

SCREENING UND CHARAKTERISIERUNG VON
ANTI- β -HERPESVIRUS-AKTIVITÄTEN
IN SUBSTANZEN AUS
PHOTOTROPHEN, AQUATISCHEN
MIKROORGANISMEN

Vorgelegt von
STEFANIE THULKE
Aus Berlin

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

Genehmigte Dissertation

Berlin 2007

D83

Tag der Disputation: 27. November 2007

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Siegert

An dieser Stelle danke ich...

- ...Prof. Dr. Wolfgang Siegert für die Ermöglichung, den Ansporn und die nachhaltige Unterstützung dieser Arbeit sowie ferner für die wertvollen Ratschläge, die nahezu väterliche Führung unserer besonders kollegialen Arbeitsgruppe und sein Vertrauen in unsere Selbständigkeit.
- ...Prof. Dr. Roland Lauster für das Interesse und die Betreuung der Arbeit sowie die regelmäßige Aufmunterung zur Fertigstellung dieser Dissertation.
- ...Dr. Tanja König selbstverständlich für die Idee zu diesem Projekt, gerne für das permanente und bohrende Hinterfragen der Korrektheit und Glaubwürdigkeit meiner Ergebnisse und vor allem für die freundschaftliche Zusammenarbeit.
- ...Aleksandar Radonić natürlich für die fachlichen Diskussionen, aber hauptsächlich für unsere vielen persönlichen Gespräche und seine uneingeschränkte Kollegialität.
- ...Prof. Dr. Rainer Buchholz und insbesondere seinen Mitarbeitern Dr. Christian Walter und Ivonne Naumann für die erhebliche Unterstützung und ausgezeichnete, freundschaftliche Kooperation in allen Phasen des Projekts.
- ...unseren fleißigen Lieschen Anke Kmetsch und vor allem Delia Barz für den frischen Wind im Labor, die unzählbaren pipettierten und mikroskopierten 96-Well Platten und nicht zu vergessen unsere „lustigen Freitage.“
- ...Prof. Dr. Kurt Possinger insbesondere für den Rückhalt und ferner für die ermunternden Worte und Gesten.
- ...Dr. Andreas Nitsche, Gabi Schreiber, Dr. Andreas Kurth und anderen wissenschaftlichen Kollegen für Ihre freundliche und großzügige Unterstützung.
- ...den ausgesprochen herzlichen Kollegen der benachbarten Arbeitsgruppen ganz besonders für die angenehme Arbeitsatmosphäre und natürlich für die vielen kleinen, wertvollen Hilfeleistungen.
- ...den Studenten Stefan Stich, Tim Ziera, Katharina Walentin, Maria Stecklum und Sabine Nagel für ihre Unterstützung und die Vitalität im Labor.
- ...und ganz besonders meinem Mann Matthias, unseren Eltern und Freunden, die mich durch sämtliche Höhen und vor allem Tiefen auf dem entsetzlich langen Weg zur Promotion begleiteten.

Zusammenfassung

Infektionen mit den β -Herpesviren humanes Cytomegalievirus (HCMV) und humanes Herpesvirus-6 (HHV-6) sind mit bis zu 90 % Seropositivität aller Erwachsenen sehr weit verbreitet. Sie verlaufen in der Regel asymptomatisch, können jedoch bei immunsupprimierten Patienten zum Teil lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen, z.B. Entzündungen der Lunge, des Gehirns oder der Netzhaut. Gegenwärtig werden verschiedene antiherpale Medikamente verwendet, die partiell ernsthafte Nebenwirkungen hervorrufen. Außerdem ist die Verbreitung resistenter Stämme zu beobachten. Daher existiert ein verstärktes Interesse an der Entwicklung neuartiger antiviraler Substanzen. Naturstoffe spielen dabei wegen ihrer großen Strukturvielfalt eine zentrale Rolle, wobei Verbindungen aus aquatischen, phototrophen Mikroorganismen (pMO, Mikroalgen und Cyanobakterien), ein bisher unzureichend genutztes Potential darstellen.

Die vorliegende Arbeit war Teil eines Projektes mit dem Ziel, antivirale Substanzen aus pMO zu identifizieren und zu isolieren. Die Substanzen wurden aus monoseptischen pMO-Kulturen in sterilisierbaren Photobioreaktoren aufgearbeitet, ihre chemische Struktur bestimmt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV getestet. Antiviral aktive Substanzen wurden ferner hinsichtlich ihrer Wirkungsweise untersucht. Zunächst wurden die Screeningmethoden zur Bestimmung der Zellvitalität von MRC-5-Fibroblasten (WST-1-Test) und der anti-HCMV-Aktivität (Peroxidasefärbung viraler Antigene) etabliert und mit dem bei HCMV-Infektionen klinisch eingesetzten Basenanalogen Ganciclovir (GCV) als Referenzsubstanz getestet. Im entwickelten Screeningsystem inhibiert es bei einer Konzentration von etwa 6 mg/ml die Zellvitalität um 50 % (CC_{50}) und bei einer Konzentration von 14 μ g/ml die HCMV-Replikation um 50 % (IC_{50}). Aus fast 500 unterschiedlich gewonnenen Extrakten wurden die folgenden wirksamen Substanzen erfolgreich identifiziert und charakterisiert:

1. Das anionische Exopolysaccharid (EPS) aus dem Rhodophyten *Porphyridium purpureum* weist im Screeningsystem eine anti-HCMV-Aktivität von $IC_{50} = 90 \mu$ g/ml auf ($CC_{50} > 5$ mg/ml). Die Substanz ist außerdem wirksam gegen HHV-6 und Vacciniavirus (VV). Damit werden erstmals Aktivitäten aus *P. purpureum* gegen β -Herpesviren und VV beschrieben.

2. Für das intrazelluläre aPS TK V2 aus der Biomasse des Cyanobakteriums *Arthrospira platensis* wurde eine Wirksamkeit von $IC_{50} = 39 \mu$ g/ml nachgewiesen ($CC_{50} > 5$ mg/ml). In diesem Extrakt ist wahrscheinlich das bereits beschriebene Ca-Spirulan enthalten.

3. Das davon zu unterscheidende, bisher unbekannte anionische Exopolysaccharid TK V3 aus *A. platensis* zeigt sogar eine 10fach höhere antivirale Aktivität ($IC_{50} = 4 \mu$ g/ml, $CC_{50} > 5$ mg/ml) als TK V2 und ist darüber hinaus etwa 3,5fach besser als das herkömmlich verwendete GCV. Hervorzuheben ist weiterhin die 100 %ige Inhibierung der HCMV-Replikation mit lediglich 20 μ g/ml TK V3, was mit 250 μ g/ml EPS, 40 μ g/ml TK V2 und ebenso mit 40 μ g/ml GCV nicht erzielt werden konnte. Sowohl TK V2 als auch TK V3 besitzen außerdem eine Wirksamkeit gegen HHV-6, VV, das Herpes Simplex-Virus-1 und das Humane Immundefizienz-Virus-1.

Anhand von *in vitro* Infektionskinetiken wurde für EPS, TK V2 und TK V3 weiterhin veranschaulicht, dass sie zu einer signifikanten Reduktion der viralen DNA- und RNA-Replikation führen. Das herausragende Charakteristikum der aPS ist die Verminderung der Virusreplikation durch Inhibierung der Adsorption und/oder Fusion der Viruspartikel an die Zellmembran. Im Gegensatz dazu hemmen herkömmliche Virostatika direkt die DNA-Replikation, zum Beispiel Basenanaloga. Die mikrobiellen aPS stellen somit eine Erfolg versprechende Basis für die Entwicklung von Virostatika mit neuartigem Wirkmechanismus und darüber hinaus mit einem sehr breiten antiviralen Wirkungsspektrum dar.

Abstract

Infections with human cytomegalovirus (HCMV) and human herpesvirus-6 (HHV-6), both belonging to the β -subfamily of herpesviruses, are very widespread with a rate up to 90 % of seropositive adults. Usually, no infection related symptoms can be detected. Nevertheless, these infections can cause life-threatening diseases in immunosuppressed patients, for instance, pneumonitis, encephalitis or retinitis. Nowadays, several different therapeutic agents are used against herpesvirus infections but still this way of treatment can come up with severe partial side effects. Furthermore, the spreading out of resistant strains can be watched, and so there is a great need for and an increasing interest in the development of novel substances. As natural products exhibit a great structural diversity, they play a central role in this process. In fact, concerning antiviral drug development, there should have been paid more attention to phototrophic microorganisms providing many different metabolic substances.

All data presented here were achieved by a project work aiming at the isolation and chemical characterisation of anti-herpetic drugs produced by phototrophic microorganisms (pMO, micro algae and cyanobacteria). Therefore, metabolically synthesised sulphated polysaccharides and sulpholipides were selectively extracted from pMO-culture and their chemical structures were determined. Also screening and characterisation of their antiviral activity were performed. Substances positively tested for antiviral action were further analysed in view of their mode of action. Initially, screening methods to ensure cytotoxicity against MRC-5-fibroblasts (WST-1 test) and anti-HCMV activity (peroxidase staining of viral antigens) were established. The therapeutically exerted base analogue ganciclovir (GCV) was used as reference substance. It inhibits cellular vitality by 50 % (CC_{50}) at a concentration of about 6 mg/ml and leads to 50 % inhibition of viral replication (IC_{50}) at a concentration of 14 μ g/ml. After having screened nearly 500 extracts, the following agents were successfully identified and characterised:

1. The anionic exopolysaccharide EPS of rhodophyte *Porphyridium purpureum* exhibits a low cytotoxicity ($CC_{50} > 5$ mg/ml) and a significant anti-HCMV activity ($IC_{50} = 90$ μ g/ml). EPS is also active against HHV-6 and vaccinia virus (VV). So this is the first report about *P. purpureum* showing activities against β -herpesviruses and VV.
2. Furthermore, the anionic polysaccharide TK V2 was isolated from the biomass of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* exhibiting an anti-HCMV activity of $IC_{50} = 39$ μ g/ml. TK V2 presumably contains the already known Ca-Spirulan.
3. In contrast to TK V2, the structurally differing anionic exopolysaccharide TK V3, also isolated from *Arthrospira platensis*, demonstrated a 10fold higher antiviral activity ($IC_{50} = 4$ μ g/ml). Compared to clinically used GCV, TK V3 is 3.5fold more active. It is to emphasise, that using the screening system only 20 g/ml TK V3 completely inhibited HCMV-replication, whereas 250 μ g/ml EPS, 40 μ g/ml TK V2 or 40 μ g/ml GCV did not achieve 100 % inhibition of HCMV-replication. TK V2 and TK V3 possess low cytotoxicities ($CC_{50} > 5$ mg/ml) and are also active against HHV-6, VV, HSV-1 and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1).

Performing *in vitro* infection kinetics, anionic polysaccharides EPS, TK V2 and TK V3 were shown to reduce viral DNA- and RNA-replication. Compared to antiherpal therapeutical agents, these agents were demonstrated to act by inhibiting the adsorption of viral particles to the cellular membrane. Because of the different mode of action of clinically used agents, which directly inhibit the viral DNA-replication, this has to be considered as an outstanding attribute. Due their broad antiviral activity and their novel mode of action, the identified anionic polysaccharides constitute a fundamental potential for the development of antiviral agents.

Die Auswahl der marinen Organismen, die Kultivierung sowie die Aufarbeitung der entsprechenden Stoffgruppen und die chemische Strukturcharakterisierung erfolgten durch die Arbeitsgruppe von Dr. Christian Walter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik von Prof. Dr. Rainer Buchholz, Universität Erlangen-Nürnberg. Die Untersuchungen der antiviralen Aktivitäten gegenüber dem Humanen Immundefizienzvirus und gegenüber Herpes-Simplex-Virus wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Marschall, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt und die Messung der antiviralen Aktivitäten gegenüber Vaccinia Virus erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Nitsche, ZBS 1, Robert-Koch-Institut.

Die Forschungsvorhaben 13883 BG und 14895 BG der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) wurden aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Arbeit und durch die AiF gefördert.

Inhalt

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Die humanpathogenen Herpesviren HCMV und HHV-6.....	- 1 -
1.1.1	Die Familie der Herpesviridae.....	- 1 -
1.1.2	Biologie von HCMV- und HHV-6	- 3 -
1.1.3	Pathologie von HCMV	- 10 -
1.1.4	Pathologie von HHV-6	- 12 -
1.2	Antivirale Therapien.....	- 14 -
1.2.1	HCMV-Vakzine.....	- 14 -
1.2.2	Therapeutisch relevante Wirkstoffe gegen HCMV- und HHV-6-Infektionen.....	- 14 -
1.2.3	Polyanionen – Potentielle antivirale Therapeutika	- 19 -
1.2.4	Antivirale Substanzen aus aquatischen Mikroorganismen	- 23 -
2	Problemstellung	- 32 -
3	Material und Methoden	- 34 -
3.1	Arbeitsmethoden	- 34 -
3.1.1	Zellkultur	- 34 -
3.1.2	Viruskultivierung.....	- 35 -
3.1.3	Antikörpertechniken	- 37 -
3.1.4	Nukleinsäuretechniken	- 38 -
3.1.5	Antivirales Screening	- 41 -
3.2	Chemikalien und Reagenzien.....	- 44 -
3.2.1	Zell- und Viruskultur	- 44 -
3.2.2	Antikörpertechniken	- 44 -
3.2.3	Nukleinsäuretechniken	- 45 -
3.2.4	Antivirales Screening	- 46 -
3.3	Geräte und Materialien	- 46 -
3.3.1	Zell- und Viruskultur	- 46 -
3.3.2	Nukleinsäuretechniken	- 46 -
4	Ergebnisse.....	- 47 -
4.1	Antivirales Screeningsystem	- 47 -
4.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität	- 47 -
4.1.2	Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HCMV	- 50 -
4.1.3	Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HHV-6	- 55 -

4.1.4	Virale mRNA-Expression.....	- 57 -
4.2	Mikrobielle Substanzen mit anti- β -Herpesvirusaktivitäten	- 62 -
4.2.1	Anionisches Exopolysaccharid aus <i>Porphyridium purpureum</i>	- 63 -
4.2.2	Anionische Polysaccharide aus <i>Arthrospira platensis</i>	- 67 -
4.2.3	Untersuchungen zum antiviralen Wirkungsmechanismus der anionischen Polysaccharide aus <i>Porphyridium purpureum</i> und <i>Arthrospira platensis</i>	- 73 -
4.2.4	Sulfoquinovosyldiacylglycerole	- 78 -
4.2.5	Chlorosulfolipide aus <i>Ochromonas danica</i>	- 85 -
5	Diskussion	- 87 -
5.1	Etablierung des antiviralen Screeningsystems.....	- 87 -
5.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität antiviraler Substanzen.....	- 87 -
5.1.2	Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HCMV	- 89 -
5.1.3	Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HHV-6	- 93 -
5.2	Antivirale Aktivität mikrobieller anionischer Polysaccharide, Sulfoglycolipide und Chlorosulfolipide	- 95 -
5.2.1	Anionische Polysaccharide aus <i>Porphyridium purpureum</i> und <i>Arthrospira platensis</i>	- 95 -
5.2.2	Mikrobielle Sulfoquinovosyldiacylglycerole.....	- 99 -
5.2.3	Chlorosulfolipide aus <i>Ochromonas danica</i>	- 101 -
5.3	Fazit.....	- 102 -
6	Ausblick und Perspektiven	- 103 -
6.1	Antivirales Screeningsystem	- 103 -
6.2	Potential zur klinischen Verwendbarkeit der anionischen Polysaccharide aus <i>Porphyridium purpureum</i> und <i>Arthrospira platensis</i>	- 103 -
7	Verzeichnis der Abkürzungen	- 107 -
8	Verzeichnis der Abbildungen	- 109 -
9	Anhang	- 112 -

1 Einleitung

Eine Vielzahl von Erkrankungen ist auf ein supprimiertes Immunsystem zurückzuführen, was die Anfälligkeit für Virusinfektionen erhöht. Zu den betroffenen Risikogruppen gehören z. B. Personen nach Transplantation oder mit erworbenem Immundefektsyndrom (*engl.* Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS). Die häufigsten Viruserkrankungen dieser Patienten sind auf die β -Herpesviren humanes Cytomegalievirus (HCMV) und die humanen Herpesviren (HHV)-6 und HHV-7 zurückzuführen^{1,2}. Bei immunkompetenten Personen verlaufen Infektionen mit β -Herpesviren in der Regel harmlos. Je nach Spezies und Verbreitung sind bis zu 90 % der Bevölkerung latent mit diesen Pathogenen infiziert. Durch Immunsuppression können im Körper persistierende Herpesviren jedoch reaktiviert werden. HCMV verursacht oft eine Pneumonitis, welche unbehandelt die häufigste Todesursache von AIDS- und Knochenmarktransplantationspatienten darstellt³. Auch HHV-6 und HHV-7 können bei Transplantationspatienten Entzündungen der Lunge, des Gehirns oder der Netzhaut hervorrufen³⁻⁶.

Gegenwärtig werden verschiedene Virostatika, überwiegend aus der Gruppe der Basenanaloge, gezielt zur Therapie von Herpesviruserkrankungen verwendet. Ihre Wirkung beruht auf der Inhibibierung der viralen DNA-Synthese. Sie rufen jedoch zum Teil ernstzunehmende, unerwünschte Nebenwirkungen hervor, die ihren Einsatz einschränken können. Zudem haben sich zunehmend resistente Virusstämme verbreitet². Daher existiert ein verstärkter Bedarf an der Entwicklung neuerartiger, antiviraler Substanzen mit gänzlich anderem Wirkmechanismus und anderem Nebenwirkungsprofil. Dabei spielen Naturstoffe wegen ihrer großen Strukturvielfalt eine zentrale Rolle⁷, wobei Verbindungen aus phototrophen Mikroorganismen ein bisher unzureichend genutztes Potential vor allem bei der Entwicklung antiviraler Wirkstoffe darstellen.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen geförderten Projektes mit dem Ziel, antivirale Substanzen aus phototrophen Mikroorganismen zu isolieren. Hierfür wurden gezielt sulfatierte Polysaccharide und Sulfolipide aus monoseptischen Kulturen dieser Organismen extrahiert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV und HHV-6 untersucht. Diese genannten Stoffgruppen wurden ausgewählt, weil von einigen ihrer Vertreter bekannt ist, dass sie die Replikation von Viren mit einer glycoproteinhaltigen Hülle inhibieren. Ferner sollte im Rahmen dieser Arbeit der antivirale Mechanismus als wirksam getesteter Substanzen näher charakterisiert werden.

1.1 Die humanpathogenen Herpesviren HCMV und HHV-6

1.1.1 Die Familie der Herpesviridae

Generell treten Herpesvirusinfektionen bei vielen Wirbeltierarten auf, wobei die einzelnen Vertreter durch eine strenge Wirtsspezifität gekennzeichnet sind. Die Symptome der

einzelnen Herpesvirusinfektionen sind in ihrem Erscheinungsbild sehr divers, wobei sich die Herpesviren hinsichtlich ihrer Partikelmorphologie und verschiedenen biologischen Eigenschaften gleichen. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion latent im Organismus zu persistieren. Dabei unterbleibt die Produktion von infektiösen Partikeln und die infizierten Zellen überleben. Das Virus kann jedoch wiederholt aus dem Zustand der Latenz reaktiviert werden.

Bisher sind acht verschiedene, humanpathogene Herpesviren bekannt, die sich aufgrund von Pathogenität, Zelltropismus und Vermehrungseigenschaften in drei Unterfamilien ordnen lassen (Tab. 1): Die α -Herpesviren mit den Vertretern Herpes-Simplex-Virus (HSV)-1, -2 und Variella-Zoster-Virus (VZV) haben *in vitro* einen kurzen Replikationszyklus, persistieren *in vivo* in den Nervenzellen und Ganglien und verursachen beim Menschen vesikuläre Exantheme. Im Unterschied dazu besitzen die Vertreter der β -Herpesviren HCMV, HHV-6 und HHV-7 ein enges Wirtsspektrum, replizieren langsam und die infizierten Zellen scheinen deutlich vergrößert. Das HHV-6 existiert in den zwei Varianten HHV-6A und HHV-6B, wobei HHV-6A bisher ursächlich mit keiner Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte. Die γ -Herpesviren Epstein-Barr-Virus (EBV) und HHV-8 infizieren entweder B- oder T-Lymphozyten³.

Tab. 1 Kurze Charakteristik der humanpathogenen Herpesviren

Genus	Unterfamilie	Tropismus	Verursachte Erkrankung
HSV-1 (HHV-1)	α -Herpesvirus	Neurotrop	Läsionen im Gesicht, (Enzephalitis, Keratitis)
HSV-2 (HHV-2)	α -Herpesvirus	Neurotrop	Genitalläsionen, (Meningitis)
VZV (HHV-3)	α -Herpesvirus	Neurotrop	Windpocken (Primärinfektion), Zoster (Reaktivierung)
EBV (HHV-4)	γ -Herpesvirus	Lymphotrop	Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), div. Karzinome, Lymphome
HCMV (HHV-5)	β -Herpesvirus	Multitrop*	Neurologische Defekte während Embryonalentwicklung, Retinitis, Hepatitis, Mononukleose
HHV-6	β -Herpesvirus	Lymphotrop**	<i>Exanthema subitum</i>
HHV-7	β -Herpesvirus	Lymphotrop	<i>Exanthema subitum</i>
HHV-8	γ -Herpesvirus	Lymphotrop	Kaposi Sarkom

*Siehe Kap. 1.1.3, **Siehe Kap. 1.1.4

Aufgrund der Sequenz der Desoxyribonukleinsäure (*engl.* deoxyribonucleic acid, DNA), des Genomaufbaus und der immunologischen Verwandtschaft bestimmter Virusproteine werden diese drei Unterfamilien in verschiedene Genera eingeteilt. So gehört das HCMV zum Genus der Cytomegalieviren und HHV-6 und -7 zum Genus der Roseoloviren. Die humanpathogenen Herpesviren wurden außerdem chronologisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert (HHV-1 bis HHV-8)³.

Abgesehen von ihrer Rolle bei immunsupprimierten Patienten können pränatale HCMV-Infektionen schwere Schädigungen des Gehörs und des zentralen Nervensystems (ZNS)

verursachen, wodurch viele Kinder *in utero* oder postnatal versterben. HHV-6B ruft das meist harmlose *Exanthema subitum*, auch Dreitagefieber genannt, bei Kleinkindern hervor³.

1.1.2 Biologie von HCMV- und HHV-6

1.1.2.1 Verbreitung und Tropismus

HCMV-Infektionen können durch Speichel, Sexualkontakt, kongenital durch intraplazentalem Transfer, durch Stillen oder durch Transplantationen (Blut, solide Organe oder hämatopoetische Stammzellen) erfolgen. In den westlichen Ländern sind 30-70 % der erwachsenen Bevölkerung seropositiv für HCMV, wobei die Seroprävalenz in bestimmten Bevölkerungsteilen (homosexuelle Männer, sozioökonomisch arme Bevölkerungsgruppen) und in Entwicklungsländern bis zu 90 % erreichen kann⁸. Der Übertragungsweg und das Manifestationsalter von HHV-6A sind bisher unbekannt. HHV-6B wird in der Hauptsache durch Speichel übertragen und es wird vermutet, dass HHV-6B in den Speicheldrüsen persistiert. Intrauterine HHV-6B-Transmissionen erfolgen nur sehr selten (bei 1-2 % aller Geburten). Bisher existiert kein serologischer Test, der zwischen den beiden HHV-6 Varianten unterscheiden kann. Mehr als 95 % aller Erwachsenen sind seropositiv, wobei der Antikörpertiter mit dem Alter abnimmt³.

Im Gegensatz zum sehr beschränkten Zelltropismus *in vitro* infiziert HCMV nahezu alle humanen Zelltypen *in vivo*⁹. Zu den hauptsächlichen Zielzellen gehören Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten. Darüber hinaus werden periphere Leukozyten, Neuronen des Hirns und der Retina, glatte Muskelzellen oder Hepatozyten infiziert¹⁰. Undifferenzierte, transformierte oder aneuploide Zellen wie die meisten Zelllinien sind generell nicht permissiv für HCMV. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise darin begründet, dass infolge von Differenzierungsprozessen der Hauptpromotor für die früh exprimierten viralen Gene (*engl.*: immediate early, IE) herunterreguliert wird¹⁰.

HHV-6 lässt sich *in vitro* am besten auf CD4⁺ T-Lymphozyten propagieren; unabhängig davon kann es aber auch eine Reihe anderer Zelltypen infizieren. Im Gegensatz zum *in vitro* Tropismus ist das *in vivo* Wirtsgewebespektrum sogar noch umfangreicher und umfasst außerdem Leber, Tonsillen, Speicheldrüsen, Endothel und Knochenmarkprogenitorzellen.

1.1.2.2 Größe und Aufbau des Virions

Die Virionen der Herpesviren haben einen Durchmesser von 150-200 nm. In Abb. 1 ist beispielhaft das HCMV-Virion schematisch dargestellt. Im Inneren der Partikel befindet sich der Viruskern, eine fibrilläre Proteinmatrix, die eng mit der linearen, doppelsträngigen DNA (dsDNA) verknüpft ist. Dieser Kern wiederum ist von einem ikosaedrischen Nukleokapsid, bestehend aus 162 Kapsomeren (Hexone), umgeben. Nach außen wird das

Virion von einer lipidreichen Hüllmembran umgeben, in die verschiedene, in Glycoproteinkomplexen (*engl.* glycoprotein complex, GC) verbundene Glycoproteine und zwei nichtglycosylierte Proteine eingelagert sind. Die Membran schützt zum einen Kapsid und Genom und bildet zum anderen das Transportvesikel bei Zell-Zell-Transmissionen¹¹. Der Bereich zwischen Hüllmembran und Nukleokapsid wird als Tegument bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine unstrukturierte Proteinmatrix, die verschiedene regulatorische Proteine enthält³.

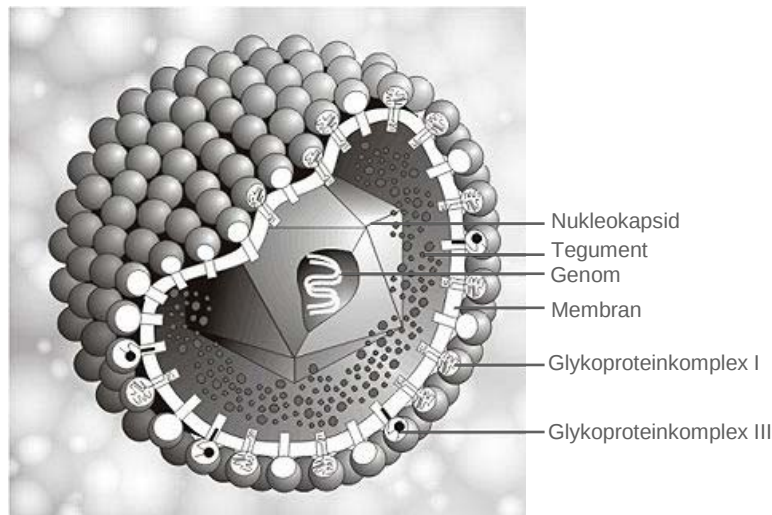


Abb. 1 Aufbau eines HCMV-Virions. (nach Reschke und Eickmann¹²)

1.1.2.3 Genetik

Die Genome der HHV liegen in den Virionen als lineare, dsDNA vor und sind im Vergleich zu anderen Viren sehr groß. HCMV gehört zu den humanpathogenen Viren mit der höchsten Kodierungskapazität. Das Genom des Stammes AD169 umfasst 229 kb und enthält Informationen für mehr als 200 Genprodukte, wovon etwa 30 eine signifikante Homologie mit entsprechenden Genprodukten anderer HHV aufweisen¹³. Viele der Gene scheinen im Verlauf der Koevolution aus dem humanen Genom erworben zu sein und sind z. B. für die Modulation der Immunantwort verantwortlich¹⁴. Das HHV-6-Genom weist mit 160-162 kb eine etwas geringere Größe auf.

Die Organisation der Genome von HCMV und HHV-6 verhält sich sehr ähnlich. Sie sind in ein langes (UL) und ein kurzes (US) singuläres Segment unterteilbar, die von Wiederholungseinheiten flankiert werden. Durch intramolekulare Rekombination bilden sich vier isomere Stränge. Die Ausgangsstelle für die Genomreplikation während des lytischen Zyklus liegt im Zentrum der UL-Region. Abgesehen von wenigen Ausnahmen wird die Expression jedes Gens von einem spezifischen, dem Leserahmen vorgelagerten Protein kontrolliert. Viele Proteine werden von gespleisssten mRNA-Molekülen translatiert. Die hierfür notwendigen Spleissdonor- und Akzeptorstellen sind über das gesamte Genom verteilt^{3,13}.

Verschiedene HCMV-Stämme besitzen eine Sequenzhomologie von 95 %¹³. HHV-6A

und HHV-6B weisen eine Sequenzidentität von etwa 90 % auf³. Darüber hinaus existieren genetische Polymorphismen, die sich über das gesamte Genom verteilen und sich sowohl innerhalb als auch außerhalb vom Leserahmen befinden¹³.

1.1.2.4 Vermehrungszyklus

Der Vermehrungszyklus eines jeden Virus besteht aus sieben Schritten: Anhaftung und Penetration in die Wirtszelle, Lösen der Virushülle, DNA-Replikation, Zusammensetzung, Reifung und Austritt⁹. Die Dauer einer vollständigen Replikation beträgt bei HCMV etwa 16-18 Stunden¹⁵ und bei HHV-6 etwa 72 Stunden. Darüber hinaus werden die Replikationsstufen der Herpesviren in die Expression sehr früher (*engl.* immediate-early, IE), verzögert früher (*engl.* delayed early, DE) und später (*engl.* late, L) Proteine unterteilt⁹, wobei die Grenzen hierbei fließend verlaufen¹⁰.

Anhaftung und Penetration des Virions an die Wirtszelle

HCMV: In Abb. 2 ist der gesamte Prozess von Adsorption und Membranfusion schematisch dargestellt.

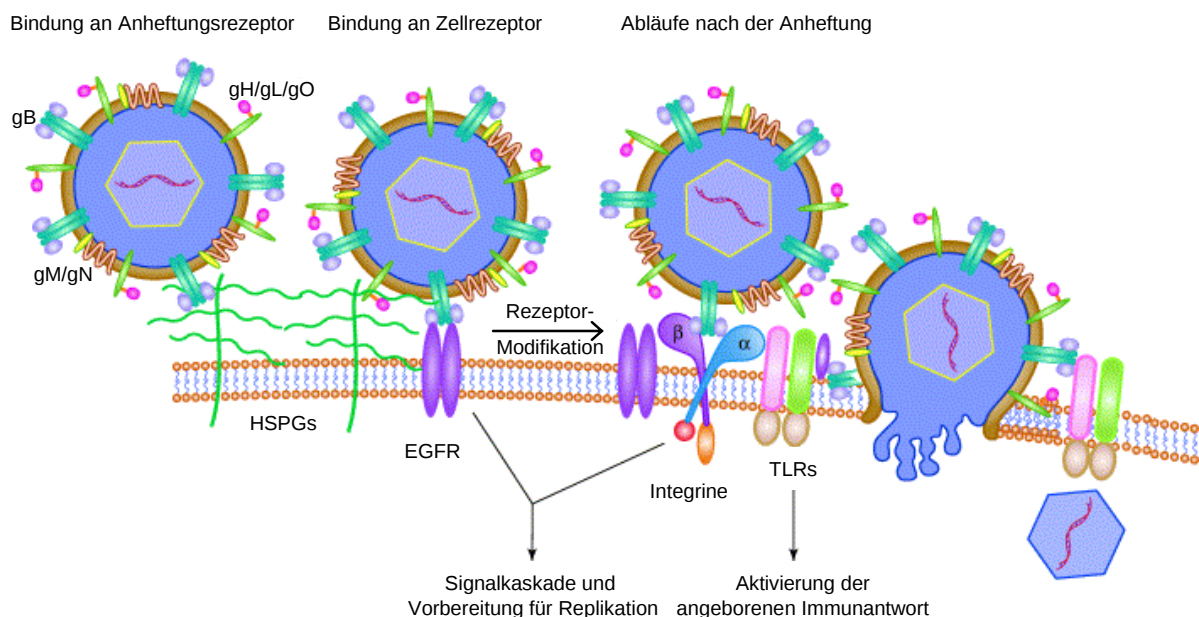


Abb. 2 Modell zu HCMV-Targetzell-Adsorption und Membranfusion (nach Compton, 2004¹⁶)

Der initiale Schritt der HCMV-Replikation ist die Bindung des viralen GC-II, bestehend aus den Glycoproteinen gM und gN (kodiert durch US1-5), oder gB (kodiert durch UL55) an das zelluläre Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG, Abb. 3) der Plasmamembran und die Interaktion mit dem Komplement C3. Bei dieser Bindung spielen zelluläre N-Acetylglucosamine und N-Acetylneuraminsäure eine Rolle¹⁷. Diese passive Bindung kann durch Heparin, Heparinase I und Heparinase (= Heparinase III) inhibiert werden^{16,17}. Da die HSPG weit über die Zelloberfläche hinausragen, ermöglichen sie eine Konzentrierung von Viruspartikeln an der Zelloberfläche¹¹.

