ und anderen neurotoxischen Proteinen sowie der Verhinderung ihrer negativen Auswirkungen sind weiterhin eine verbesserte „Clearance“, also der Abtransport, sowie die Verhinderung der Aggregation der Monomere zu Oligomeren, Polymeren usw. denkbar. Die Proteinopathien-auslösenden Substanzen können z. B. über ABC-Transporter vom ZNS in den Blutstrom abgegeben werden und Induktoren dieser Effluxpumpen (z. B. Phenytoin, Rifampicin, Johanniskraut, verschiedene Flavonoide) sind in der Lage, diesen Prozess zu fördern (Dutheil *et al.*, 2010; Hofrichter *et al.*, 2013; Langner *et al.*, 2011; Pahnke *et al.*, 2009). Hydroethanolische Auszüge aus dem Griechischen Bergtee scheinen die ABC-Transporter allerdings nicht zu beeinflussen

(Hofrichter *et al.*, 2016). Es besteht auch die Möglichkeit, dass Substanzen die Beseitigung der fehlgefalteten Proteine durch das Proteasom, z. B. durch Induktion der Ubiquitinierung, fördern. Das ist kaum erforscht; eine Behandlung mit *Ginkgo biloba* konnte im Zellmodell aber beispielsweise die Proteasomaktivität steigern (Stark und Behl, 2014). Die relevanten Peptide könnten weiterhin in Lysosomen oder durch eine Vielzahl von Enzymen, z. B. Nephilysin degradiert werden, die durch die Mikroglia, Astrozyten usw. produziert werden (Ciechanover und Brundin, 2003; Iwata *et al.*, 2001; Miners *et al.*, 2011; Ross und Pickart, 2004). Letztere Strukturen sind in *C. elegans* nicht vorhanden, aber es verfügt über ein Ubiquitin-Proteasom-System und Lysosom-ähnliche Organellen, wodurch eine Beeinflussung der Proteinqualitätskontrolle und des -abbaus durchaus eine Rolle im Wurmmodell für Neurodegeneration spielen könnte (Hermann *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). Ein weiterer großer Aspekt zur Detoxifizierung der Proteine sind Chaperone, also Faltungshelfer wie Hitzeschockproteine, die durch eine Vermeidung der Fehlfaltung bzw. Umfaltungen verhindern können, dass die Peptide derart vorliegen, dass sie leicht aggregieren. Diese protektive, aggregationsmindernde Wirkung der Chaperone wurde bei A β , Tau, α -Synuclein und PolyQ-Proteine beschrieben (Rekas *et al.*, 2004; Sahara *et al.*, 2007; Vos *et al.*, 2010; Wilhelmus *et al.*, 2007). Es existiert eine Vielzahl von Hitzeschockproteinen in *C. elegans*; die hydroethanolischen *Sideritis scardica*-Extrakte waren zumindest nicht im Stande, die Expression von HSP-16.2 zu induzieren (Kapitel 2.2.10). Ebenfalls aktivierten sie in keiner Konzentration die Wanderung des Transkriptionsfaktors DAF-16 in die Zellkerne. Dies würde im Zusammenspiel mit anderen TFs wie Hitzeschockfaktoren die Expression einer Vielzahl von Proteinen bewirken, die für eine Stressresistenz und antioxidativer Abwehr von Bedeutung sind, darunter auch HSPs (Hsu *et al.*, 2003; Panowski *et al.*, 2007). Der TF gehört zum ILS-Signalweg (insuline-like signaling), welcher in den Würmern eine große Rolle in der Dauer-Formation, dem Altern und der Lebensspanne hat. DAF-2-Rezeptor-Antagonisten führen zur Dephosphorylierung von DAF-16, der dadurch in den Zellkern wandern kann. Der Signalweg ist stark konserviert; viele der beteiligten Strukturen haben Homologe im Menschen, wie die FOXO-Transkriptionsfaktoren (Gottlieb und Ruvkun, 1994; Kimura *et al.*, 1997; Papatheodorou *et al.*, 2014). Die Beteiligung des ILS-Signalwegs an der Degradation und Detoxifizierung von z. B. A β ist bekannt (Cohen *et al.*, 2006); die fehlende Induzierung durch die Extrakte lässt aber den Schluss zu, dass dies nicht der WM sein kann. Als wahrscheinlichster Wirkmechanismus der *S. scardica*-Extrakte bleibt die direkte Aggregationshemmung übrig, also das Erzeugen eines „Spacer-Effektes“ durch polyphenolische Verbindungen, wodurch die neurotoxischen Proteine sich nicht mehr so gut zusammenlagern und Oligomere, Plaques usw. bilden können. Dies würde einen gemeinsamen WM darstellen, der sich gegen sämtliche untersuchte neurodegenerativen Proteine auswirkte und von antioxidativen Effekten unabhängig wäre. Eine verringerte Anzahl von Ablagerungen (A β und PolyQ) bzw. die verringerte Fluoreszenzintensität von aggregiertem, YFP-gekoppeltem α -Synuclein durch die Extrakte wurde ja direkt gemessen. Die verringerte Toxizität von A β , Tau und Huntingtin ließe sich dann spezifischer mit der Inhibition der Oligomerisierung erklären, da die kleineren Zusammenlagerungen ja bei allen Proteinen als die toxischeren Spezies angesehen werden. Dieser WM ist nicht zuletzt sehr wahrscheinlich, weil er bereits bei Polyphenolen beschrieben worden ist und *S. scardica* einen hohen Gehalt dieser Sekundärmetaboliten aufweist. Es wurde bereits untersucht, wie der Hauptwirkstoff des Grüntees, EGCG, an A β binden kann, nämlich über hydrophobe

Wechselwirkungen und nicht-kovalente Bindungen (del Amo *et al.*, 2012; Palhano *et al.*, 2013; Porat *et al.*, 2006). D. h. gerade bei fehlgefalteten Proteinen sind die aromatischen Strukturen exponiert und können mit hydrophoben Stellen des Polyphenols interagieren. Zudem können die phenolischen Hydroxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen mit den freien Aminogruppen der Peptide eingehen und da die funktionellen Gruppen physiologisch meist als Phenolate vorliegen, sind sogar stärkere, ionische Bindungen an das Protein möglich (Le Bourvellec und Renard, 2012; Siebert *et al.*, 1996; van Wyk *et al.*, 2016). Diese nicht-kovalenten Bindungen werden v. a. bei Proteinen wie Huntingtin, die wenig bis keine aromatischen Strukturen beinhalten, dafür aber viele freie NH₂-Gruppen, bedeutsam sein. Den postulierten WM stützend, hemmt EGCG auch die Aggregation von α -Synuclein, Tau und PolyQ, wobei es sogar vermag, reife Aggregate aufzulösen (Bieschke *et al.*, 2010; Caruana *et al.*, 2011; Ehrnhoefer *et al.*, 2006; Wobst *et al.*, 2015). Auch weitere polyphenolische Naturstoffe (Curcumin, Quercetin, Myricetin, ...) sind in der Lage, die Aggregation von mehr als einem Protein zu hemmen. Dabei wird angenommen, dass Substanzen mit mind. zwei phenolischen Ringen und mind. drei aromatisch gebundenen Hydroxylgruppen die größte aggregationsinhibierende Wirkung besitzen und dass für die Wirksamkeit drei vicinale OH-Gruppen besser als zwei oder gar nur eine an einem Aromatenring sind (Bulic *et al.*, 2010; Caruana *et al.*, 2011; Herva *et al.*, 2014; Howlett *et al.*, 1999). Das geht Hand in Hand mit einer Studie über Acteosid, welche die Brenzcatechin-Struktur als Pharmakophor für die starke und direkte aggregationshemmende Wirkung sieht und die Hypothese stützt (Kurisu *et al.*, 2013). Allgemein würde dieser WM die Ähnlichkeit der Datenlage bei den in *S. scardica* enthaltenen Phenylethanoiden erklären (siehe oben).

Abgekoppelt davon muss man die Protektion vor der 6-OHDA-induzierten Neurodegeneration sehen. Auch hier ist eine verminderte Toxizität durch Hemmung von ROS ausgeschlossen, da die Extrakte in den neuroprotektiven Konzentrationen keine antioxidativen Eigenschaften zeigten. Auch wenn *C. elegans* über eine Monoaminoxidase (MAO) verfügt (Bargmann, 1998) und 6-OHDA ein potentielles Substrat dieses Enzym darstellt (wenig erforscht, da es die BBB nicht überwindet (Schober, 2004)), ist eine MAO-Induktion durch die Extrakte und damit ein verbesserter Abbau des Neurotoxins als WM unwahrscheinlich, denn im Gegensatz zu MAO-Inhibitoren ist solch eine pharmakologische Wirkung scheinbar nicht bekannt. Viel wahrscheinlicher ist eine reduzierte Aufnahme von 6-OHDA in die Neuronen durch die Hemmung von NA- oder DA-Transportern, was Auszüge aus dem Griechischen Bergtee *in vitro* nachweislich tun, v. a. wenn lipophilere AZM benutzt wurden (Feistel und Appel, 2013; Knörle, 2012).

Eine Beeinflussung von Strukturen durch die *S. scardica*-Extrakte, welchen erst in den letzten Jahren eine größere Beachtung im Forschungsfeld der „Drug discovery“ zuteil wurde, wie die DDRs oder die Asparaginendopeptidase, welche so oder so ähnlich wahrscheinlich auch in den Nematoden existieren (Ray und McKerrow, 1992; Unsoeld *et al.*, 2013), kann natürlich nicht ausgeschlossen werden. Da *C. elegans* als Modell für neurodegenerative Erkrankungen aber gewisse Einschränkungen besitzt (Kapitel 1.3.2) und nicht über alle komplexen Mechanismen verfügt, die bei AD, PD und HD eine Rolle spielen, bleibt die direkte und unspezifische Aggregationshemmung der neurotoxischen Proteine der wahrscheinlichste molekulare Wirkmechanismus der extrahierten Polyphenole aus *Sideritis scardica*, auch weil es ganz nach Ockhams Sparsamkeitsprinzip der einfachste wäre (von Ockham, 1984).

4.5 Vergleich zu Referenzextrakten

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war das Testen von ausgewählten Pflanzenextrakten, die bekannt für ihre Wirkungen im ZNS und bereits auf dem Markt etabliert sind. Das sollte neben neuen Erkenntnissen zu neuroprotektiven Aktivitäten der Extrakte vornehmlich dazu dienen, die Wirkungsprofile der Arzneipflanzen mit dem von *Sideritis scardica* zu vergleichen und den potentiellen Wert des Griechischen Bergtees auszuloten. Als Referenz dienten der *Ginkgo biloba*-Spezialextrakt EGb 761, der in Tebonin® enthalten ist, ein lipophiler *Hypericum perforatum*-Auszug, der das wirksame Prinzip in Laif® darstellt, ein handelsüblicher *Rhodiola rosea*-Extrakt, der in vielen traditionellen, pflanzlichen Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln vorkommt und ein aufkonzentrierter Extrakt aus *Bacopa monnieri*, einer Pflanze, die ebenfalls für zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel verwendet wird; z. B. in memoLoges® in einer Kombination mit dem 20 % ethanolischen Auszug aus *S. scardica*, der dem in dieser Arbeit genutzten EtOH20 entspricht. Das Kombinationspräparat wurde ebenfalls in den verfügbaren Experimenten getestet (für detaillierte Informationen zu den Referenzextrakten siehe Kapitel 2.1.6).