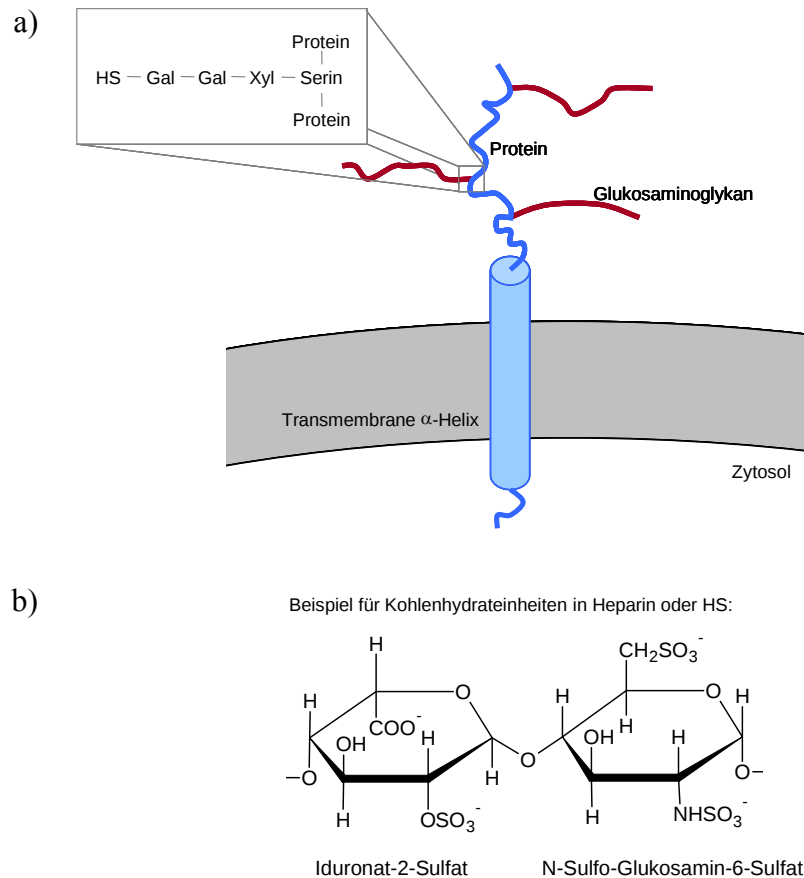


Abb. 3 Struktur eines Heparansulfatproteoglycans (HSPG).

a) Das HSPG setzt sich aus einem Core-Protein (transmembrane und extrazelluläre Domäne) sowie Glucosaminoglycanen (GAG), in diesem Fall Heparansulfat (HS), zusammen. Die Verknüpfung zwischen Core-Protein und GAG erfolgt an einem Serin mit einem Trisaccharid aus Xylose (Xyl) und zwei Galactosemolekülen (Gal). b) Weiterhin ist ein Beispieldisaccharid für HS angegeben. Acetylierungs- und Sulfatierungsgrad sind sehr verschieden. Unter physiologischen Bedingungen sind die Ester- und Sulfamidogruppen deprotoniert und gehen mit Kationen eine Bindung ein.

Wang *et al.*¹⁸ zeigten, dass unmittelbar danach das virale gB an den zellulären Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*engl.* epidermal growth factor receptor, EGFR) bindet. EGFR wird von vielen HCMV-permissiven Zellen exprimiert. Dagegen wird EGFR z. B. nicht von hämatopoetischen, HCMV-permissiven Zellen gebildet, was für einen weiteren zellulären HCMV-Rezeptor spricht. Die folgende, pH-abhängige¹⁹ Membranfusion wird durch den GC-III, bestehend aus gH/gL/gO, und durch gB vermittelt. gO spielt dabei nur eine assessorische Rolle für gH/gL²⁰. Dafür binden helikale Domänen in gB und gH spezifisch an zelluläre Membranbestandteile²¹. Wang *et al.* zeigten zudem, dass es sich hierbei um $\alpha\beta_3$ -Integrin handelt, wobei der EGFR und das $\alpha\beta_3$ -Integrin unabhängig voneinander mit HCMV interagieren und beide jeweils zelluläre PI3-K- und Src-Signaltransduktionswege aktivieren, die wiederum für die HCMV-Internalisierung entscheidend sind. Für diese Internalisierung müssen EGFR und $\alpha\beta_3$ -Integrin in einer

sogenannten *Lipid-raft* Domäne einen Komplex bilden²². Die Penetration oder der Transfer des Kapsids einschließlich der assessorischen Proteine in das Zytosol erfolgt durch clathrinvermittelte Endozytose^{11,23}. Durch die Bindung des HCMV-Parikels an EGFR wird weiterhin der Toll-like Rezeptor 2 aktiviert. Toll-like Rezeptoren gehören zum System, welches die angeborene Immunität vermittelt. Der eben beschriebene Prozess gilt vor allem für die Anhaftung und Penetration der Virionen in Fibroblasten. Für Endothel- und Epithelzellen wurde mit Hilfe der klinischen HCMV-Stämme (TR und FIX) gezeigt, dass die Genprodukte UL128-UL150 für Endozytose und anschließende pH-abhängige Membranfusion relevant sind²⁴.

HHV-6: Der Beginn des Replikationszyklus von HHV-6 verläuft dem von HCMV sehr ähnlich. Die beteiligten Proteine sind meist Homologe der beschriebenen HCMV-Proteine. Der initiale Viruseintritt beginnt mit gH (U48), gL (U82), gQ (U100) und bei HHV-6B auch mit gB (U39). Sie vermitteln die Membranfusion, wobei gH zunächst an den zellulären Rezeptor CD46 bindet^{25,26}. CD46 ist ein Membranprotein, das von allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird und weiteren Pathogenen, z. B. dem Masernvirus als Rezeptor dient.

Die HHV-6-Anhaftung an die Zellmembran und die Infektion werden durch Vorbehandlung der Zellen mit Trypsin nicht behindert, aber durch Papain inaktiviert. Dies spricht für einen proteinbasierten Rezeptor. Dagegen spielen für Anhaftung und Infektion zelluläre Glycosylierungen keine Rolle. Weiterhin werden die Anhaftung und die Infektion zwar durch Heparansulfat und Heparin inhibiert, aber erst bei viel höheren Konzentrationen als z. B. zur Inhibierung aller anderen HHV-Infektion notwendig sind. Außerdem führt die Behandlung der Zellen mit Heparinitase und Heparinase nur zu schwach verringerter Anhaftung und Infektion. Das bedeutet, dass das Glucosaminoglycan Heparansulfat für die HHV-6-Adsorption an die Zellmembran nur eine unspezifische Rolle spielt²⁷.

Obwohl die Bindung zwischen Viren und ihren Rezeptoren sehr spezifisch ist, sind sie oft von nur geringer Affinität. Allerdings garantieren mehrere Rezeptorbindungsstellen nahezu irreversible Bindungen der Viruspartikel an die Zelloberfläche¹¹.

Transport des Virions zum Zellkern

Nach der Fusion von HCMV-Hüll- und -Zellmembran muss das Nukleokapsid zum Zellkern transportiert werden. Objekte, die kleiner als 500 kDa sind, können durch das Zytoplasma diffundieren, wogegen für Objekte mit einem Durchmesser von mehr als 20 nm ein aktiver Transport erfolgt. Prinzipiell existieren drei verschiedene Klassen molekularer Motoren: Kinesin und Dynein, die Mikrotubolie verwenden und Myosin, das mit Hilfe von Aktinfilamenten transportiert²⁸. Bei HCMV wird durch EGFR und $\alpha v \beta_3$ -Integrin vermittelte Signaltransduktion das stationäre Niveau der RhoA-GTPase-Expression, einem Regulator der Aufrechterhaltung des Zytoskellets, herunterreguliert.

Dadurch werden die Aktin-Mikrofilamente zerstört²². Für die Translokation durch das Zytoplasma zum Zellkern werden vom HCMV-Virion dagegen die Mikrotubolie verwendet^{3,9}. Der Transport von HHV-6 durch das Zytoplasma ist noch nicht bis ins Detail geklärt, scheint aber dem von HCMV sehr ähnlich zu sein²⁵.

Virusreplikation und Einflussnahme auf die Signaltransduktion der Zelle

Im Zellkern wird die virale, lineare DNA in ein zirkuläres Molekül überführt, das als Episom im Kernplasma vorliegt³. Wie bereits beschrieben, beginnt die Replikation des HCMV bereits einige Stunden nach Infektion mit der Expression der IE-Proteine. Hierbei handelt es sich in der Regel um sogenannte Transaktivatoren, also um Proteine, die wiederum die Expression anderer Proteine stimulieren. Man kennt im Genom von HCMV insgesamt vier IE-Regionen, die alle u. a. durch das Tegumentprotein pp71 aktiviert werden:

- Die IE1/IE2-Region mit den Leserahmen UL123 und UL122
- UL36/37,
- US3,
- Ein Gen der US22 Familie (TRS1/IRS1, in zweifacher Kopie vorhanden)³.

Die Expressionen der genetischen Elemente IE1 und IE2 unterliegen der Kontrolle des Major IE-Promoters (MIEP)¹⁴.

Bisher wurde die erste Phase der Infektion beschrieben, in der die virusvermittelte Signaltransduktion darauf ausgerichtet ist, die virale Replikation zu starten. In der zweiten Phase der Infektion zielt die HCMV vermittelte Signaltransduktion darauf ab, die optimalen zellulären Bedingungen für die Replikation herzustellen:

- S-Phasebedingungen,
- Zellzyklusarrest,
- Apoptoseinhibierung und
- Expression von Transkriptionsfaktoren, um die Virusreplikation zu beschleunigen⁹.

Diese Funktionen werden von den DE-Proteinen erfüllt. In der letzten Replikationsphase werden L-Proteine exprimiert. Diese sind meist glycosyliert und Komponenten des reifen Viruspartikels.

Zusammensetzung und Reifung des Virions und Austritt aus der Zelle

Zur Reifung der Herpesviren im Allgemeinen zeigen Publikationen von Mettenleiter^{29,30} anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen den Transport des Viruskapsids durch Kernmembran, Golgi-Apparat bzw. Endosomen und Zellmembran mit der jeweiligen „Membranverpackung“. Im Gegensatz dazu entwickelten Torrisi *et al.* (1999)³¹ mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden ein Modell zu intrazellulären Transport und Reifung von HHV-6. Die langen, reproduzierten DNA-Fragmente werden durch Proteine verkapselt, reife Nukleokapside verlassen den Zellkern und erhalten im Zytoplasma das

Tegument sowie im Golgi-Apparat oder den Ringmembranen die Virushülle. Mit diesen Organellen werden sie an die Zellmembran transportiert und verlassen die Zelle durch Exozytose. Aufgrund der Tatsachen, dass HHV-6-infizierte Zellen keine viralen Glycoproteine an der Plasmamembran präsentieren und eine HHV-6-Infektion die Bildung zytoplasmatischer, ringförmiger Lamellen induziert, vermuten Torrisi *et al.* einen speziellen Reifungsprozess für HHV-6³¹. Im Gegensatz zu Viren ohne Hülle, die die infizierte Zelle meist durch Lyse verlassen, werden Viren mit Hülle erst nach Einschluss in eine Membran sezerniert¹¹.

Eine weitere Möglichkeit ist die Infektion von Zelle zu Zelle durch Synzytienbildung, die für die meisten HHV nachgewiesen wurde. In der Regel sind hierfür die gleichen viralen GC entscheidend, wie für die Infektion durch freie Viruspartikel. Infizierte Zellen exprimieren diese Glycoproteine an ihrer Zelloberfläche. Der genaue Mechanismus für die Infektion von Zelle zu Zelle ist bisher noch nicht genau geklärt. Jedoch zeigten Kinzler und Compton³², dass gH/gL für die Synzytienbildung relevant sind, wogegen gB keine Rolle zu spielen scheint. Für HHV-6A aber nicht für HHV-6B wurde ebenfalls die Infektion von Zelle zu Zelle gezeigt. Die Synzytienbildung ist vom HHV-6-Rezeptor CD46 abhängig; beteiligte, virale Glycoproteine auf der Oberfläche der infizierten Zelle sind noch nicht identifiziert³³.

1.1.2.5 Latenz

Alle HHV-Infektionen sind dadurch charakterisiert, dass sich nach einer Primärinfektion im Organismus eine lebenslange Latenz etabliert. Dabei werden nur wenige Gene exprimiert und keine Virionen produziert. Myeloische Zellen bilden das Hauptreservoir latent persistierenden HCMV. In gesunden HCMV-Trägern wurde die virale DNA in CD34⁺ Zellen des Knochenmarks und außerdem in CD14⁺ Monozyten, dendritischen Zellen und Megakaryozyten nachgewiesen. Inwiefern myeloische Zellen für eine virale Replikation suszeptibel sind, hängt von ihrem Differenzierungsstatus ab: Monozyten sind diesbezüglich intolerant, wogegen in differenzierten Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen eine produktive Infektion erfolgen kann⁸.

Aufgrund von NF- κ B und AP-1 sensitiven Elementen im IL-8-Promotor wird IL-8 in HCMV-infizierten Monozyten hochreguliert. Dies impliziert, dass HCMV-infizierte Monozyten chronisch inflammatorische Zytokine sezernieren und damit eine latente HCMV-Infektion unterstützen⁹.

HHV-6B persistiert, wie bereits beschrieben, durch schwache Replikation in den Speicheldrüsen. Zusätzlich ist bekannt, dass es in Monozyten und Progenitorzellen des Knochenmarks latent verweilt. Regulation und Expression während der Latenz scheinen bei HHV-6 und HCMV ähnlich zu sein²⁵.

1.1.3 Pathologie von HCMV

Kongenitale und neonatale HCMV-Infektionen

Wesentliche, klinische Manifestationen von HCMV-Infektionen sind Erkrankungen bei Neugeborenen, die während der Schwangerschaft infiziert wurden. Es existieren Schätzungen, dass jährlich 40.000 Neugeborene infiziert werden³⁴. Das Risiko für eine Primärinfektion einer seronegativen Mutter liegt bei 0,7-4 %, wobei die Wahrscheinlichkeit einer kongenitalen Infektion 40 % beträgt⁸. Das Risiko ist im ersten Drittel der Schwangerschaft am größten. Eine pränatale Infektion ist nur schwer zu diagnostizieren und wird meistens nicht erkannt⁸. Obwohl eine maternale HCMV-Infektion vor der Schwangerschaft einen gewissen Schutz bietet, ist dieser nicht vollständig¹⁰.

Ein Anteil von 10-17 % der pränatal infizierten Babys entwickeln Hörschäden bzw. Folgeerkrankungen in der Neuronalentwicklung. Tiefergreifend sind allerdings irreversible Schäden des zentralen Nervensystems, in Form von Mikroenzephalien, Enzephalitiden, Spasmen, Gehörlosigkeit, Fehlsteuerungen der oberen motorischen Nerven und psychomotorische Retardierungen. Darüber hinaus weisen diese Babys weitere pathologische Erscheinungen auf: Verzögertes Wachstum während der Schwangerschaft, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Hepatitis usw. Langzeitstudien zeigen, dass bis zu 80 % dieser Babys lebenslanglich neurologische Missbildungen und lebensbedrohende Organdysfunktionen aufweisen, was zu einer Mortalität von 10-20 % in dieser Patientengruppe führt⁸. Es wird vermutet, dass HCMV mehr Hörschäden bei Kindern verursacht, als durch *Haemophilus influenza* verursachte Meningitiden oder kongenitale Rötelninfektionen vor Einführung der Impfung³⁴.

HCMV-Infektionen können ebenso zum Zeitpunkt der Geburt erfolgen, was in der Regel asymptomatisch verläuft. Allerdings entwickeln bis zu 30 % dieser Babys kurzzeitige, selbstlimitierende Symptome von Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Hepatitis oder Pneumonie. Neurologische Störungen und Gehörschäden sind mit diesem Infektionszeitpunkt nicht mehr assoziiert⁸.

HCMV-Infektion immunsupprimierter Patienten

HCMV-Erstinfektionen führen bei immunkompetenten Personen nur sehr selten zu ernsthaften Erkrankungen. Dagegen kann bei längerfristig immunsupprimierten Patienten (z. B. AIDS-, Transplantationspatienten) eine Erstinfektion oder eine Reaktivierung des Virus aus der Latenz zu unkontrollierter Replikation und ernsthaften Erkrankungen führen⁸. Im Folgenden wird dies näher erläutert.

HCMV-Erkrankung nach Transplantation solider Organe

Um die Abstoßung transplanterter Organe zu vermeiden, wird das Immunsystem der Patienten medikamentös supprimiert, wodurch latent persistierende Viren wieder

reaktiviert werden können. Mehr als 75 % aller Transplantationspatienten werden neu mit HCMV infiziert bzw. HCMV wird reaktiviert¹. Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten und ständiger Beobachtung tragen diese Reaktivierungen nach wie vor zu vergleichsweise hoher Morbidität bei. Das größte Risiko besteht hierbei für HCMV-seronegative Rezipienten eines Transplantats von seropositiven Spendern, wobei diese Kombination aufgrund der limitierten Organverfügbarkeit nicht immer vermieden werden kann⁸.

Infizierte Patienten entwickeln ein sogenanntes HCMV-Syndrom mit Grippe-ähnlichen Symptomen, Mononukleose und Neutropenie, häufig begleitet von Sekundärinfektionen¹. Außerdem sind HCMV-assoziierte Erkrankungen bei Transplantationspatienten im transplantierten Organ lokalisiert, z. B. Hepatitis nach Lebertransplantation, wobei sich die Erkrankungen anschließend systemisch ausbreiten und Pneumonitiden, Enteritiden, Hepatiden und seltener Retinitiden und ZNS-Störungen verursachen können⁸. Das Transplantat wird häufig abgestoßen; die verursachenden Mechanismen hierfür sind noch nicht geklärt¹.

HCMV-Erkrankung nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Neben Fieber, Leuko- und Thrombozytopenie ruft eine HCMV-Reaktivierung infolge einer Stammzelltransplantation in der Hauptsache ernsthafte Pneumonitiden hervor, wobei diese unbehandelt eine Mortalität von 60-80 % und bei antiviraler Chemotherapie einschließlich HCMV-Immunglobulinbehandlung (Kap. 1.2) immer noch eine Mortalität von 50 % verursacht. HCMV-assoziierte Pneumonitis ist charakterisiert durch Hypoxie und fortschreitende respiratorische Insuffizienz. Risikofaktoren für eine Pneumonitis sind insbesondere: Seropositivität des Rezipienten, Prophylaxe bzw. Therapie der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*engl.* graft-versus-host-disease, GvHD) und T-Zelldepletion des Allografts^{8,35}. Beim Vergleich von myeloablativer oder sogenannter intensitätsreduzierter Konditionierung vor Stammzelltransplantation konnte gezeigt werden, dass das Therapieregime keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens und die Höhe nachweisbarer HCMV-Lasten hat³⁶. Zur kontinuierlichen Kontrolle des HCMV-Status von Stammzelltransplantationspatienten wird klassischerweise die Konzentration von HCMV-Antigen positiven Lymphozyten gemessen; inzwischen werden aber auch quantitative real-time PCRs eingesetzt³⁷⁻³⁹.

HCMV-Koinfektion bei bestehender HIV-Infektion

Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) können die Krankheit AIDS auslösen. Das Spektrum HCMV-assoziiierter Erkrankungen bei AIDS besteht in der Hauptsache in der Retinitis (Abb. 4), charakterisiert durch eine hämorrhagische Nekrose der Retina. Bevor antiretrovirale Substanzen zur Verfügung standen, entwickelten bis zu 25 % der AIDS-Patienten eine Retinitis, die zum Teil zur Blindheit der Patienten führte⁹. Seitdem wird therapeutisch mit der HIV-Last auch die HCMV-Last reduziert⁸.

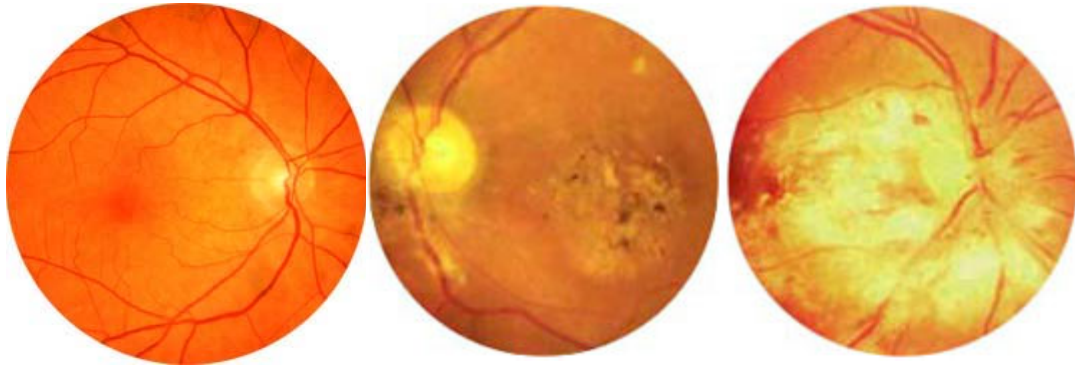


Abb. 4 Links gesunde Retina, mitte und rechts durch HCMV verursachte Retinitiden bei AIDS-Patienten ⁴⁰.

1.1.4 Pathologie von HHV-6

Kongenitale HHV-6-Infektion

1-2 % der Neugeborenen sind bereits positiv für HHV-6, wobei im Gegensatz zu den postnatalen Infektionen bei einem Drittel dieser Gruppe HHV-6A-DNA im Nabelschnurblut nachgewiesen werden konnte. Die Neugeborenen sind symptomlos, auch bei aktiver HHV-6-Replikation ⁴¹. Ein möglicher Übertragungsweg ist die Integration der viralen DNA in Chromosomen des humanen Genoms ^{42,43}.

HHV-6-Primärinfektion

Im durchschnittlichen Alter von sechs Monaten bis einem Jahr erfolgen HHV-6B-Primärinfektionen und verursachen für drei bis sieben Tage ein sehr hohes Fieber, meist gefolgt von einem Hautauschlag (*Exanthema subitum*) (Abb. 5).

Die meisten Erkrankungen verlaufen trotz des hohen Fiebers harmlos und verheilen selbständig. Neurologische Komplikationen werden vergleichsweise selten beschrieben. Vereinzelt treten Fälle von schwerer Hepatitis oder Thrombozytopenie auf. Aufgrund der hohen Seroprävalenz erfolgen Primärinfektionen bei Erwachsenen nur sehr selten ²⁵. Studien haben gezeigt, dass HHV-6 bei 10-20 % der fieberigen Erkrankungen dieser Altersgruppe nachweisbar ist ⁴¹.



Abb. 5 Postfebriles *Exanthema subitum* infolge HHV-6B-Infektion ⁴⁴.

HHV-6-induzierte ZNS-Erkrankungen und Neoplasien

Primärinfektionen oder die Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten werden gelegentlich von ernsthaften Enzephalitiden und/oder Enzephalopathien begleitet, wobei beide Virusvarianten, HHV-6A und HHV-6B, in Proben aus verschiedenen Bereichen des Hirns nachgewiesen werden konnten²⁵. Da HHV-6A im Hirn (auch bei immunkompetenten Erwachsenen) häufiger nachgewiesen werden kann, wird vermutet, dass HHV-6A stärker neurotrop ist als HHV-6B⁴⁵. Damit erklärt sich auch das große Spektrum neurologischer Symptome, mit denen HHV-6-Infektionen assoziiert werden: Multiple Sklerose, Epilepsie, chronisches Erschöpfungssyndrom, Depression und kognitive Funktionsstörungen. Der Zusammenhang zwischen HHV-6 und diesen Erkrankungen wird derzeit noch kontrovers diskutiert und die ätiologische Rolle von HHV-6 bedarf für jede dieser Erkrankungen umfangreicher weiterer Studien⁴⁶.

Da EBV und HHV-8 als onkogene Erreger identifiziert wurden, besteht ein fortlaufendes Interesse, die Rolle von HHV-6 im Zusammenhang mit malignen Tumoren zu klären, insbesondere im Zusammenhang mit einer Immunsuppression. Allerdings geht man inzwischen davon aus, dass HHV-6 sich diesbezüglich eher opportunistisch denn als verursachendes Pathogen verhält²⁵.

HHV-6-Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten

Sehr häufig wird HHV-6B bei immunsupprimierten Patienten reaktiviert. Die Viruslast erreicht bei Transplantationspatienten bereits 2-4 Wochen nach der Transplantation ein Maximum, wobei die Reaktivierung bei Knochenmarktransplantationen etwas häufiger auftritt, als nach der Transplantation solider Organe²⁵. Mit der Reaktivierung kann derzeit kein spezifisches Syndrom verbunden werden. Manchmal verläuft sie asymptomatisch oder ist mit verschiedensten Komplikationen assoziiert: Enzephalitiden und/oder Enzephalopathien, Pneumonitiden, verzögertes Thrombozytenengraftment, Fieber oder Exantheme^{25,47}. Mit *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass HHV-6A und HHV-6B die Expansion mononuklärer Nabelschnurblutlymphozyten hemmen, aber nur HHV-6A die Proliferation von CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen inhibiert⁴⁸.

Ferner wird HHV-6 sehr oft in HIV-infizierten Patienten nachgewiesen, wobei bisher nicht geklärt ist, ob HHV-6 die HIV-Infektion beschleunigt oder lediglich begleitet. Für beide Sachverhalte gibt es zahlreiche Indizien. Alle bisher beschriebenen Fälle zeigen, dass eine HHV-6-Infektion auch hier nicht mit einer spezifischen Symptomatik einhergeht oder ernsthafte Komplikationen in HIV-seropositiven Patienten hervorrufen würde²⁵.

1.2 Antivirale Therapien

1.2.1 HCMV-Vakzine

HCMV-Erkrankungen verursachen hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Die Gesamtkosten aufgrund kongenitaler HCMV-Infektionen wurden in den 1990er Jahren in den USA auf 1,9 Mrd. US\$ jährlich, bei durchschnittlichen 300.000 US\$ pro erkranktem Kind geschätzt³⁴. Die Kosten spiegeln den hohen Aufwand einer lebenslang notwendigen Therapie wieder.

Mit Impfungen kann man prophylaktisch gezielte Patientengruppen immunisieren (z. B. Transplantatspender oder -empfänger, Mädchen, passive Immunsisierung schwangerer Frauen) oder generell auf eine universelle Immunisierung zielen³⁴. Ausführliche Zusammenfassungen über HCMV-Vakzinierungsstrategien finden sich bei Schleiss³⁴ und Plotkin⁴⁹. In Tab. 2 sind erwähnenswerte Vakzine, die derzeit in klinischen Studien untersucht werden, aufgelistet. Derzeit haben „Schutzimpfungen“ aber noch keine praktische Bedeutung erlangt.

Tab. 2 Klinischer Status einiger ausgewählter HCMV-Vakzine nach Schleiss³⁴

Vakzin	Typ	Status, Bewertung
Towne-Vakzin	Lebendes, attenuiertes Vakzin	Eingeschränkte Effektivität in Nierentransplantationspatienten, derzeit weiterführende Studien
Towne-Toledo-Vakzin	Lebendes, attenuiertes Vakzin einer Chimäre aus 2 HCMV-Stämmen	Sicher, gut verträglich, derzeit Phase-I-Studie in HCMV-Seropositiven
gB-Untereinheit	Proteinuntereinheit	Sicher, gut verträglich, immunogen, derzeit Effizienzstudien
ALVAC	gB oder pp65 kloniert in Kanarienvogelpocken als Vektor	Gut verträglich, immunogen, derzeit in Phase-I-Studien
DNA-Vakzine	Applikation von Plasmiden, in die immunogene Gene (gB, pp65...) kloniert wurden	Gut verträglich, immunogen, derzeit in Phase-I-Studie

1.2.2 Therapeutisch relevante Wirkstoffe gegen HCMV- und HHV-6-Infektionen

Seit der Behandlung immunsupprimierter Patienten mit antiherpalen Substanzen ist die HCMV-assoziierte Mortalität deutlich zurückgegangen. Darüber hinaus haben sich prophylaktische Therapiekonzepte durchgesetzt, die nicht nur Morbidität und Mortalität reduzierten, sondern auch die finanziellen Kosten¹.

Wirkstoffe, die eine Virusreplikation hemmen, können an jedem Punkt der Virusreplikation (Kap. 1.1.2.4) angreifen. Derzeit in therapeutischer Anwendung befindliche, antiherpale Wirkstoffe richten sich fast ausschließlich gegen die virale DNA-Replikation. Dazu zählen azyklische Nukleosidanaloga (Aciclovir, Ganciclovir, Valganciclovir, Penciclovir), Phosphonatanaloga (Cidofovir), Pyrophosphatanaloga

(Foscarnet) und Antisense-RNA-Präparate (Fomivirsen)². Auch Substanzen, die sich derzeit bereits in der klinischen Entwicklungsphase befinden, wirken durch Interaktion mit der viralen DNA-Synthese. Dazu zählen Maribavir, BAY 38-4766, GW275175X und Cidofovir⁵⁰.

Wirkmechanismen von Ganciclovir, Aciclovir, Foscarnet und Cidofovir

Aciclovir und Ganciclovir (GCV) (Abb. 6) sind Nukleosidanaloga, die die virale DNA-Polymerase kompetitiv hemmen, indem sie anstatt des natürlichen Substrats Didesoxyguanosintriphosphat (dGTP) in die DNA eingebaut werden und aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe zu einem Kettenabbruch führen. Ihre Spezifität beruht zum einen auf einer höheren Affinität zur viralen als zur zellulären DNA-Polymerase und zum anderen auf ihrer selektiven Aktivierung durch virale Phosphatkinasen bzw. Phosphotransferasen. Bei HCMV wird GCV durch die virale pUL97 und bei HHV-6 durch die homologe pU69 Phosphotransferase zum Monophosphat aktiviert²⁵ (Abb. 7). Die natürliche pUL97-Funktion im Viruszyklus ist bisher nicht geklärt.

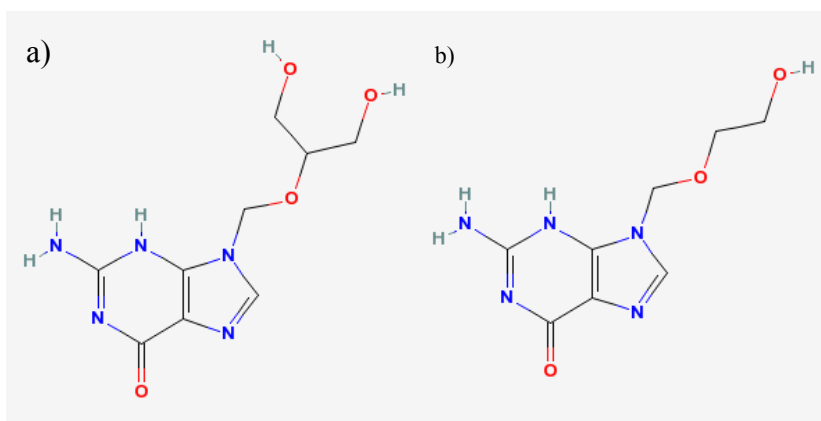


Abb. 6 Strukturformeln von a) GCV und b) Aciclovir (PubChem Compound, CID 3454 und CID 2022).

Foscarnet (Trinatriumsalz der Phosphonoameisensäure, Abb. 8 a) ist ein Pyrophosphat-analogon mit einer breiten Aktivität gegen alle HHV. Seine Selektivität beruht auf der sehr viel höheren Affinität zur viralen als zur zellulären DNA-Polymerase. Es inhibiert diese durch eine reversible Bindung nahe der Pyrophosphatbindungsstelle des Enzyms, wodurch die Spaltung des Pyrophosphats vom Didesoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) verhindert wird, was zu einem Kettenabbruch führt²⁵.

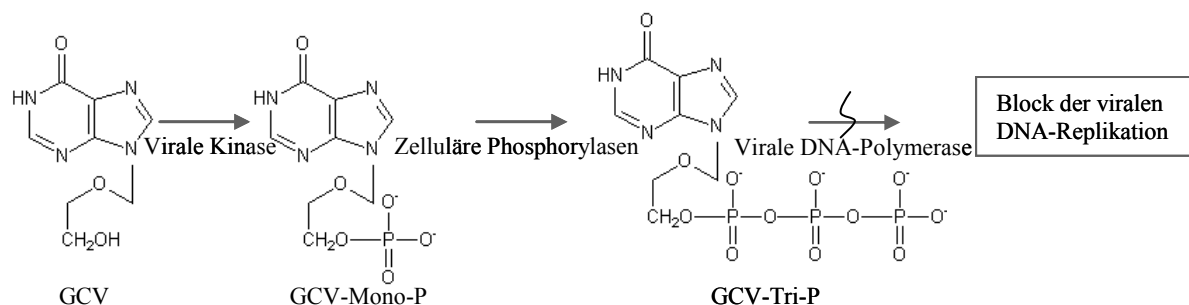


Abb. 7 Wirkmechanismus von GCV

Die virale Kinase ist bei HCMV das Expressionsprodukt von UL97 und bei HHV-6 von U69. P - Phosphat

Cidofovir ist ein azyklisches Nukleosidphosphonatanalogon von Didesoxycytidinmonophosphat (dCMP) (Abb. 8 b) und zeigt ein breites Wirkungsspektrum (HHV, Papilloma-, Polyoma-, Adenoviren und Vaccinia Virus (VV)). Cidofovir wird durch zelluläre Enzyme in seine aktive Form überführt und agiert durch kompetitive Hemmung gegenüber Didesoxycytidintriphosphat (dCTP). Seine Spezifität ist ebenfalls in der höheren Affinität zur viralen DNA-Polymerase begründet²⁵.

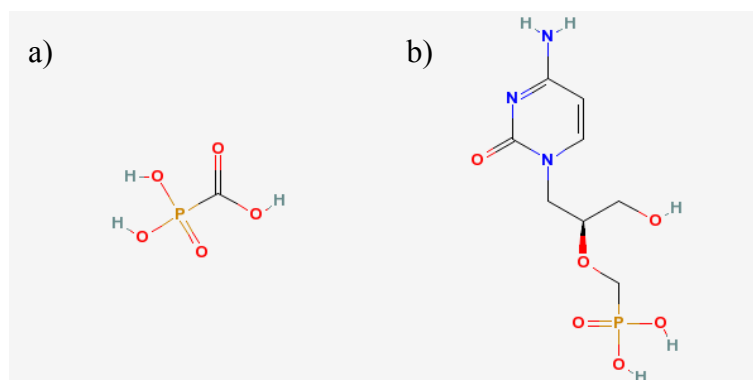


Abb. 8 Strukturformeln von a) Foscarnet und b) Cidofovir (PubChem Compound CID 3415 und CID 60613).