4.5.1 *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba wird schon seit langem gegen kognitive Störungen und die Alzheimer-Demenz u. a. eingesetzt. Insbesondere der Spezialextrakt EGb 761 der Firma Schwabe wurde in unzähligen Studien untersucht. In ihm werden in über 20 Schritten Ginkgoflavonglykoside und Terpenlactone (Ginkgolide und Bilobalide) an- und Ginkgolsäuren angereichert. Seine Wirksamkeit gegen das dementielle Syndrom wird v. a. auf eine Stabilisierung der Mitochondrienfunktion bzw. verringertem oxidativen Stress, der Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes und damit gesteigerter Hirndurchblutung, der Förderung der neuronalen Zellvernetzung und einer Regulierung der Neurotransmission (z. B. Dopamin und Glutamat) zurückgeführt (Bertoni-Freddari *et al.*, 2002; Chrubasik und Wink, 1998; Dobson *et al.*, 2013; Eckert *et al.*, 2005; Fehske *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2015). In klinischen Studien konnte so eine Verbesserung der Symptomatik verschiedener Demenz-Formen und eine Verbesserung kognitiver Leistungen im Alter gezeigt werden (Ernst und Pittler, 1999; Kaschel, 2009). Auch die Beeinflussung der MCI- und Alzheimer-Pathogenese durch Ginkgo bzw. EGb 761 wurde bereits umfänglich untersucht. Hierbei wurde u. a. eine Minderung der A β -induzierten Neurotoxizität nachgewiesen, z. B. auch in *C. elegans* (Bastianetto *et al.*, 2000; Luo, 2006; Wu *et al.*, 2006). Die in den genannten Quellen beschriebenen Effekte auf A β konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGb 761 zeigten eine hervorragende Hemmung der A β -Aggregation, -Toxizität und -induzierten neuronalen Dysfunktion, wobei die Effektivität stets ungefähr der von 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des 50 % ethanolischen *S. scardica*-Auszuges entsprach. Das bedeutet, dass EGb 761 in den *C. elegans*-Versuchen zwar nur die Hälfte der Konzentration für die gleiche Wirkung gebraucht hat als einer der aktivsten Auszüge aus dem Griechischen Bergtee, jedoch spricht diese Tatsache auch für EtOH50, denn dieser stellt einen ganz einfachen, relativ günstigen Trockenextrakt dar, während EGb 761 aufwendig und teurer angereichert wurde. Würde sich das Verhältnis der Aktivitäten in weiteren Studien bestätigen, würde das *S. scardica* als Alternative zu Ginkgo auch rein industriell und ökonomisch interessant machen. Eine Beteiligung an der neuroprotektiven Wirkung durch Verminderung von oxidativem Stress konnte für den

Ginkgo-Extrakt im Wurmmodell jedoch nicht verifiziert werden, obwohl dies bereits beschrieben wurde (Luo, 2003). So blieb ein Effekt auf das intrazelluläre ROS-Level und die schädliche Wirkung von Juglon sowie auf die Translokation von DAF-16 aus (Kapitel 3.5). Auch auf die Aggregation von α -Synuclein und die 6-OHDA-induzierte Neurodegeneration hatte die Behandlung mit 200 $\mu\text{g/mL}$ EGb 761 keinen signifikanten Einfluss. Höhere Konzentrationen konnten nicht getestet werden, da die Nematoden im Orientierungsversuch Wachstumsstörungen zeigten. Laut Literatur konnten zumindest isolierte Inhaltsstoffe von Ginkgo einen Effekt auf α -Synuclein ausüben (Caruana *et al.*, 2011) und auch die neurotoxische Wirkung von 6-OHDA und anderen Parkinsonismus-auslösenden Substanzen konnte abgemildert werden (Ahmad *et al.*, 2005; Christen, 2004). In *C. elegans* konnte das an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Dass EGb 761, ebenso wie die *S. scardica*-Extrakte, die Aggregation von PolyQ-Proteinen beeinflusst (Stark und Behl, 2014), konnte hingegen auch in den Nematoden beobachtet werden. Zusätzlich schwächte es die Toxizität von Huntingtin auf die Neuronen ab (Kapitel 3.9).

4.5.2 *Hypericum perforatum*

Das Tüpfel- oder Echte Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) wird seit jeher zur Behandlung von leichten bis mittelschweren depressiven Verstimmungen eingesetzt und ist auch heute noch das wichtigste pflanzliche Antidepressivum (Rote Liste, 2017; van Wyk *et al.*, 2016). Der Haupt-Wirkmechanismus ist eine unspezifische Wiederaufnahmehemmung von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin aber auch von GABA und Glutamat (Nathan, 2001). Während früher das Anthrachinon-Derivat Hypericin, später die Phloroglucin-Derivate Hyperforin und Adhyperforin für die stimmungsaufhellende Wirkung verantwortlich gemacht wurden, betrachtet man Johanniskrautextrakte heute eher als wirksames Prinzip, in dem die Bestandteile synergistisch wirken. Dazu trägt auch der Rutin-Gehalt bei, denn ohne Rutin bleibt die antidepressive Wirkung aus, obwohl es allein keine solche Aktivität zeigt (Mennini und Gobbi, 2004; Nöldner und Schötz, 2002). Moderne Extrakte (wie der hier getestete) werden deshalb neben Hypericin und Hyperforin auch auf einen hohen Gehalt von Flavonoiden wie Rutin eingestellt. Bezüglich potentieller neuroprotektiver Mechanismen wurde zumindest *in vitro* eine antioxidative Aktivität berichtet (Silva *et al.*, 2008). Auch in den Fadenwürmern wirkten 600 $\mu\text{g/mL}$ des Johanniskrautextraktes, im Gegensatz zum Griechischen Bergtee, der Entstehung von ROS und dem Juglon-induzierten oxidativen Stress entgegen. Zudem induzierte es, wenn auch in geringem Ausmaß, die Bewegung von DAF-16 in den Zellkern. Es gibt einige Studien, die die Reduktion der A β -Toxizität und eine -Disaggregation belegen (Dinamarca *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004). Diesbezüglich zeichnete der verwendete *Hypericum*-Extrakt in den Versuchen ein recht konfuse Bild. Zwar verögerte er die A β -induzierte Paralyse der Würmer deutlich. Aber weder auf die Anzahl der β -Amyloid-Aggregate noch auf die verringerte Chemotaxis des Stammes CL2355 hatte er einen signifikanten Einfluss. Man könnte eine verringerte A β -Toxizität bei fehlender Aggregationshemmung auf die Hemmung von ROS als Vermittler der toxischen Wirkung zurückführen. Dennoch bleibt dann unklar, warum dieselbe Konzentration die chemotaktische Bewegung zum Anlockungsmittel (welche durch A β gestört ist) nicht fördern konnte. Sehr diskutabel ist hierbei auch, warum das Johanniskraut im selben *C. elegans*-Stamm der A β -bedingten 5HT-Hypersensibilität am besten von allen getesteten Substanzen entgegenwirkte.

Der antidepressive Wirkmechanismus könnte hier allerdings eine potentielle Hemmung der A β -Neurotoxizität verschleiern bzw. überdecken. Denn die Inhibition der Serotonin-Transporter bewirkt die verringerte Wiederaufnahme von 5-HT und eventuell gelangt exogenes Serotonin so überhaupt erst in die Nervenzellen von *C. elegans* und löst so die Paralyse aus (Sawin *et al.*, 2000). D. h., der erhöhte Anteil an aktiven Würmern könnte durchaus dadurch bedingt sein, dass einfach weniger 5-HT in deren Neuronen ankommt. Die Hemmung von Monoamintransportern, wie dem für DA und NA, könnte, zusammen mit der antioxidativen Wirkung, auch der Grund für protektive Wirkung auf dopaminerge Nervenzellen sein, welche 6-OHDA ausgesetzt wurden, was sowohl im Rahmen dieser Arbeit, als auch von anderen Wissenschaftlern beobachtet wurde (Kiasalari *et al.*, 2016). Eine Wirkung auf α -Synuclein, wie sie von isolierten Bestandteilen (Quercetin, Kämpferol, Biapigenin) beschrieben ist, konnte für den Gesamt-Extrakt nicht bestätigt werden. Ebenso wenig wirkte Johanniskraut gegen die Aggregation und Toxizität von PolyQ-Peptiden, was Ergebnissen anderer Forscher entspricht, aber relativ wenig untersucht ist (Vieira, 2011).

4.5.3 *Rhodiola rosea*

Rosenwurz (*Rhodiola rosea*) ist eine sukkulente Pflanze, die in Gebirgsregionen Eurasiens und Nordamerikas aber auch in der Arktis wächst. Die Wurzeldroge enthält verschiedene phenolische Verbindungen wie das Zimtalkoholglykosid Rosavin oder ein Tyrosol-Glucosid namens Salidroside. Die beiden Substanzen scheinen ganz wesentlich zu den pharmakologischen Eigenschaften von *Rhodiola*-Extrakten beizutragen. (Panossian *et al.*, 2010). Rosenwurz zählt zu den bekanntesten Adaptogenen und wird bei erhöhter physischer und psychischer Belastung eingenommen. Weiterhin sind durch klinische Studien u. a. zentral stimulierende (verbesserte kognitive Funktionen) und moderate antidepressive/ anxiolytische Eigenschaften bekannt (Darbinyan *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2011; Olsson *et al.*, 2009). Zahlreiche Publikationen beschreiben auch die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte und Salidroside sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Furmanowa *et al.*, 1998; Zhang und Liu, 2005). In den *C. elegans*-Versuchen wirkte der verwendete Rosenwurz-Extrakt bereits in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemmend auf die Produktion von ROS und den oxidativen Stress, den Juglon auslöst. Damit stellt er einen der potentesten antioxidativ wirksamen Pflanzenextrakte der vorliegenden Arbeit dar. Für eine stressmindernde und die Lebensspanne verlängernde Aktivität von *Rhodiola rosea*, die in verschiedenen Tiermodellen belegt ist, spricht auch die starke Induktion des DAF2- bzw. DAF16-Signalweges (Schriner *et al.*, 2013; Wiegant *et al.*, 2009). Bezüglich der Versuche, die die Fadenwürmer als Modell für AD, PD und HD nutzen, ergaben sich für 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des Extraktes (Konzentration konnte auf festem Medium höher gewählt werden) recht heterogene Daten. So konnte zwar die Aggregation von A β und α -Synuclein inhibiert werden, nicht jedoch die der PolyQ-Peptide und auch auf die A β -Toxizität (Paralyse, Chemotaxis, 5-HT-Sensibilität) hatte die Behandlung mit dem Rosenwurz-Auszug keinen Effekt. Zumindest Salidroside und eine verwandte *Rhodiola*-Art zeigten bisher Effekte, die sich gegen Auswirkungen von A β richteten (Jang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Über einen Einfluss auf α -Synuclein scheint nach eingehender Literaturrecherche bisher nichts bekannt zu sein, aber Salidroside war als Reinstoff in der Lage, die PolyQ-vermittelte Neurotoxizität in *C. elegans* zu reduzieren (Xiao *et al.*, 2014). Allerdings wurde hier nur mit 200 μM (ca. 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Salidroside ein signifikanter Effekt

erzielt, eine Konzentration, die mit 400 µg/mL Nativanteil des Rosenwurz-Extraktes mit mind. 1 % Salidroside nicht erreicht werden konnte (mind. 4 µg/mL Salidroside enthalten). Im 6-OHDA-Assay war *R. rosea* ebenfalls unwirksam. Eine protektive Wirkung von Salidroside gegen dieses DA-Derivat und MPP⁺ wurden erst vor kurzem entdeckt (Tao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Warum sich in den Versuchen ein uneinheitliches Bild des pharmakologischen Profils abzeichnet, kann nicht vollends geklärt werden. Empirisch war es laut Aussagen einiger Kollegen, die mit Pflanzenextrakten mit adaptogenen Eigenschaften arbeiteten, jedoch immer schon schwieriger, eindeutige und valide Ergebnisse in den *in vivo*-Experimenten zu erhalten, da Adaptogene *per definitionem* in jedem Individuum leicht unterschiedliche Auswirkungen haben können (je nach individueller Stresssituation etc.), was auch meist höhere Standardabweichungen bedingt.