1.2.2.1 Antivirale Aktivitäten von Ganciclovir, Aciclovir, Foscarnet und Cidofovir

Bisher zeigte sich, dass antivirale Komponenten gegen HCMV ein ähnliches *in vitro* Verhalten gegen HHV-6 zeigen. Die Wirksamkeit der Komponenten gegenüber den einzelnen Viren variiert jedoch^{4,51,52}. Tab. 3 zeigt Substanzen, die zur Prophylaxe, zur vorbereitenden Therapie und zur Behandlung von HCMV-Erkrankungen derzeit Verwendung finden.

Bisher wurden keine kontrollierten Studien zur Behandlung von HHV-6-Infektionen durchgeführt. Deshalb werden therapeutisch meist die gleichen Substanzen, wie für andere HHV-Erkrankungen verwendet²⁵. Hinsichtlich HHV-6 wurden folgende *in vitro*-Reaktionen beobachtet: GCV wurde mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen als *in vivo* HHV-6-Inhibitor eingesetzt⁴. Foscarnet und Cidofovir wurden als HHV-6 *in vitro* Inhibitoren identifiziert. Das antivirale Präparat Aciclovir zeigte hingegen eine geringe *in*

vitro Wirksamkeit gegenüber HHV-6. Generell war die Wirkung der HHV-6-Inhibierung durch HCMV spezifische Virostatika im Vergleich zu HCMV geringer^{25,51}. Die beiden HHV-6-Varianten zeigten bei den meisten antiviralen Komponenten eine vergleichbare Empfindlichkeit⁴. De Clercq und Naesens⁵³ haben kürzlich den Stand der Forschung hinsichtlich effektiver anti-HHV-6 Substanzen zusammengefasst.

Während für HCMV also bewährte Therapien vorhanden sind, ist für HHV-6 derzeit kein befriedigender Therapieansatz beschrieben^{2,54}. Es konnte jedoch in verschiedenen Fällen nachgewiesen werden, dass die *in vivo* Vermehrung von HHV-6A durch die Behandlung mit GCV und Forcarnet sowie in geringerer Effektivität mit Aciclovir vermindert werden konnte⁵⁴.

1.2.2.2 Nebenwirkungen von Herpesvirostatika

Der Einsatz der beschriebenen Virostatika ist partiell von schwerwiegenden, unerwünschten Nebenwirkungen begleitet. Bei dem Einsatz von GCV wurden unter anderen Veränderungen des Blutbildes (Thrombozytopenien, Neutropenien), ZNS-Dysfunktionen, hepatische oder okuläre Defekte beobachtet. Forcarnet führte oft zu Einschränkungen der Nierenfunktion, zu Übelkeit, zu Veränderungen des Blutbildes (Hämoglobinabfall), zu neurologischen Defekten und zu Knochenveränderungen⁵⁵. Cidofovir wird aufgrund seiner starken Nephrotoxizität lediglich als Zweittherapie verwendet²⁵. (Siehe auch Tab. 3)

1.2.2.3 Resistenzen gegenüber Herpesvirostatika

Die Anzahl immunsupprimierter Patienten ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Ursache dafür sind eine zunehmende Anzahl von Organtransplantationen, ein zunehmender Einsatz aggressiver Chemotherapien und eine erhöhte Anzahl an AIDS Patienten². Die Zunahme immunsupprimierter Patienten führte direkt zu einem erhöhten Einsatz antiviraler Komponenten gegen Herpesinfektionen, was wiederum in eine schnelle Resistenzentwicklung der Viren gegen die verwendeten Präparate resultierte. In einer Studie von Drew *et al.*⁵⁶ wird berichtet, dass 38 % der Patienten, die über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten mit GCV behandelt wurden, gegenüber dem Präparat resistente HCMV-Stämme aufwiesen. Eine andere Studie beschreibt, dass nach einer neunmonatigen Behandlung mit GCV in 27 % der AIDS-Patienten resistente HCMV-Stämme nachweisbar waren⁵⁷. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien bei Langzeittherapien mit den übrigen Präparaten².

Resistenzen von HCMV-Stämmen (Tab. 3) beruhen im Allgemeinen auf einer Mutation im Gen der GCV phosphorylierenden Transferase (UL97) und im DNA-Polymerasegen (UL54)². Resistenzen gegenüber Cidofovir und Foscarnet können nur durch Mutationen im DNA-Polymerasegen hervorgerufen werden, da diese Substanzen bereits monophosphoryliert sind. In der Regel entwickeln sich Resistenzen langsam, da der

Wildtypstamm allmählich durch die Mutante ersetzt wird⁵⁸. Mutationen von HCMV-UL97 sind die Hauptursache für eine GCV-Resistenz. Mindestens elf Mutationen oder Deletionen, die die GCV-Phosphorylierung beeinträchtigen, konnten bisher in der Kodonregion zwischen 460-607 bp des HCMV-Genoms identifiziert werden⁵⁸. Die meisten Mutationen im DNA-Polymerasegen sind Substitutionen einer Aminosäure und wurden im Fall einer GCV-Resistenz bisher meistens zusammen mit einer UL97-Mutation nachgewiesen. Je nach Lage der Mutation innerhalb des DNA-Polymerase-Kodons ist der Stamm gegenüber GCV / Cidofovir, GCV / Foscarnet, GCV / Cidofovir / Foscarnet oder nur Foscarnet resistent⁵⁸.

Von HHV-6-Resistenzen gegen Virostatika wurde bisher noch nicht berichtet²⁵.

Tab. 3 Substanzen zur Prophylaxe und Therapie von HCMV-Infektionen, die derzeit Verwendung finden.

Antivirales Medikament	Applikation	Wirkungsweise	Nebenwirkungen	Mutationen, die Resistenzen verursachen	Bemerkungen
Immunoglobuline	Intravenös	Bewirken eine passive, humorale Immunität gegen HCMV			Kombination aus GCV und Immunglobulinen ist bei Stammzelltransplantationen „Goldener Standard“
GCV	Intravenös, Oral, Intraokular	Nukleosidanalogen	Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie	In den Genen von UL97 und UL54	Führt zu verringerter Virämie, oral geringe Bioverfügbarkeit Klinische Phase II und III Studien zeigten trotz Nebenwirkungen Nutzen von GCV bei Behandlung kongenital infizierter Säuglinge
Valganciclovir	Oral	Ist ein Pro-GCV			Besitzt bessere Bioverfügbarkeit als GCV
Foscarnet	Intravenös	Pyrophosphatanalogen	Kardiologische und neurologische Probleme infolge Nierenfunktionsstörung – einschließlich Apoplexie	In Gen von UL54	Für Zweitlinientherapie empfohlen Keine synergistischen Effekte mit GCV
Cidofovir	Intravenös	Azyklisches Nukleosidanalogen	Nephrotoxisch		Für Zweitlinientherapie empfohlen
Fomiviren	Intraokular	Antisense RNA-Oligonukleotid, wodurch die Translation des Major-IE-Proteins von HCMV inhibiert wird.			Für Zweitlinientherapie der HCMV-assoziierten Retinitis bei AIDS-Patienten

(nach Gandhi und Khanna, 2004 sowie Biron, 2006^{8,50})

1.2.3 Polyanionen – Potentielle antivirale Therapeutika

Von Polyanionen war bereits seit längerem eine potentielle antivirale Aktivität bekannt. 1987 wurde in ersten Studien Dextransulfat (DS) als potentielles anti-HIV-Agens identifiziert und daraufhin nahm das Interesse an dieser Stoffgruppe zu⁵⁹⁻⁶¹. Für verschiedene Polyanionen konnten antivirale *in vitro* Aktivitäten gegenüber HIV und vielen weiteren Viren gezeigt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie ebenfalls die Synzytienbildung inhibieren und *in vitro* kaum resistente Stämme induzieren⁶². Der Hauptanteil der Erkenntnisse zur antiviralen Aktivität von Polyanionen wurde von der belgischen Arbeitsgruppe um de Clercq erbracht⁶³⁻⁶⁹.

1.2.3.1 Antivirale *in vitro* Aktivität von Polyanionen

Für die antivirale Aktivität von Polyanionen kann man zunächst vereinfachend zusammenfassen, dass die Komposition des Polymergerüsts (Polysaccharid, einfache Alkylkette oder Polypeptid) ebenso, wie die Anionengruppen (Sulfate, Sulfone, Karboxylate oder Phosphate) eine untergeordnete Rolle spielen. Dagegen können strukturelle und konformationelle Aspekte genauso wie Ladungsdichte und -verteilung Einfluss auf die antivirale Aktivität einer Substanz haben⁶². Sulfatierte Polysaccharide (sPS), z. B. DS, zeigen eine verschieden gute Wirksamkeit gegen unterschiedliche HIV-Stämme und andere Viren. Bengston beschrieb bereits 1965⁷⁰, dass die antivirale Aktivität von DS gegenüber Poliovirus mit zunehmendem Molekulargewicht steigt. Neben dem Molekulargewicht des Polyanions ist für die antivirale Aktivität außerdem der Sulfatierungsgrad entscheidend⁶⁹. Schols *et al.*⁶⁷ beschrieben, dass Polyvinylethanol-sulfat und dessen Kopolymer mit Akrylsäure zum Teil eine bessere antivirale Aktivität besitzen als DS und auch höhere Serumkonzentrationen erreichen als DS. Neyts *et al.*⁶⁶ verglichen die antiviralen Aktivitäten verschiedener DS-Derivate: Carboxymethyl-DS, Carboxymethyl-Benzylamid-DS und Carboxymethyl-Benzylamid-Sulfonsäure. Für eine gute anti-HSV-Aktivität war das Benzylamidderivat absolut erforderlich, was für HCMV, HIV und das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) nicht gilt. Sehr verallgemeinert stellt das ideale, antiviral wirksame Kohlenhydrat ein lineares Polysaccharid mit einem minimalen Molekulargewicht von etwa 3 kDa⁷¹ und einer Sulfatierung von mehr als zwei Sulfatgruppen pro Kohlenhydratmonomer dar⁶².

Bisher wurde die antivirale Aktivität von Polyanionen für verschiedene DNA- und RNA-Viren gezeigt. Nur Viren mit einer Hülle (z. B. HIV, HHV, VV, Influenzavirus, Masernvirus, Parainfluenzavirus, Papillomavirus u. a.) reagieren auf eine Inhibierung durch Polyanionen, wogegen Viren ohne Hülle (z. B. Reovirus, Pikornavirus, Parvovirus, Papovavirus oder Adenovirus) nicht sensitiv für Polyanionen sind. Tab. 4 zeigt die antiviralen Aktivitäten einiger ausgewählter Polyanionen gegenüber HIV, Influenzavirus und Masernvirus.

1.2.3.2 Antiviraler Wirkmechanismus von Polyanionen

Bengtsson⁷² postulierte, dass Polyanionen und insbesondere sPS die Bindung von Viruspartikeln an die Zellmembran inhibieren. Ferner inhibieren sPS die Aktivität verschiedener Enzyme, z. B. die reversen Transkriptasen verschiedener Retroviren^{60,73}. Da sPS aufgrund ihrer Größe und Ladung nicht in die Zellen eindringen können, kann man vermuten, dass dieser Effekt von geringerer Bedeutung ist. Die Wirkungsweise von sPS gegenüber HIV ist inzwischen sehr detailliert aufgeklärt worden. Der Ansatzpunkt für den Mechanismus gegenüber Influenzavirus, HSV und einige weitere Viren ist ebenfalls geklärt. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

Tab. 4 Antivirale Aktivitäten einiger ausgewählter Polyanionen

Komponente	IC ₅₀ [µg/ml]				
	HIV-1	HIV-2	Influenza-A-Virus	Influenza-B-Virus	Masernvirus
Sulfatierte Polysaccharide					
Dextransulfat					
MW 40.000	1,3 ^a		1,0 ^c	>200 ^c	>200
MW 110.000	3,0 ^a		1,4 ^c	>200 ^c	>200
Pentosanpolysulfat					
MW 3.100	1,0 ^a		20 ^c	> 200 ^c	> 200
Carrageenan κ	6,4 ^a				
Carrageenan λ	2,2 ^a				
Synthetische sulfatierte Polymere					
PVAS	0,3 ^b	0,35 ^b	> 200 ^b	> 200 ^b	> 200 ^b
PAVAS	0,31 ^b	0,50 ^b	> 200 ^b	> 200 ^b	> 200 ^b
Polyanion mit geringem Molekulargewicht					
Suramin	32 ^d				
Synthetische ω-ungesättigte, anionische, aus Aminosäuren oder Dipeptiden abgeleitete Tenside					
2p	0,37	4,11	20	>100	

PVAS sulfatierter Polyvinylalkohol, PACAS sulfatierte Polyvinylakrylsäure, Suramin symetrisches Polysulfonsäure-, Naphtylaminderivat des Harnstoffs⁷⁴, 2p aus Alanin abgeleitetes Tensid⁷⁵

a - Baba *et al.* 1990⁷⁶, b - Schols *et al.* 1990⁶⁷, c - Hosoya *et al.* 1991⁷⁷, d - Mitsuya *et al.* 1984⁷⁸, e - Leydet *et al.* 1996⁷⁵

Wirkungsmechanismus gegenüber HIV

Baba *et al.*⁷³ wiesen nach, dass DS und Heparin die HIV-Replikation nicht durch Inhibierung der reversen Transkriptase, sondern durch Blockierung der Virus-Zelladsorption inhibieren. Ledermann *et al.*⁷⁹ zeigten, dass DS und Heparin eine Affinität zum zellulären HIV-Rezeptor CD4 besitzen. Diese Affinität betrifft jedoch eine andere als die vom HIV gp120 genutzte CD4-Domäne. Außerdem besteht diese Affinität nur unter bestimmten Temperaturbedingungen und bei hohen Wirkstoffkonzentrationen⁶⁹. Batinić und Robey⁸⁰ demonstrierten, dass sowohl DS als auch Heparin an die positiv geladene V3-Schleife des HIV-gp120 binden. Inzwischen wurden bereits DS-resistente HIV-Stämme isoliert, die bestimmte Aminosäureänderungen in der V3-Schleife des gp120 aufweisen⁷¹. Daraus postulieren Witvrouw *et al.*⁶⁹ zwei Konsequenzen für die Wirkungsweise:

1. Inhibierung der Virusadsorption: Durch Bindung des sPS an die positiv geladene V3-Schleife verliert das gp120 seine Affinität zum CD4 und zum Heparansulfat auf der Targetzelle.
2. Inhibierung der Membranfusion: Außerdem wird durch die Bindung zwischen dem sPS und der V3-Schleife die Affinität der V3-Schleife zum zellulären Korezeptor CXCR4 bzw. CCR5 inhibiert, wodurch die Konformationsänderung von gp41 zur Initialisierung der Membranfusion nicht erfolgen kann.

Wirkungsmechanismus gegenüber Influenzaviren

Mit Hilfe von Membranfusionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sPS selektiv die Fusion von Virus- und Zellmembran von Erythrozyten bei pH 5 aber nicht bei neutralem pH-Wert inhibieren⁸¹. Ferner wurde gezeigt, dass sPS die Konformationsänderungen im viralen Hämagglutinin bei kleinem pH-Wert nicht beeinflussen. Diese Konformationsänderungen sind Voraussetzung für die Präsentation des hydrophoben Fusionspeptids (HA2 N-Terminus) des Hämagglutinins⁸¹ und damit für die Fusion mit der Zellmembran. Lüscher-Mattli⁶² postuliert, dass das Fusionspeptid zwar präsentiert wird, aber in Anwesenheit von sPS seinen hydrophoben Charakter verliert. Dies könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den anionischen sPS und den positiv geladenen Aminosäureresten des N-Terminus des Fusionspeptids verursacht sein⁶².

Wirkungsmechanismus gegenüber HSV

Bei HSV wird angenommen, dass sPS die Bindungsstellen für Heparansulfat der Glycoproteine gB und gC (basische und hydrophobe Aminosäuren am N-Terminus, Homologe auch in anderen HHV), die für die Virusadsorption sorgen, blockieren.

Wirkungsmechanismen gegenüber weiteren Viren

sPS und Polymere sind bei Myxoviren und Retroviren wirksam, die im Glycoprotein ihrer Proteinhülle, welches den zellulären Rezeptor bindet, das Tripeptid Phenylalanin-Leucin-Glycin aufweisen. Dazu gehören: Das RSV, Influenza-A-Virus, HIV-1, HIV-2 und das Simiane Immundefizienzvirus; im Gegensatz dazu stehen das Parainfluenzavirus 3, Masern und Influenza-B-Virus und das Simianen-verwandte AIDS-Virus⁷⁷.

Weiterhin ist bekannt, dass sPS die reverse Transkriptase diverser Retroviren und die zelluläre DNA-Polymerase inhibieren. Aufgrund ihres polyanionischen Charakters geht man aber davon aus, dass sPS nicht in die Zellen eindringen können, wodurch diese Eigenschaft nicht zur Geltung kommen kann⁶⁹. Bisher ist noch nicht geklärt, welches besondere Merkmal der sPS die antivirale Aktivität verursacht.

Wie einzelne sPS mit den Glycoproteinen der Virushülle genau interagieren, ist bisher nicht geklärt. Zum einen besteht kein Zweifel darüber, dass die großen, sauren Sulfatsubstituenten der sPS den physikalischen Charakter dieser Moleküle dominieren und damit die Aktivität eines basischen Moleküls unspezifisch beeinflussen⁸². Neben diesen ionischen Wechselwirkungen sind inzwischen zahlreiche Beispiele für spezifische Interaktionen zwischen sPS und Proteinen bekannt, wobei bereits kleine Unterschiede im Sulfatierungsmuster Einfluss auf die Affinität zum Protein haben können. Zu diesen spezifischen Interaktionspartnern gehören an erster Stelle Heparin mit Antithrombin, weiterhin Heparin mit den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren I oder II sowie Dermatan-sulfat mit dem Heparin-Kofaktor II. Ferner interagieren verschiedene Heparansulfate mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und sind so an der Regulation des Zellzyklus beteiligt⁸².

Tab. 5 Anheftungsrezeptoren der Zellmembran für verschiedene humanpathogene Viren nach Olofson und Bergstrom⁸³

Viren	Anheftungsrezeptor (-en)
Adenoviren 2, 5	Dystroglycan, Glycane
Flaviviren	Heparansulfat
Herpesviren	Heparansulfat
HIV	Heparansulfat, Chondroitinsulfat
Influenza-A-Virus	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
Ortopoxviren	Heparansulfat, Chondroitinsulfat
Papillomavirus	Heparansulfat
Paramyxoviren (Pneumovirus, Metapneumovirus)	Heparansulfat, Chondroitinsulfat

Die Arbeitsgruppe um de Clerq⁶⁹ formulierten die generelle Hypothese, nach der aPS aufgrund ionischer Wechselwirkungen mit den Glycoproteinen der Virusmembran die Adsorption und Membranfusion mit der Targetzelle blockieren. Diese Hypothese stimmt mit der Tatsache überein, dass aPS gegenüber zahlreichen Viren wirksam sind (Kap. 1.2.3.1) und eben auch zahlreiche Virusfamilien negativ geladene Glycane von

Glycolipiden, Glycoproteinen und Proteoglycanen der Zellmembran als Anheftungs-Rezeptoren nutzen⁸³. Eine beispielhafte Übersicht über die als Anheftungsrezeptoren genutzten Glucosaminoglycane ist in Tab. 5 gegeben. Ferner konnte die Arbeitsgruppe mittels Adsorptionschromatographie zeigen, dass sPS die Bindung zwischen HCMV und Heparin kompetitiv hemmen⁶⁴.

Entgegen dieser Theorie wird von Huleihel *et al.*⁸⁴ eine Kohlenhydratakkumulation in humanen Zellen postuliert. In der Studie wurde die antivirale Aktivität von sPS aus *Porphyridium* sp. auf die HSV-1-Replikation mittels mikroskopischer Spektroskopie untersucht. Bei diesen Arbeiten konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Mono- oder Oligosaccharidverunreinigungen des Extraktes handelt, die in die Zellen eindringen und zum antiviralen Effekt beitragen. Zudem wurden weder charakteristische OH-Valenzschwingungen der Kohlenhydrate bei IR-Messungen im Bereich von 3400 cm^{-1} (dieser Bereich ist in der Veröffentlichung nicht abgebildet) noch eine intrazelluläre Sulfatzunahme aufgrund akkumulierter sPS gezeigt. Andererseits wurde in den HSV-1-infizierten Zellen eine IR-Bande bei 1235 cm^{-1} beobachtet, die als intrazelluläre Phosphatzunahme interpretiert wurde. Diese Phosphatzunahme konnte infolge einer EPS-Behandlung infizierter Zellen reduziert werden. Dies könnte z. B. ein Hinweis darauf sein, dass durch die Inhibierung der Virusreplikation der normale Zellmetabolismus (Kohlenhydratstoffwechsel, Phosphatkinasen, N-Acetylglucosamine, Imine, Lysin-Kohlendydrat-Verbindungen) erhalten bleibt bzw. wiederhergestellt wird. Das ist ohne sPS nicht möglich, da eine Virusreplikation den Zellzyklus vollständig unterbricht. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit besteht z. B. darin, dass der Phosphatanstieg ein Indikator für aktive Signaltransduktionsprozesse ist, was auf einen zusätzlichen Wirkmechanismus hinwies.

Festzuhalten bleibt, dass sPS in erster Linie vermutlich durch die Blockierung des Zell-Virus-Kontakts agieren.

1.2.4 Antivirale Substanzen aus aquatischen Mikroorganismen

Die Vielzahl phototropher, aquatischer Organismen bietet mit ihrer hohen Biodiversität ein weitreichendes Reservoir an potentiellen bioaktiven Wirkstoffen. Innerhalb der letzten Jahre führten entsprechende Untersuchungen zur Identifizierung und Strukturaufklärung einer Fülle von Verbindungen aus dieser Organismengruppe⁸⁵⁻⁸⁹. Hierzu gehören Antikoagulantien, Immunsuppressiva, Herbizide, Anthelminthika, antiprotozoale (z. B. gegen Malaria), antibakterielle (z. B. gegen Tuberkulose), antifugale, zytotoxische, antitumorale und antivirale Wirkstoffe. Mayer und Hamann⁹⁰ haben einige der potentiellen, bioaktiven Wirkstoffe aus Cyanobakterien und Mikroalgen zusammengefasst.

Eine der Hauptursachen für den Mangel an pharmazeutisch nutzbaren Wirkstoffen aus aquatischen Organismen liegt in der Tatsache begründet, dass nur geringe Wirkstoffmengen aus den langsam wachsenden Cyanobakterien und Mikroalgen isolierbar

sind. Die Lösung dieses Problems liegt in der Optimierung der Fermentergeometrie einschließlich der Bestrahlungseinrichtung und einzelner Kultivierungsparameter. Einige Substanzen, wie z.B. Cyanovirin-N (Kap. 1.2.4.3), werden inzwischen auch rekombinant mit *Escherichia coli* produziert⁸⁵.

Die Tatsache, dass Algen verschiedenste bioaktive Substanzen synthetisieren, erklärt noch nicht die Frage, warum ausgerechnet antivirale, genauer antiherpale Substanzen darunter sein sollten. Dieses Problem wird im folgenden Abschnitt thematisiert, anschließend wird auf bereits beschriebene, antivirale Aktivitäten aus marinen Organismen näher eingegangen.

1.2.4.1 Provenienz von Substanzen mit anti- β -Herpesvirusaktivität in Mikroalgen

Phyto- und Bakterioplankton (v. a. Cyanobakterien) teilen sich mit dem Virioplankton einen gemeinsamen Lebensraum, wobei das Virioplankton mit 10^3 - 10^6 Viruspartikeln pro ml nicht nur die reichhaltigste, sondern auch die mannigfaltigste Komponente des Planktons darstellt. In hunderten Phyto- (darunter in über 44 Mikroalgentaxa) bzw. Bakterioplanktonspezies konnten bisher Virusinfektionen nachgewiesen werden⁹¹.

Tab.6 Indizien für einen gemeinsamen evolutionsbiologischen Ursprung von Phycodnaviren und Herpesviren

Phycodnaviren	Herpesviren
Einige Evolutionsbiologen gehen von einem unizellulären Chlorophyten als erste eukaryotische Zelle aus ⁹² . Sofern sich Algenviren gemeinsam mit ihren Wirten entwickelten, könnte ihr Ursprung auf bis zu 1,2 Mrd Jahre zurückdatiert werden.	Durch DNA-Sequenzanalysen wurde der Ursprung der Herpesviren auf mindestens 400 Mio Jahre zurückdatiert ⁹³ . Das ist die geochronologische Einheit des Devons, in der sich die ersten terrestrischen Vertebraten (Amphibien), Osteichthyes und Anthropoden entwickelten und sich die terrestrischen Pflanzen ausbreiteten. Ferner bildete sich eine große Diversität innerhalb der Fische aus.
Durch phylogenetische Analyse der Phycodnavirus-DNA-Polymerasen wurde deren Herkunft nahe am Ursprung aller δ -DNA-Polymerasen gezeigt ⁹⁴ .	Ebenso, wie für die Phycodnaviren wurde durch phylogenetische Analyse verschiedener Herpesvirus-DNA-Polymerasen deren Herkunft nahe am Ursprung aller δ -DNA-Polymerasen gezeigt ⁹⁴ .
Zur Familie der Phycodnaviren gehören z. B. das <i>Paramecium bursaria</i> Chlorellavirus-1 (PBCV-1), welches <i>Chlorella</i> infiziert und das marine, filamentöse Phaeophyta infizierende <i>Ectocarpus siliculosus</i> Virus-1 (EsV-1). Beide weisen nur 33 gemeinsame Gene auf, bei 231 bzw. ca. 375 proteinkodierenden Genen. Mit Ausnahme einer repetitiven Region im EsV-1-Genom ist der G+C-Gehalt mit 40 % bzw. 52 % für beide Genome außergewöhnlich einheitlich. Dieses Muster ist ein Hinweis auf eine sehr lange Existenz der einzelnen Gene ⁹⁵ .	

Cyanophagen gehören u. a. zu den Phagenfamilien der Myoviren, der Siphoviren und der Podoviren. Alle drei besitzen ein Kapsid mit dsDNA-Genom (wie Herpesviren) und einem Schwanz. Ferner sind sie sowohl zum lytischen Zyklus befähigt, als auch zur Latenz,

indem sie als temperente Phagen ihre DNA ins Bakterienchromosom integrieren. Vom Cyanobakterium *Synechococcus* sind Resistenzen gegenüber verschiedenen Phagen bekannt. Somit müssen Cyanobakterien im Laufe der Koevolution mit den Cyanophagen antivirale Strategien entwickelt haben ⁹⁶.

Mikroalgen infizierende Viren sind obwohl morphologisch ähnlich, genetisch sehr verschieden ⁹⁷. Sie sind geografisch ubiquitär ⁹⁵. Einen sehr großen Anteil der Mikroalgen infizierenden Varianten bilden Vertreter der Familie der *Phycodnaviridae*. Sie sind mit einem dsDNA-Genom von 160-380 kb ⁹⁵ genauso wie die *Herpesviridae* vergleichsweise groß. Ferner gibt es mehrere evolutionsbiologische Indizien dafür, dass beide Familien bereits einen lange zurückliegenden gemeinsamen Ursprung besitzen (Tab. 6).

Darüber hinaus infiziert z. B. das einfachste, bekannte HHV *Ostreidae* ⁹⁸, also marine Mollusken von früher evolutionärer Entwicklungsstufe. Durch direkten Sequenzvergleich von Abschnitten des DNA-Polymerasegens wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen der hohe Verwandtschaftsgrad von Herpesviren und Phycodnaviren gezeigt ^{87,94}, wobei die Verwandtschaft zwischen Phycodnaviren und Herpesviren deutlich größer ist, als die zwischen Phycodnaviren und z. B. VV oder Baculoviren ⁸⁷. Letztere sind invertebrateninfizierende Viren mit dsDNA und mehrfach eingehüllten Nukleokapsiden.

Unabhängig vom wahrscheinlich gemeinsamen Ursprung existieren zwischen der Gattung der Phaeoviren mit ihrem Prototyp EsV-1 und den Herpesviren weitere Gemeinsamkeiten. Beide:

- ... infizieren die Zelle durch Membranfusion. Dabei wird anschließend das Tegument mit dem Nukleokapsid ins Zytoplasma abgegeben.
- ... Genome besitzen mehrere interne Wiederholungssequenzen.
- ... können einen Zustand latenter Infektion durch Integration in das Wirtsgenom erreichen und
- ... besitzen durch zelluläre Glycosyltransferasen glycosylierte Proteine.

Interessanterweise identifizierten Iyer *et al.* ⁹⁹ neun Proteine, die zwischen Pockenviren, Iridoviren, Asfarviren und Phycodnaviren einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Dazu gehören zwei Virionmembranproteine, welche mögliche Angriffspunkte für Polyanionen aus Mikroalgen sind.

Generell spielt das Virioplankton eine große Rolle bei der Regulation von Phyto- und Bakterioplankton. Es wird z. B. für das Verschwinden ganzer sogenannter Algenblüten verantwortlich gemacht ⁹⁵. Für ein biologisches Gleichgewicht sind antivirale Abwehrmechanismen (oder Resistenzen) durch die Algen erforderlich. Demzufolge kann man auf Komponenten schließen, die sich spezifisch gegen algeninfizierende Viren entwickelten. Aufgrund des eben beschriebenen hohen Verwandtschaftsgrades könnte man schließen, dass Komponenten gegen algenpathogene Viren auch eine Aktivität gegen humanpathogene HHV besitzen. Insbesondere von den aPS der pflanzlichen extrazellulären Matrix ist bekannt, dass sie für die Initiierung von Abwehrmechanismen gegen Bakterien und Pilze,

vor allem durch aktiven Sauerstoff (O_2^- , H_2O_2 oder OH-Radikale), relevant sind¹⁰⁰. Die dafür erforderlichen Signalwege scheinen bei terrestrischen und marinen Spezies ähnlich zu sein¹⁰⁰. Nach Infektion von Tabakpflanzen mit Tabakmosaikvirus konnte in den infizierten Blättern das Hyperoxid (O_2^-) nachgewiesen werden¹⁰¹. Für antivirale Abwehrmechanismen durch aPS in marinen Organismen konnte in der Literatur kein Beispiel gefunden werden, aber abgesehen von der sehr vagen, elektronenmikroskopischen Beobachtung virusähnlicher Partikel im Zytoplasma von *Porphyridium purpureum*¹⁰², wurden z. B. bei diesem Rhodophyten bisher keine Virusinfektionen beschrieben. Da sich gerade *Porphyridium*-Zellen durch aPS-Synthese mit einem hochviskosen Gel umgeben, könnte dies auf einen wirksamen Schutzmechanismus hinweisen. Neben der Induktion von aktivem Sauerstoff nach Erkennen von Pathogenen durch aPS der extrazellulären Matrix ist die Rolle von aPS in weiteren pflanzlichen Abwehrmechanismen (u. a. Ca-Strom, Aktivierung verschiedener Signalwege) bekannt¹⁰³.

Eine antivirale Wirksamkeit von Substanzen aus Cyanobakterien beschrieben erstmals Gustafson *et al.*¹⁰⁴. Sie isolierten Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG) aus *Lyngbya lagerheimii* und *Phormidium tenue* (beides Cyanobakterien) mit einer antiviralen Aktivität gegen HIV-1. Bei diesen Lipiden ist die 6'-Hydroxygruppe der Glucose durch eine Sulfongruppe substituiert (Sulfoquinovose). Im Gegensatz dazu liegt organisch gebundener Schwefel natürlicherweise meist als Sulfatester vor. Loya *et al.*¹⁰⁵ stellten fest, dass sowohl die Sulfatgruppe als auch die Fettsäureester der SQDG einen substanziellen Effekt auf die inhibierende Wirkung besitzen.

Bisher beschriebene antivirale Substanzen aus aquatischen Mikroorganismen richten sich meist gegen Viren mit einer glycoproteinhaltigen Hülle und gehören in der Hauptsache zu den Sulfo-(glyco-)lipiden, den Lektinen oder sulfatierten Polysacchariden. Auf diese Stoffgruppen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2.4.2 Sulfo-(glyco-)lipide

Gustafson *et al.*¹⁰⁴ beschrieben zunächst die Extraktion gegen HIV wirksamer Sulfolipide aus Cyanobakterien. In weiteren Studien zeigten Loya *et al.*¹⁰⁵ und Reshef *et al.*¹⁰⁶, dass die antivirale Aktivität verschiedener SQDG auf die spezifische Inhibierung der viralen reversen Transkriptase zurückzuführen ist. Für das Sulfolipid KM043 aus dem marinen Rhodophyten *Gigartina tenella* wurde weiterhin gezeigt, dass es nicht nur die reverse Transkriptase von HIV inhibiert, sondern ebenso die eukaryotischen α - und β -DNA Polymerasen^{107,108}. Tab. 7 zeigt Beispiele für antiviral wirksame Sulfolipide aus marinen Organismen.

Tab. 7 Beispiele für antiviral wirksame Sulfolipide aus marinen Organismen

Organismus	Target	Referenz
Cyanobacteria		
<i>Lyngbya lagerheimii</i>	HIV-1	Gustafson <i>et al.</i> 1989 ¹⁰⁴
<i>Phormidium tenue</i>	HIV-1	Gustafson <i>et al.</i> 1989 ¹⁰⁴ ; Loya <i>et al.</i> 1998 ¹⁰⁵
Makroalgen		
<i>Gigartina tenella</i>	HIV-1 und eukaryotische DNA-Polymerasen	Ohta <i>et al.</i> 1999 ^{107,108}

1.2.4.3 Lektine

Lektine sind Proteine, die mindestens eine katalytische Gruppe besitzen, um spezifische Mono- oder Oligosaccharide reversibel zu binden. Pflanzenlektine erfüllen häufig Schutzfunktionen ¹⁰⁹. Tab. 8 zeigt eine Übersicht über antiviral wirksame Lektine aus Extrakten phototropher Organismen.

Balzarini *et al.* zeigten erstmals, dass mannosespezifische Lektine aus Pflanzen der Familie der *Amaryllidaceae* mit einer antiviralen Aktivität gegen HIV-1, HIV-2, HCMV, Influenza-A-Virus, aber nicht gegen HSV-1, HSV-2, VV, Coxsackievirus B4, Parainfluenzavirus 3 und andere Viren mit Glycoproteinhülle die Bindung des Virions zum zellulären CD4 inhibieren. Die Kombination der Pflanzenlektine mit DS führte zu einer synergistischen Reduktion der HIV-Replikation ^{110,111}. Diese mannosespezifischen Lektine interagieren nicht mit CD4, CXCR4 und anderen rezeptorinduzierten Signalen, sondern blockieren die Zell-Virus-Fusion an einer spezifischen Sequenzen des viralen gp120 ^{112,113} der HIV-Hülle.

Tab. 8 Beispiel für antiviral wirksame Lektine und lektinähnlicher Verbindungen aus phototrophen Organismen.

Antivirale Substanz	Organismus	Target	Referenz
Cyanobacteria			
Cyanovirin-N	<i>Nostoc ellipsosporum</i>	HIV, HHV-6, Masernvirus, Influenza-A,-B -Virus, HSV-1, EBV, Ebolavirus	Barrientos <i>et al.</i> 2005 ¹¹⁴ , Dey <i>et al.</i> 2000 ¹¹⁵ und O'Keefe <i>et al.</i> 2003 ¹¹⁶
Mikroalgen			
Pheophorbid-ähnliche Komponente	<i>Dunaliella primolecta</i> C-525	HSV-1	Ohta <i>et al.</i> 1998 ¹¹⁷
Höhere Pflanzen			
Mannose-spezifische Lektine	<i>Amaryllidaceae</i>	HIV-1, -2, HCMV, Influenza-A-Virus	Balzarini <i>et al.</i> 1991 ¹¹⁰ , 1992 ¹¹¹

Weiterhin wurde von Boyd *et al.* (1997)¹¹⁸ das lektinähnliche Cyanovirin-N aus dem Cyanobakterium *Nostoc ellisporum* isoliert. Die Komponente zeigt eine antivirale Aktivität gegen HIV-1, Influenza-A, -B-Viren und Masernvirus sowie eine geringere Aktivität gegen HSV-1, EBV, HHV-6 und Ebolavirus. Cyanovirin-N ist nicht wirksam gegen Vacciniavirus, Rhinovirus, humanem Parainfluenzavirus und andere¹¹⁴⁻¹¹⁶. Cyanovirin-N bindet spezifisch an des HIV-gp120, wodurch es dessen Affinität zum zellulären CD4 inaktiviert^{115,118}. Darüber hinaus nimmt es nach der gp120-CD4-Bindung Einfluss auf die Bindung zum Korezeptor CCR5¹¹⁵. Die Substanz weist eine spezifische Affinität zum viralen Hämagglutinin des Influenzavirus auf und scheint auf diese Weise die Adsorption des Influenzavirus an die Zelle zu hemmen¹¹⁶. In einer weiteren Studie demonstrierten Balzarini *et al.*, dass HIV resistente Stämme gegenüber den mannosespezifische Lektinen aus *Amaryllidaceae* nicht kreuzresistent gegen das ebenfalls mannosespezifische (Mannose $\alpha 1 \rightarrow 2$ Mannose) Cyanovirin-N sind, was wiederum für einen anderen Wirkmechanismus spricht¹¹². Cyanovirin-N ist hinsichtlich physikochemischer Degradation sehr stabil und widersteht Behandlungen mit denaturierenden Verbindungen, Detergentien, organischen Lösungsmitteln, Hitze oder wiederholten Einfrier-Auftauzyklen⁸⁵.

Cyanovirin-N bietet als topisch angewandtes Mikrobiozid in Form von Vaginal- oder Rektalcremes ein beträchtliches Potential, um die sexuelle Übertragung von HIV zu verhindern. In HIV-Transmissionsmodellen (Ratte: vaginal und Makake: rektal) wurde bereits die gute Verträglichkeit der Substanz gezeigt¹¹⁴.

1.2.4.3 Sulfatierte Polysaccharide

Seit mehr als 60 Jahren werden Polysaccharide aus marinen Algen isoliert und charakterisiert. Sie bilden eine reichhaltige Quelle für industrielle Produkte (z. B. Gele, Emulgatoren)¹¹⁹. Wie bereits im Kap. 1.2.3 beschrieben wurde, sind sPS Polyanionen, deren antivirales Wirkspektrum und deren antiviraler Wirkmechanismus bereits eingehend erläutert wurden. Viele sPS wirken stark blutgerinnungshemmend, fördern die Fibrinolyse, verursachen partiell Thrombozytopenien oder beeinflussen Endothelzellfunktionen¹¹⁹. Aufgrund dieser Tatsache ist ihre therapeutisch verabreichbare Dosis stark limitiert. Da andererseits keine Resistenzen gegenüber diesen Verbindungen bekannt sind, ist die Suche nach weiteren, verwandten Substanzen mit geringeren Nebenwirkungen sehr erfolgversprechend. Hierbei spielen phototrophe, marine Organismen eine große Rolle.

Die sPS kommen in vielen Pflanzen, Tieren und verschiedenen Geweben vor. In tierischen Geweben stellen sPS in der Hauptsache Glucosaminoglycane (GAG), z. B. Heparin und Heparansulfat dar und sind im perizellularen Raum auf Zellmembranen, in der extrazellulären Matrix und auf Schleimhäuten zu finden. In Pflanzen sind sPS in der Regel von struktureller Bedeutung oder stellen eine Schutzfunktion dar, Beispiele sind Fukoidane oder Carrageenane.

Eine ausführliche Übersicht über bisher bekannte, antiviral wirksame sPS aus marinen Organismen ist in Tab. 9 dargestellt. Darüber hinaus wird im Folgenden auf sPS aus *Arthrospira platensis* und aus verschiedenen *Porphyridium* Spezies näher eingegangen, da sPS aus diesen Organismen im Screening dieser Arbeit von wesentlicher Bedeutung sind.

Tab. 9. Beispiele für antiviral wirksame sPS aus marinen Organismen

Antivirale Substanz	Organismus	Target	Referenz
<i>Cyanobacteria</i>			
Calcium Spirulan, sulfatiertes Polysaccharid	<i>Arthrospira platensis</i>	HSV-1, HIV-1, HCMV, Masern, Mumps, Influenza A Virus	Hayashi <i>et al.</i> 1996 ^{120,121}
Nostoflan, Polysaccharid	<i>Nostoc flagelliforme</i>	HSV-1, HSV-2, HCMV, Influenza A Virus	Kanekiyo <i>et al.</i> 2005 ¹²²
<i>Mikroalgen</i>			
Sulfatiertes Polysaccharid	<i>Porphyridium sp.</i> , <i>Rhodella reticulata</i>	HSV-1, -2, VZV, Mu-LV, MuSV-124	Huleihel <i>et al.</i> 2001 ^{123,124} , Talyshinsky 2002 ¹²⁴
Polysaccharid	<i>Porphyridium cruentum</i>	Influenza A Virus	Minkova <i>et al.</i> 1996 ¹²⁵
<i>Makroalgen</i>			
Sulfatiertes Galactan	<i>Aghardhiella tenera</i>	HIV-1, -2, HSV-1, -2, CMV, VV, Influenza A Virus, RSV, VSV	Witvrouw <i>et al.</i> 1994 ⁶⁸
Sulfatiertes XyloGalactan	<i>Nothogenia fastigiata</i>	HSV-1	Damonte <i>et al.</i> 1996 ¹²⁶
Carrageenan, partiell cycl. Carrageenan	<i>Gigartina skottsbergii</i>	HSV-1, -2, HHV-6A	Carlucci <i>et al.</i> 1997, 1999 ^{127,128} , Neasens <i>et al.</i> 2006 ¹²⁹
Sulfatiertes Galactan	<i>Cryptopleura ramosa</i>	HSV-1, HSV-2	Carlucci <i>et al.</i> 1997 ¹³⁰
Rhamnan-Sulfat	<i>Monostroma latissimum</i>	HSV-1, HCMV, HIV-1	Lee <i>et al.</i> 1999 ¹³¹
Sulfatiertes α -(1-3) D-Mannan	<i>Nothogenia fastigiata</i>	HSV-1, HSV-2	Kolender <i>et al.</i> 1997 ¹³²
Sulfatiertes Galactan	<i>Bostrychia montagnei</i>	HSV-1, HSV-2	Duarte <i>et al.</i> 2001 ¹³³
Sulfatiertes Polysaccharid	<i>Cryptonemia crenulata</i>	DENV-2	Talarico <i>et al.</i> 2005 ¹³⁴
Sulfatiertes Polysaccharid	<i>Gymnogongrus griffithsia</i>	DENV-2, -3, -4	Talarico <i>et al.</i> 2005 ¹³⁴

VSV Vesikuläres Stomatitisvirus; DENV Denguevirus

sPS aus *Porphyridium*

Porphyridium (Abb. 9a) ist eine einzelliger Rhodophyt (Klasse *Bangiophycidae*, Ordnung *Porphyridiales*). Minkova *et al.* beschrieben die antivirale Aktivität eines sPS aus *P. cruentum* gegen Influenza-A-Virus. Strukturell stellt es ein polyanionisches Heteropolymer aus Xylose, Glucose, Galactose, Rhamnose, Harnsäure, sulfatgebundenen Estern sowie 6-7 % Protein dar¹²⁵. Huleihel *et al.* untersuchten ein sPS aus *P. spezie* mit einer antiviralen Aktivität gegen HSV-1, -2 und VCV^{123,135} und gegen die murinen Retroviren murines Sarkomavirus-124 (MuSV-124) und murines Leukämievirus (MuLV)¹²⁴. Das sPS besteht ebenfalls in der Hauptsache aus Xylose, Glucose, Galactose, Glucuronsäure und sulfatgebundenen Estern¹³⁶. Die Arbeitsgruppe um Matsui *et al.*¹³⁷ untersuchten gleichfalls sPS aus *Porphyridium* und konnte eine entzündungshemmende Wirkung zeigen, was für eine vielversprechende Anwendung dieser sPS in Cremes gegen Hautalterung spricht.

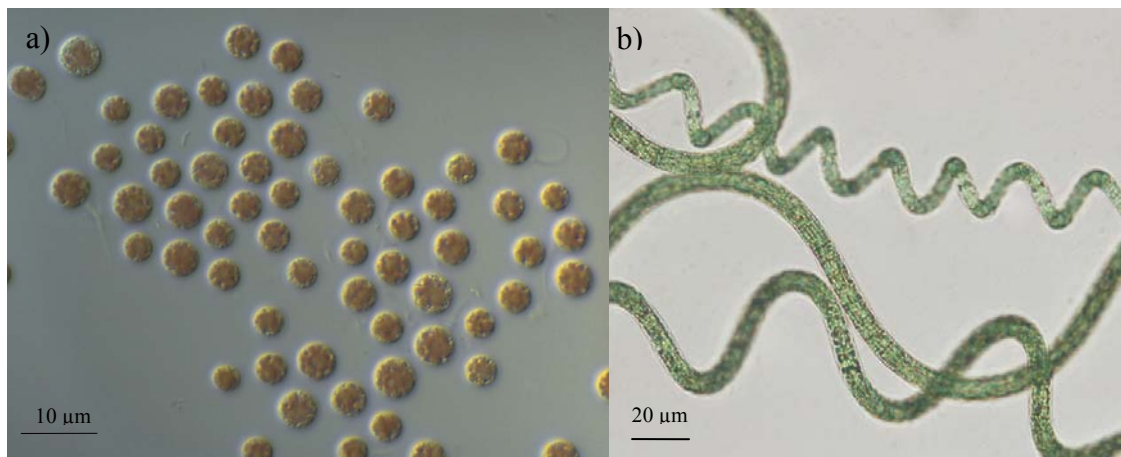


Abb. 9 Mikroskopische Aufnahmen von Zellen von a) *Porphyridium spezie*¹³⁸; b) *Arthrospira platensis*¹³⁹. Calcium Spirulan (Ca-SP)

Calcium-Spirulan (Ca-SP)

Ca-SP ist ein sPS aus dem filamentösen Cyanobakterium *Arthrospira platensis* (Abb. 9b, früher: *Spirulina platensis*), welches aus den zwei repetitiven Einheiten O-Rhamnosyl-Acofriose und O-Hexuronosyl-Rhamnose (Aldobiuronsäure) sowie Sulfat und Calcium besteht^{121,140,141}. Es besitzt vielfache biologische Aktivität, u. a. wurde von Hayashi *et al.* eine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1, HCMV und HSV-1 nachgewiesen^{120,121}. Dabei wurde in Experimenten, bei denen die antivirale Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich des Infektionszeitpunktes dazugegeben wird (*engl.* time of addition, TOA), gezeigt, dass die Substanz dann am effektivsten wirkt, wenn sie während der Infektion vorhanden ist. Weiterhin ist von Spirulan sowohl das Natrium- als auch das Calciumsalz antiviral wirksam, jedoch nicht deionisiertes oder desulfatiertes Spirulan^{120,142}. Die antivirale Aktivitäten von Ca-SP und DS liegen gegenüber HIV-1 etwa in der gleichen Größenordnung, gegenüber HSV-1 ist Ca-SP allerdings 10-20 x wirksamer¹²⁰. Im

Gegensatz zu DS und anderen sulfatierten Polysacchariden besitzt Ca-SP nur eine geringe blutgerinnungshemmende Wirkung und hat im Vergleich zu DS eine lange *in vivo* Verweilzeit (Mausexperimente) ¹²⁰. Ferner wurde gezeigt, dass Ca-SP die Produktion von Thrombin durch Inhibierung des Heparin-II-Kofaktors erhöht ¹⁴³. Damit weist Ca-SP keine der nachteiligen Nebenwirkungen anderer Polyanionen auf.

2 Problemstellung

Für die Behandlung von HCMV- oder HHV-6-Infektionen vor allem bei Transplantations- und AIDS-Patienten steht derzeit nur ein geringes Spektrum therapeutisch relevanter Substanzen mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund war das Ziel eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Walter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen Nürnberg, unter der Leitung von Prof. Rainer Buchholz, die Identifizierung neuer, antiviraler Wirkstoffe gegen HCMV und HHV-6.

Aquatische, phototrophe Mikroorganismen mit ihrer hohen Diversität sind für die Synthese von antiviralen Substanzen bereits bekannt. Im Gegensatz zu den meisten bisher beschriebenen mikrobiellen, antiviralen Isolaten sollten in diesem Projekt die Kultivierungen der aquatischen Mikroorganismen im Hinblick auf spätere, klinische Anwendungen hinsichtlich monoseptischer Kulturführung, großer Biomasse- und Produktausbeuten sowie reproduzierbarer Produktqualität optimiert werden. Ferner sollten speziell Cyanobakterien und Mikroalgen kultiviert werden, die Substanzen aus den Stoffgruppen der anionischen Polysaccharide (aPS) und Sulfolipide produzieren, von denen bereits ein antiviraler Effekt bekannt ist. Von aPS ist bereits ein im Vergleich zu herkömmlichen Virostatika neuartiger antiviraler Wirkmechanismus beschrieben: Sie inhibieren die Adsorption freier Viruspartikel an die Zellmembran, wogegen herkömmliche Virostatika, in der Regel Basenanaloge, die virale DNA-Synthese inhibieren. Aufgrund der schwefelhaltigen Anionengruppen der Sulfolipide kann für diese Substanzklasse ein den aPS ähnlicher Wirkmechanismus erwartet werden.

Im Rahmen des Projektes identifizierte, antivirale wirksame Substanzen würden somit einen neuartigen Wirkmechanismus im Vergleich zu herkömmlichen Substanzen darstellen. Darüber hinaus wären sie im Hinblick auf eine spätere pharmakologische Weiterentwicklung steril, mit großen Produktausbeuten und gleich bleibender Produktqualität herstellbar.

Die Kultivierung der Algen, die Aufarbeitung der Substanzen und ihre Strukturaufklärung sollten durch die Kooperationspartner der Bioverfahrenstechnik erfolgen. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von antiherpal wirksamen Substanzen, die Beschreibung der antiviralen Aktivität und die Charakterisierung ihrer Wirkungsweise:

- Zunächst sollten alle Substanzen hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV in einem Maßstab gescreent werden, der einen hohen Probendurchsatz bei geringem Substanzverbrauch erlaubt. Für dieses Screeningsystem sollten zunächst geeignete Nachweismethoden für Zytotoxizität und antivirale Aktivität ausgewählt und anhand geeigneter Referenzsubstanzen etabliert, optimiert und standardisiert werden. Dafür boten sich DS als Referenz für sPS, Na-Dodezylsulfat als Referenz für Alkylsulfate (Sulfolipide) und GCV als Standardtherapeutikum von β -Herpesvirus-

erkrankungen an. Die Ergebnisse des antiviralen Screeningsystems sollten anschließend unter Verwendung einer weiteren Methode und anhand der Referenzsubstanzen verifiziert werden.

- Ferner sollten die mikrobiellen Substanzen hinsichtlich einer Aktivität gegen HHV-6A und HHV-6B getestet werden. Hierfür sollte ebenfalls ein geeignetes System gegebenenfalls unter Verwendung quantitativer real-time PCR-Assays (QPCR) für virale DNA und mit Hilfe der Referenzsubstanzen etabliert und optimiert werden. Auch für dieses System galt der Anspruch an einen möglichst geringen Substanzverbrauch.
- Antiviral wirksame Substanzen sollten schließlich in der Art ihrer Wirksamkeit näher beschrieben werden. Dazu gehörten Untersuchungen zum Verlauf der HCMV-Infektion bei gleichzeitiger Behandlung mit antiviraler Substanz. Hierfür sollten *in vitro* Infektionskinetiken durchgeführt werden, wobei gleichzeitig die Entwicklung viraler DNA und RNA mittels QPCR quantifiziert werden sollte. Für diese Fragestellung würden neu zu etablierende und optimierende QPCR zum Nachweis verschiedener HCMV-RNAs erforderlich sein.
- Abschließend sollte von antiviral wirksamen Substanzen der Wirkmechanismus näher charakterisiert werden. Dabei wäre die Frage zu klären, ob die neu isolierten, mikrobiellen aPS ebenfalls die Virusreplikation durch Hemmung der Virusadsorption an die zellulären Anheftungsrezeptoren hemmen. Dafür sollten zunächst Versuche durchgeführt werden, bei denen die Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der Infektion dazugegeben wird (*engl.* time of addition, TOA). Für isolierte Sulfolipide wäre generell der Wirkmechanismus zu klären. TOA-Experimente könnten ebenfalls zunächst den Zeitpunkt des antiviralen Wirkens bezüglich des Virusreplikationszyklusses klären.

3 Material und Methoden

3.1 Arbeitsmethoden

3.1.1 Zellkultur

Die Vermehrung von HCMV, HHV-6A und HHV-6B erfolgte auf MRC-5, CCRF-HSB-2 bzw. Molt-3-Zellen. Für die Kultur der Fibroblastenzelllinie MRC-5 wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen pro 175 cm^2 in 30 ml D-MEM mit 20 % fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 200 mM Glutamax I ausgesät, bei 37°C und 5 % CO_2 in einem Feuchtbrutschrank bis zur Konfluenz (ca. 3-4 Tage) inkubiert, trypsinisiert und erneut eingesät. Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 20 verwendet.

Die T-Zelllinien CCRF-HSB-2 (infolge nur noch mit HSB-2 benannt) und Molt-3 wurden in einer Konzentration von $1-5 \times 10^5$ Zellen/ml in 10 ml RPMI 1640 mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 200 mM Glutamax I bei 37°C und 5 % CO_2 in einem Feuchtbrutschrank inkubiert. Etwa alle drei Tage erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Bei einer Zellkonzentration von etwa $1 \times 10^6/\text{ml}$ wurden die Zellen wieder in frischem Medium verdünnt und ausgesät.

Zellproliferationstest

Die Überprüfung der zytotoxischen Aktivität einzelner Substanzen erfolgte durch Bestimmung der Zellproliferation mittels WST-1-Tests. Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein lösliches Tetrazoliumsalz, dass durch mitochondriale Dehydrogenasen (Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System) proliferierender Zellen zu dunkelrotem / -braunen Formazan umgewandelt wird. Mit den Ergebnissen dieses Tests wurde im antiviralen Screening die Substanzkonzentration bestimmt, die Vitalität der Zellen um 50 % reduziert (*engl.* cytotoxic concentration of 50 %, CC_{50} , siehe Kap. 2.1.5)

Der Test erfolgte unter Verwendung von Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen, wobei die Randvertiefungen mit 100 μl PBS gefüllt wurden, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Außerdem wurde jedes Mal eine Standardgerade erstellt, um die Linearität zwischen Zellzahl und Extinktion des Formazanproduktes sicherzustellen. Für die Standardgerade wurden die jeweiligen Zellen in je fünf Vertiefungen mit 100 μl Zellkulturmedium eingesät. Hierfür mussten geeignete Zellkonzentrationen jedes Mal neu ausgetestet werden, da die Zellproliferation vom Alter der Kultur und der Anzahl der Zellpassagen stark abhängig war. In Tab. 10 sind beispielhaft Größenordnungen für die eingesetzten Zellzahlen der drei verwendeten Zelllinien angegeben. Weiterhin erfolgte die Aussaat von 50 μl verdünnte Substanz und 50 μl Zellen der jeweils zweithöchsten Zellzahl in je fünf Vertiefungen (Tab. 10). Das Zellkulturmedium wies eine FKS-Endkonzentration von 5 % auf. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 in einem Feuchtbrutschrank. Einen Tag nach Einsaat wurden 10 μl WST-1-Reagenz zugefügt und die Reaktion für 1 h

bei 37 °C und 5 % CO₂ im Feuchtbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des Formazanproduktes bei 450 nm im Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Extinktion des Blindwertes (Medium ohne Zellen und ohne antivirale Substanz) wurde jeweils von der Extinktion der einzelnen Werte abgezogen.

Tab. 10: Zellzahlen pro Vertiefung für die Einsaat zur Ermittlung der Standardgeraden für den WST-1-Test

HSB-2	Molt-3	MRC-5
150 000	30.000	25.000
100 000	20.000	10.000
75.000	10.000	7.500
50.000	7.500	5.000
10.000	5.000	2.500
0	0	0

3.1.2 Viruskultivierung

Die Kultur von HCMV-Stamm AD169 erfolgte auf MRC-5-Fibroblasten. Der HHV-6A-Stamm U1102 wurde auf HSB-2-Zellen und der HHV-6B-Stamm Z29 wurde auf Molt-3-Zellen vermehrt.

3.1.2.1 HCMV-Kultivierung

HCMV-Vermehrung

Für die Propagation von HCMV wurden 2 ml HCMV-haltiger Zellkulturüberstand auf die sechs Vertiefungen einer zu 80 % mit MRC-5-Zellen konfluenten Zellkulturplatte aufgeteilt und 30 min bei 700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium auf 4 ml aufgefüllt und die Zellen solange kultiviert, bis sie sich aufgrund der Infektion vom Plattenboden ablösten (ca. 5-7 Tage). Nachfolgend wurde der Zellrasen abgeschabt und zusammen mit dem Überstand wurden 4 x 10⁶ frische MRC-5-Zellen 30 min bei 700 x g zentrifugiert. Die Zellaussaat erfolgte auf 175 cm² und nach etwa einer Woche waren die Zellen komplett durchinfiziert. Die Infektionen erfolgten in Zellkulturmedium mit 10 % FKS. Der Überstand wurde in Aliquots bei -80 °C aufbewahrt und für Neuinfektionen verwendet.

Virusanreicherung

Für die Herstellung hochtitriger HCMV-Lösungen, erfolgte eine Anreicherung der eingefrorenen, virushaltigen Überstände durch ein Saccharosekissen in der Ultrazentrifuge. Hierfür wurden 10 ml Saccharoselösung (40 %ig) vorgelegt und vorsichtig mit ca. 25 ml HCMV-Zellkulturüberstand überschichtet. Anschließend wurde das Virus bei 150.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Die virushaltigen Aliquots wurden bei -80 °C aufbewahrt.

HCMV-Versuche zum Nachweis mittels QPCR

Für Versuche, bei denen die HCMV-Vermehrung unter bestimmten Bedingungen (Behandlung mit antiviralen Substanzen, Kinetik) mittels quantitativer real-time PCR (QPCR) untersucht werden sollte, wurden Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen gewählt, in die 5×10^5 MRC-5-Zellen pro Vertiefung in 2 ml Zellkulturmedium eingesät und kultiviert wurden. Einen Tag später erfolgte die Infektion und ggf. die Zugabe der antiviralen Substanz in einem Gesamtvolumen von 2 ml Zellkulturmedium mit 5 % FKS. Für die Bestimmung der Substanzkonzentration, bei der die Virulast um die Hälfte reduziert ist (*engl.* inhibiting concentration, IC_{50} , siehe Kap. 2.1.5) erfolgte die Zellernte drei Tage nach Infektion (*lat. post infectionem*, p. i.), bei Infektionskinetiken entsprechend zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt.

Für die Zellernte wurde der Mediumüberstand entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und schließlich entweder in 350 µl RLT-Puffer (für RNA-Extraktion) oder in 200 µl PBS (für DNA-Extraktion) aufgenommen.

HCMV-Versuche zum Nachweis mittels Peroxidasefärbung

Zur Bestimmung des Virustiters und für die Bestimmung der IC_{50} (siehe Kap. 2.1.5) im Screening nach antiviralen Substanzen wurden MRC-5-Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen infiziert und die infizierten Zellen drei Tage p. i. mittels immunzytochemischer Peroxidasefärbung (POX) markiert. Die Randvertiefungen wurden wiederum mit 200 µl PBS gefüllt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden.

Zunächst wurden die Platten mit 50 µl Gelatinelösung für 30 min bei 37 °C beschichtet, anschließend die Gelatine einmal mit PBS abgewaschen und danach $1,6 \times 10^4$ MRC-5-Zellen in 200 µl pro Vertiefung eingesät.

Für eine Virustiterbestimmung wurden einen Tag später 20 µl des Mediumüberstandes entfernt und in fünf Vertiefungen je 20 µl des Virusstocks pipettiert. Anschließend erfolgte ausgehend von diesen fünf Vertiefungen eine Verdünnungsreihe bis in die letzte Reihe der Platte, wobei jedes Mal 20 µl übertragen und in der letzten Reihe verworfen wurden.

Für eine IC_{50} -Bestimmung wurde einen Tag nach Einsaat der gesamte Mediumüberstand entfernt und mit 50 µl virushaltigem Zellkulturmedium infiziert. Dabei wurden $1-4 \times 10^{-3}$ infektiöse Partikel pro Zelle (*engl.* multiplicity of infection, MOI) eingesetzt. Außerdem wurden 50 µl antivirale Substanz pro Vertiefung dazugegeben. Die Substanzen wurden jeweils in sechs Verdünnungsstufen einschließlich Nullkontrolle im Fünffachansatz untersucht. Die Infektionen erfolgten in Zellkulturmedium mit 5 % FKS. Drei Tage p. i. wurden die infizierten Zellen mittels POX der viralen Antigene gefärbt.

3.1.2.2 HHV-6A und -B Kultivierung

HHV-6-Vermehrung

Für die Propagation von HHV-6A und HHV-6B wurden HSB-2 bzw. Molt-3-Zellen mit einem Pellet infizierter, bei -80 °C eingefrorener Zellen im Verhältnis 1:1 in ca. 2 ml Zellkulturmedium vermischt und 30 min bei 700 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für weitere 4 h inkubiert und dabei halbstündlich resuspendiert. Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen (5×10^5 Zellen/ml) und kultiviert. Der FKS-Anteil im Zellkulturmedium betrug während der Infektion 2 %. Wöchentlich wurde der Anteil infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenzassay (IFA, siehe Kap. 3.1.3.2) bestimmt. Aliquots mit einem Anteil von > 70 % infizierter Zellen wurden als Stocks bei -80 °C gelagert und für Neuinfektionen bereitgestellt.

HHV-6-Versuche zum Nachweis mittels QPCR

Die Versuche zur Bestimmung der IC_{50} antiviraler Substanzen gegenüber HHV-6 oder zur Beobachtung von Infektionskinetiken erfolgten in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen. Hierfür wurden Stocks eingefrorener (-80 °C), infizierter Zellen verwendet. Das Verhältnis zwischen der Zellzahl im Pellet des Stocks und der Zahl neu zu infizierender Wirtszellen (HSB-2 für HHV-6A und Molt-3 für HHV-6B) betrug 1:1. Für jede Substanzverdünnung wurden $2,5 \times 10^6$ neu zu infizierenden Wirtszellen in 1 ml infizierten Überstand resuspendiert, mit 1 ml antiviraler Substanz versetzt, 30 min bei 700 g zentrifugiert und anschließend für weitere 4 h inkubiert und dabei halbstündlich resuspendiert. Danach wurden die Ansätze auf 5 ml mit Zellkulturmedium (2 % FKS) aufgefüllt und je 2 ml dieser Lösung in zwei Vertiefungen aufgeteilt (Doppelbestimmung mit 10^6 Zellen pro Vertiefung). Für eine IC_{50} -Bestimmung wurden die Zellen nach einem (HHV-6A) bzw. drei (HHV-6B) Tagen und bei Kinetiken zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Infektion geerntet. Hierfür wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und anschließend entweder in 200 µl PBS (für DNA-Extraktion) oder in 350 µl RLT-Puffer (für RNA-Extraktion) aufgenommen bzw. für einen später erfolgenden IFA auf einen Objektträger aufgetropft.

3.1.3 Antikörpertechniken

3.1.3.1 Nachweis von HCMV-Antigenen

Das Screening der Substanzen hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität und die HCMV-Titerbestimmung erfolgte durch POX viraler Antigene an adhären, infizierten Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen.

Drei Tage nach Infektion (siehe Kap. 3.1.2.1) wurde der Zellkulturüberstand entfernt und anschließend 2 h bei -20 °C mit 200 µl Methanol pro Vertiefung fixiert. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit 50 µl Primärantikörper anti-p52 Klon CCH2 (1:100 in

PBS, 1 %ig mit Magermilchpulver) pro Vertiefung, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation mit dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG, 1:100 in PBS, 1 %ig mit Magermilchpulver) pro Vertiefung. Nach beiden Antikörperinkubationen wurde der Zellrasen jeweils dreimal mit PBS gewaschen werden. Zum Abschluss erfolgte die Farbreaktion mit 50 µl einer Lösung mit Amino-Ethyl-Carbazol (AEC).

Infizierte Zellen erschienen rot und wurden pro Vertiefung ausgezählt und in antigenproduzierenden Einheiten (*engl.* antigen producing units, APU) pro Vertiefung angegeben.

3.1.3.2 Nachweis von HHV-6-Antigenen

Die Bestimmung des Anteils HHV-6A oder HHV-6B-infizierter Zellen erfolgte mittels IFA. Hierfür wurden HHV-6-infizierte Zellen auf Objektträger aufgetropft, getrocknet und danach 10 min mit 4 °C-kaltem Aceton fixiert. Anschließend erfolgten nacheinander je eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C mit dem Primärantikörper anti-gp60/110 H-AR-2 (1:100 in PBS) und mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG (1:100 in 2×10^{-4} % w/v Evans Blue/PBS). Nach dem Eindeckeln wurden die im UV-Licht grün fluoreszierenden, infizierten Zellen gegenüber den Zellen mit den durch das Evans Blue rot fluoreszierenden Zellkernen ausgezählt.

3.1.4 Nukleinsäuretechniken

3.1.4.1 Nukleinsäureextraktion und cDNA-Synthese

Für die Isolation zellulärer und viraler DNA und RNA aus Zellkulturen wurden QIAamp DNA Mini Kits bzw. RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen verwendet. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Bei DNA-Isolation aus infizierten Zellen, die mit aPS behandelt wurden, wurde die DNA siebenmal mit dem AW2-Puffer auf der Säule gewaschen. Die DNA wurde mit 100 µl Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert. RNA wurde mit 30 µl Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

Die Beseitigung von Verunreinigungen der RNA mit DNA erfolgten unter Verwendung des Kits Turbo DNA-free mit dem dazugehörigen DNase-Protokoll der Firma Ambion. Anschließend wurden RNA-Reinheit und -Konzentration photometrisch bestimmt und 1 µg RNA für die folgende cDNA-Synthese verwendet.

Hierfür wurde 1 µg RNA in 10 µl Wasser gelöst und mit 1 µl Random Hexamer Primer (50 ng/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) versetzt. Die Denaturierung der RNA erfolgte für 5 min bei 65 °C und wurde durch sofortiges Abkühlen auf Eis für 2 min stabilisiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 4 µl First Strandbuffer (5 x), 2 µl DDT (0,1 M), 1 µl RNase Out (40 U/ml) und 1 µl Superscript II (200 U/µl) versetzt. Das Primerannealing erfolgte für 10 min bei 25 °C, gefolgt von der Elongation für 50 min bei 42 °C. Am Ende wurde die Reaktion durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt.

3.1.4.2 PCR-Amplifikation

Qualitative PCRs wurden nur bei der Etablierung der QPCR-Assays und für die Klonierung durchgeführt. Da die PCR-Thermoblocks für die qualitative PCR ohne beheizten Deckel ausgeführt waren, mussten die Ansätze zusätzlich mit Bayol F überschichtet werden.