4.5.4 *Bacopa monnieri*

Das Kleine Fettblatt (*Bacopa monnieri*) stammt ursprünglich aus der ayurvedischen Medizin und ist oft unter dem Namen Brahmi zu finden. Es wächst oft am Rande von stehenden Gewässern, auch im Schlamm und Brackwasser. Die leicht sukkulente Sumpfpflanze enthält Flavonoide, Alkaloide und Triterpensaponine, von denen die Bacoside mutmaßlich den größten Anteil an den zentralen Wirkungen der Brahmi-Extrakte ausmachen (Russo und Borrelli, 2005). In der westlichen Welt wurde es in den letzten Jahren immer bekannter, insbesondere für seinen Einfluss auf die kognitive Leistungsfähigkeit, welche auch klinisch schon geprüft wurde (Kongkeaw *et al.*, 2014; Pase *et al.*, 2012; Uabundit *et al.*, 2010). Bezüglich des neuroprotektiven Wirkungsspektrums war der verwendete *B. monnieri*-Auszug dem von *S. scardica* am ähnlichsten, denn er zeigte in allen Experimenten, in denen er getestet wurde, eine signifikante Wirkung, mit Ausnahme des DAF-16-Assays. Dabei war die Aktivität der eingesetzten 400 µg/mL stets vergleichbar mit der der gleichen Konzentration EtOH50. Es gab bereits vorher Hinweise, dass Auszüge aus dem Kleinen Fettblatt in der Lage sind, Aβ entgegenzuwirken, jedoch wurde dies v. a. im Hinblick auf eine Minderung des Aβ-induzierten oxidativen Stresses *in vitro* betrachtet (Limpeanchob *et al.*, 2008). Hinweise, dass Brahmi auch die Aggregation von α-Synuclein hemmt und vor 6-OHDA-induzierter Neurodegeneration schützt, kamen von Untersuchungen einer homöopathischen Urtinktur in *C. elegans* (Jadiya *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen konnten nun mit dem aufkonzentrierten und auf Bacoside eingestellten Extrakt ebenfalls gemacht werden. Die Aggregationshemmung von PolyQ-Proteinen und die verminderte Neurotoxizität, die der *B. monnieri*-Auszug bewirkte, scheinen bis jetzt noch nicht genauer erforscht zu sein. Das einzige, was Brahmi vom Griechischen Bergtee bzgl. der Ergebnisse dieser Arbeit unterscheidet, ist, dass es zusätzlich noch über antioxidative Eigenschaften *in vivo* verfügt (Kapitel 3.5.2). Diese scheinen unabhängig von DAF-16 zu sein und könnten einen zusätzlichen Mechanismus darstellen, der die toxischen Auswirkungen von Aβ, 6-OHDA und Huntingtin verringert. Über einen Einfluss auf Tau-Proteine, so wie *S. scardica* ihn zeigte, kann leider keine Aussage getroffen werden, da die Referenzextrakte nicht mehr getestet werden konnten.

Im Kombinationspräparat memoLoges® liegen neben dem 20 % ethanolischen *S. scardica*- und dem angereicherten *B. monnieri*-Extrakt, die hier auch einzeln getestet wurden, zusätzlich Vitamine und Mineralstoffe vor (Kapitel 2.1.6). Der Inhalt der Kapseln wurde ergänzend als gesamtwirksames Prinzip in einer Konzentration von 600 µg/mL in den

C. elegans-Versuchen getestet, um es mit der Effektivität von 600 µg/mL EtOH20 zu vergleichen. Da diese Konzentration für *B. monnieri* leider zu hoch für die Nematoden war, kann sich nur auf 400 µg/mL des Extraktes bezogen werden. Beim Vergleich ist zu beachten, dass in 600 µg/mL des Kapselinhaltes ca. 340 µg EtOH20 und ca. 105 µg Brahmi-Extrakt enthalten sind (basierend auf Wiegen von Kapselinhalten und der Massenangabe pro Kapsel im Beipackzettel). Obschon der Bacopa-Auszug deutliche antioxidative Effekte in den Würmern zeigte, reichte es beim Kombinationspräparat nicht für eine signifikante Wirkung. In jedem Versuch, der eine potentielle Neuroprotektion untersucht und bei dem *S. scardica* bzw. *B. monnieri* wirksam war, ließ sich auch eine signifikante Wirkung von memoLoges® beobachten. Die erreichten Messwerte von 600 µg/mL des Kapselinhaltes schwankten dabei meist zwischen denen der gleichen Konzentration EtOH20 und 400 µg/mL *B. monnieri*, manchmal waren sie sogar wirksamer. Berücksichtigt man nun den Anteil der beiden Extrakte im Kapselinhalt, spricht dies stark für eine synergistische Wirkung zwischen *Sideritis scardica* und *Bacopa monnieri*. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich das nicht endgültig klären, da nur eine Konzentration einer 3:1-Kombination untersucht wurde, die zudem noch weitere Bestandteile enthält. Um einen potentiellen Synergismus adäquat zu untersuchen, müsste man Kombinationen mit verschiedenen Anteilen, weitere Konzentrationen der individuellen Pflanzenextrakte und sämtliche Vitamine, Mineralstoffe und andere Bestandteile des Kapselinhaltes einzeln testen oder letztere außen vor lassen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass *S. scardica in puncto* neuroprotektive Wirkung im Vergleich mit den ausgewählten, zentral aktiven Extrakten hervorragend abschneidet. Das pharmakologische Profil ähnelt dem des Ginkgo-Spezialextraktes und noch mehr dem von *Bacopa monnieri*, wobei diese Aussage nur in Bezug auf die für die neurodegenerativen Erkrankungen relevanten und untersuchten Pathomechanismen gilt; eine Einbeziehung weiterer zentraler Effekte wie z. B. das „cognitive enhancement“ oder antidepressive Eigenschaften, die für die sowohl der Griechische Bergtee (Kapitel 1.2.3.7 und 1.2.3.8), als auch die oben genannten Pflanzen bekannt sind (Dhingra und Sharma, 2006), war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Im Gegensatz zu EGb 761 haben die *Sideritis*-Extrakte sogar bei Parkinson-assoziierten Störungen eine Wirkung gezeigt, jedoch wiesen sie keine antioxidativen Eigenschaften wie der Brahmi-Extrakt auf. Natürlich muss hier bedacht werden, dass die Referenzextrakte nur in einer einzelnen Konzentration getestet wurden, welche sich nach der Verträglichkeit für die Würmer richtete.

4.6 Einfluss der Bakterien als Futterquelle

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit sollte sein, zu überprüfen, inwiefern die lebenden *E. coli* OP50-Bakterien, die als Futterquelle von *C. elegans* dienen, auf den Extrakt im Medium einwirken, bevor die Würmer ihn überhaupt aufnehmen. Denkbar wäre hier einerseits ein metabolischer Abbau potentieller Wirkstoffe, aber auch eine Aktivierung von Substanzen, die eventuell als Prodrugs vorliegen, wie es z. B. für viele Glykoside beschrieben ist (Kobashi, 1998; Kobashi und Akao, 1997). Um Einblicke in diese Thematik zu erhalten, wurden 2 Herangehensweisen durchgeführt:

Einerseits wurde in diversen *C. elegans*-Versuchen die pharmakologische Wirkung einer bestimmten Konzentration eines *S. scardica*-Extraktes verglichen, die einmal zusammen mit

lebenden und einmal mit durch Hitze abgetöteten Bakterien appliziert wurde. Dies war bei vielen Experimenten schlicht nicht möglich, da v. a. frisch geschlüpfte L1-Larven oft Probleme mit den toten *E. coli* hatten und nicht richtig wuchsen. Wenn es funktionierte, dann bestand zwischen der Wirkung der gewählten Extraktkonzentration mit lebenden und abgetöteten Bakterien entweder kein Unterschied oder die Würmer verhielten sich komplett anders, was am Paralyse-Assay deutlich zu erkennen war. Schon ohne Extraktzugabe zeigten die Würmer, die sich von toten *E. coli* ernähren mussten, einen stark abweichenden Paralyseverlauf (Kapitel 3.7.1.2). Über eine gesteigerte oder verminderte Wirksamkeit der Sideritis-Extrakte konnte so keine einedeutige Aussage gewonnen werden.

Die zweite Herangehensweise war die phytochemische Analyse der Medien, die den Extrakt mit lebenden oder toten Bakterien enthielten. An dieser Stelle wurden auch Wurmlysate bzw. -extrakte hergestellt, um nachzuvollziehen ob und in welchem Umfang die Extraktivstoffe von *C. elegans* aufgenommen werden. Zur Methodik gehörten hier die Messung des Gesamt-Polyphenolgehaltes via Folin-Ciocalteu-Reagenz und eine HPLC-Analyse der phenolischen Leitsubstanzen. Hier zeigte sich eindeutig, dass die Bakterien einen sehr geringen Einfluss auf die Menge der Polyphenole haben, ihn also kaum verstoffwechseln (Kapitel 3.4). Das würde auch die nicht vorhandenen Unterschiede in der pharmakologischen Effektivität der Extrakte mit Lebend- oder Totfutter erklären. Weiterhin wurde klar, dass die Würmer nur einen geringen Anteil der Polyphenole resorbieren, was bei der BV dieser Substanzgruppe logisch erscheint und, behält man die zahlreichen Effekte des Griechischen Bergtees im Hinterkopf, die Aktivität der Extraktivstoffe umso interessanter macht.

Selbstverständlich müssten für eine umfassende Bewertung des metabolischen Einflusses der Bakterien und Würmer ausgedehnte massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden, die den Rahmen dieser Promotionsarbeit gesprengt hätten. Der Metabolismus ist in so gut wie allen wissenschaftlichen Publikationen, die über eine pharmakologische Wirkung in *C. elegans* berichten und besonders, wenn es sich um Pflanzenextrakte handelt, eine riesige Black Box. Das liegt u. a. daran, dass nicht viel über die Verstoffwechslung, gerade von Polyphenolen, in diesem biologischen Testsystem bekannt ist. Nichtsdestotrotz konnte eine grobe Idee gewonnen werden, was mit dem Extrakt passiert. Insgesamt scheint die Idee, die auch viele *C. elegans*-Forscher vertreten, die Würmer mit abgetöteten *E. coli* zu füttern um eine mögliche Veränderung der untersuchten Substanz zu unterbinden zwar logisch, birgt aber viele Stolpersteine und Probleme. Zum Beispiel kann sich das Verhalten der Würmer ändern (siehe oben), was die Machbarkeit vieler Experimente beeinträchtigen kann. Obwohl es Hinweise gibt, dass sowohl polare als auch unpolare Verbindungen von den Fadenwürmern etwas besser in Kombination mit toten *E. coli* aufgenommen werden, als mit lebenden (Zheng *et al.*, 2013), ist die Vergleichbarkeit zu biochemischen Vorgängen im Menschen so jedoch geringer. Denn unsere intestinale Mikroflora besteht zu einem Teil aus *Escherichia coli* und anderen Bakterien, die ebenfalls Prodrugs aktivieren oder Wirkstoffe abbauen können (Adlerberth und Wold, 2009; Clayton *et al.*, 2009; Finegold *et al.*, 1983). Das Verhältnis zwischen Wurm und Mikroben ist außerdem sehr eng und komplex (Cabreiro und Gems, 2013). Forcierte Eingriffe darin wirken sich womöglich multifaktoriell aus und sind dadurch wenig berechenbar. So benötigen die Nematoden für eine funktionierende Verdauung beispielsweise eine bestimmte Partikelgröße (Vanfleteren, 1974). Bei einer Abtötung mit Hitze könnten einige Bakterien platzen, was die mittlere Partikelgröße wiederum verändern würde und damit evtl. auch das Verhalten der

Würmer. Das Implementieren der Verwendung von abgetöteten *E. coli* OP50 in die Versuchsprotokolle ist also kein einfacher Schritt, sondern könnte ein völlig anderes Testsystem hervorrufen, das nicht vergleichbar mit dem bisherigen und auch weiter weg vom Menschen ist.