Alle QPCR-Assays wurden im TaqMan-Format durchgeführt. Für die DNA von genomischem Aktin, HCMV ^{38,39}, HHV-6A und HHV-6B ¹⁴⁴ (Tab. 11) wurden mit Hilfe von Lymphozyten bzw. eigens dafür dargestellten Plasmiden Standardgeraden erstellt, die die entsprechende DNA im Bereich zwischen 10 und 10⁶ Kopien (Genomäquivalente, *engl.* genomic equivalents, ge) quantifizieren und zudem die Effizienz des jeweiligen Assays repräsentieren.

Tab. 11 Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Temperaturbedingungen

	Genom. Aktin ¹⁴⁴	HCMV ³⁸	HHV- 6A ¹⁴⁴	HHV- 6B ¹⁴⁴	Referenz- gene ^{47,145}	HCMV- und HHV-6 mRNA
Mastermix:						
Gesamtvolumen [µl]	25	25	25	25	25	25
qPCR Super-Mix	-	-	-	-	-	12,5
Puffer [x-fach]	1	2,5	1	1	1	-
MgCl ₂ [mM]	3	2,5	3	3	4,5	4,5
dNTP [µM]	200	200	200	200	200	-
ROX [µM]	0,94	0,5	0,94	0,94	1	0,5
Platinum Taq-Polymerase [U]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Primer [µM] For	200	400	800	800	200	200
Back	200	400	400	800	200	200
SYBRgreen [x-fach]	-	-	-	-	-	1
Sonde [µM]	250	120	250	250	120	-
Template	2µl DNA	2µl DNA	2µl DNA	2µl DNA	2µl cDNA	2µl cDNA
Temperaturprogramm:						
Denaturierung [°C] / [min]	94 / 3		94 / 3	94 / 3	94 / 3	95 / 3
Anzahl der Zyklen	40		40	40	40	40
Denaturierung [°C] / [s]	94 / 20		94 / 20	94 / 20	94 / 20	95 / 15
Annealing [°C] / [s]	65 / 50		65 / 50	65 / 50	X / 30	X / 15
Elongation [°C] / [s]	-		-	-	-	72 / 20*

X = Annealingtemperatur vom Assay abhängig (siehe Tab. 12 bzw. Radonić *et al.* 2004 und 2005 ^{47,145}), * Die Elogation für die HHV-6 RNA-Assays erfolgt für 30 s bei 72 °C.

Die Quantifizierung von mRNA erfolgte mit Hilfe von Referenzgenen (Tab. 11)^{47,145}. Es wurden QPCR-Assays (Tab. 11) für die mRNA-Expression der folgenden viralen Proteine verwendet:

- HCMV-Proteine: gp42, gp140 (Tegumentproteine), gp60 (virale DNA-Polymerase), gp65 (Teil des viralen DNA-Helikase-/ Primase-Komplexes), gp51 (minor capsid protein), gp81 (major capsid protein, MCP).
- HHV-6-Proteine: U30 (capsid assembly protein), U41 (major DNA binding protein), U53 (protease assembly protein), U57 (MCP), U73 (origin binding protein), U95 (IE2-Protein).

Für alle mRNA-QPCR-Assays erfolgte eine Optimierung der PCR-Bedingungen mit Hilfe von Plasmiden. Dazu wurden Standardgeraden verschiedener Plasmidkonzentrationen erstellt und damit die PCR-Effizienz bestimmt.

Die Effizienz aller QPCR-Assays liegt bei $\geq 90\%$.

Tab. 12 Sequenzen für die verwendeten PCR-Assays

Assay	GenBank Acc. Nb.	Primer	Sequenz	T [°C]
HCMV mRNA-Assays:				
UL36, gp42	NC_001347	gp42 F gp42 R1	5'- CCC ACC TgT CAA CAT CCC AA 5'- CgA gTC CgT CgT CAC CAg T	63
US22, gp140	NC_001347	gp140 F gp140 R	5'- ACC gTA Tag gCg ATA CTC CAg AA 5'- ggg gAT ggg gAC CTg TTT	63
UL54, gp60	NC_001347	gp60 F gp60 R	5'- TgT CgA ggA CCT ggT gCT T 5'- CgC CgT CAg AAC gTA AAA gAC	65
UL70, gp65	NC_001347	gp65 up gp65 do	5'- ACg TCA CCC CCT TAC TgC C 5'- Tgg Tgg Tag ATg CCT gTg TCT Agg	65
UL46, gp51	NC_001347	gp51 up gp51 do	5'- TCA CCT CCA gCA TCg CAC A 5'- ggA CgA Cgg ACA gTT TgA gTT C	65
UL46, gp81	NC_001347	gp81 F gp81 R	5'- gCC AAC AAA ACg CTC TTC AA 5'- ggT ggT gCT gAg gAT Cgg TA	65
HHV-6 mRNA-Assays:				
U41, gp054	1487936		*	65
U31, gp044	1487925		*	65
U95, gp109	1487995		*	65
U73, gp086	1487971		*	65

T-Annealingtemperatur, * Die HHV-6 mRNA-Assays wurden von Aleksandar Radonić (Charité-CCM, Hämatologie/Onkologie, Berlin) etabliert. Eine Zuordnung der HHV-6A Genexpression zu IE-, DE- und L-Produkten erfolgte unter anderem nach Mirandola *et al.*¹⁴⁶.

3.1.4.3 Gel-Elektrophorese

Die Produkte der qualitativen PCR-Ansätze wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese größenspezifisch aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht. Hierfür wurden 2 %ige Agarosegele in TAE-Puffer vor dem Gießen mit 0,25 µg/mg Ethidiumbromid versetzt und das Gel schließlich mit den PCR-Amplifikaten beladen. In der Elektrophoresekammer, die ebenfalls mit TAE-Puffer beladen war, erfolgte die Auftrennung der Amplifikate für 30-60 min bei 80-100 V. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde im UV-Licht ($\lambda = 256 \text{ nm}$) sichtbar gemacht; die Fotodokumentation erfolgte mit einer Polaroid-Kamera.

3.1.4.4 Klonierung und Plasmidisolation

Für die Erstellung von QPCR-Standardgeraden erfolgte eine Klonierung der Amplifikate in *Escherichia coli*. Dafür wurde zunächst eine qualitative PCR mit 1,5 mM MgCl_2 durchgeführt (restliche Bedingungen siehe Tab. 11) und anschließend das PCR-Produkt kloniert. Dies erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits mit dem Vektor pCR 2.1-TOPO, 3,9 kb. Ligation und Transformation erfolgten nach den Angaben des Herstellers, wobei die Zellen am Ende auf 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-gal) vorbehandeltem LB-(*engl.* lysogeny broth) -Agar mit Ampicillin ausplattiert wurden. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C wurden weiße Kolonien gepickt, in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und erneut für 12 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 11.000 x g für 10 min pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Plasmidkonzentration wurde mit Hilfe der photometrisch bei 260 nm bestimmten DNA-Konzentration und anhand der Gesamtplasmidgröße berechnet und lag im Bereich von 10^{10} - 10^{12} Plasmiden/µl. Nach geeigneter Verdünnung wurden die Plasmide zur Erstellung der Standardgeraden für den jeweiligen QPCR-Assay und zur Berechnung der PCR-Effizienz verwendet.

2.1.5 Antivirales Screening

3.1.4.5 Screeningproben

Die hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV und HHV-6 zu testenden Substanzen stammten von unseren Kooperationspartnern Dr. Tanja König und Dipl.-Ing. Ivonne Naumann in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Walter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik unter der Leitung von Prof. Buchholz der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Bei den Substanzen handelte es sich um verschieden aufgearbeitete Extrakte aus unterschiedlichen Mikroalgenkulturen.

aPS-Extrakte wurden vor dem Screening gefriergetrocknet, in PBS gelöst, autoklaviert und

anschließend mit D-MEM Zellkulturmedium verdünnt, so dass in der fertigen Probe 20 % PBS enthalten waren. Hydrophobe Extrakte wurden zunächst in DMSO oder Methanol gelöst und hinterher mit PBS/Zellkulturmedium verdünnt, so dass letztendlich maximal 5 % Methanol bzw. DMSO und 20 % PBS in der präparierten Probe enthalten waren. Alle Proben wurden vom Labor in Erlangen gekühlt verschickt, bis zum Screening bei 4 °C gelagert und anschließend aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Im Screening erfolgte eine Verdünnung der Proben von mindestens 1:2 (siehe Kap. 3.1.2.1).

Als Referenzsubstanzen für die Etablierung aller Testverfahren wurden Stocklösungen von GCV (6 mg/ml) und DS (trocken autoklaviert, 100 mg/ml) verwendet.

3.1.4.6 Bestimmung der antiviralen Aktivität

Bevor die antivirale Aktivität einer Substanz im *in vitro* System bestimmt werden kann, muss zunächst die Zytotoxizität der Substanz ermittelt werden. Dies erfolgte unter Verwendung des WST-1-Zellproliferationstests (Kap. 3.1.1). Für jede Substanz wurden sechs verschiedene Konzentrationen einschließlich der Nullkontrolle im Fünffachansatz gemessen.

Anschließend wurden die einzelnen Extinktionswerte über der Konzentration graphisch abgebildet. Die Abhängigkeit der Extinktion von der Substanzkonzentration ließ sich durch eine quadratische Ausgleichskurve darstellen. Mit Hilfe der Ausgleichsfunktion wurde die Konzentration berechnet, bei der die Zellaktivität um 50 % (*engl.* cell cytotoxic concentration of 50 %, CC_{50}) reduziert war:

$$y = f(x) = \text{Extinktion}, \quad x = \text{Konzentration} \quad \text{und} \quad \frac{c}{2} \equiv 50 \% \text{ Zellaktivität};$$

$$\text{Ausgleichsfunktion: } y = ax^2 + bx + c$$

$$\text{mit } y = \frac{c}{2} \Rightarrow \frac{c}{2} = ax^2 + bx + c \Leftrightarrow 0 = ax^2 + bx + \frac{c}{2}$$

$$\text{mit } p = \frac{b}{a} \quad \text{und} \quad q = \frac{c}{2a} \Rightarrow x_{1,2} = CC_{50,1,2} = \frac{p}{2} \pm \sqrt{\frac{p^2}{4} - q}$$

Für diese Berechnung wurde Excel (Office XP, Microsoft) verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Fehlerbereichs für die berechnete CC_{50} mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 13.0.1. Dazu wurden Extinktion und Konzentration so aufgetragen, dass die Konzentration die abhängige Variable ($f(y) = x$) war, wiederum eine quadratische Ausgleichsfunktion durch die Punkte gelegt und außerdem die Kurven für die dazugehörigen Prädiktionsintervalle (95 %) abgebildet. Anschließend erfolgte die grafische Ermittlung des Prädiktionsintervalls um die CC_{50} . In Abb. 10 ist die Auswertung am Beispiel einer CC_{50} -Bestimmung verdeutlicht.

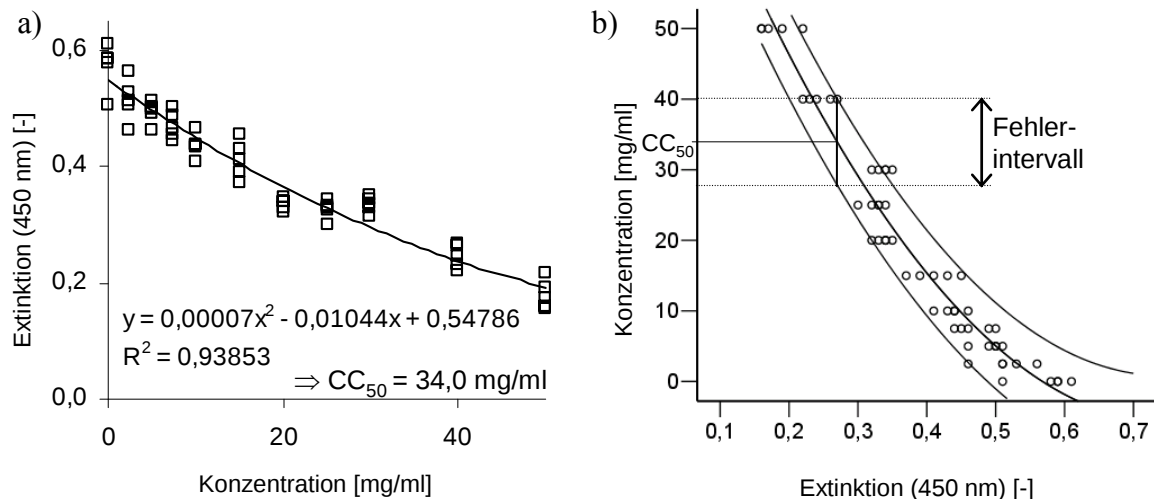


Abb. 10 Beispielauswertung zur Bestimmung der CC_{50}

Für die Ermittlung der CC_{50} einschließlich Fehlerintervall, wurde zunächst die CC_{50} anhand der Funktion der quadratischen Ausgleichsfunktion im linken Diagramm berechnet (a). Anschließend wurde die Konzentration als Funktion der Extinktion mit dem dazugehörigen Prädiktionsintervall von 95 % abgebildet und das Fehlerintervall um die CC_{50} grafisch abgelesen (b).

Im Anschluss an die Testung der Zytotoxizität einer Substanz erfolgte die Ermittlung ihrer antiviralen Aktivität. Hierfür wurden im Screening für HCMV der Nachweis viraler Antigene mittels POX (Kap. 3.1.2.1 und 3.1.3.1) und für HHV-6 der Nachweis viraler DNA mittels QPCR (Kap. 3.1.2.2 und 3.1.4.2) verwendet. Die Berechnung der Konzentration, bei der die Viruslast um 50 % inhibiert war (*engl.* inhibiting concentration of 50 %, IC_{50}) erfolgte analog zur Berechnung der CC_{50} , wobei hierfür $y = f(x)$ durch die Viruslast (in [APU/Vertiefung] für HCMV bzw. in [ge/Zelle] für HHV-6) zu ersetzen ist.

Damit wurde nachfolgend der Selektivitätsindex (SI) der antiviralen Substanz ermittelt:

$$SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

Dieser Wert ist eine charakteristische *in vitro* Größe für die Aktivität antiviraler Substanzen und spezifisch für das verwendete Zell- / Virussystem sowie die zur CC_{50} - und IC_{50} -Bestimmung verwendeten Methoden. Der SI ist umso größer, je geringer die Zytotoxizität (große CC_{50}) und je höher die antivirale Aktivität (kleine IC_{50}) sind.

3.2 Chemikalien und Reagenzien

3.2.1 Zell- und Viruskultur

Zelllinien:

MRC-5	ECACC
CCRF-HSB-2	DSMZ
Molt-3	Advanced Biotechnology Inc.

Viren:

HCMV Stamm AD169	Prof. Hengel, RKI Berlin
HHV-6A Stamm U1102	Dr. Neipel, Virologie Erlangen
HHV-6B Stamm Z29	Advanced Biotechnology Inc.

Zellkulturmedien und -zusätze:

D-MEM (4500mg/L Glucose, GlutaMAX, Pyruvat)	GIBCO
RPMI 1640 Medium +GlutaMAX	GIBCO
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	GIBCO
FKS	GIBCO

Weitere Lösungen und Reagenzien

PBS	PAA
Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO
Gelatine (5 mg/ml)	Merck

Zellproliferationstest:

WST-1	Roche
-------	-------

3.2.2 Antikörpertechniken

Allgemeine Lösungen, Reagenzien:

PBS w/o Ca, Mg	Biochrom AG
Methanol	Merck
Aceton	Dr.K.Hollborn&Söhne, Leipzig
BSA (Fraktion V)	Sigma

Antikörper, gelabelte Antikörper:

p52 Klon CCH2	Dako
Peroxidase gekoppeltes anti-Maus IgG	Dianova
Anti gp60/110 H-AR-2	Prof. J. Luka, Eastern Virginia Medical School, USA
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Probes

Farbstoffe / Gegenfärbung:

AEC-Lösung:

1AEC-Tablette	Sigma
4 ml Dimethylformamid	Merck
16 ml Na-Acetat (0,1 M, pH 5)	Merck
40 µl H ₂ O ₂ (30 %ig)	
Evans Blue	Sigma

3.2.3 Nukleinsäuretechniken

DNA- und RNA-Extraktion:

QIAamp DNA Mini Kits	Qiagen
RNeasy Mini Kits	Qiagen
DNeasy Plant Mini Kits	Qiagen
Mercaptoethanol	Calbiochem

DNase-Verdau:

Turbo DNA-free	Ambion
----------------	--------

cDNA-Synthese:

Random Primer	Invitrogen
dNTP Mix	Invitrogen
First Strandbuffer	Invitrogen
DDT	Invitrogen
RNase Out	Invitrogen
Superscript II	Invitrogen

PCR:

Aqua ad iniectabilia	Braun
Bayol F	Serva
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
10x PCR Rxn Buffer (-MgCl ₂)	Invitrogen
MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen
ROX-Lösung (100 µM)	Gennova, TibMolbiol
PlatinumTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	Invitrogen
Primer, Sonden	TIB Molbiol

Gel-Elektrophorese:

Agarose	Cambrex
---------	---------

TAE-Puffer:

400 mM Tris-Base
20 mM Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O
200 mM Natriumacetat
296 mM Essigsäure

Ethidiumbromidlösung

Klonierung und Plasmidpräparation:

TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Vektor: pCR 2.1-TOPO	Invitrogen
LB-Medium	
LB-Medium	Amersham
50 µg/ml Ampicillin	Sigma
LB-Agar	
15 g/l Agar	Difco
LB-Medium	Amersham
50 µg/ml Ampicillin	Sigma
40 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) ausplattieren	Sigma
QIAprep Miniprep	Qiagen

3.2.4 Antivirales Screening

DS (MW 500.000)	Sigma
GCV-Na (Cymeven i.v. Trockensubstanz)	Roche
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Serva

3.3 Geräte und Materialien

3.3.1 Zell- und Viruskultur

Zentrifugen:

Labofuge GL und Minifuge RF	Heraeus
Ultrazentrifuge: XL-90, Rotor: SW32 Ti	Beckmann

Mikrotiterplattenleser:

Multiscan Plus MK II	Titertek
----------------------	----------

3.3.2 Nukleinsäuretechniken

Qualitative PCR:

Trio Thermoblock	Biometra
------------------	----------

QPCR:

ABI Prism 7700 Sequence Detector System	ABI
---	-----

Gelelektrophorese:

Gelkammer Horizon TM 11.14	
----------------------------	--

Powersupply Model 200/2.0	BioRad
---------------------------	--------

Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration:

Ultrospec 2100	Amersham
----------------	----------

4 Ergebnisse

4.1 Antivirales Screeningsystem

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Extrakte aus phototrophen Mikroalgenkulturen hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV und HHV-6 *in vitro* getestet. Im Folgenden wird zunächst die Etablierung der für das Screening verwendeten Methoden dargestellt und im Anschluss daran auf einzelne untersuchte Substanzen näher eingegangen.

4.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Vor der Bestimmung der antiviralen Aktivität einer Substanz wurde die Toxizität gegenüber den verwendeten Zellsystemen ermittelt. Diese Untersuchungen erfolgten unter Verwendung des Zellproliferationstest WST-1, der die Aktivität mitochondrialer Enzyme erfasst.

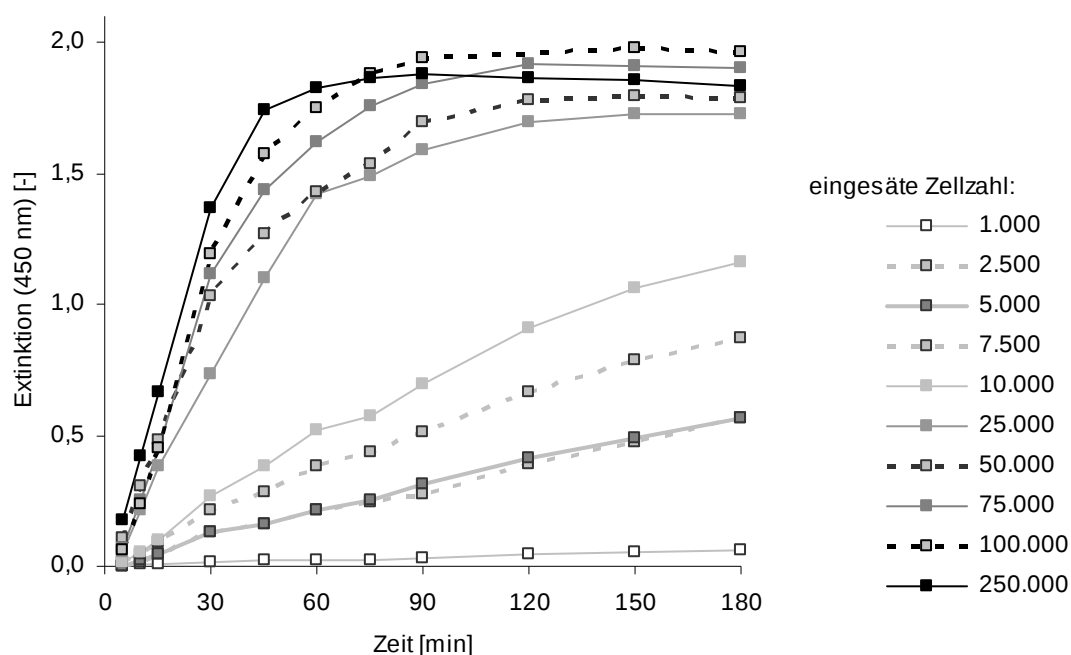


Abb. 11 WST-1-Reaktionskinetik an MRC-5-Zellen einen Tag nach Einsaat der angegebenen Zellzahlen pro Vertiefung. (Mittelwerte aus $n = 5$)

Mit dem WST-1-Reagenz wurden zunächst Reaktionskinetiken für alle drei verwendeten Zelllinien durchgeführt. In Abb. 11 ist beispielhaft die Kinetik für MRC-5-Zellen einen Tag nach Einsaat der Zellen dargestellt. Für Zellzahlen ≥ 25.000 pro Vertiefung folgt die Kinetik einer Hyperbel, bei der die Sättigung je nach Zellzahl nach etwa 90 min erreicht ist. Für Zellzahlen ≤ 10.000 pro Vertiefung ist nach 180 min noch keine Sättigung erreicht. Aufgrund dieser Daten erfolgte die Messung der Extinktion im linearen Bereich, ca. eine Stunde nach Beginn der Reaktion bei entsprechend geringer Zellzahl (1×10^4 Zellen/Vertiefung). Die Messergebnisse zeigten weiterhin eine Abhängigkeit von der

Zellpassage und dem WST-1-Reagenz, so dass vor jedem Versuch eine geeignete Zellzahl für die Einsaat bestimmt wurde. Außerdem wurde in jedem Versuch eine Zellstandardgerade erstellt, um sicherzustellen, dass die Werte im linearen Messbereich liegen.

Im Rahmen der Etablierung des Zytotoxizitätstests erfolgten Untersuchungen zur möglichen Störung der Extinktionsmessung durch Zelllysate. Dafür wurden in einem Versuch mit verschiedenen Dextransulfat (DS)-Konzentrationen die Zelllysate pelletiert und die WST-1-Extinktion des Überstandes im Vergleich zur nicht zentrifugierten Lösung gemessen (Abb. 12a). Außerdem wurde in einem weiteren Versuch die Extinktion bei 650 nm, bei der Streueffekte durch Zellreste erfasst werden, als Referenzwellenlänge gemessen (Abb. 12b). Beide Versuche zeigen, dass die in den Lösungen enthaltenen Zelltrümmer die gemessene WST-1-Extinktion nicht stören. Im Screening erfolgten die Messungen daher ohne Abzentrifugation der Zelltrümmer. Außerdem wurden die Proben ausschließlich bei 450 nm gemessen.

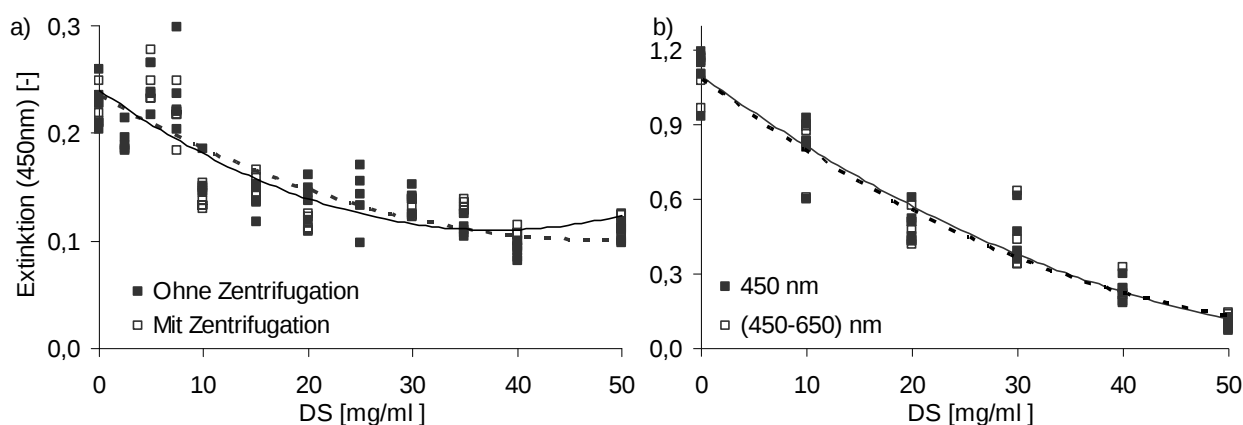


Abb. 12 Einfluss von Zelllysaten auf den WST-1-Test: a) Messung der Extinktion mit und ohne Eliminierung der Zelllysate durch Zentrifugation. b) Messung der Extinktion mit und ohne Referenzfilter bei 650 nm. (n = 5)

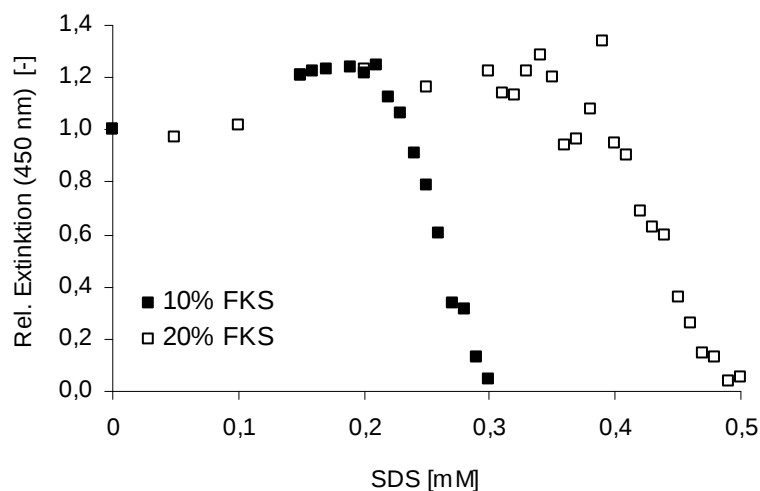


Abb. 13 Einfluss von FKS auf die Zytotoxizität von SDS. (Mittelwerte aus n = 5)

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, inwiefern FKS im Zellkulturmedium einen Einfluss auf die CC_{50} -Bestimmung hat. Abb. 13 zeigt beispielhaft, dass FKS die Zytotoxizität von Na-Dodecylsulfat (*engl.* Sodium-Dodecylsulphate, SDS) signifikant vermindert. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten und die reale Zytotoxizität möglichst unbeeinflusst zu messen, wurde im weiteren Screening der FKS-Anteil im Zellkulturansatz auf 5 % reduziert.

Der Test wurde zunächst mit den Referenzsubstanzen DS (MW 500.000) und Ganciclovir (GCV) etabliert. DS diente als Referenz für sulfatierte Polysaccharidextrakte. GCV ist das klinisch verwendete Standardtherapeutikum bei HCMV-Erkrankungen. SDS sollte die Referenz für Alkylsulfate darstellen, wurde jedoch aufgrund seiner hohen Zytotoxizität im weiteren Verlauf nicht mehr verwendet (Abb. 13). Abb. 14 zeigt die Zytotoxizität von DS und GCV gegenüber den im Screening verwendeten Wirtszelllinien. GCV beginnt bei einem physiologischem pH-Wert ab einer Konzentration von 6 mg/ml auszufallen. Außerdem ist die Substanz vergleichsweise teuer, so dass für HSB-2- und Molt-3-Zellen keine Konzentrationen über 6 mg/ml gemessen wurden.

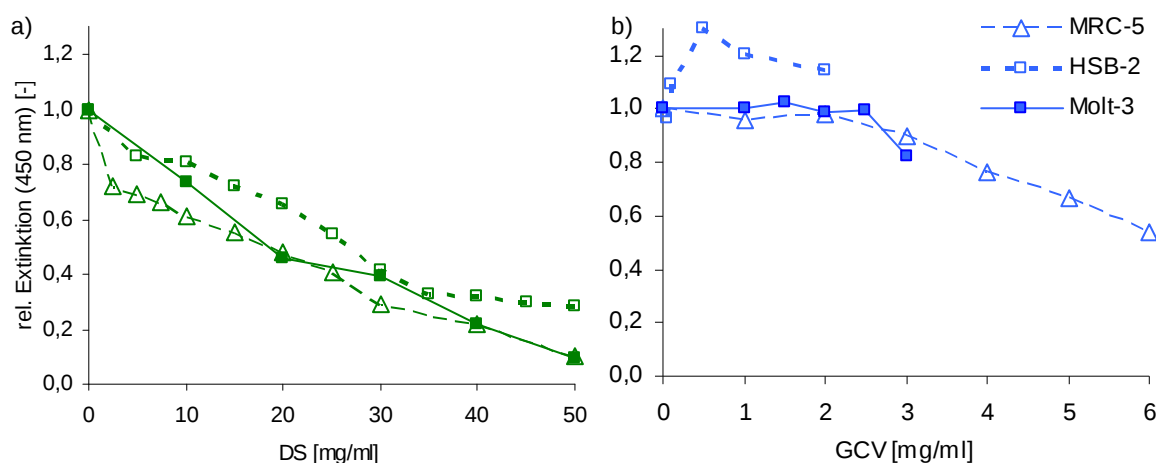


Abb. 14 Bestimmung der Zytotoxizität von DS und GCV gegenüber MRC-5-, HSB-2- und Molt-3-Zellen mittels WST-1-Test. (Mittelwerte aus $n = 5$) Die Messwerte von GCV an MRC-5-Fibroblasten wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bestimmt¹⁴⁷ und die Messwerte von DS an HSB-2 Zellen im Rahmen einer Studienarbeit¹⁴⁸.

Tab. 13 Zytotoxizität von DS und GCV gegenüber MRC-5, HSB-2 und Molt-3-Zellen im Screeningsystem, als Wirtszellen von HCMV, HHV-6A bzw. HHV-6B.

	CC_{50} (MRC-5) [mg/ml]	CC_{50} (HSB-2) [mg/ml]	CC_{50} (Molt-3) [mg/ml]
DS	21,4 ^{+5,6} - 6,42	38 ⁺⁸ - 10,2	21 ^{+6,7} - 8,0
GCV	6,0* ± 0,7	> 2*	> 3

* Die CC_{50} (GCV) gegenüber MRC-5-Fibroblasten wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bestimmt¹⁴⁷ und die CC_{50} (DS) gegenüber HSB-2 Zellen im Rahmen einer Studienarbeit¹⁴⁸.

Anhand der Messwerte wurden die jeweiligen CC_{50} bestimmt (Tab. 13). DS erwies sich im verwendeten System im Gegensatz zu GCV für alle verwendeten Wirtszellen als weniger zytotoxisch.

Für GCV und MRC-5-Zellen wurde weiterhin gezeigt, dass es nach sieben Tagen bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml nur wenig zytotoxisch ist (Abb. 15).

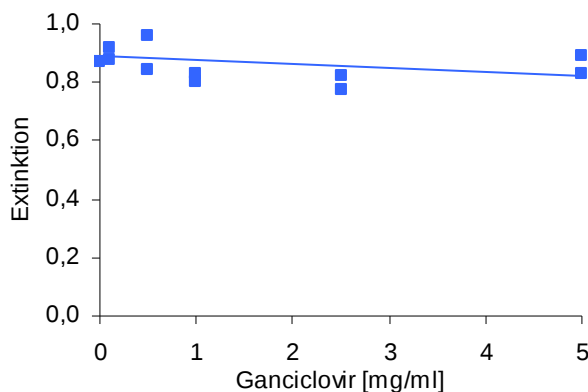


Abb. 15 WST-1-Test von GCV an MRC-5-Zellen sieben Tage nach Einsaat. Einsaat von 3000 Zellen pro Vertiefung und 1:10 Verdünnung des WST-1-Reagenz.

4.1.2 Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HCMV

Die antivirale Aktivität wurde im Screening durch immunzytochemische Peroxidasefärbung (POX) viraler Antigene durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Verfahren etabliert, um mittels QPCR die antivirale Aktivität zu erfassen. Beide Methoden sollen im Folgenden vorgestellt werden.

4.1.2.1 Immunzytochemische Bestimmung der anti-HCMV-Aktivität

Die antivirale Aktivität der Substanzen gegenüber HCMV wurde im Screening in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt, in denen MRC-5-Zellen mit HCMV infiziert und gleichzeitig standardmäßig mit der zu testenden Substanz behandelt wurden. Drei Tage nach Infektion und gleichzeitiger Substanzzugabe wurden die infizierten Zellen mittels POX der viralen Antigene rot markiert (Abb. 16) und anschließend pro Vertiefung ausgezählt. Mit dieser Methode konnte innerhalb von fünf Tagen die antivirale Aktivität einzelner Substanzen ermittelt werden.



Abb. 16 Peroxidasemarkierung (POX) viraler Antigene HCMV-infizierter MRC-5-Zellen.

Anhand von sechs unabhängigen Versuchen zur Bestimmung der IC_{50} von DS erfolgte eine Überprüfung der Genauigkeit der Methode. Hierfür wurden sechs unabhängige DS-Proben unterschiedlicher Konzentration analog zu den Extraktproben vorbereitet und anschließend analysiert. Abb. 17 zeigt die Streuung der Messwerte der sechs Versuche. Für jeden dieser sechs Versuche wurde die IC_{50} ermittelt und daraus der Mittelwert der IC_{50} (Versuch 1 bis Versuch 6) sowie die dazugehörige Standardabweichung (Tab. 14) errechnet. Für die IC_{50} ergibt sich aus den unabhängigen Versuchen eine Schwankungsbreite von 11 %.

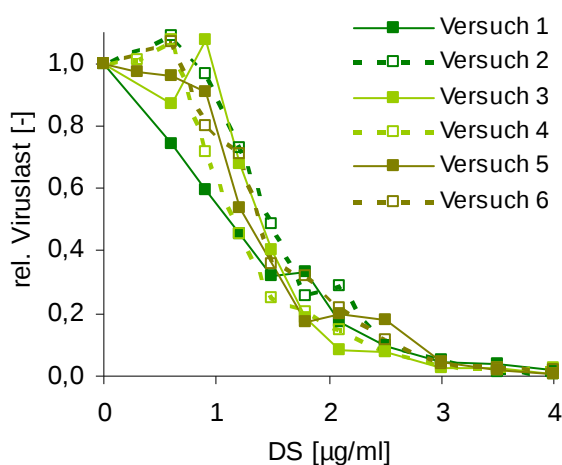


Abb. 17 IC_{50} -Bestimmung von DS. Dargestellt sind sechs unabhängige Versuche (Mittelwerte aus $n = 5$).

Tab. 14 IC₅₀-Bestimmung von DS

	IC ₅₀ (DS) [µg/ml]	pos. Abweichung [%]	neg. Abweichung [%]
Versuch 1	1,38	37	35
Versuch 2	1,37	53	38
Versuch 3	1,12	51	38
Versuch 4	1,38	23	13
Versuch 5	1,42	41	37
Versuch 6	1,10	54	37
Mittelwert	1,30	43,17	33
Standardabweichung	0,14	12,04	9,86

In Tab. 15 sind die mit dieser Methode ermittelten Werte für IC₅₀ und SI von DS und GCV dargestellt. DS und GCV erwiesen sich als Referenzsubstanzen als sehr gut geeignet. Im verwendeten System ist DS mit einem fast 40fach höheren SI wesentlich aktiver gegenüber HCMV als GCV.

Tab. 15 Antivirale Aktivität von DS und GCV im HCMV-Screeningsystem.

	IC ₅₀ (HCMV) [µg/ml]	SI (HCMV)
DS	1,3 ± 0,14	16.000
GCV*	14 ± 5	430

IC₅₀ – Substanzkonzentration, die die Zahl infizierter Zellen im Screeningansatz um 50 % reduziert, SI – Selektivitätsindex = CC₅₀ / IC₅₀, * Die IC₅₀ von GCV gegenüber HCMV wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bestimmt¹⁴⁷.

Um auszuschließen, dass Stoffwechselprodukte mit kleinerem Molekulargewicht, die beim Aufarbeitungsprozess eventuell nicht beseitigt wurden, das Screening beeinflussen, erfolgte außerdem eine Messung von CC₅₀ und IC₅₀ von Pyruvat und Glucose (Tab. 16). Insbesondere die IC₅₀ weist für beide Komponenten sehr hohe Werte auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Stoffe das Screening nicht störend beeinflussen.

Tab. 16 Zytotoxizität und antivirale Aktivität von Pyruvat, D-Glucose, PBS und DMSO im HCMV-Screeningsystem.

	CC ₅₀ (MRC-5)	IC ₅₀ (HCMV)
Pyruvat	10 mg/ml	3,75 mg/ml
D-Glucose	35 mg/ml	13 mg/ml
PBS	38,1 % v/v	>50 % v/v
DMSO	5 % v/v	>5 % v/v
Methanol	4,8% v/v	

Polysaccharidhaltige Extrakte wurden in Vorbereitung für das antivirale Screening zunächst in PBS gelöst, autoklaviert und anschließend in Zellkulturmedium verdünnt. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von PBS im Screeningsystem untersucht (Tab. 16). PBS verursacht auch in hohen Konzentrationen ($CC_{50} = 38\%$ v/v) keinen negativen Effekt auf die Screeningergebnisse.

Des Weiteren dienten DMSO oder Methanol als Lösungsmittel für stark hydrophobe Extrakte. Erwartungsgemäß sind beide bereits in kleinen Konzentrationen ($CC_{50} \cong 5\%$ v/v) zytotoxisch (Tab. 16). Aus diesem Grund wurden hydrophobe Extrakte im Screening mit einer maximalen Endkonzentration von 2,5 % v/v DMSO oder Methanol eingesetzt. Außerdem wurde entweder eine Kontrolle ohne Extrakt mit gleicher Verdünnung mitgeführt oder die Substanz in Medium mit gleicher Lösungsmittelkonzentration verdünnt.

Ferner wurde der Einfluss von Proteinen auf das antivirale Screeningsystem untersucht. Abb. 18a zeigt, dass z. B. bovines Serumalbumin (BSA) die Screeningergebnisse signifikant beeinflusst. Folglich könnte auch der FKS-Anteil im Medium einen Einfluss auf die antivirale Aktivität der zu untersuchenden Substanzen haben: Wie anhand von Abb. 18b zu erkennen ist, nimmt die IC_{50} von DS mit zunehmender FKS-Konzentration zu, das heißt die antivirale Aktivität von DS gegenüber HCMV nimmt mit zunehmendem FKS-Anteil im Medium ab. Für eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde im Screeningsystem durchgehend eine FKS-Konzentration von 5 % im Zellkulturmedium verwendet.

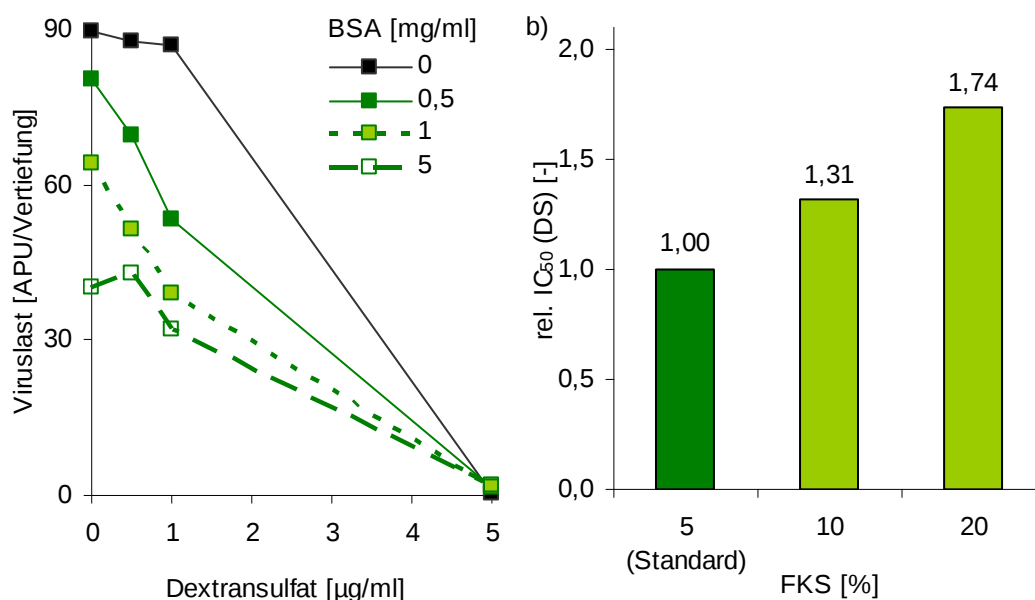


Abb. 18 Einfluss von Proteinen auf die HCMV-Replikation im antiviralen Screening. a) Einfluss von BSA auf die Viruslast bei verschiedenen DS-Konzentrationen b) Veränderung der IC_{50} (HCMV) von DS bei verschiedenen FKS-Konzentrationen bezogen auf die IC_{50} bei 5 % FKS (Standard FKS-Anteil im Zellkulturmedium im antiviralen Screening). (APU – Antigen producing units, Mittelwerte aus $n = 5$)

Die hier vorgestellte Methode zum antiviralen Screening war sehr gut geeignet, sämtliche aus den Mikroalgen isolierten Substanzen hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV zu screenen. Mit dem Ziel, die Screeninguntersuchungen zu beschleunigen, wurde das AEC-Substrat für die Peroxidasefärbung durch ein lösliches Substrat ersetzt. Dadurch wäre die Viruslast im Mikrotiterplattenleser messbar und hätte nicht anhand infizierter Zellen pro Vertiefung ausgezählt werden müssen. Als lösliche Substrate wurden o-Phenyldiaminhydrochlorid (OPD, Sigma-Aldrich) und BM-Blue (Roche) nach den Protokollen der Hersteller ausgetestet. Beide erwiesen sich als ungeeignet, da der Fehlerbereich der Messwerte zu hoch war und sich die erhaltenen Werte nicht reproduzieren ließen.

4.1.2.2 Bestimmung der anti-HCMV-Aktivität mittels QPCR

Die Verifizierung der Daten, die im Screeningsystem immunzytochemisch gewonnen wurden, erfolgte unter Verwendung eines QPCR-Assays. Für diese Methode wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen ausgesät, einen Tag später mit einer $\text{MOI} = 0,35$ infiziert und mit den antiviralen Substanzen behandelt. Drei Tag nach Infektion (*lat. post infectionem, p. i.*) wurden die Zellen geerntet, die DNA isoliert und der Anteil viraler DNA mittels QPCR bestimmt.

Die IC_{50} der Referenzsubstanzen DS und GCV, deren Bestimmung mit der QPCR erfolgte, sind im Vergleich zu den IC_{50} , die mittels Peroxidasefärbung bestimmt wurden, in Tab. 17 dargestellt. Die Ergebnisse der QPCR und der Peroxidasefärbung liegen in der gleichen Größenordnung und somit ist die Methode der QPCR zur Bestimmung der HCMV-Last geeignet.

Tab. 17 IC_{50} von DS und GCV gegenüber HCMV ermittelt mittels QPCR im Vergleich zur Peroxidasefärbung (POX).

	IC_{50} (POX) [$\mu\text{g/ml}$]	IC_{50} (QPCR) [$\mu\text{g/ml}$]
DS	1,3 $\pm 0,14$	0,3 $\begin{matrix} + 0,2 \\ - 0,3 \end{matrix}$
GCV*	15 ± 5	6,7 $\begin{matrix} + 5,3 \\ - 6,2 \end{matrix}$

* Die IC_{50} von GCV gegenüber HCMV wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bestimmt ¹⁴⁷.

Darüber hinaus sollte die QPCR verwendet werden, um Infektionsverläufe zu beobachten. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse eines Versuches, in dem die HCMV-Last unter Einfluss von GCV im zeitlichen Verlauf über neun Tage verfolgt wurde. Es ist zu erkennen, dass auch über einen Zeitraum von neun Tagen die Viruslast von der eingesetzten GCV-Konzentration abhängig ist. Am sechsten Tag *p. i.* wurden die Zellen durch einen Mediumwechsel gefüttert, wodurch Virus aus der Kultur entnommen wurde, was das Absinken der Viruslast am neunten Tag erklären könnte.

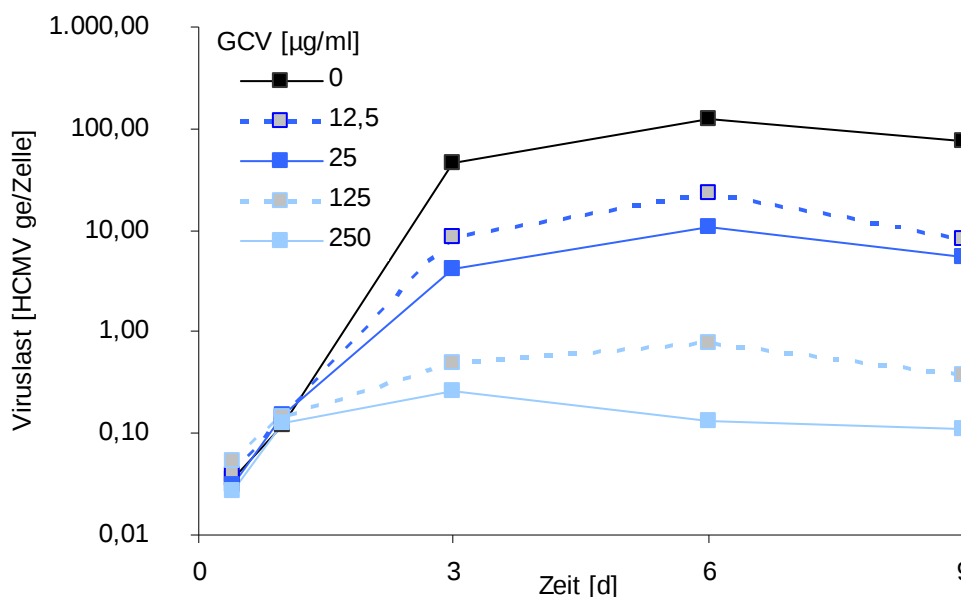


Abb. 19 Einfluss von GCV auf die HCMV-Last im zeitlichen Verlauf. (Mittelwerte aus $n = 3$, $MOI = 0,35$)

4.1.3 Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HHV-6

Im Gegensatz zu HCMV weist HHV-6 eine deutlich geringere Virulenz auf: Die Infektionen dauern länger und die erzielten Viruslasten sind wesentlich geringer. Außerdem wird HHV-6 auf T-Lymphozyten als Wirtszellen kultiviert. Hierbei handelt es sich um Suspensionszellen, wodurch klassische, virologische Methoden zur Bestimmung des Virustiters, wie z. B. der Plaque-Test nicht anwendbar sind. In einer gut mit HHV-6 durchinfizierten Kultur sind frühestens nach etwa 6-7 Tagen alle Zellen positiv für virale Antigene. Für das Screening sind solche lange Zeiträume wenig geeignet. Daher wurde die Viruslast ausschließlich mit der QPCR verfolgt, da mit dieser Methode schon zu früheren Zeitpunkten eine Virusreplikation nachweisbar ist. In allen Versuchen wurden Virusstocks verwendet, die aus eingefrorenen Zellen (80-100 % HHV-6-antigenpositiv) bestanden. Diese Stocks wurden schnell aufgetaut, wobei die Zellstruktur aufgrund fehlenden DMSOs zerstört und die Viren freigesetzt wurden. Mit dem Überstand dieser Stocks konnten anschließend neue Zellen infiziert werden. Abb. 20a zeigt den Verlauf einer HHV-6A-Infektion: Die Zunahme der viralen DNA und der Zahl HHV-6-antigenpositiver Zellen verlaufen etwa gleich.

Um so wenig wie möglich von der zu testenden Substanz im Screening zu verbrauchen, sollten die Versuche in einem kleinen Volumen erfolgen. Daher wurde zunächst versucht, die HHV-6-Infektion in einem kleinen Maßstab durchzuführen. Dabei erwiesen sich Infektionen in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen als das kleinst mögliche Volumen für erfolgreiche HHV-6-Infektionen (siehe Abb. 20b).

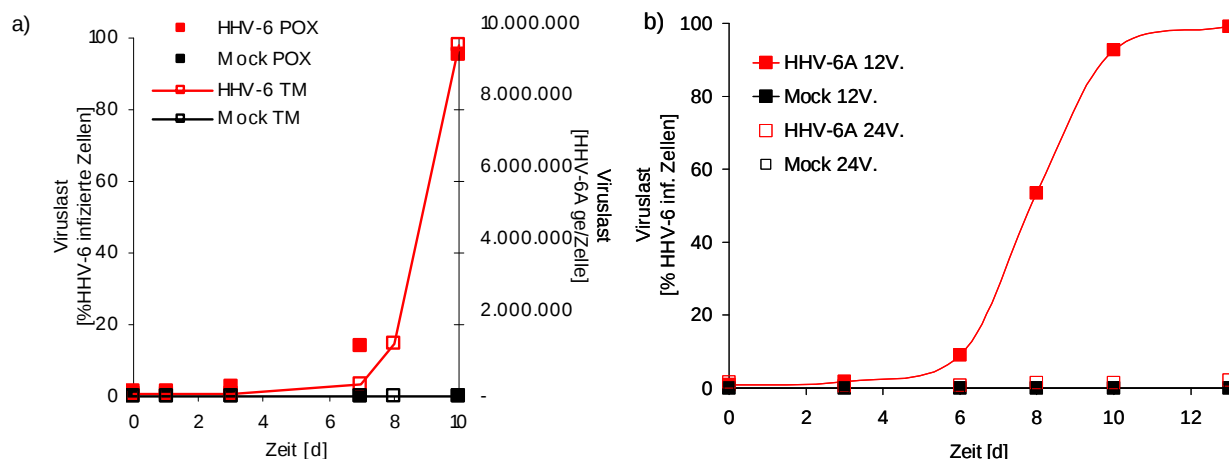


Abb. 20 Etablierung des HHV-6 Screeningsystems: a) Kinetik einer HHV-6A-Infektion von HSB-2-Zellen, verfolgt mittels Peroxidasefärbung (POX, linke y-Achse) und mittels QPCR (rechte y-Achse); b) Vergleich der Kinetik einer HHV-6A-Infektion in Zellkulturplatten mit 12 und 24 Vertiefungen (V.).

Das Screeningsystem wurde im Rahmen einer Studienarbeit etabliert ¹⁴⁹.

Im Folgenden wurden HHV-6A- und HHV-6B-Infektionen mit DS bzw. GCV durchgeführt und die Viruslast mittels QPCR nach einem, drei und sieben Tagen p. i. erfasst. GCV erwies sich gegenüber HSB-2- und Molt-3-Zellen über einen längeren Zeitraum bereits bei kleinen Konzentrationen als sehr toxisch. Für HHV-6A erwies sich eine Messung der Viruslast einen Tag p. i., für HHV-6B war ein Messzeitpunkt von drei Tagen p. i. geeignet. In Abb. 21 sind die konzentrationsabhängigen Viruslasten von HHV-6A (Abb. 21a) und HHV-6B (Abb. 21b) bei Behandlung mit GCV dargestellt. Bei allen Versuchen wurde zusätzlich die Zahl infizierter Zellen in einem Ansatz ohne Virostatikum sieben Tage p. i. kontrolliert.

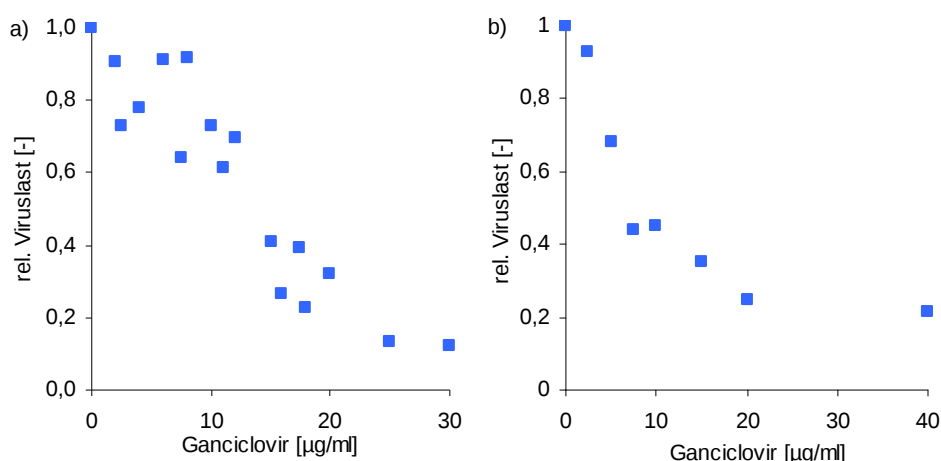


Abb. 21 Viruslast einen Tag p. i. mit HHV-6A (a) bzw. drei Tage p. i. mit HHV-6B (b) bei gleichzeitiger Behandlung mit GCV.

Die IC₅₀ Bestimmung gegenüber HHV-6A wurde im Rahmen einer Studienarbeit etabliert ¹⁴⁸. Mittelwerte aus n = 3.

In Tab. 18 sind die auf diese Weise erzielten IC₅₀ sowie die SI für DS und GCV gegen HHV-6A und HHV-6B zusammengefasst.

Tab. 18 IC₅₀ und SI von DS und GCV gegenüber HHV-6A (ein Tag p. i.) und HHV-6B (drei Tage p. i.)

	IC ₅₀ (HHV-6A) [µg/ml]	SI (HHV-6A / HSB-2)	IC ₅₀ (HHV-6B) [µg/ml]	SI (HHV-6B / Molt-3)
DS	16 ±11	2390	-	-
GCV	13* +15 -13	>150	12±5	>250

* Die IC₅₀ von GCV gegenüber HHV-6A wurde im Rahmen einer Studienarbeit bestimmt ¹⁴⁸.

Alternativ zur QPCR sollte zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der WST-1-Test verwendet werden. Mit dem WST-1-Test wird die Proliferation der Zellen erfasst. Bei infizierten Zellen wird in der Regel der Zellzyklus unterbrochen, wodurch ihre Proliferation vermindert wird. Eine antivirale Substanz müsste diesen Effekt aufheben, was letztlich mit dem WST-1-Test messbar sein sollte. Für HCMV wurde bereits eine Anwendung des WST-1-Tests zur IC₅₀-Bestimmung beschrieben¹⁵⁰. Aufgrund der sehr verschiedenen Infektiosität des HHV-6 und des vergleichsweise langen Replikationszyklus ließen sich Versuchsergebnisse mit dieser Methode nicht reproduzieren und sie war daher für das antivirale Screening gegen HHV-6 ungeeignet.

4.1.4 Virale mRNA-Expression

Zur detaillierteren Charakterisierung der antiviralen Aktivität wirksamer Substanzen wurden QPCR-Assays für die Untersuchung der viralen RNA-Expression folgender charakteristischer HCMV-Proteine etabliert:

- IE-Proteine: UL36 bzw. gp42 (Transaktivator, Tegumentprotein)
US22 bzw. gp140 (Transaktivator, Tegumentprotein)
- DE-Proteine: UL54 bzw. gp60 (DNA-Polymerase)
UL70 bzw. gp65 (Helikase-Primase-Komplex)
- L-Proteine: UL46 bzw. gp51 (Minorkapsidprotein)
UL86 bzw. gp81 (Majorkapsidprotein)

Die PCR-Produkte jedes Assays wurden in *E. coli* kloniert. Anschließend wurden die Bedingungen für die einzelnen QPCR-Assays mit Hilfe der isolierten Plasmid-DNA so optimiert, dass die PCR-Assays jeweils eine Effizienz von > 90 % aufweisen. Das bedeutet, dass mit jedem PCR-Zyklus die bereits vorliegenden Kopien des entsprechenden PCR-Amplifikats mit einer Effizienz von > 90 % verdoppelt werden.

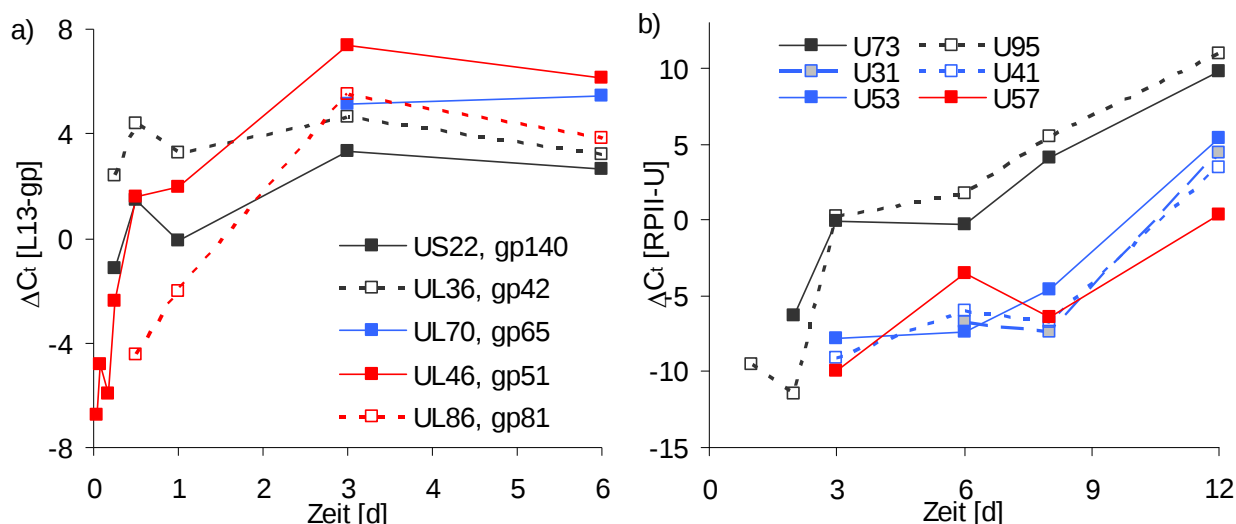


Abb. 22 mRNA-Expression der HCMV-Genen US22, UL36, UL70, UL46 und UL86 im Verlauf einer HCMV-Infektion, MOI = 0,35 (a) und mRNA-Expression der HHV-6A-Genen U73 (origin binding protein), U95 (immediate protein 2, IE2), U31 (large tegument protein), U41 (major DNA-binding protein), U53 (protease/assembly protein), U57 (major capsid protein) im zeitlichen Verlauf einer HHV-6A-Infektion (b).

Für HCMV (a) wurde das ribosomale Protein L13 und für HHV-6A (b) die RNA-Polymerase II (RPII) als Referenzgen verwendet. Die Differenz der C_t -Werte (ΔC_t) ist so aufgetragen, dass ein höherer Zahlenwert einer höheren mRNA-Expression entspricht. Die Verläufe beginnen zu dem Zeitpunkt, an dem erstmalig die entsprechende mRNA nachgewiesen werden konnte. Schwarz IE-Genen, Blau-DE-Genen, Rot-L-Genen. Die Daten der Kinetik der HHV-6A mRNA-Expression stammen von Aleksandar Radonić, Onkologie/Hämatologie, Charité CCM. (Mittelwerte aus $n = 2$)

Von den infizierten Zellen wurde einerseits die mRNA-Expression eines zellulären housekeeping-Gens und andererseits die Expression einer viralen mRNA ermittelt. Die Expressionsniveaus (angegeben in C_t -Werten der QPCR) wurden anschließend miteinander verrechnet, wobei das konstant exprimierte housekeeping-Gen als Referenzgen fungiert. Abb. 22 zeigt die mRNA-Expressionskinetik verschiedener Proteine für HCMV (Abb. 22a) und HHV-6A (Abb. 22b). Aufgrund der langsamen Replikation von HHV-6 beginnt die Expression der HHV-6A-Genen im Vergleich zu den HCMV-Genen später. Bei HHV-6A ist außerdem erkennbar, dass die mRNA-Expression der frühen Proteine zuerst beginnt und die anderen folgen, bei HCMV ist der Prozess auf mRNA-Ebene nicht erkennbar. Daher wurde zunächst eine geeignete HCMV-MOI für die Versuche ausgetestet und anschließend der Einfluss von DS auf die mRNA-Expression untersucht.

Abb. 23 zeigt die Expressionskinetik dieser Gene einerseits in Abhängigkeit von der MOI, mit der die Zellen infiziert wurden, und andererseits bei Behandlung der Infektion mit DS. Je geringer die initiale Viruslast (MOI), desto kleiner die Expression der einzelnen RNAs bzw. desto später der Zeitpunkt, ab dem sie nachweisbar sind. DS führte ebenfalls zu einer Reduktion der RNA-Expression.

Im Gegensatz dazu war der antivirale Effekt von GCV auf mRNA-Ebene frühestens und mit geringen Unterschieden 24 h p. i. und Behandlung zu erkennen (Abb. 24). GCV hemmt die Replikation der viralen DNA und wirkte demnach erst zu einem Zeitpunkt, nachdem bereits erste Proteinexpressionen erfolgt sind.

Mit den etablierten QPCR-Assays war es also möglich, den Einfluss antiviraler Substanzen auf die Infektionskinetik auch auf Transkriptionsebene zu verfolgen.

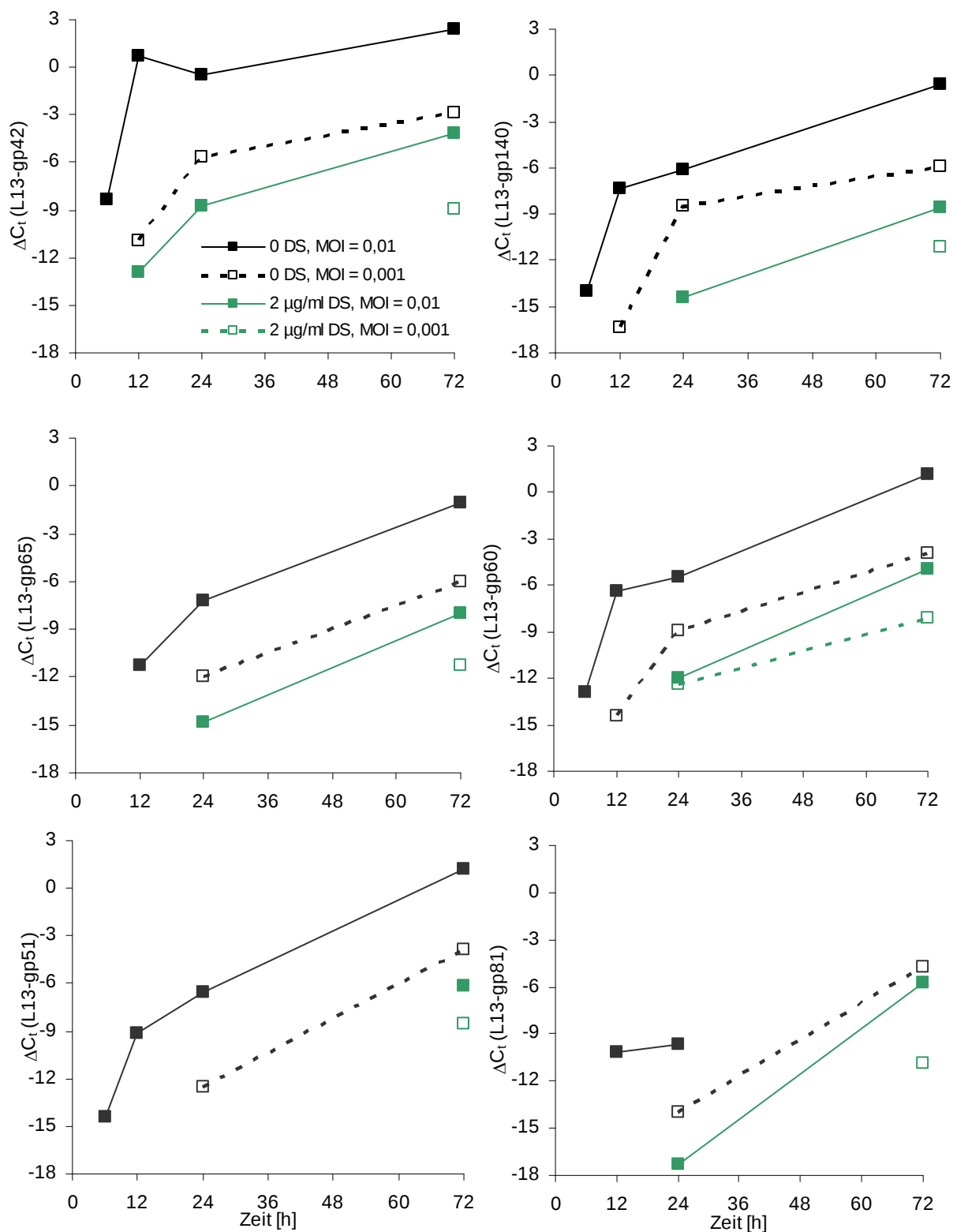


Abb. 23 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI = 0,01 und 0,001 bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne 2 µg/ml DS. Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Mittelwerte aus n = 3)

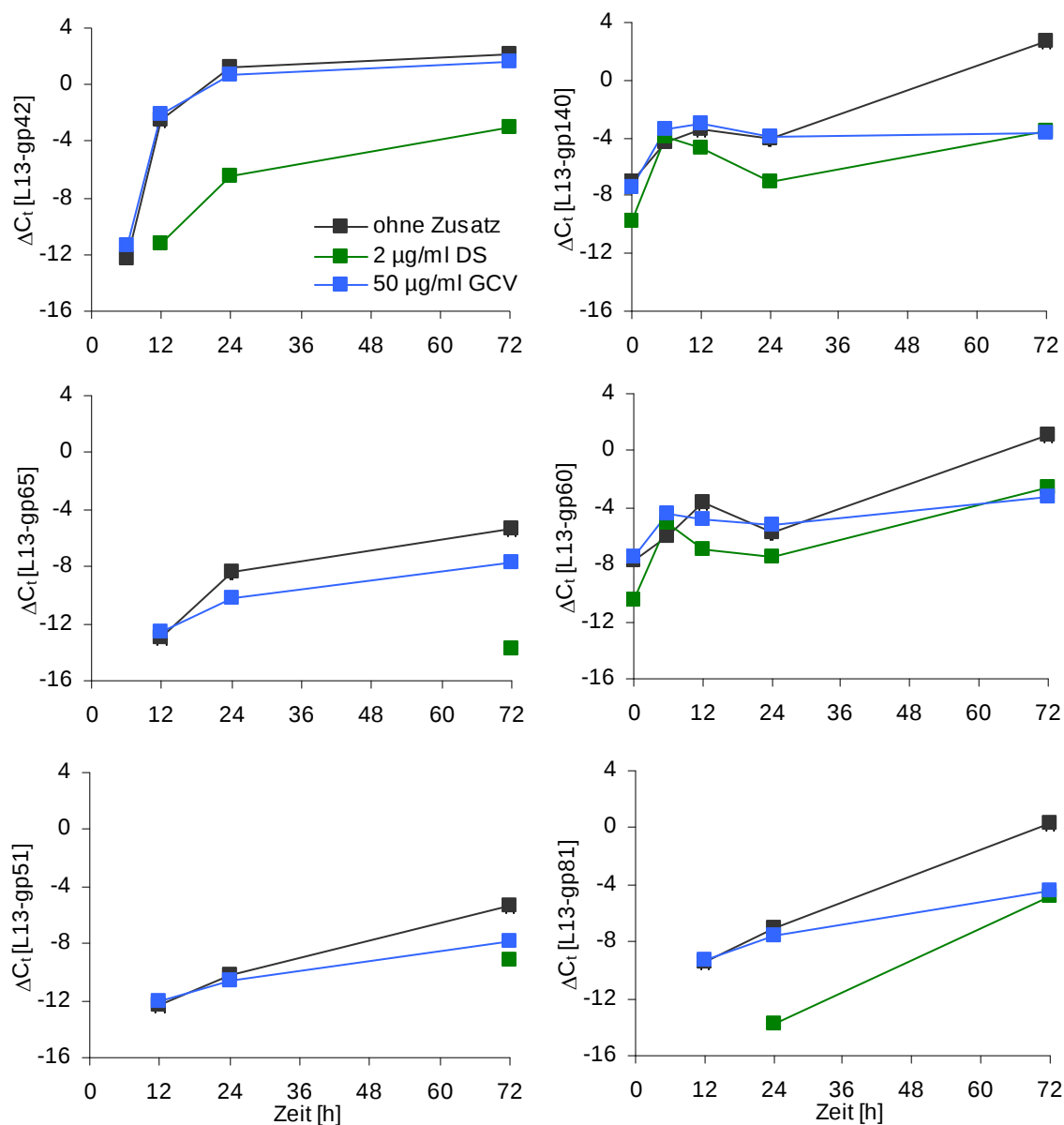


Abb. 24 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI = 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit DS, GCV und ohne Zusatz. Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Mittelwerte aus n = 2)

Wie für HCMV konnte auch für HHV-6A gezeigt werden, dass die Zugabe von DS zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der viralen mRNA-Expression führt. Abb. 25 zeigt dies beispielhaft für drei der ausgewählten Gene.