4.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von hydroethanolischen *Sideritis scardica*-Extrakten bei β -Amyloid-bedingten Störungen in einem weiteren Tiermodell bestätigt sowie zum ersten Mal gezeigt, dass die Auszüge auch die Aggregation bzw. Toxizität von Tau, α -Synuclein und Polyglutamin-Proteinen reduzieren und dopaminerge Nervenzellen vor der neurotoxischen Wirkung von 6-Hydroxydopamin schützen. Das macht Zubereitungen aus dem Griechischen Bergtee interessant für eine präventive oder therapeutische Behandlung von Alzheimer bzw. MCI, Parkinson, Chorea Huntington und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen bzw. Demenz-Formen. Im Kontext zur bestehenden Literatur stehen die Ergebnisse im Einklang mit denen anderer Forscher, bestätigen und erweitern das pharmakologische Profil von *S. scardica*; allein die antioxidativen Eigenschaften, die die Auszüge *in vitro* zeigten, ließen sich *in vivo* nicht nachvollziehen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mittelpolare Auszüge aktiver waren als rein wässrige oder lipophilere und es gelang, die in den Extrakten enthaltenen Phenylethanoid-Glykoside als mindestens wirkungsmittelbestimmende Inhaltsstoffe zu identifizieren. Auch ein Wirkmechanismus, nämlich die direkte Aggregationshemmung von neurotoxischen Proteinen, konnte postuliert werden, welcher weiterer Aufklärung bedarf. Im Vergleich mit etablierten, ZNS-aktiven Extrakten zeigte ein einfacher Auszug aus dem Griechischen Bergtee neben *Bacopa monnieri* eines der größten Wirkungsspektren und benötigte für einen vergleichbaren Effekt oft nur die doppelte Konzentration wie die des in über 20 Schritten hergestellten Ginkgo-Spezialextraktes EGb 761. Neben einer Verifizierung oder Falsifizierung des hypothetischen Wirkmechanismus und einer weiteren Untersuchung potentieller Synergismen der Extraktivstoffe sind v. a. weitere klinische Studien notwendig, um den Wert von *S. scardica*-Extrakten bzw. daraus isolierten Naturstoffen als zukünftiges Medikament bei neurodegenerativen Erkrankungen besser zu bewerten. Zur zentralen Wirkung im Menschen gibt es bereits Resultate, die beispielsweise kognitive Verbesserungen bei der Alzheimer-Vorstufe MCI aufzeigen; bzgl. einer neuroprotektiven Wirksamkeit wären allerdings groß angelegte Studien mit Patienten in unterschiedlichen Stadien wünschenswert, die der Komplexität der neurodegenerativen Krankheiten Rechnung tragen.

Referenzen

- Abbas S, Wink M (2009) Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med* **75**: 216-221.
- Abbas S, Wink M (2010) Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway. *Phytomed* **17**: 902-909.
- Abe T, Tohgi H, Isobe C, Murata T, Sato C (2002) Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **70**: 447-450.
- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I (2009) Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* **12**: 1567-1576.
- Adlerberth I, Wold A (2009) Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* **98**: 229-238.
- Agostinho P, Pliassova A, Oliveira CR, Cunha RA (2015) Localization and trafficking of amyloid- β protein precursor and secretases: impact on Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **45**: 329-347.
- Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Chaturvedi RK, Agrawal AK, Islam F (2005) *Ginkgo biloba* affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem* **93**: 94-104.
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**: 875-877.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) Molecular biology of the cell. 6. Auflage. Garland Science (Taylor & Francis Group), New York.
- Albin RL, Aldridge JW, Young AB, Gilman S (1989) Feline subthalamic nucleus neurons contain glutamate-like but not GABA-like or glycine-like immunoreactivity. *Brain Res* **491**: 185-188.
- Alexander AG, Marfil V, Li C (2014) Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet* **5**: 279.
- Alim MA, Ma QL, Takeda K, Aizawa T, Matsubara M, Asada A, Saito T, Kaji M, Yoshii, M, Hisanaga S (2004) Demonstration of a role for α -synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis* **6**: 435-442.
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI (2014) Verbascoside—A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv* **32**: 1065-1076.
- Alipieva K, Petreska J, Gil-Izquierdo A, Stefova M, Evstatieva L, Bankova V (2010) Influence of the extraction method on the yield of flavonoids and phenolics from *Sideritis* spp. (Pirin Mountain tea). *Nat Prod Comm* **5**: 51-54.

- Alkema MJ, Hunter-Ensor M, Ringstad N, Horvitz HR (2005) Tyramine functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Neuron* **46**: 247-260.
- Allan-Butterfield D (2002) Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* **36**: 1307-1313.
- Alonso AdC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* **2**: 783-787.
- Altun Z, Hall D (2009) Introduction. Wormatlas URL: <http://www.wormatlas.org> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2017).
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medicin* **64**: 146-148.
- Alzheimer's Association (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **11**: 332-384.
- Amadoro G, Corsetti V, Atlante A, Florenzano F, Capsoni S, Bussani R, Mercanti D, Calissano P (2012) Interaction between NH 2-tau fragment and A β in Alzheimer's disease mitochondria contributes to the synaptic deterioration. *Neurobiol Aging* **33**: 833.e1-833.e25.
- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **12**: 413-420.
- Amor S, Peferoen LA, Vogel D, Breur M, Valk P, Baker D, Noort JM (2014) Inflammation in neurodegenerative diseases—an update. *Immunology* **142**: 151-166.
- Andrew R, Watson D, Best S, Midgley J, Wenlong H, Petty R (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res* **18**: 1175-1177.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**: 805-810.
- Assenov G (1978) Morphological characteristics of *Sideritis scardica* Griseb. *Pharmacia* **2**: 29-32.
- Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NME, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* **273**: 12817-12826.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee V, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* **152**: 879-884.
- Bai P, Peng X, Gao L, Huo S, Zhao P, Yan M (2013) Study on protective effect of acteoside on cellular model of Alzheimer's disease induced by okadaic acid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **38**: 1323-1326.
- Baker H, Ridley R, Duchon L, Crow T, Bruton C (1994) Induction of β (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. *Mol Neurobiol* **8**: 25-39.

- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski H (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* **477**: 90-99.
- Bargmann CI (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**: 2028-2033.
- Bargmann CI, Hartweg E, Horvitz HR (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**: 515-527.
- Bargmann CI, Horvitz HR (1991) Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7**: 729-742.
- Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG (1992) Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid β -peptides of Alzheimer's disease: analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* **225**: 1075-1093.
- Bartus RT, Dean R, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**: 408-414.
- Baser K, Kirimer N, Tümen G (1997) Essential oil of *Sideritis scardica* Griseb. subsp. *scardica*. *J Essent Oil Res* **9**: 205-207.
- Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R (2000) The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. *Eur J Neurosci* **12**: 1882-1890.
- Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya A, Cunha IB, Carvalho PO, Eberlin MN (2007) Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* **12**: 423-432.
- Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross CA, Scahill RI, Wetzel R (2015) Huntington's disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**.
- Begley DJ (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* **10**: 1295-1312.
- Behrendt I, Schneider I, Schuchardt JP, Bitterlich N, Hahn A (2016) Effect of an herbal extract of *Sideritis scardica* and B-vitamins on cognitive performance under stress: a pilot study. *Int J Phytomed* **8**: 95-103.
- Bell KF, Zheng L, Fahrenholz F, Cuellar AC (2008) ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging* **29**: 554-565.
- Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Caselli U, Paoloni R, Solazzi M (2002) Chronic administration of EGb 761 modulates synaptic and mitochondrial plasticity in adult vitamin E-deficient rats. *Cellular Mol Biol* **48**: 709-715.
- Beyreuther K, Pollwein P, Multhaup G, Mönning U, König G, Dyrks T, Schubert W, Masters CL (1993) Regulation and expression of the Alzheimer's β /A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **695**: 91-102.
- Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, Wanker EE (2010) EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 7710-7715.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**: 1371-1378.

- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* **5**: 270.
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progr Neurobiol* **65**: 135-172.
- Bojchinov A (1943) Pharmacognostic study of *Sideritis scardica* Griseb. *Aptek Pregled* **9**: 151-158.
- Borah A, Mohanakumar KP (2012) L-DOPA induced-endogenous 6-hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients. *Med Hypotheses* **79**: 271-273.
- Bourdenx M, Koulakiotis NS, Sanoudou D, Bezard E, Dehay B, Tsarbopoulos A (2017) Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progr Neurobiol* **155**: 171-193.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser 396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* **10**: 1089-1099.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Bright J, Hussain S, Dang V, Wright S, Cooper B, Byun T, Ramos C, Singh A, Parry G, Stagliano N (2015) Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* **36**: 693-709.
- Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2010) Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* **59**: 276-289.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267**: 546-554.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the *pars compacta* of the *substantia nigra* by N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci* **80**: 4546-4550.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**: 879-888.
- Byerly L, Cassada R, Russell R (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* **51**: 23-33.
- Cabreiro F, Gems D (2013) Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Mol Med* **5**: 1300-1310.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health 1. *Annu Rev Public Health* **22**: 15-33.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol* **5**: 974-983.

- Carlsson A (1964) Evidence for a role of dopamine in extrapyramidal functions. *J Neural Transm* **26**: 484-493.
- Caruana M, Högen T, Levin J, Hillmer A, Giese A, Vassallo N (2011) Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett* **585**: 1113-1120.
- Cassada RC, Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **46**: 326-342.
- Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, Choi YJ, Byun J, Mook-Jung I (2012) Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLOS ONE* **7**: e34929.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M (2004) α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**: 1167-1169.
- Cheng F, Vivacqua G, Yu S (2011) The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat* **42**: 242-248.
- Choi YB, Kadakkuzha BM, Liu XA, Akhmedov K, Kandel ER, Puthanveetil SV (2014) Huntingtin is critical both pre-and postsynaptically for long-term learning-related synaptic plasticity in Aplysia. *PLOS ONE* **9**: e103004.
- Christen Y (2004) *Ginkgo biloba* and neurodegenerative disorders. *Front Biosci* **9**: 3091-3104.
- Chrubasik S, Wink M (1998) Phytotherapie bei Störungen und Erkrankungen des Nervensystems. M Rheinheimer, Ludwigshafen.
- Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**: 427-446.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**: 672-674.
- Clabough EB (2013) Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. *Yale J Biol Med* **86**: 217-233.
- Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M (2013) Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 9535-9540.
- Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK (2009) Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 14728-14733.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**: 79-84.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313**: 1604-1610.
- Colton CA, Chernyshev ON, Gilbert DL, Vitek MP (2000) Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 292-307.

- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) (2016) (EMA/HMPC/39453/2015: EU herbal monograph on *Sideritis* ssp. herba. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Herbal_monograph/2016/10/WC500215568.pdf (zuletzt aufgerufen am 08.06.2017).
- Cookson MR, van der Brug M (2008) Cell systems and the toxic mechanism (s) of α -synuclein. *Exp Neurol* **209**: 5-11.
- Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small GA, Roses A, Haines J, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**: 921-923.
- Corder E, Saunders A, Risch N, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Rimmler J, Locke P, Conneally P, Schmechel K (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* **7**: 180-184.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M (2015) A Transparent Window into Biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. WormBook URL: <http://www.wormbook.org> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2017).
- Cosentino C, Torres L, Cuba M (1996) Gabapentin for Huntington disease. *J Neurol* **243**: 6-9.
- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem R, Shelanski ML, Nunez J (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 4378-4381.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C (2012) Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat* **33**: 1340-1344.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* **127**: 59-69.
- Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* **9**: 869-877.
- Cummings JL (2000) Cognitive and behavioral heterogeneity in Alzheimer's disease: seeking the neurobiological basis. *Neurobiol Aging* **21**: 845-861.
- Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JNP, Perry VH (2009) Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* **65**: 304-312.
- Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH (2005) Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* **25**: 9275-9284.
- Daigle I, Li CA (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 12045-12049.
- Danesi F, Saha S, Kroon PA, Glibetic M, Konic-Ristic A, D'Antuono LF, Bordoni A (2013) Bioactive-rich *Sideritis scardica* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *J Sci Food Agric* **93**: 3558-3564.
- Darbinyan V, Aslanyan G, Amroyan E, Gabrielyan E, Malmström C, Panossian A (2007) Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression. *Nord J Psychiatry* **61**: 343-348.

- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**: 537-548.
- Dayalu P, Albin RL (2015) Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol Clin* **33**: 101-114.
- De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, Annaert W, Van Broeckhoven C, De Strooper B (2001) Pathogenic APP mutations near the γ -secretase cleavage site differentially affect A β secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet* **10**: 1665-1671.
- del Amo JML, Fink U, Dasari M, Grelle G, Wanker EE, Bieschke J, Reif B (2012) Structural properties of EGCG-induced, nontoxic Alzheimer's disease A β oligomers. *J Mol Biol* **421**: 517-524.
- DeLong M (2000) The basal ganglia. In: Principles of neural science. 5. Auflage. McGraw-Hill, New York.
- Deng M, Ju XD, Fan DS, Tu PF, Zhang J, Shen Y (2008) Verbascoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from MPP⁺-induced apoptosis. *Chin Pharmacol Bullet* **10**: 013.
- Dhingra D, Sharma A (2006) A review on antidepressant plants. *NISCAIR Online NPR* **5**: 144-152.
- Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M, Kyoung M, Südhof TC, Brunger AT (2013) Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife* **2**: e00592.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* **14**: 1075-1081.
- Dimcheva V, Karsheva M (2017) Antioxidant activity and polyphenolic content of the bulgarian wild herb *Cistus incanus* L. stored under different conditions. *J Chem Technol Metall* **52**: 781-790.
- Dimpfel W (2013) Pharmacological classification of herbal extracts by means of comparison to spectral EEG signatures induced by synthetic drugs in the freely moving rat. *J Ethnopharmacol* **149**: 583-589.
- Dimpfel W, Biller A, Suliman S, Dipah GNC (2016a) Psychophysiological effects of a combination of sideritis and bacopa extract (memoLoges®) in 32 subjects suffering from Mild Cognitive Impairment. A double-blind, randomized, placebo-controlled, 2-armed study with parallel design. *Adv Alzheimer Dis* **5**: 103-125.
- Dimpfel W, Feistel B, Schombert L (2016b) Opposite neurophysiological findings induced by *Sideritis scardica* and *Sideritis euboa* extract in the rat. *J Behav Brain Sci* **6**: 448-461.
- Dimpfel W, Schombert L, Biller A (2016c) Psychophysiological effects of Sideritis and Bacopa extract and three combinations thereof—A quantitative EEG study in subjects suffering from Mild Cognitive Impairment (MCI). *Adv Alzheimer Dis* **5**: 1-22.
- Dimpfel W, Schombert L, Feistel B (2016d) *Ex vivo* characterization of the action of Sideritis extract using electrical activity in the rat hippocampus slice preparation. *Pharmacol Pharm* **7**: 407-416.
- Dinamarca M, Cerpa W, Garrido J, Hancke J, Inestrosa N (2006) Hyperforin prevents [beta]-amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid-[beta]-deposits. *Mol Psychiatry* **11**: 1032-1048.

- Dinamarca M, Rios JA, Inestrosa N (2012) Postsynaptic receptors for amyloid- β oligomers as mediators of neuronal damage in Alzheimer's disease. *Front Physiol* **3**: 464.
- Ding H, Johnson GV (2008) The last tangle of tau. *J Alzheimers Dis* **14**: 441-447.
- Dobson H, Milgram B, Schramm E, Koch E (2013) The *Ginkgo biloba* special extract EGb 761® improves behavioral activity and cerebral blood flow in aged Beagle dogs with mild cognitive dysfunction. *Planta Med* **79**: PL20.
- Dominguez JR, Gonzalez T, Palo P, Cuerda-Correa EM (2011) Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs. *Desalination* **269**: 231-238.
- Dordevic S, Blagojevic S, Sekulovic D, Sekesan V, Runjaic-Antic D (1993) The analysis of mineral content in active components and the preparation of phytopreparations for anemia prevention. *Arh Pharm* **43**: 225-231.
- Dostal V, Link CD (2010) Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model. *JoVE*: e2252.
- Drake J, Link CD, Butterfield DA (2003) Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* **24**: 415-420.
- Dutheil F, Jacob A, Dauchy S, Beaune P, Scherrmann JM, Decleves X, Lorient MA (2010) ABC transporters and cytochromes P450 in the human central nervous system: influence on brain pharmacokinetics and contribution to neurodegenerative disorders. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**: 1161-1174.
- Eckert A, Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Müller WE (2005) Stabilization of mitochondrial membrane potential and improvement of neuronal energy metabolism by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Ann N Y Acad Sci* **1056**: 474-485.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr* **38**: 1236-1239.
- Ehrnhoefer DE, Duennwald M, Markovic P, Wacker JL, Engemann S, Roark M, Legleiter J, Marsh JL, Thompson LM, Lindquist S (2006) Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Human Mol Genet* **15**: 2743-2751.
- El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, Freeman MW, Luster AD (2003) CD36 mediates the innate host response to β -amyloid. *J Exp Med* **197**: 1657-1666.
- Emami J (2006) *In vitro-in vivo* correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci* **9**: 169-189.
- Ernst E, Pittler M (1999) *Ginkgo biloba* for dementia. *Clin Drug Investig* **17**: 301-308.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**: 1122-1124.
- Esposito E, Dal Toso R, Pressi G, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S (2010) Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**: 93-105.

- Europäisches Arzneibuch (2017) 9. Auflage. Europarat, Straßburg.
- Evstatieva L (2002) Variation in the flavonoids and tannins content of *S. scardica* Griseb. *Annu Sofia Univ "Kliment Ohridski"* **90**: 99-105.
- Evstatieva L (2011) *Sideritis scardica* Griseb. In: Red Data Book of the Republic of Bulgaria. D Peev. Gemeinschaftsaufgabe der Bulgarian Academy of Sciences & Ministry of Environment and Water of Bulgaria, Sofia.
- Evstatieva L, Bakalova K, Protich N (1990) Ecological and biological peculiarities of *Sideritis scardica* Griseb. *Plant Sci* **27**: 77-80.
- Fehske CJ, Leuner K, Müller WE (2009) *Ginkgo biloba* extract (EGb761®) influences monoaminergic neurotransmission via inhibition of NE uptake, but not MAO activity after chronic treatment. *Pharmacol Res* **60**: 68-73.
- Feistel B (2013) Griechisches Eisenkraut - Mental fit mit Griechischem Bergtee. *Vitalstoffe* **3**: 34-37.
- Feistel B, Appel K (2013) Extrakte aus Griechischem Bergtee hemmen die Wiederaufnahme von Neurotransmittern. *Z Phytother* **34**: P24.
- Fellous A, Francon J, Lennon AM, Nunez J (1977) Microtubule assembly *in vitro*. *FEBS J* **78**: 167-174.
- Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE (1983) Normal indigenous intestinal flora. In: Human intestinal microflora in health and disease. Hentges DJ. 1. Auflage. Academic Press.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
- Flavin WP, Bousset L, Green ZC, Chu Y, Skarpathiotis S, Chaney MJ, Kordower JH, Melki R, Campbell EM (2017) Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol* **134**: 629-653.
- Florez-McClure ML, Hohsfield LA, Fonte G, Bealor MT, Link CD (2007) Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of β -amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy* **3**: 569-580.
- Fontaine SN, Sabbagh JJ, Baker J, Martinez-Licha CR, Darling A, Dickey CA (2015) Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cell Mol Life Sci* **72**: 1863-1879.
- Fonte V, Kipp DR, Yerg J, Merin D, Forrestal M, Wagner E, Roberts CM, Link CD (2008) Suppression of *in vivo* β -amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. *J Biol Chem* **283**: 784-791.
- Furmanowa M, Skopinska-Rozewska E, Rogala E, Hartwich M (1998) *Rhodiola rosea* *in vitro* culture-phytochemical analysis and antioxidant action. *Acta Soc Bot Pol* **67**: 69-73.
- Garai K, Verghese PB, Baban B, Holtzman DM, Frieden C (2014) The binding of apolipoprotein E to oligomers and fibrils of amyloid- β alters the kinetics of amyloid aggregation. *Biochem* **53**: 6323-6331.
- Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H (2006) Mild cognitive impairment. *Lancet* **367**: 1262-1270.

- Gelino S, Chang JT, Kumsta C, She X, Davis A, Nguyen C, Panowski S, Hansen M (2016) Intestinal autophagy improves healthspan and longevity in *C. elegans* during dietary restriction. *PLoS Genet* **12**: e1006135.
- Geng X, Tian X, Tu P, Pu X (2007) Neuroprotective effects of echinacoside in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* **564**: 66-74.
- Georgetown University Medical Center (2017) Agent clears toxic proteins, reduces inflammation and improves cognition in neurodegeneration models. Alzheimer's Association International Conference, London.
- Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M (2015) Invited review: frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol* **41**: 24-46.
- Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VMY (2003) Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* **300**: 636-640.
- Glinka Y, Gassen M, Youdim M (1997) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. In: Advances in research on neurodegeneration. 10. Auflage. Springer, Luxemburg.
- Goedert M, Spillantini M, Jakes R, Rutherford D, Crowther R (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**: 519-526.
- Gonzalez-Burgos E, Carretero ME, Gomez-Serranillos MP (2011) Sideritis spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities-A review. *J Ethnopharmacol* **135**: 209-225.
- Gottlieb S, Ruvkun G (1994) daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **137**: 107-120.
- Greenberg S, Davies P, Schein J, Binder L (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* **267**: 564-569.
- Gregory CD, Devitt A (2004) The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* **113**: 1-14.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 4913-4917.
- Guo H, Hu LM, Wang SX, Wang YL, Shi F, Li H, Liu Y, Kang LY, Gao XM (2011a) Neuroprotective effects of scutellarin against hypoxic-ischemic-induced cerebral injury via augmentation of antioxidant defense capacity. *Chin J Physiol* **54**: 399-405.
- Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, Riddle DM, Kwong LK, Xu Y, Trojanowski JQ (2013) Distinct α -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* **154**: 103-117.
- Guo L, Guan Z, Wang Y (2011b) Scutellarin protects against A β -induced learning and memory deficits in rats: involvement of nicotinic acetylcholine receptors and cholinesterase. *Acta Pharmacol Sin* **32**: 1446-1453.

- Ha SK, Lee P, Park JA, Oh HR, Lee SY, Park JH, Lee EH, Ryu JH, Lee KR, Kim SY (2008) Apigenin inhibits the production of NO and PGE 2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem Int* **52**: 878-886.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* **269**: 17741-17748.
- Hänsel R, Sticher O (2009) Pharmakognosie-Phytopharmazie. 9. Auflage. Springer, Berlin.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184.
- Harman D (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**: 298-300.
- He W, Goodkind D, Kowal P (2016) An aging world: 2015. International population reports. United States Census Bureau und National Institute on Aging (US Department of Health and Human Services).
- Heidler T, Hartwig K, Daniel H, Wenzel U (2010) *Caenorhabditis elegans* lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1. *Biogerontology* **11**: 183-195.
- Heikiila R, Cohen G (1971) Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* **172**: 1257-1258.
- Heitman E, Ingram DK (2017) Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutr Neurosci* **20**: 32-39.
- Henderson ST, Johnson TE (2001) daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11**: 1975-1980.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **14**: 388-405.
- Hermann GJ, Schroeder LK, Hieb CA, Kershner AM, Rabbitts BM, Fonarev P, Grant BD, Priess JR (2005) Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **16**: 3273-3288.
- Herva ME, Zibae S, Fraser G, Barker RA, Goedert M, Spillantini MG (2014) Anti-amyloid compounds inhibit α -synuclein aggregation induced by protein misfolding cyclic amplification (PMCA). *J Biol Chem* **289**: 11897-11905.
- Heywood VH (1972) *Sideritis L.* In: *Flora Europaea*. Tutin T, Burges N, Moore D, Valentine S, Walters S, Webb D. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hobert O (2005) Specification of the nervous system. WormBook URL: <http://www.wormbook.org> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2017).
- Hoffner G, Kahlem P, Djian P (2002) Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with β -tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci* **115**: 941-948.

- Hofrichter J, Krohn M, Schumacher T, Lange C, Feistel B, Walbroel B, Heinze HJ, Crockett S, Sharbel T, Pahnke J (2013) Reduced Alzheimer's disease pathology by St. John's Wort treatment is independent of hyperforin and facilitated by ABCC1 and microglia activation in mice. *Curr Alzheimer Res* **10**: 1057-1069.
- Hofrichter J, Krohn M, Schumacher T, Lange C, Feistel B, Walbroel B, Pahnke J (2016) Sideritis spp. extracts enhance memory and learning in Alzheimer's β -amyloidosis mouse models and aged C57Bl/6 mice. *J Alzheimers Dis* **53**: 967-980.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry V (2009) Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* **73**: 768-774.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **104**: 1433-1439.
- Hornykiewicz O (1962) Dopamin (3-hydroxytyramin) im Zentralnervensystem und seine Beziehung zum Parkinson-Syndrom des Menschen. *Dtsch Med Wochenschr* **87**: 1807-1810.
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE, Evans PD (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**: 1012-1014.
- Howlett DR, George AR, Markwell RE (1999) Common structural features determine the effectiveness of carvedilol, daunomycin and rolitetracycline as inhibitors of Alzheimer β -amyloid fibril formation. *Biochem J* **343**: 419-423.
- Hoyer S (1988) Glucose and related brain metabolism in dementia of Alzheimer type and its morphological significance. *Age* **11**: 158-166.
- Hoyer S (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* **105**: 415-422.
- Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300**: 1142-1145.
- Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E (2000) α -Synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol* **157**: 401-410.
- Hung SK, Perry R, Ernst E (2011) The effectiveness and efficacy of *Rhodiola rosea* L.: a systematic review of randomized clinical trials. *Phytomed* **18**: 235-244.
- Huntington G (1872) On chorea. *Med Surg Rep* **26**: 317.
- Hurtig H, Trojanowski J, Galvin J, Ewbank D, Schmidt M, Lee VY, Clark C, Glosser G, Stern M, Gollomp S (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* **54**: 1916-1921.
- Ignatova Z, Gierasch LM (2006) Extended polyglutamine tracts cause aggregation and structural perturbation of an adjacent β barrel protein. *J Biol Chem* **281**: 12959-12967.
- Inglis P, Ou G, Leroux M, Scholey J (2006) The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. WormBook URL: <http://www.wormbook.org> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2017).
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2010) Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement* **6**: 420-424.

- Ittner LM, Götz J (2011) Amyloid- β and tau—a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **12**: 67-72.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**: 387-397.
- Ivancheva S, Stantcheva B (2000) Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J Ethnopharmacol* **69**: 165-172.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T (2005) Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **96**: 145-150.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* **292**: 1550-1552.
- Jadiya P, Khan A, Sammi SR, Kaur S, Mir SS, Nazir A (2011) Anti-Parkinsonian effects of *Bacopa monnieri*: insights from transgenic and pharmacological *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **413**: 605-610.
- James BD, Wilson RS, Barnes LL, Bennett DA (2011) Late-life social activity and cognitive decline in old age. *J Int Neuropsychol Soc* **17**: 998-1005.
- Jang S, Pae H, Choi B, Oh G, Jeong S, Lee H, Kim H, Kang K, Yun Y, Kim Y (2003) Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* protects neuronal PC12 cells against cytotoxicity induced by amyloid- β . *Immunopharmacol Immunotoxicol* **25**: 295-304.
- Jellinger K, Linert L, Kienzl E, Herlinger E, Youdim M (1995) Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **46**: 297-314.
- Jeremic I, Petrovic D, Zivkovic M, Petricevic S, Tadic V, Petronijevic M, Stanojevic Z, Trajkovic V, Sefik-Bukilica M, Gosic K (2015) AB0092 *Sideritis scardica* extract prevents bone loss in ovariectomized rats. *Ann Rheum Dis* **74**: 921-921.
- Jeremic I, Tadic V, Isakovic A, Trajkovic V, Markovic I, Redzic Z, Isakovic A (2013) The mechanisms of *in vitro* cytotoxicity of Mountain tea, *Sideritis scardica*, against the C6 glioma cell line. *Planta Med* **79**: 1516-1524.
- Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T (2005a) Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ* **12**: 19-24.
- Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran-Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R (2011) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol Pharm* **9**: 708-717.
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Rad Biol Med* **52**: 1-6.
- Kanaan NM, Morfini GA, LaPointe NE, Piginio GF, Patterson KR, Song Y, Andreadis A, Fu Y, Brady ST, Binder LI (2011) Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci* **31**: 9858-9868.

- Kang SS, Lee JY, Choi YK, Kim GS, Han BH (2004) Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 2261-2264.
- Karapandzova M, Qazimi B, Stefkov G, Baceva K, Stafilov T, Panovska TK, Kulevanova S (2013) Chemical characterization, mineral content and radical scavenging activity of *Sideritis scardica* and *S. raeseri* from R. Macedonia and R. Albania. *Nat Prod Comm* **8**: 639-644.
- Kaschel R (2009) *Ginkgo biloba*: specificity of neuropsychological improvement—a selective review in search of differential effects. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* **24**: 345-370.
- Katsube T, Tsurunaga Y, Sugiyama M, Furuno T, Yamasaki Y (2009) Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem* **113**: 964-969.
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* **279**: 46363-46366.
- Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H (2008) Antioxidant activity of some common plants. *Turkish J Biol* **32**: 51-55.
- Kiasalari Z, Baluchnejadmojarad T, Roghani M (2016) *Hypericum perforatum* hydroalcoholic extract mitigates motor dysfunction and is neuroprotective in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol* **36**: 521-530.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 6382-6387.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277**: 942-946.
- Klass MR (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* **6**: 413-429.
- Knörle R (2012) Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *J Neural Transm* **119**: 1477-1482.
- Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 384-396.
- Kobashi K (1998) Glycosides are natural prodrugs—Evidences using germ-free and gnotobiotic rats associated with a human intestinal bacterium. *J Trad Med* **15**: 1-13.
- Kobashi K, Akao T (1997) Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides. *Biosci Microflora* **16**: 1-7.
- Kobayashi S, Higashimura H (2003) Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progr Polym Sci* **28**: 1015-1048.
- Kögel D, Deller T, Behl C (2012) Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp Brain Res* **217**: 471-479.
- Kokhan V, Afanasyeva M, Van'kin G (2012) α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav Brain Res* **231**: 226-230.

- Kokkalou E (1987) Constituents of *Sideritis scardica* ssp. *scardica* that are extractable with water vapor. *Plantae Medicinales et Phytotherapie* **21**: 262-266.
- Koleva I, Linssen JPH, van Beek TA, Evstatieva LN, Kortenska V, Handjieva N (2003) Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *J Sci Food Agric* **83**: 809-819.
- Kongkeaw C, Dilokthornsakul P, Thanarangsarit P, Limpeanchob N, Scholfield CN (2014) Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *J Ethnopharmacol* **151**: 528-535.
- Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* **269**: 17386-17389.
- Koo KA, Sung SH, Park JH, Kim SH, Lee KY, Kim YC (2005) *In vitro* neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma*. *Planta Med* **71**: 778-780.
- Kostadinova E, Alipieva K, Stefova M, Antonova D, Evstatieva L, Stefkov G, Tsvetkova I, Naydenski H, Bankova V (2008) Influence of cultivation on the chemical composition and antimicrobial activity of *Sideritis* spp. *Pharmacogn Mag* **4**: 102-106.
- Kostadinova E, Nikolova D, Alipieva K, Stefova M, Stefkov G, Evstatieva L, Matevski V, Bankova V (2007) Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Nat Prod Res* **21**: 819-823.
- Kostrzewa RM, Jacobowitz DM (1974) Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* **26**: 199-288.
- Kraemer-Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W (1998) Solid-phase extraction (SPE)—a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var. Nero. *J Sci Food Agric* **78**: 435-440.
- Kurisu M, Miyamae Y, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie K, Shigemori H (2013) Inhibition of amyloid β aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 1329-1332.
- Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim HC, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY (2010) Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur J Pharmacol* **649**: 210-217.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **27**: 796-807.
- Lambert MP, Barlow A, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan T, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6448-6453.
- Langner A, Borchert H, Mehnert W (2010) Biopharmazie. 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Larson M, Sherman MA, Amar F, Nuvolone M, Schneider JA, Bennett DA, Aguzzi A, Lesne SE (2012) The complex PrPc-Fyn couples human oligomeric A β with pathological Tau changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **32**: 16857-16871.

- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kayed R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* **6**: 39.
- Latchoumycandane C, Anantharam V, Jin H, Kanthasamy A (2011) Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *Toxicol Appl Pharmacol* **256**: 314-323.
- Le Bourvellec C, Renard C (2012) Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr* **52**: 213-248.
- Lee CD, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* **117**: 949-960.
- Lee KY, Jeong EJ, Lee HS, Kim YC (2006) Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments. *Biol Pharm Bullet* **29**: 71-74.
- Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH (2008) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid- β assemblies have intact memory function. *Neuroscience* **151**: 745-749.
- Lezi E, Swerdlow RH (2012) Mitochondria in neurodegeneration. In: Advances in mitochondrial medicine. 1. Auflage. Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R. Springer, Luxemburg.
- Li J, Le W (2013) Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Neurol* **250**: 94-103.
- Li Y, Shi W, Li Y, Zhou Y, Hu X, Song C, Ma H, Wang C, Li Y (2008) Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol* **26**: 13-21.
- Lichtenthaler SF (2011) Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* **116**: 10-21.
- Lim T (2014) *Sideritis scardica*. In: Edible medicinal and non medicinal plants. 1. Auflage. Springer, Luxemburg.
- Limpeanchob N, Jaipan S, Rattanakaruna S, Phrompittayarat W, Ingkaninan K (2008) Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J Ethnopharmacol* **120**: 112-117.
- Lin H, Bhatia R, Lal R (2001) Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* **15**: 2433-2444.
- Lin J, Gao L, Huo S, Peng X, Wu P, Cai L, Yan M (2012) Effect of acteoside on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. *Zhongguo Zhong yao za zhi* **37**: 2956-2959.
- Lindroth R, Pajutee M (1987) Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts. *Oecologia* **74**: 144-148.
- Link CD, Taft A, Kapulkin V, Duke K, Kim S, Fei Q, Wood DE, Sahagan BG (2003) Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging* **24**: 397-413.
- Liu G, Rogers J, Murphy CT, Rongo C (2011) EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *EMBO J* **30**: 2990-3003.

- Lovestone S, Reynolds C (1997) The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* **78**: 309-324.
- Luo Y (2003) Contemporary neuroscience meets traditional medicine-towards understanding *Ginkgo biloba* neuroprotection. *Curr Top Nutraceut Res* **1**: 49-58.
- Luo Y (2006) Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and *Ginkgo biloba* leaf extract. *Life Sci* **78**: 2066-2072.
- Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, Khachaturian AS, Trzepacz P, Amatniek J, Cedarbaum J, Brashear R, Miller DS (2011) Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**: 532-539.
- Ma L, Wang J, Li Y (2015) Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clin Chim Acta* **444**: 18-23.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* **54**: 197-201.
- Maguire-Zeiss KA (2008) α -Synuclein: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Pharmacol Res* **58**: 271-280.
- Maier W, Barnikol U (2014) Neurokognitive Störungen im DSM-5. *Nervenarzt* **85**: 564-570.
- Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y, Ewbank JJ (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol* **12**: 1209-1214.
- Markesbery W, Lovell M (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**: 33-36.
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* **136**: 1128-1138.
- Matsunaga S, Kishi T, Iwata N (2015) Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *PLOS One* **10**: e0123289.
- Matthews D (1975) Intestinal absorption of peptides. *Physiol Rev* **55**: 537-608.
- Mayeux R, Stern Y (2012) Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006239.
- Mennini T, Gobbi M (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci* **75**: 1021-1027.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul S, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 12683-12688.
- Mihaylova DS, Anna L, Albert KI (2014) A study on the antioxidant and antimicrobial activities of pressurized-liquid extracts of *Clinopodium vulgare* and *Sideritis scardica*. *Agro Food Ind Hi Tech* **25**: 55-59.
- Mikami Y, Yamazawa T (2015) Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci* **139**: 69-74.
- Mikulca J, Nguyen V, Gajdosik D, Teklu S, Giunta E, Lessa E, Tran C, Terak E, Raffa R (2014) Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther* **39**: 25-37.