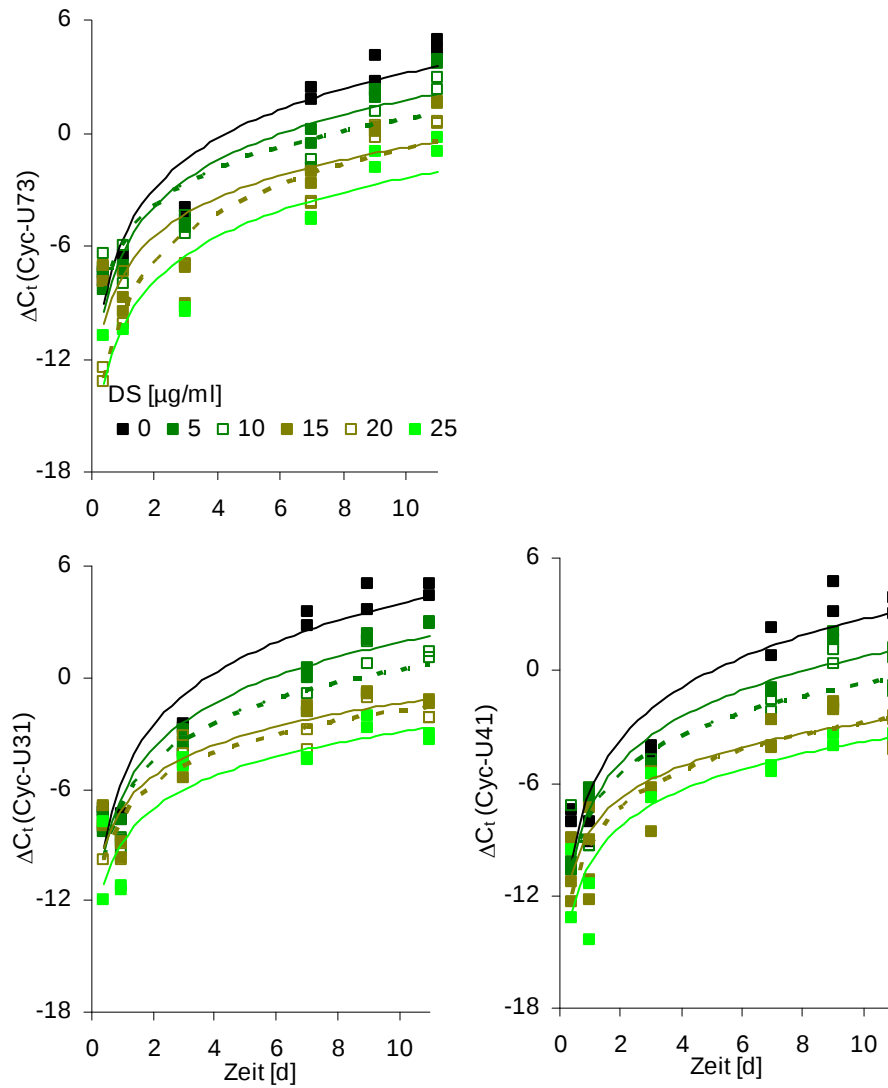


Abb. 25 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HHV-6A-Infektion von HSB-2-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit DS. Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen Cyclophilin A (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Logarithmische Ausgleichskurven mit $n = 2$ pro Zeitpunkt)

4.2 Mikrobielle Substanzen mit anti- β -Herpesvirusaktivitäten

Im Rahmen des Screenings wurden insgesamt fast 500 unterschiedlich präparierte, mikrobielle Extrakte aus verschiedenen Mikroalgen (Tab. 19) getestet. Bei den Extrakten handelte es sich sowohl um intra- als auch extrazelluläre Produkte, die über verschiedene Aufarbeitungsschritte isoliert wurden und deren Extraktion partiell mehrfach reproduziert wurde. Die Auswahl und Kultur der Mikroalgen, die Aufarbeitung der Extrakte und die Strukturaufklärung der Wirkstoffe erfolgten von Tanja König und Ivonne Naumann am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, unter Leitung von Prof. Dr. Rainer Buchholz.

Tab. 19 Liste der Mikroalgen, deren aPS- und Sulfolipidextrakte im antiviralen Screening untersucht wurden.

Abteilung	Mikroorganismus
Rhodophyta	<i>Dixoniella grisea</i>
	<i>Porphyridium purpureum</i>
	<i>Porphyridium spezie</i>
Haptophyta	<i>Pavlova lutheri</i>
Cyanophyta	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> NIES 39
	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> NIES 46
	<i>Nostoc punctiforme</i>
	<i>Scytonema hofmanni</i>
Heterokontophyta	<i>Heterosigma carterae</i>
	<i>Ochromonas danica</i>
	<i>Phaeodactylum tricornutum 1a</i>
	<i>Phaeodactylum tricornutum 1b</i>
	<i>Phaeodactylum tricornutum 6</i>
Chlorophyta	<i>Chlorella kessleri</i>
	<i>Chlorella salina</i>
	<i>Chlorella species</i>
	<i>Chlorella vulgaris</i>
	<i>Dunaliella parva</i>
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>

Mit Hilfe der beschriebenen Screeningmethode (siehe Kap. 4.1.1 und 4.1.2.1) wurden anionische Polysaccharide (aPS) mit einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV aus *Porphyridium purpureum*, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, Chlorosulfolipidfraktionen aus *Ochromonas danica* und verschiedene Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG) aus

mehreren marinen Organismen identifiziert, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Darüber hinaus wurden aPS mit einer antiviralen Aktivität gegen HCMV aus *Porphyridium species* und *Dixoniella grisea* isoliert jedoch nicht näher untersucht, da für diese Spezies keine monoseptischen Mikroalgenkulturen zur Verfügung stehen.

4.2.1 Anionisches Exopolysaccharid aus *Porphyridium purpureum*

Bei dem aus dem Rhodophyten *Porphyridium purpureum* isolierten anionischen Exopolysaccharid, fortan als EPS abgekürzt, handelt es sich um ein stark verzweigtes, heterogenes Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von $> 10^6$ g/mol, bestehend aus den Saccharidmonomeren Galactose, Xylose, Glucose und Glucuronsäure, wobei etwa jedes sechste Monosaccharid sulfatiert ist¹⁵¹. Es wurde durch repetitive Cross-Flow Ultrafiltration aus dem zentrifugierten Kulturüberstand gewonnen.

Mit Hilfe der in Kap. 4.1.1 und 4.1.2.1 beschriebenen Screeningmethoden wurden die Zytotoxizität und die antivirale Aktivität von EPS gegen HCMV bestimmt. Abb. 26a zeigt die Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Zellen von EPS im Vergleich zu GCV. Über einer Konzentration von 5 mg/ml war die Substanz aufgrund ihrer hohen Viskosität in den Zellkulturansätzen nicht verwendbar. In Abb. 26b ist die konzentrationsabhängige Inhibierung der HCMV-Replikation durch EPS im Vergleich zu GCV zu erkennen. Beide Substanzen weisen eine ähnliche, sehr geringe Zytoxizität auf (CC_{50} (GCV) = 6 mg/ml, CC_{50} (EPS) > 5 mg/ml). GCV (IC_{50} = 16 µg/ml) besitzt dagegen die bessere antivirale Aktivität gegen HCMV (IC_{50} (EPS) = 90 µg/ml).

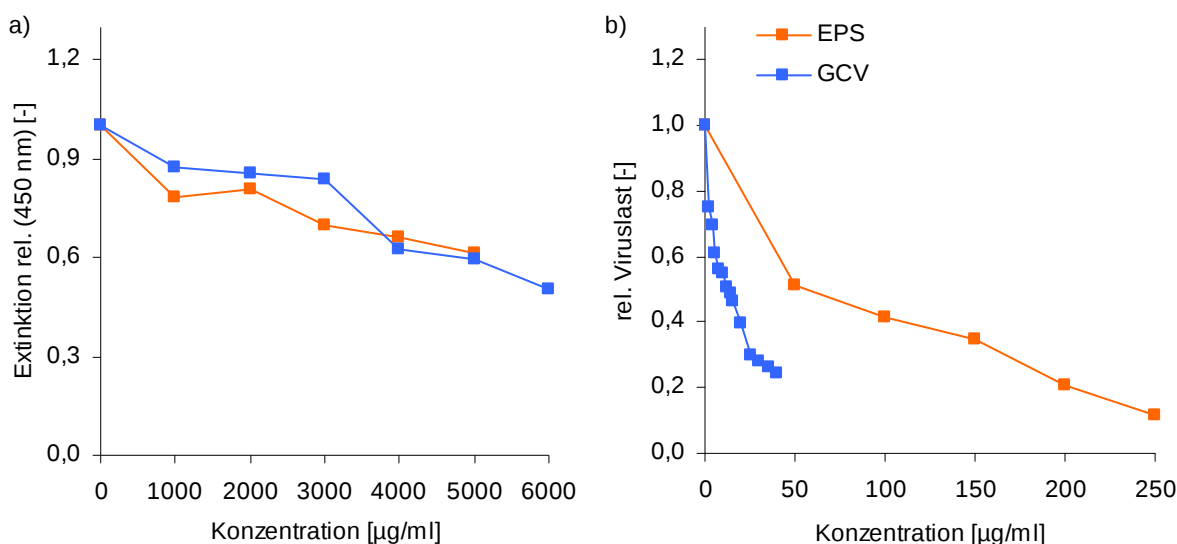


Abb. 26 Zytotoxizität gegen MRC-5-Zellen (a) und antivirale Aktivität gegen HCMV (b) von EPS aus *Porphyridium purpureum* und GCV im antiviralen Screening. (Mittelwerte aus n = 5)

Die Zytotoxizität wurde mittels WST-1-Tests (a) und die antivirale Aktivität mittels Peroxidasefärbung viraler Antigene (b) einen bzw. drei Tage nach Behandlung und Infektion bestimmt.

Im antiviralen Standardscreening wird die Zytotoxizität der Extrakte bereits nach eintägiger Behandlung bestimmt. Um Aussagen über die Zytotoxizität bei längerer Behandlung der

Zellen treffen zu können, wurde der WST-1-Test außerdem nach einem Zeitraum von drei und sieben Tagen EPS-Behandlung durchgeführt.

Tab. 20. Zytotoxizität von EPS aus *Porphyridium purpureum* gegenüber MRC-5-Zellen nach 1-, 3- und 7-tägiger Behandlung. Die CC_{50} wurde mit dem WST-1-Zellproliferationstest bestimmt.

Dauer [d]	Eingesäte Zellzahl pro Vertiefung	CC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
1	10000	> 5000
3	4000	1700 ⁺¹⁵⁰ -160
7	1000	3900 ⁺¹⁶⁰⁰ -1700

Die Ergebnisse hierzu zeigt Tab. 20. Je länger die Dauer des Versuches, desto weniger Zellen konnten für den Test eingesät werden, da sie während des Versuches nicht nachgefüttert wurden. Auch bei langer Behandlungsdauer der Zellen mit dem EPS ist die Zytotoxizität vergleichsweise gering ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$), obwohl aufgrund der geringeren Zellzahl mehr Substanz auf die einzelnen Zellen einwirkte.

Zusätzlich zur Zytotoxizität wurde die antivirale Aktivität des EPS im zeitlichen Verlauf untersucht. Dazu wurden MRC-5-Zellen infiziert, gleichzeitig mit $500 \mu\text{g/ml}$ EPS behandelt und sowohl Virusüberstand als auch EPS während des Versuches auf den Zellen belassen. Abb. 27 zeigt die Kinetik der HCMV-Infektion bei Behandlung mit den EPS. Auch sieben Tage p. i. lässt sich noch eine deutliche Inhibierung der HCMV-Replikation durch EPS nachweisen.

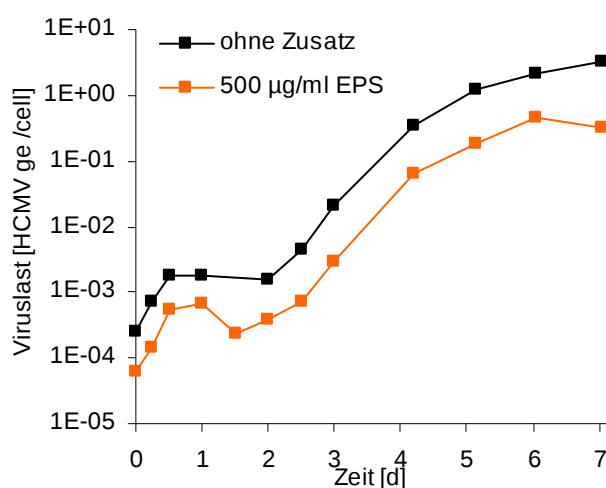


Abb. 27 Kinetik der HCMV-Infektion unter Einfluss von EPS aus *Porphyridium purpureum*. Die Viruslast wurde durch QPCR ermittelt. (MOI = 0,01; Mittelwerte aus n = 2)

In Abb. 28 ist die Kinetik der viralen mRNA-Expression in HCMV-infizierten MRC-5-Fibroblasten mit und ohne Behandlung durch EPS über sieben Tage dargestellt. Generell werden bei Behandlung mit EPS die Gene auf niedrigerem Niveau exprimiert und die Expression ist erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar als ohne Behandlung. Somit lässt

sich die anti-HCMV-Aktivität von EPS auch auf Transkriptionsniveau wiederfinden. gp65 wird sehr viel schwächer als die anderen Gene exprimiert. Daher liegt die Expression von gp65 bei Behandlung mit EPS wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze. Ferner fällt auf, dass zwischen zwei und drei Tagen nach Infektion die Expression aller Gene nahezu konstant verläuft, am vierten Tag wieder zunimmt, um anschließend wieder zu stagnieren. Dieser „doppelt sigmoidale“ Verlauf könnte wahrscheinlich durch den Replikationszyklus von HCMV verursacht sein, der nach etwa drei Tagen beendet ist. Somit wäre zu Beginn eines Infektionszyklus (Tage 1-2 und 4-5) jeweils ein Anstieg der viralen RNA-Expression zu beobachten und zum Ende (Tag 3, 6-7) wäre die RNA-Expression bereits abgeschlossen.

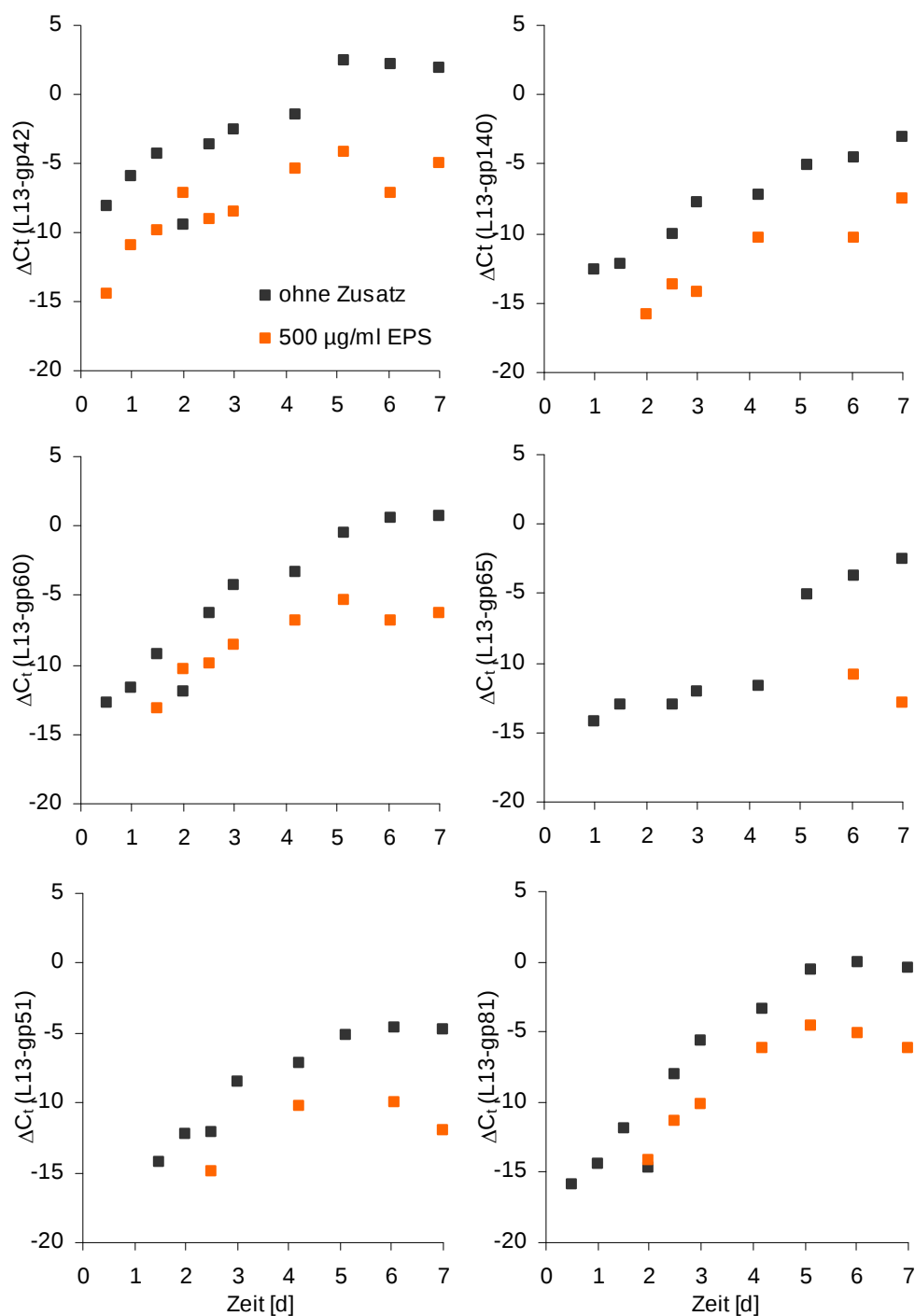


Abb. 28 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit EPS und ohne Zusatz. (Mittelwerte aus n = 2)

Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen, sofern die Expression von Letzterem messbar war.

Neben der antiviralen Aktivität der mikrobiellen Substanz aus *Porphyridium purpureum* gegenüber HCMV wurde die antivirale Aktivität gegenüber HHV-6A mit Hilfe der im Kap. 4.1.3 vorgestellten QPCR-Methode untersucht. Abb. 29 zeigt, dass schon bei 25 µg/ml EPS die HHV-6A-Replikation deutlich gehemmt ist.

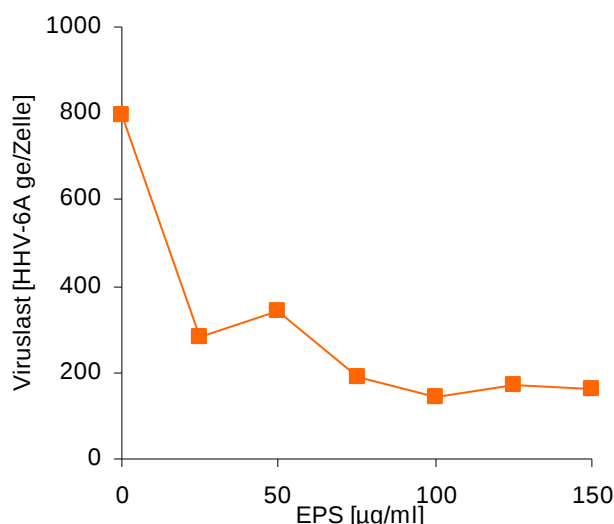


Abb. 29 Abhängigkeit der HHV-6A-Viruslast von der EPS-Konzentration aus *Porphyridium purpureum* einen Tag p. i. (Mittelwerte aus n = 3)

In Tab. 21 sind die Zytotoxizität und die antiviralen Aktivitäten von EPS gegen HCMV und gegen HHV-6A zusammengefasst. Die Substanz ist auch gegenüber HSB-2-Zellen wenig toxisch und inhibiert die HHV-6A-Replikation stärker als die HCMV-Replikation.

Für das anionische EPS des Rhodophyten *Porphyridium purpureum* konnte demnach eine ausgeprägte antivirale Aktivität gegenüber den β -Herpesviren HCMV und HHV-6A ermittelt werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese Substanz nur gering zytotoxisch ist. Im Anschluss an diese Ergebnisse wurde EPS hinsichtlich weiterer antiviraler Aktivitäten untersucht. Dabei konnte Dr. Andreas Nitsche (Robert-Koch-Institut, ZBS-1, Berlin) auch eine inhibierende Wirkung auf die VV-Replikation nachweisen.

Tab. 21 Zytotoxizität und antivirale Aktivität von EPS aus *Porphyridium purpureum* gegenüber HCMV und HHV-6A

	MRC-5 / HCMV				HSB-2 / HHV-6A		
	CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI		CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI
EPS	> 5000	90 ⁺²⁹ -31	> 56		> 5000	< 25	> 200

4.2.2 Anionische Polysaccharide aus *Arthrospira platensis*

Aus der Biomasse des Cyanobakteriums *Arthrospira* (früher bezeichnet als *Spirulina*) *platensis* NIES-39 wurde das sulfathaltige, aPS TK V2 mit einer antiviralen Aktivität gegen HCMV isoliert. Dieses Extrakt enthält wahrscheinlich das in der Literatur bereits beschriebene Ca-Spirulan (Kap. 1.2.4.3). Des Weiteren wurde das davon zu unterscheidende extrazelluläre Produkt TK V3 isoliert, welches sich aus vier Komponenten mit Molekulargewichten zwischen 10^3 und 10^6 g/mol zusammensetzt. Bei diesen Komponenten handelt es sich zu ca. 35 % (w/w) um Polysaccharide und zu ca. 50 % (w/w)

um Proteine. Die Polysaccharide bestehen in der Hauptsache aus Rhamnose sowie außerdem aus Methylrhamnose und Glucose. Ferner konnten die Saccharidmonomere Xylose, Galactose, Glucuronsäure und Mannose nachgewiesen werden¹⁵¹. In weiteren Aufreinigungsschritten konnte das Polysaccharid TK IV von den Proteinen getrennt werden. In den meisten, der im Folgenden vorgestellten Versuchen wurde jedoch TK V3 verwendet. Die *Arthrospira*-Kultur und die Extraktaufarbeitung für TK V2 und TK V3 ist ebenfalls in der Promotionsschrift von Frau Dr. Tanja König beschrieben¹⁵¹.

Abb. 30 zeigt die Zytotoxizität und die anti-HCMV-Aktivität von TK V2 und TK V3. Im Vergleich zu GCV sind diese Substanzen gegen MRC-5-Zellen weniger toxisch. Weiterhin konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der HCMV-Replikation gezeigt werden, wobei die antivirale Aktivität von TK V2 im Vergleich zu GCV geringer (2,6fach bzgl. IC_{50}) und die von TK V3 größer (3,8fach bzgl. IC_{50}) ist. Die Abbildung verdeutlicht weiterhin, dass durch TK V3 HCMV bereits innerhalb eines Replikationszyklus (etwa drei Tage, entspricht dem Inkubationszeitraum im Screening) bei vergleichsweise geringer Konzentration von etwa 20 $\mu\text{g/ml}$ komplett inhibiert werden konnte, was mit Hilfe von GCV nicht möglich war. Die dazugehörigen CC_{50} und IC_{50} sind in der zusammenfassenden Tab. 23 dargestellt.

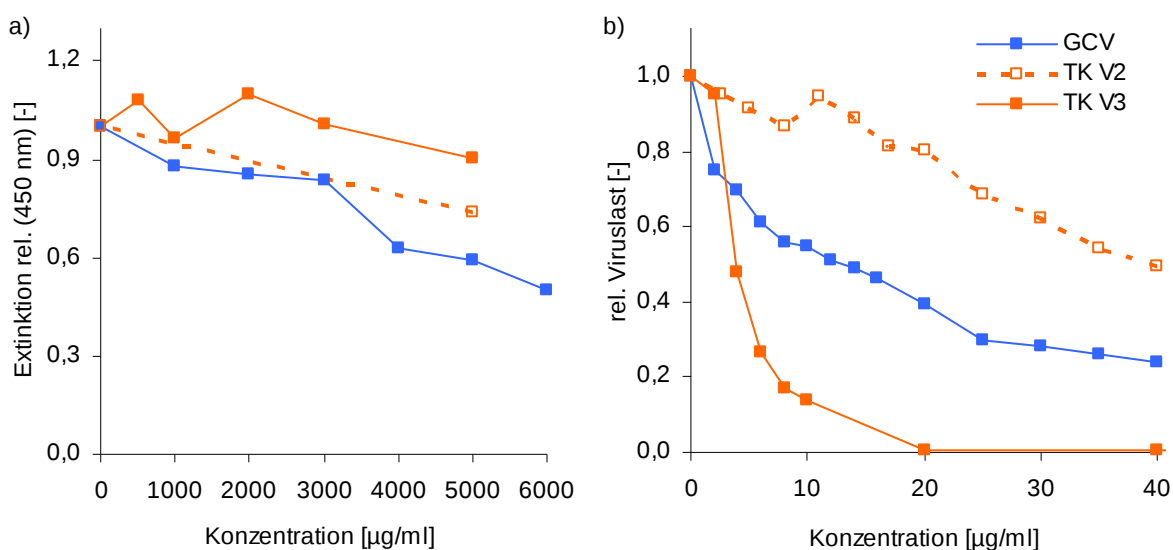


Abb. 30 Zytotoxizität gegen MRC-5-Zellen (a) und antivirale Aktivität gegen HCMV (b) von TK V2 und TK V3 aus *Arthrospira platensis* sowie GCV im antiviralen Screening. (Mittelwerte aus $n = 5$)

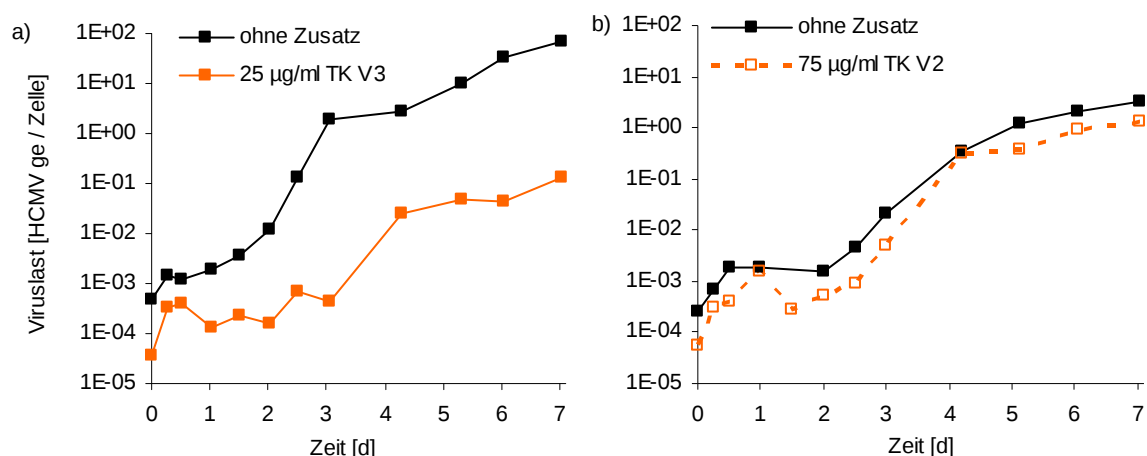
Die Zytotoxizität wurde mittels WST-1-Tests (a) und die antivirale Aktivität durch Peroxidasefärbung viraler Antigene (b) einen bzw. drei Tage nach Behandlung und Infektion bestimmt.

Für das extrazelluläre Produkt aus *Arthrospira platensis* TK V3 wurde ferner untersucht, inwiefern es bei Behandlung der Zellen über einen längeren Zeitraum zytotoxisch wirkt. Tab. 22 zeigt, dass trotz Behandlung kleiner Zellzahlen TK V3 nur gering toxisch auf MRC-5-Zellen wirkt ($CC_{50} > 1 \text{ mg/ml}$ drei und sieben Tage nach Behandlungsbeginn).

Tab. 22 Zytotoxizität von TK V3 gegenüber MRC-5-Zellen bei Behandlung der Zellen über 1, 3 und 7 Tage.

Dauer [d]	Eingesäte Zellzahl pro Vertiefung	CC ₅₀ [µg/ml]
1	10000	>5000
3	4000	2500 ⁺²⁵⁰ -300
7	1000	1200 ⁺⁶⁰⁰ -750

Außerdem wurde die Kinetik der HCMV-Infektion unter Einfluss der antiviralen Substanzen TK V2 und TK V3 untersucht. Hierfür wurden MRC-5-Zellen infiziert und gleichzeitig mit 25 µg/ml TK V2 bzw. 75 µg/ml TK V2 behandelt. Extrakte und Virusüberstand wurden während der gesamten Versuchsdauer im Ansatz belassen. Bis zum siebten Tag p. i. inhibieren beide Substanzen die Infektion (Abb. 31). Die Wirksamkeit von TK V2 ist in der eingesetzten Konzentration etwas geringer, doch auch nach einer Woche ist die Viruslast im Vergleich zur unbehandelten Infektion etwa um die Hälfte reduziert.

Abb. 31 Kinetik der HCMV-Infektion unter Einfluss der antiviralen Substanzen TK V3 (a) und TK V2 (b) aus *Arthrospira platensis*. (Mittelwerte aus n = 2, MOI = 0,1)

Um zu ermitteln, inwiefern die MOI einen Einfluss auf die antivirale Aktivität der Substanzen ausübt, wurde ferner die QPCR verwendet. Abb. 32 zeigt für GCV und das extrazelluläre Produkt TK V3 aus *Arthrospira platensis*, dass die antivirale Wirksamkeit mit zunehmender MOI geringer wird.

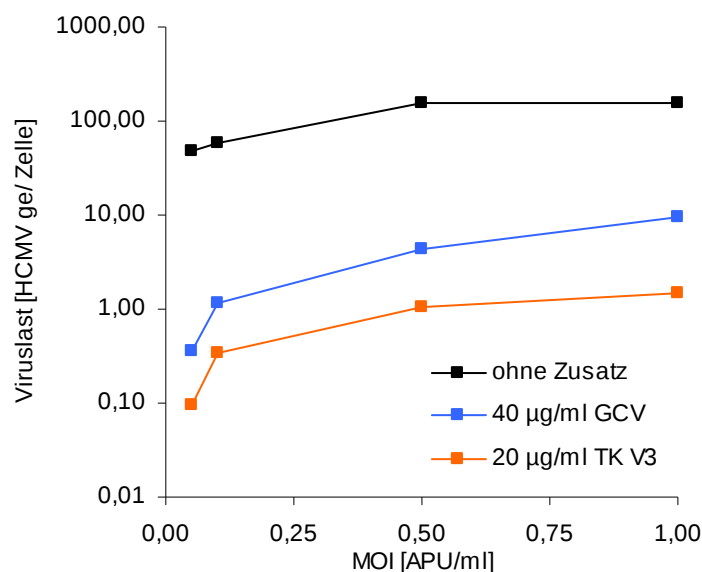


Abb. 32 Einfluss der MOI auf die antivirale Aktivität von **GCV** und das extrazellulären Extrakt **TK V3** aus *Arthrospira platensis*. Die HCMV-Viruslast wurde 3d p. i. mittels QPCR bestimmt. (Mittelwerte aus n = 2)

In Abb. 33 ist die Kinetik der viralen mRNA-Expression in HCMV-infizierten MRC-5-Fibroblasten mit und ohne Behandlung mit TK V3 über sieben Tage dargestellt. Generell werden bei Behandlung mit TK V3 die Gene auf niedrigerem Niveau exprimiert und die Expression ist zu späteren Zeitpunkten messbar als ohne Behandlung. gp65 wird wesentlich schwächer als die anderen Gene exprimiert. Deshalb liegt die Expression von gp65 bei Behandlung mit TK V3 wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze. Ferner kann ebenso, wie beim EPS der „doppelt sigmoidalen“ Verlauf interpretiert werden. Im Vergleich zu TK V3 lassen sich für TK V2 ähnliche, aber deutlich weniger expressions-inhibierende Verläufe finden (Abb. 34). Der vergleichsweise geringe Unterschied der viralen RNA-Expressionen zwischen unbehandelter und behandelter Infektion lässt sich wahrscheinlich auf die TK V2-Konzentration zurückführen.