- Milbury PE, Kalt W (2010) Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood–brain barrier. *J Agric Food Chem* **58**: 3950-3956.
- Miller WC, DeLong MR (1987) Altered tonic activity of neurons in the *globus pallidus* and subthalamic nucleus in the primate MPTP model of parkinsonism. In: The basal ganglia II. Springer, Luxemburg.
- Miners JS, Barua N, Kehoe PG, Gill S, Love S (2011) A β -degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**: 944-959.
- Miyamae Y, Kurisu M, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie K, Shigemori H (2012) Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β -protein. *Bioorg Med Chem* **20**: 5844-5849.
- Morales R, Duran-Aniotz CA, Soto C (2012) Role of prion protein oligomers in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies. In: Non-fibrillar amyloidogenic protein assemblies–Common cytotoxins underlying degenerative diseases. Rahimi F, Bitan G. 1. Auflage. Springer, Luxemburg.
- Morselli E, Maiuri M, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik S, Vitale I (2010) Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis* **1**: e10.
- Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA (2006) Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp Gerontol* **41**: 928-934.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet* **1**: 345-347.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**: 277-283.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer–Korting M (2008) Arzneimittelwirkungen–Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Nance M, Mathias-Hagen V, Breningstall G, Wick MJ, McGlennen R (1999) Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* **52**: 392-392.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**: 811-823.
- Nass R, Hall DH, Miller DM, Blakely RD (2002) Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3264-3269.
- Nathan PJ (2001) *Hypericum perforatum* (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. *J Psychopharmacol* **15**: 47-54.
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kron PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* **42**: 29-42.
- Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M (2016) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* **53**: 4094-4125.

- Nikolov S (2006) Encyclopedia of the medicinal plants in Bulgaria. Publishing House "Trud", Sofia.
- Nöldner M, Schötz K (2002) Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med* **68**: 577-580.
- Norris EH, Giasson BI, Lee VMY (2004) α -Synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* **60**: 17-54.
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mut* **31**: 763-780.
- O'Reilly LP, Luke CJ, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC (2014) *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliver Rev* **69**: 247-253.
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**: 994-999.
- Olsson E, von Scheele B, Panossian A (2009) A randomized double-blind placebo controlled parallel group study of SHR-5 extract of *Rhodiola rosea* roots as treatment for patients with stress related fatigue. *Planta Med* **75**: 105-112.
- Pahnke J, Walker LC, Scheffler K, Krohn M (2009) Alzheimer's disease and blood-brain barrier function—Why have anti- β -amyloid therapies failed to prevent dementia progression? *Neurosci Biobehav Rev* **33**: 1099-1108.
- Palhano FL, Lee J, Grimster NP, Kelly JW (2013) Toward the molecular mechanism (s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* **135**: 7503-7510.
- Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* **34**: 11117-11127.
- Panossian A, Wikman G, Sarris J (2010) Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomed* **17**: 481-493.
- Panowski SH, Wolff S, Aguilaniu H, Durieux J, Dillin A (2007) PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* **447**: 550-555.
- Papatheodorou I, Petrovs R, Thornton JM (2014) Comparison of the mammalian insulin signalling pathway to invertebrates in the context of FOXO-mediated ageing. *Bioinformatics* **30**: 2999-3003.
- Parkinson J (1817) An essay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland, London.
- Pase MP, Kean J, Sarris J, Neale C, Scholey AB, Stough C (2012) The cognitive-enhancing effects of *Bacopa monnieri*: a systematic review of randomized, controlled human clinical trials. *J Altern Complement Med* **18**: 647-652.
- Patil SP, Jain PD, Sancheti JS, Ghumatkar PJ, Tambe R, Sathaye S (2014) Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacol* **86**: 192-202.
- Peña-Casanova J, Sanchez-Benavides G, de Sola S, Manero-Borras RM, Casals-Coll M (2012) Neuropsychology of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **43**: 686-693.
- Penney JB, Vonsattel JP, Macdonald ME, Gusella JF, Myers RH (1997) CAG repeat number governs the development rate of pathology in Huntington's disease. *Ann Neurol* **41**: 689-692.

- Perry EK, Perry R, Blessed G, Tomlinson B (1978) Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* **4**: 273-277.
- Perry VH, Holmes C (2014) Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10**, 217-224.
- Perumal AS, Tordzro WK, Katz M, Jackson-Lewis V, Cooper TB, Fahn S, Cadet JL (1989) Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Res* **504**: 139-141.
- Petreska J, Stefkov G, Kulevanova S, Alipieva K, Bankova V, Stefova M (2011a) Phenolic compounds of Mountain tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and content. *Nat Prod Comm* **6**: 21-30.
- Petreska J, Stefova M, Ferreres F, Moreno DA, Tomas-Barberan FA, Stefkov G, Kulevanova S, Gil-Izquierdo A (2011b) Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal "Mountain tea". *Food Chem* **125**: 13-20.
- Petreska J, Stefova M (2013) Assay of urinary excretion of polyphenols after ingestion of a cup of mountain tea (*Sideritis scardica*) measured by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem* **61**: 10488-10497.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS* **4**: 89-96.
- Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Stürzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CE (2011) Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* **12**: 329-347.
- Porat Y, Abramowitz A, Gazit E (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **67**: 27-37.
- Pountney DL, Voelcker NH, Gai WP (2005) Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. Hypothesis. *Neurotox Res* **7**: 59-67.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* **26**: 7212-7221.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M (2015) World Alzheimer Report. Alzheimer's Disease International, London.
- Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* **27**: 1083-1091.
- Proestos C, Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ (2013) Determination of plant bioactive compounds. Antioxidant capacity and antimicrobial screening. *FMFI* **2**: 26-35.
- Pugazhenth S, Qin L, Reddy PH (2017) Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Bas Dis* **1863**: 1037-1045.
- Qazimi B, Karapandzova M, Stefkov G, Kulevanova S (2010) Chemical composition of ultrasonic-assisted n-hexane extracts of *Sideritis scardica* Grieseb. and *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) from Macedonia and Albania. *Maced Pharm Bull* **56**: 45-56.

- Qiao Y, Zhao Y, Wu Q, Sun L, Ruan Q, Chen Y, Wang M, Duan J, Wang D (2014) Full toxicity assessment of Genkwa flos and the underlying mechanism in nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLOS One* **9**: e91825.
- Quintanilla RA, von Bernhardi R, Godoy JA, Inestrosa NC, Johnson GV (2014) Phosphorylated tau potentiates A β -induced mitochondrial damage in mature neurons. *Neurobiol Dis* **71**: 260-269.
- Ray C, McKerrow JH (1992) Gut-specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene. *Mol Biochem Parasitol* **51**: 239-249.
- Rekas A, Adda CG, Aquilina JA, Barnham KJ, Sunde M, Galatis D, Williamson NA, Masters CL, Anders RF, Robinson CV (2004) Interaction of the molecular chaperone α B-crystallin with α -synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity. *J Mol Biol* **340**: 1167-1183.
- Richardson CE, Kooistra T, Kim DH (2010) An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*. *Nature* **463**: 1092-1095.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M (2007) The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain APP α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* **27**: 7817-7826.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**: 750-754.
- Roberts CJ (2007) Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnol Bioeng* **98**: 927-938.
- Rosas HD, Koroshetz WJ, Jenkins BG, Chen Y, Hayden DL, Beal MF, Cudkowicz ME (1999) Riluzole therapy in Huntington's disease (HD). *Mov Disord* **14**: 326-330.
- Ross CA, Pickart CM (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* **14**: 703-711.
- Rote Liste - Arzneimittelinformationen für Deutschland (2017) Rote Liste Service GmbH.
- Rubinsztein DC, Carmichael J (2003) Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Med* **5**: 1-21.
- Ruiperez V, Darios F, Davletov B (2010) Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res* **49**: 420-428.
- Rusanen M, Rovio S, Ngandu T, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M (2010) Midlife smoking, apolipoprotein E and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based cardiovascular risk factors, aging and dementia study. *Dement Geriatr Cogn Disord* **30**: 277-284.
- Russo A, Borrelli F (2005) *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedi* **12**: 305-317.
- Sadri-Vakili G, Jang-Ho JC (2006) Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease. *Nat Rev Neurol* **2**: 330-338.
- Sahara N, Maeda S, Yoshiike Y, Mizoroki T, Yamashita S, Murayama M, Park JM, Saito Y, Murayama S, Takashima A (2007) Molecular chaperone-mediated tau protein metabolism counteracts the formation of granular tau oligomers in human brain. *J Neurosci Res* **85**: 3098-3108.

- Salmaki Y, Zarre S, Ryding O, Lindqvist C, Bräuchler C, Heubl G, Barber J, Bendiksby M (2013) Molecular phylogeny of tribe Stachydeae (Lamiaceae subfamily Lamioideae). *Mol Phylogenet Evol* **69**: 535-551.
- Sawada M, Imamura K, Nagatsu T (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis Disorder* **70**: 373-381.
- Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* **26**: 619-631.
- Scheen AC, Bendiksby M, Ryding O, Mathiesen C, Albert VA, Lindqvist C (2010) Molecular phylogenetics, character evolution, and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae) 1. *Ann Missouri Bot Gard* **97**: 191-217.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* **97**: 2517.
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* **318**: 215-224.
- Schriner SE, Lee K, Truong S, Salvadora KT, Maler S, Nam A, Lee T, Jafari M (2013) Extension of *Drosophila* lifespan by *Rhodiola rosea* through a mechanism independent from dietary restriction. *PLOS ONE* **8**: e63886.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**: 595-608.
- Serpionov GV, Alexandrov AI, Ter-Avanesyan MD (2017) Distinct mechanisms of mutant huntingtin toxicity in different yeast strains. *Yeast Res* **17**: fow102.
- Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y (2016) The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**: 50-56.
- Seward ME, Swanson E, Norambuena A, Reimann A, Cochran JN, Li R, Roberson ED, Bloom GS (2013) Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* **126**: 1278-1286.
- Shadel GS, Horvath TL (2015) Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* **163**: 560-569.
- Shah R (2013) The role of nutrition and diet in Alzheimer disease: a systematic review. *J Am Med Dir Assoc* **14**: 398-402.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* **106**: 45-55.
- Sheng GQ, Zhang JR, Pu XP, Ma J, Li CL (2002) Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* **451**: 119-124.
- Shiao YJ, Su MH, Lin HC, Wu CR (2017) Echinacoside ameliorates memory impairment and cholinergic deficit induced by amyloid beta peptide via inhibiting amyloid deposition and toxicology. *Food Funct* **8**: 2283-2294.

- Shvadchak VV, Yushchenko DA, Pievo R, Jovin TM (2011) The mode of α -synuclein binding to membranes depends on lipid composition and lipid to protein ratio. *FEBS Lett* **585**: 3513-3519.
- Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn PY (1996) Nature of polyphenol– protein interactions. *J Agric Food Chem* **44**: 80-85.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *FEBS J* **215**: 213-219.
- Silva BA, Dias AC, Ferreres F, Malva JO, Oliveira CR (2004) Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on β -amyloid-induced neurotoxicity. *Neurotox Res* **6**: 119-130.
- Silva BA, Malva JO, Dias AC (2008) St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several *in vitro* models of oxidative stress. *Food Chem* **110**: 611-619.
- Silvestroni A, Faull RL, Strand AD, Möller T (2009) Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport* **20**: 1098-1103.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* **56**: 4855-4873.
- Singleton A, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R (2003) α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**: 841-841.
- Smith C, Carney JM, Starke-Reed P, Oliver C, Stadtman E, Floyd R, Markesbery W (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 10540-10543.
- Snowdon DA (2003) Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Ann Intern Med* **139**: 450-454.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. *PLOS ONE* **5**: e9505.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6469-6473.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) [alpha]-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**: 839-840.
- Stark M, Behl C (2014) The *Ginkgo biloba* extract Egb 761 modulates proteasome activity and polyglutamine protein aggregation. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**: 940186.
- Stefani M, Dobson C (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* **81**: 678-699.
- Stiernagle T (1999) Maintenance of *C. elegans*. In: *C. elegans: A practical approach*. Hope IA. 1. Auflage. The Practical Approach Series, Oxford.
- Stöhr J, Condello C, Watts JC, Bloch L, Oehler A, Nick M, DeArmond SJ, Giles K, DeGrado WF, Prusiner SB (2014) Distinct synthetic A β prion strains producing different amyloid deposits in bigenic mice. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 10329-10334.

- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H (1998) Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* **19**: 1771-1776.
- Sulston J, Dew M, Brenner S (1975) Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Compar Neurol* **163**: 215-226.
- Sydow A, van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, Petrova O, Drexler D, Zhou L, Rune G, Mandelkow E (2011) Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic tau mutant. *J Neurosci* **31**: 2511-2525.
- Tadic V, Bojovic D, Arsic I, Dordevic S, Aksentijevic K, Stamenic M, Jankovic S (2012) Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae extracts. *Molecules* **17**: 2683-2703.
- Tadic V, Dordjevic, S, Arsic I, Dobric S, Milenkovic M, Antic-Stankovic J (2007) Anti-inflammatory and antimicrobial activity of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Med* **73**: P098.
- Tadic V, Dordjevic S, Arsic I, Nikolic K, Gligorijevic N, Radulovic S, Markovic G (2008) Cytotoxic activity and antioxidative properties of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Med* **74**: PA206.
- Tadic V, Markovic G, Jeremic I, Isakovic A, Markovic I, Bumbasirevic V, Dordjevic S, Arsic I (2009) Antiglioma action of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Med* **75**: PE67.
- Tadic VM, Jeremic I, Dobric S, Isakovic A, Markovic I, Trajkovic V, Bojovic D, Arsic I (2012) Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Med* **78**: 415-427.
- Tan MS, Yu JT, Tan CC, Wang HF, Meng XF, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Tan L (2015) Efficacy and adverse effects of *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* **43**: 589-603.
- Tao K, Wang B, Feng D, Zhang W, Lu F, Lai J, Huang L, Nie T, Yang Q (2016) Salidroside protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by attenuating ER stress. *Neurosci Bullet* **32**: 61-69.
- Taskova R, Mitova M, Evstatieva L, Ancev M, Peev D, Handjieva N, Bankova V, Popov S (1997) Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae and Rubiaceae. *Bocconea* **5**: 631-636.
- Terwel D, Muylleert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, van Leuven F (2008) Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol* **172**: 786-798.
- The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.
- Todorova M, Trendafilova A (2014) *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *J Ethnopharmacol* **152**: 256-265.
- Todorova MN, Christov RC (2000) Essential oil composition of three *Sideritis* species from Bulgaria. *J Ess Oil Res* **12**: 418-420.
- Toscano G, Colarieti ML, Greco G (2003) Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme Microb Technol* **33**: 47-54.

- Trendafilova AB, Todorova MN, Evstatieva LN, Antonova DV (2013) Variability in the essential-oil composition of *Sideritis scardica* Griseb. from native Bulgarian populations. *Chem Biodivers* **10**: 484-492.
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee V (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* **37**: 209-215.
- Tsivgoulis G, Alexandrov A, Wadley V, Unverzagt F, Go R, Moy C, Kissela B, Howard G (2009) Association of higher diastolic blood pressure levels with cognitive impairment. *Neurology* **73**: 589-595.
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 777-788.
- Uabundit N, Wattanathorn J, Mucimapura S, Ingkaninan K (2010) Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J Ethnopharmacol* **127**: 26-31.
- Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM (2012) Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* **15**: 1227-1235.
- Unsoeld T, Park JO, Hutter H (2013) Discoidin domain receptors guide axons along longitudinal tracts in *C. elegans*. *Develop Biol* **374**: 142-152.
- van Raamsdonk JM, Vega IE, Brundin P (2017) Oxidative stress in neurodegenerative disease: causation or association? *Oncotarget* **8**: 10777-10778.
- van Wyk BE, Wink C, Wink M (2016) Handbuch der Arzneipflanzen: Ein Bildatlas. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Vanfleteren JR (1974) Nematode growth factor. *Nature* **248**: 255-257.
- Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF (2014) Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem* **130**: 4-28.
- Venturella P, Bellino A (1979) Isolation and partial synthesis of ent-18-acetoxycyclohex-16-ene-3 β ,7 α ,15 β -triol from *Sideritis scardica*. *Phytochem* **18**: 1571-1572.
- Vieira PMS (2011) *Hypericum perforatum* phenolic compounds: protective role in the toxicity induced by heterologous expression of α -synuclein and huntingtin in yeast cells. Masterthesis.
- von Ockham W (1984) Summe der Logik. Deutsche Übersetzung der *Summa logicae* aus dem 14. Jh. durch Kunze P, Hamburg.
- Vos MJ, Zijlstra MP, Kanon B, van Waarde-Verhagen MA, Brunt ER, Oosterveld-Hut HM, Carra S, Sibon OC, Kampinga HH (2010) HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Hum Mol Genet* **19**: 4677-4693.
- Walker FO (2007) Huntington's disease. *Lancet* **369**: 218-228.
- Wang H, Xu Y, Yan J, Zhao X, Sun X, Zhang Y, Guo J, Zhu C (2009) Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. *Brain Res* **1283**: 139-147.

- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* **25**: 59-68.
- Wang S, He H, Chen L, Zhang W, Zhang X, Chen J (2015) Protective effects of salidroside in the MPTP/MPP⁺-induced model of Parkinson's disease through ROS–NO-related mitochondrion pathway. *Mol Neurobiol* **51**: 718-728.
- Wang S, Wang H, Guo H, Kang L, Gao X, Hu L (2011) Neuroprotection of scutellarin is mediated by inhibition of microglial inflammatory activation. *Neuroscience* **185**: 150-160.
- Wang YH, Xuan ZH, Tian S, Du GH (2015) Echinacoside protects against 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial dysfunction and inflammatory responses in PC12 cells via reducing ROS production. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**: 189239.
- Watzl B, Leitzmann C (2005) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: the mind of a worm. *Phil Trans R Soc Lond* **314**: 1-340.
- World Health Organization (WHO) Mombour W, Schmidt M (2013) Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10 Kapitel V (F) Klinisch-diagnostische Leitlinien. Huber H, Bern.
- Wiegant F, Surinova S, Ytsma E, Langelaar-Makkinje M, Wikman G, Post J (2009) Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology* **10**: 27-42.
- Wilhelmus MM, de Waal RM, Verbeek MM (2007) Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **35**: 203-216.
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S (2011) *In vivo* demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 4194-4199.
- Wobst HJ, Sharma A, Diamond MI, Wanker EE, Bieschke J (2015) The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Lett* **589**: 77-83.
- Wojtecki L, Groiss SJ, Hartmann CJ, Elben S, Omlor S, Schnitzler A, Vesper J (2016) Deep brain stimulation in Huntington's disease—preliminary evidence on pathophysiology, efficacy and safety. *Brain Sci* **6**: 38.
- Wright EM, Martin MG, Turk E (2003) Intestinal absorption in health and disease—sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**: 943-956.
- Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Link CD, Luo Y (2006) Amyloid- β -induced pathological behaviors are suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **26**: 13102-13113.
- Xiao L, Li H, Zhang J, Yang F, Huang A, Deng J, Liang M, Ma F, Hu M, Huang Z (2014) Salidroside protects *Caenorhabditis elegans* neurons from polyglutamine-mediated toxicity by reducing oxidative stress. *Molecules* **19**: 7757-7769.
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* **8**: 600-606.

- Yaffe K (2007) Metabolic syndrome and cognitive decline. *Curr Alzheimer Res* **4**: 123-126.
- Yan X, Chen T, Zhang L, Du H (2017) Protective effects of forsythoside A on amyloid beta-induced apoptosis in PC12 cells by downregulating acetylcholinesterase. *Eur J Pharmacol* **810**: 141-148.
- Yokota O, Terada S, Ishizu H, Ujike H, Ishihara T, Nakashima H, Yasuda M, Kitamura Y, Ueda K, Checler F (2002) NACP/ α -Synuclein, NAC, and β -amyloid pathology of familial Alzheimer's disease with the E184D presenilin-1 mutation: a clinicopathological study of two autopsy cases. *Acta Neuropathol* **104**: 637-648.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. *J Neurochem* **85**: 180-192.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ (2004a) Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Rad Biol Med* **36**: 592-604.
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004b) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Rad Biol Med* **37**: 1683-1693.
- Yu W, Polepalli J, Wagh D, Rajadas J, Malenka R, Lu B (2011) A critical role for the PAR-1/MARK-tau axis in mediating the toxic effects of A β on synapses and dendritic spines. *Hum Mol Genet* **21**: 1384-1390.
- Yun JY, Lee WW, Lee JY, Kim HJ, Park SS, Jeon BS (2010) SNCA variants and multiple system atrophy. *Ann Neurol* **67**: 554-555.
- Zakzanis KK (1998) The subcortical dementia of Huntington's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* **20**: 565-578.
- Zarkovic BD, Blagojevic S (1993) Comparison of the mineral composition of the plant *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae and corresponding soil substrate. *Arhiv Farmaciju* **43**: 233-237.
- Zempel H, Mandelkow EM (2012) Linking amyloid- β and tau: amyloid- β induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegener Dis* **10**: 64-72.
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2010) A β oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous tau into dendrites, tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* **30**: 11938-11950.
- Zhang D, Li H, Wang JB (2015a) Echinacoside inhibits amyloid fibrillization of HEWL and protects against A β -induced neurotoxicity. *Int J Biol Macromolec* **72**: 243-253.
- Zhang H, Pan N, Xiong S, Zou S, Li H, Xiao L, Cao Z, Tunnacliffe A, Huang Z (2012) Inhibition of polyglutamine-mediated proteotoxicity by *Astragalus membranaceus* polysaccharide through the DAF-16/FOXO transcription factor in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* **441**: 417-424.
- Zhang L, Yu H, Zhao X, Lin X, Tan C, Cao G, Wang Z (2010) Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* **57**: 547-555.
- Zhang S, Shao SY, Song XY, Xia CY, Yang YN, Zhang PC, Chen NH (2016) Protective effects of *Forsythia suspense* extract with antioxidant and anti-inflammatory properties in a model of rotenone induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* **52**: 72-83.

- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**, 3.
- Zhang Y, Liu Y (2005) Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong yao cai* **28**: 794-796.
- Zhang Y, Mair WB (2017) Dietary restriction in *C. elegans*. In: Ageing: Lessons from *C. elegans*. Olson A, Gill MS. 1. Auflage. Springer, Luxemburg.
- Zhang Z, Kang SS, Liu X, Ahn EH, Zhang Z, He L, Iuvone PM, Duong DM, Seyfried NT, Benskey MJ (2017) Asparagine endopeptidase cleaves α -synuclein and mediates pathologic activities in Parkinson's disease. *Nat Struct Mol Biol* **24**: 632-642.
- Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Duong DM, Seyfried NT, Cao X, Cheng L, Sun YE, Yu SP (2015b) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun* **6**: 8762.
- Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon IS, Duong DM, Seyfried NT, Hu WT, Liu Z, Wang JZ (2014) Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat Med* **20**: 1254-1262.
- Zhao L, Wang JL, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L (2013) Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules* **18**: 9949-9965.
- Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2009) Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric A β . *J Biol Chem* **284**: 18742-18753.
- Zheng SQ, Ding AJ, Li GP, Wu GS, Luo HR (2013) Drug absorption efficiency in *Caenorhabditis elegans* delivered by different methods. *PLOS ONE* **8**: e56877.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**: 493-498.