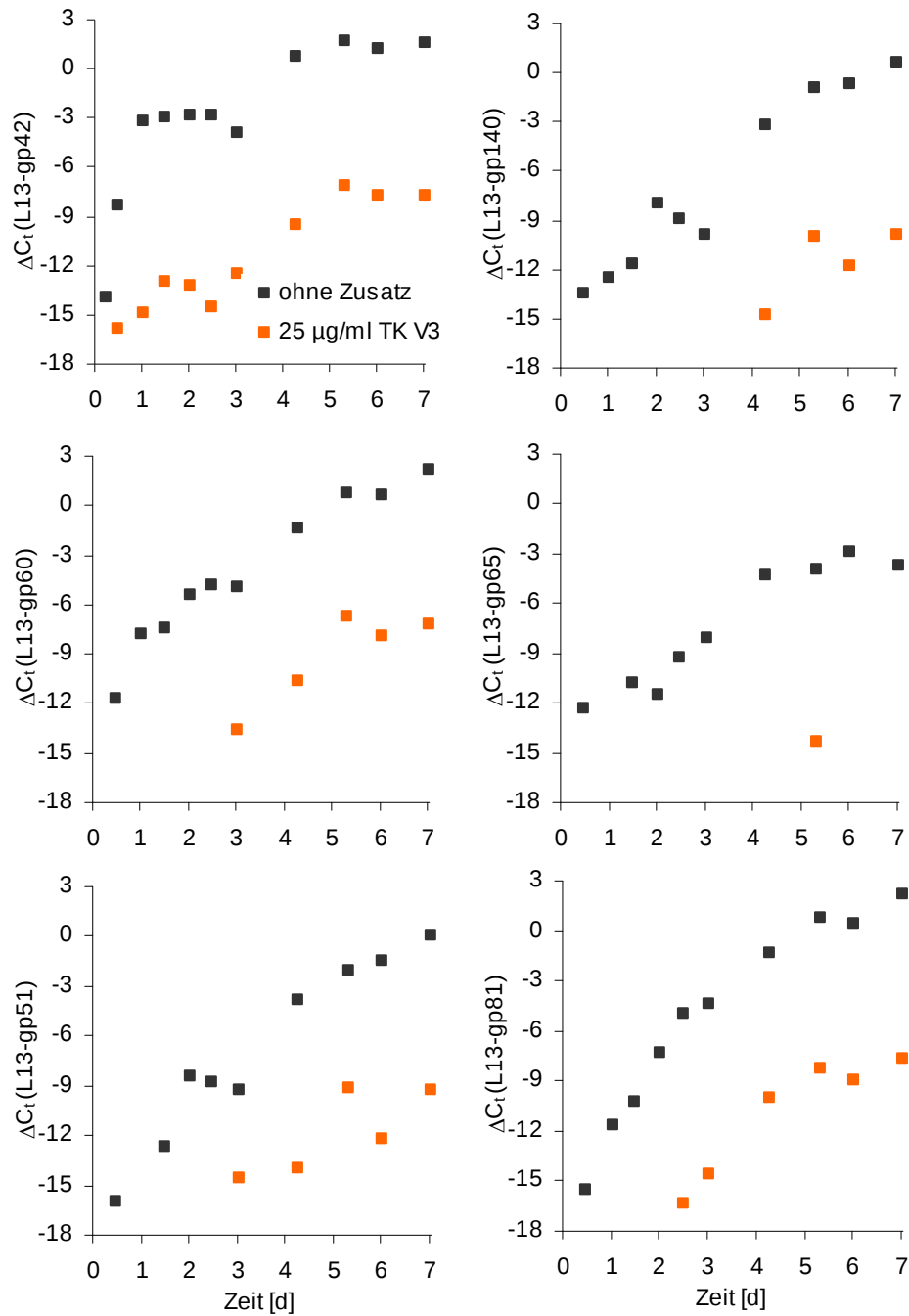


Abb. 33 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit TK V3 und ohne Zusatz.

Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen, sofern die Expression von Letzterem messbar war. (Mittelwerte aus $n = 2$)

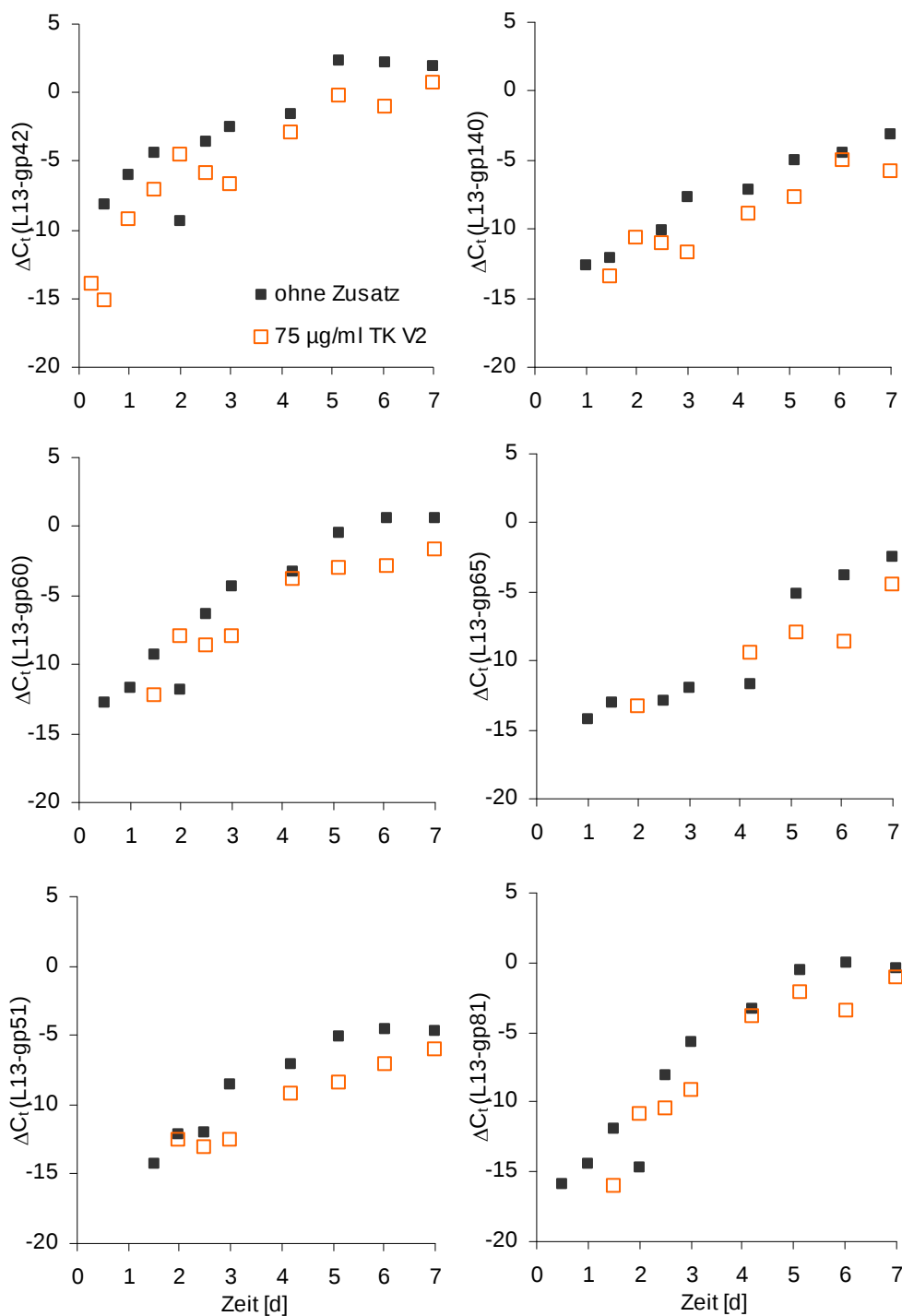


Abb. 34 Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit TK V2 und ohne Zusatz.

Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_t -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen, sofern die Expression von Letzterem messbar war. (Mittelwerte aus $n = 2$)

Die antiviralen Aktivitäten von TK V3 und TK V2 aus *Arthrospira platensis* gegenüber HCMV und HHV-6A sind in Tab. 23 zusammengefasst. Die anti-HCMV-Aktivität von TK V3 ist mit der von DS (Tab. 15) vergleichbar. Weiterhin sind beide Substanzen gering zytotoxisch gegen HSB-2-Zellen (> 2 mg/ml) und inhibieren die HHV-6A-Replikation.

Tab. 23 Zytotoxizität und antivirale Aktivität von TK V2 und TK V3 aus *Arthrospira platensis* gegenüber HCMV und HHV-6A

	MRC-5 / HCMV				HSB-2 / HHV-6A			
	CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI		CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI	
TK V2	> 5000	39	+8,19 - 7,8	> 128	2800	+1,8 -2,0	<25	>112
TK V3	> 5000	4	+1,6 - 2	> 1250	3600	+1,8 -1,9	<250	>14

Insgesamt wurden sowohl für das extra- als auch das intrazelluläre Produkt TK V3 bzw. TK V2 hohe antivirale Aktivitäten gegen HCMV und HHV-6A bei geringer Zytotoxizität nachgewiesen. Für die proteinfreie, höher aufgereinigte Variante TK IV von TK V3 konnte mit IC₅₀(HCMV) = 5 µg/ml keine weitere Verbesserung der antiviralen Aktivität erzielt werden. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden die Substanzen in den Arbeitsgruppen von Prof. Manfred Marschall (Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen) und Dr. Andreas Nitsche (Robert-Koch-Institut, ZBS 1, Berlin) hinsichtlich weiterer antiviraler Aktivitäten untersucht. Dabei konnte die Inhibierung der HCMV-Replikation reproduziert werden. Weiterhin sind die Substanzen wirksam gegen die humanpathogenen Viren: HSV-1, HIV-1 und VV, weniger gegen EBV und nicht signifikant gegen Influenza-A-Virus¹⁵². Da es sich hierbei sowohl um DNA- als auch RNA-Viren handelt und alle eine Glycoproteinhülle besitzen, geben diese Ergebnisse weitere Hinweise hinsichtlich der Wirkungsweise der Substanzen, die im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

4.2.3 Untersuchungen zum antiviralen Wirkungsmechanismus der anionischen Polysaccharide aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis*

Für die Extrakte EPS aus *Porphyridium purpureum* sowie TK V2 und TK V3 aus *Arthrospira platensis*, für die eine starke antivirale Aktivität gegenüber den β -Herpesviren HCMV und HHV-6A sowie gegenüber weiteren Viren nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend detaillierte Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus durchgeführt.

DS und die aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis* isolierten Wirkstoffe gehören zur Stoffgruppe der aPS. Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie den Virus-Zell-Adsorptionsprozess blockieren (Kap. 1.2.3.2). Zur Untersuchung des Zeitpunktes der Virusreplikation, an dem eine antivirale Substanz wirkt, wurde die Zugabe der Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion untersucht (*engl.* time of addition, TOA). Für diese Versuche wurde mindestens die doppelte IC₅₀ verwendet. Anhand der Ergebnisse aus Abb. 35 ist zu erkennen, dass DS, EPS aus *Porphyridum purpureum* sowie TK V2 und

TK V3 aus *Arthrosira platensis* im Gegensatz zu GCV zu frühen Zeitpunkten der Infektion am effektivsten die virale Replikation inhibieren. GCV hemmt die virale DNA-Synthese und ist daher erst zu späteren Zeitpunkten der Virusreplikation aktiv.

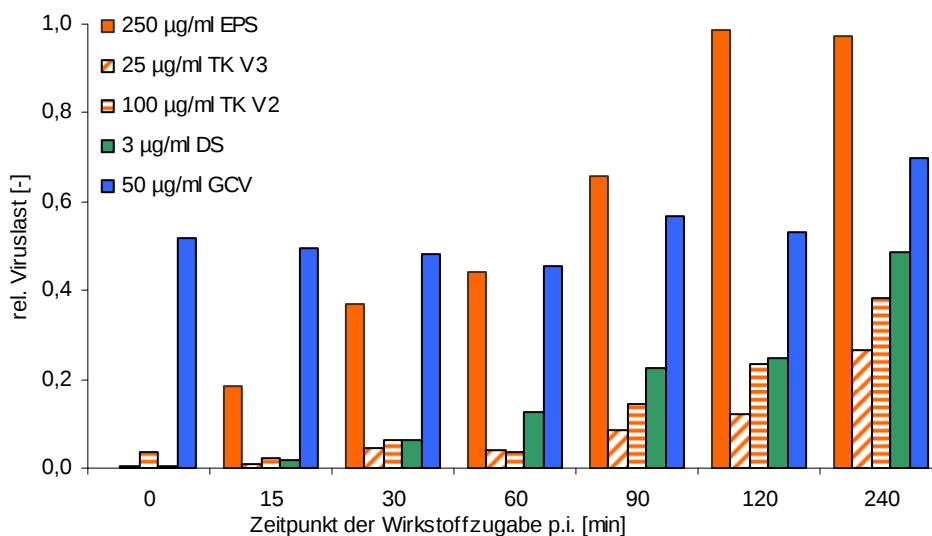


Abb. 35 Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe antiviraler Substanz nach HCMV-Infektion auf die Viruslast.

Die antivirale Substanz blieb nach ihrer Zugabe während des gesamten Inkubationszeitraumes im Ansatz; die Bestimmung der HCMV-Viruslast erfolgte mittels POX viraler Antigene. (Mittelwerte aus $n = 5$)

In weiteren Experimenten erfolgte die Zugabe der Wirkstoffe zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der Infektion. Vor allem für jeweils höhere Konzentrationen zeigte sich, dass die aPS den größten inhibierenden Effekt aufweisen, wenn sie vor der Infektion auf die freien Viruspartikel wirken können (Abb. 36). Diese Ergebnisse sind mit der Theorie von Witvrouw und de Clercq⁶⁹ erklärbar, wonach aPS eine ionische Wechselwirkung mit den freien Viruspartikeln eingehen und dadurch den Adsorptionsprozess der Viruspartikel an die Zelle und die anschließende Membranfusion blockieren. Dagegen bleibt der Effekt von GCV bei allen drei Ansätzen etwa gleich. Die untersuchten aPS scheinen außerdem einen antiviralen Effekt aufzuweisen, wenn sie vor der Infektion zu den Zellen dazugegeben werden. Dies ist wahrscheinlich damit erklärbar, dass sie dadurch rechtzeitig zum Zeitpunkt der Infektion vorhanden sind, um eine inhibierende Wirkung auf freie Viruspartikel ausüben zu können.

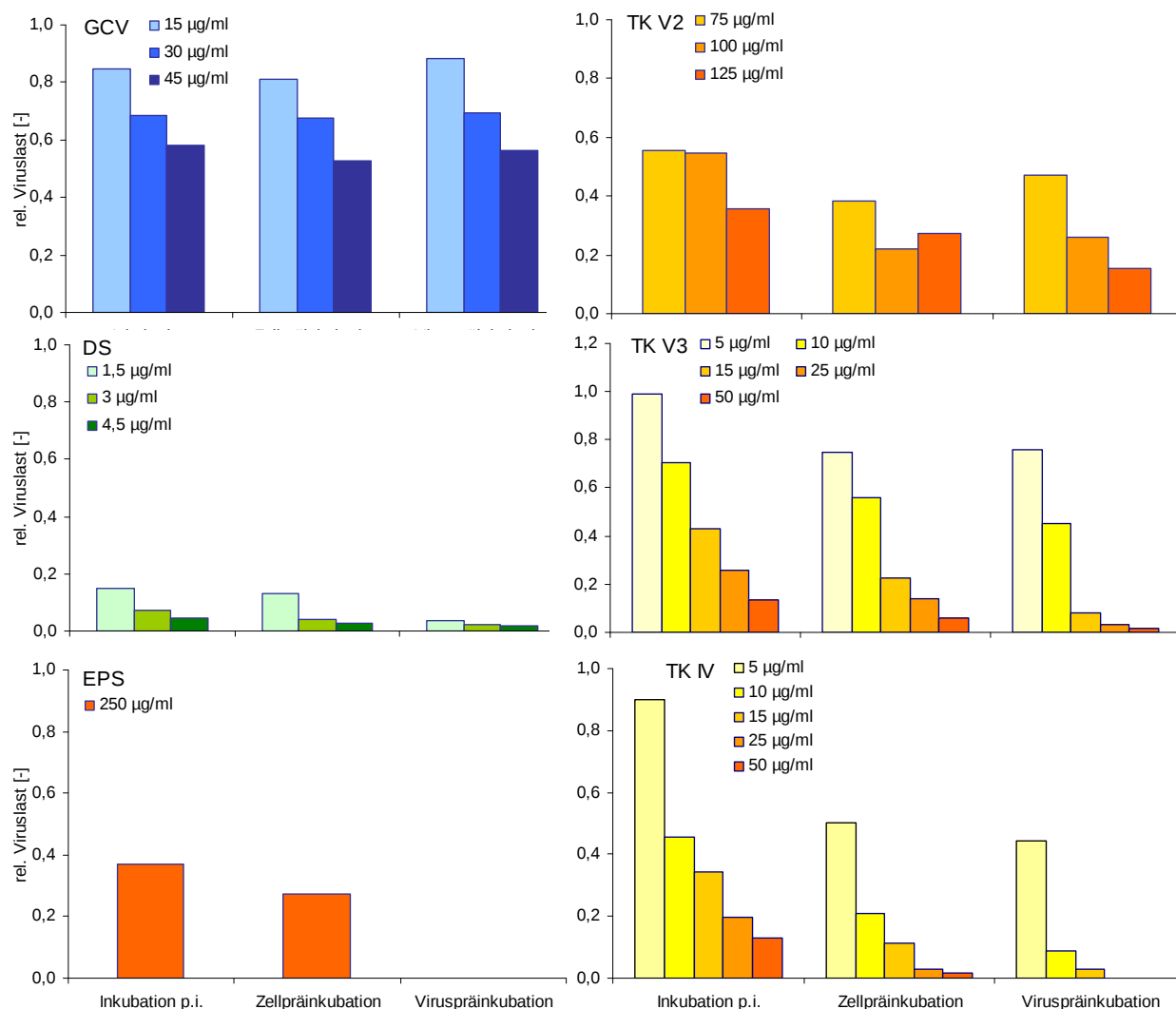


Abb. 36 TOA-Experiment mit den antiviralen Wirkstoffen **DS**, **GCV**, **EPS** aus *Porphyridium purpureum*, **TK V2**, **TK V3** und **TK IV** aus *Arthrospira platensis* an HCMV und MRC-5-Zellen.

Variation der Zugabe der antiviralen Substanz bezüglich des Infektionszeitpunktes: Zugabe der Substanz 30 min p. i., Behandlung der Zellen mit der Substanz 30 min vor der Infektion (Zellpräinkubation) und Behandlung der freien Viruspartikel mit der Substanz für 30 min und dann Infektion (Viruspräinkubation). Die antivirale Substanz blieb nach ihrer Zugabe während des gesamten Inkubationszeitraumes im Ansatz; Bestimmung der HCMV-Restaktivität mittels POX viraler Antigene. (Mittelwerte aus n = 5)

Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch die mikrobiellen Substanzen die Virusadsorption an die Zielzelle oder der Prozess der Fusion von Virus- und Zellmembran blockiert werden. Hierfür wurden adhärente MRC-5-Zellen in Zellkulturplatten eingesät, einen Tag später mit Formaldehyd fixiert und mit den antiviralen Substanzen sowie anschließend mit HCMV behandelt. Um die Membranfusion zu verhindern und nur die Virusadsorption zu erlauben, erfolgte das Procedere bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, aus den Zellen mit den anhaftenden Viruspartikeln die DNA isoliert und die virale DNA quantifiziert. Wie Abb. 37 zeigt, konnte durch diese Vorgehensweise gezeigt werden, dass DS die Adsorption der Viruspartikel an die Zellmembran komplett inhibiert. Das extrazelluläre Produkt TK V3 aus *Arthrospira platensis* scheint die Virusadsorption nicht bzw. nur in geringem Ausmaß zu inhibieren

und das intrazelluläre Produkt TK V2 aus *Arthrospira platensis* sowie das EPS aus *Porphyridium purpureum* haben keine Auswirkung auf die Virusadsorption. DS scheint demnach die Virusadsorption zu hemmen, wogegen dies für die mikrobiellen Wirkstoffe nicht gezeigt werden kann.

Für eine Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Viruslast in diesem Versuchen sehr stark von der Qualität der DNA-Isolation abhängt: Um gebundene Viruspartikel nicht wieder von den Zellen zu entfernen, musste in diesem Versuch auf einen Waschschriff vor der DNA-Isolation verzichtet werden. Dies übt einen starken Einfluss auf die DNA-Reinheit und vor allem auf die DNA-Ausbeute aus. Außerdem hemmen Polysaccharide die PCR, weshalb zusätzliche Reinigungsschritte im Verlauf der DNA-Extraktion notwendig waren.

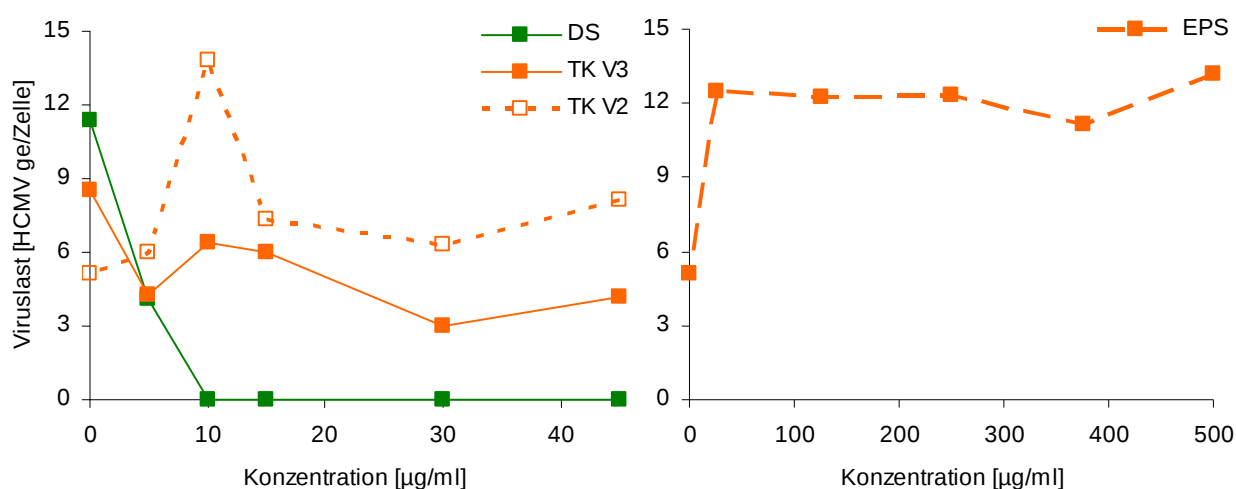


Abb. 37 Bestimmung der Adhäsion von HCMV-Partikeln an die Targetzelle unter Einfluss der mikrobiellen antiviralen aPS. (Mittelwerte aus n = 2)

(Fixierte Zellen wurden bei 4°C mit den antiviralen Substanzen DS (MW 500.000), TK V2, TK V3 aus *Arthrospira platensis* und EPS aus *Porphyridium purpureum* behandelt und „infiziert.“ Anschließend wurde die Viruslast der Zellen mittels QPCR bestimmt.)

Analog zu den HCMV-TOA-Versuchen wurde ein TOA-Versuch mit HHV-6A durchgeführt (Abb. 38). In Anbetracht der relativ hohen Schwankungen der QPCR-Ergebnisse gibt es für die Ergebnisse zwei Schlussfolgerungen: Zum einen ist es möglich, dass die Substanzen bezüglich HHV-6A keinen direkten Einfluss auf den Virus-Zell-Adsorptionsprozess haben. Zum anderen kann keine Unterscheidung dahingehend getroffen werden, ob die Substanzen auf die freien Viruspartikel oder auf die Zellen vor der HHV-6A-Infektion wirken.

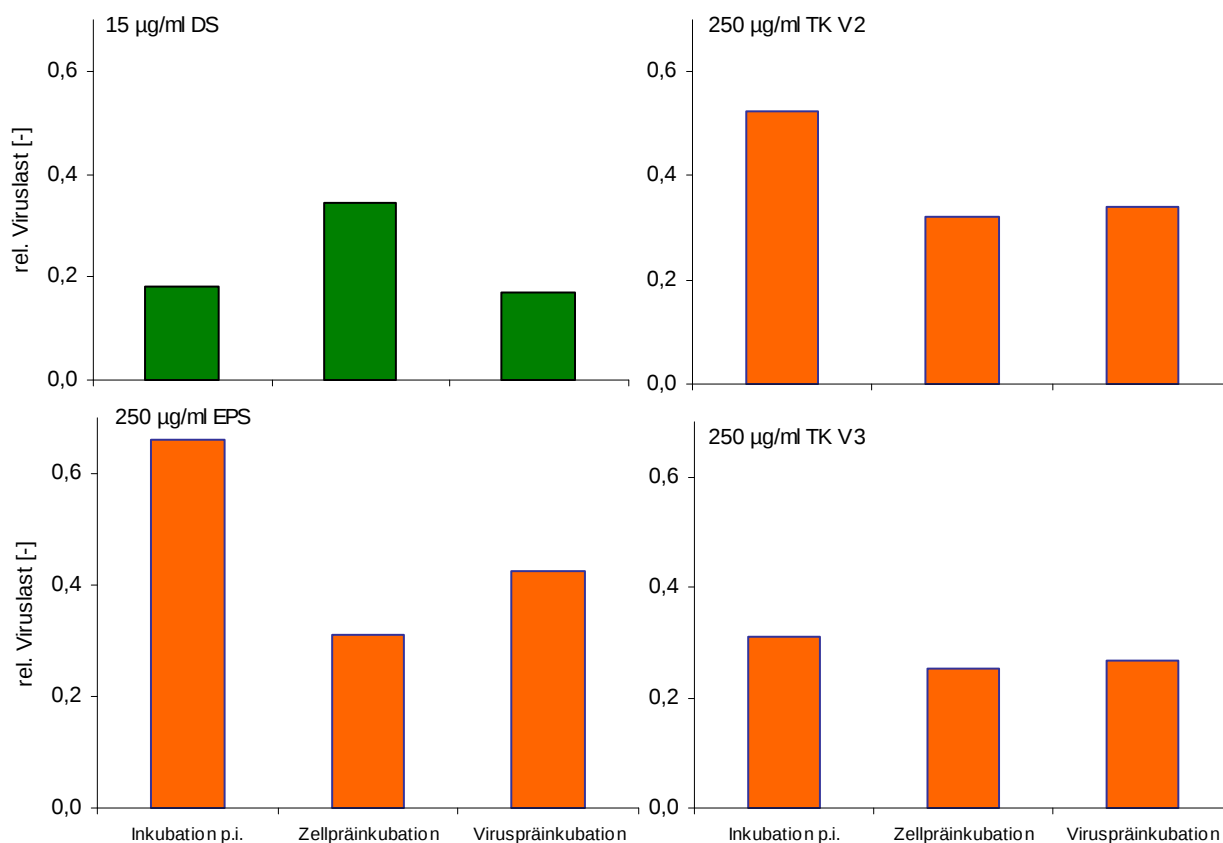


Abb. 38 TOA-Experiment mit den antiviralen Wirkstoffen **DS**, **EPS** aus *Porphyridium purpureum*, **TK V2** und **TK V3** aus *Arthrospira platensis* an HHV-6A und HSB-2-Zellen.

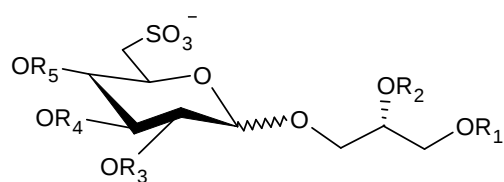
Variation der Zugabe der antiviralen Substanz bezüglich des Infektionszeitpunktes: Zugabe der Substanz 30 min nach HHV-6A-Infektion (Inkubation p. i.), Behandlung der Zellen mit der Substanz 30 min vor HHV-6A-Infektion (Zellpräinkubation) und Behandlung der freien HHV-6A-Partikel mit der Substanz für 30 min und dann Infektion (Viruspräinkubation). Die antivirale Substanz blieb nach ihrer Zugabe während des gesamten Inkubationszeitraumes im Ansatz; Bestimmung der HHV-6A-Restaktivität mittels QPCR. (Mittelwerte aus $n = 3$)

4.2.4 Sulfoquinovosyldiacylglycerole

Aus den phototrophen Mikroorganismen der Algenabteilungen der Heterokontophyta (*Heterosigma carterae* (SQDG-Hc), *Phaeodactylum tricornutum* 6 (SQDG-Pt6), *Phaeodactylum tricornutum* 1a (SQDG-Pt1a) und *Phaeodactylum tricornutum* 1b (SQDG-Pt1b)), der Rhodophyta (*Porphyridium purpureum* (SQDG-Pp)) sowie aus den Cyanobakterien (*Arthrospira platensis* NIES-46 (SQDG-Ap46), *Scytonema hofmani* (SQDG-Sh) und *Nostoc punctiforme* (SQDG-Np)) wurden verschiedene SQDG-Fraktionen gewonnen (Abb. 39). Die SQDG wurden im Festphasenextraktionsverfahren mit modifiziertem Kieselgel isoliert und hinsichtlich ihrer Struktur charakterisiert. Kultivierung, Aufarbeitung und Strukturaufklärung erfolgten von Ivonne Naumann am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Universität Erlangen-Nürnberg.

Wie aus Abb. 39 hervorgeht, sind die SQDGs der einzelnen Fraktionen mit verschiedenen Acylresten verestert. Teilweise handelt es sich um die gleichen Substanzen, die aus unterschiedlichen Organismen isoliert wurden, z. B. SQDG-Ap46 und SQDG-Sh mit Lineolyl- und Palmitoleylresten. Besonders hervorzuheben sind die SQDG-Fraktionen aus den *Phaeodactylum tricornutum* Stämmen. Sie enthalten SQDGs vom Typ 2 (Abb. 39), bei denen Acylreste nicht nur am Glycerol verestert sind, sondern auch eine Hydroxygruppe der Sulfoquinovose mit einer Acylgruppe substituiert wurde. Die isolierten Fraktionen wurden im Screeningsystem zunächst hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und anschließend auf eine anti-HCMV-Aktivität untersucht.

Beispielhaft ist in Abb. 40 die WST-1-Extinktion einer MRC-5 Kultur nach Behandlung mit SQDG-Hc dargestellt. Bei eintägiger Behandlung der Zellen ist bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml keine Zytotoxizität nachweisbar. Je länger die Zellen mit SQDG-Hc behandelt wurden, desto höher ist die detektierbare zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Nach sieben Tagen waren bei nur 300 µg/ml SQDG-Hc keine vitalen Zellen mehr nachweisbar. Die Zytotoxizitäten der übrigen SQDG-Fraktionen verhalten sich etwa ähnlich und sind in Tab. 24 anhand der CC_{50} nach ein- und dreitägiger Behandlung zusammengefasst.



Typ 1: R_1, R_2 - Acylreste

R_3, R_4, R_5 - H-Atome

Typ 2: R_1, R_2 - Acylreste

R_3, R_4, R_5 - Acylreste oder
H-Atome

Abb. 39 Zusammensetzung der mikrobiellen SQDG-Fractionen

Von SQDG-Pt1b wurde durch weitere Fraktionierung Typ 1 und Typ 2 SQDGs voneinander getrennt (Fr)

(Ivonne Naumann, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Universität Erlangen-Nürnberg, Veröffentlichungen in Vorbereitung)

Name	Typ	Veresterte Acylreste
SQDG-Hc	1	Palmitoleoyl- und Palmitoylrest bzw. Eicosapentaenoyl- und Palmitoleoylrest
SQDG-Pt6	1	Palmitoleoyl- und Palmitoylrest bzw. Eicosapentaenoyl- und Palmitoylrest
	2	Palmitoleoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest bzw. Eicosapentaenoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest
SQDG-Pt1a	1	Palmitoleoyl- und Palmitoylrest bzw. Eicosatetraenoyl- und Palmitoylrest
	2	Palmitoleoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest bzw. Eicosapentaenoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest
SQDG-Pt1b	1	Palmitoleoyl- und Palmitoylrest bzw. Stearoyl- und Palmitoylrest bzw. Eicosatetraenoyl- und Palmitoylrest
	2	Palmitoleoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest bzw. Eicosapentaenoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest
	Fr	I Eicosapentaenoyl-, Palmitoyl und Eicosapentaenoylrest
		II Gemisch aus beiden Typ 2 IV Gemisch Typ 1
SQDG-Pp	1	Palmitoyl- und Linoleoylrest bzw. Palmitoyl- und Eicosatetraenoylrest bzw. Palmitoyl- und Eicosapentaenoylrest
SQDG-Ap46	1	Linoleoyl- und Palmitoylrest
SQDG-Sh	1	Linoleoyl- und Palmitoylrest
	2	Noch nicht charakterisiert
SQDG-Np	1, 2	Linolenoyl- und Palmitoylrest bzw. Linoleoyl- und Palmitoylrest bzw. Oleoyl- und Palmitoylrest

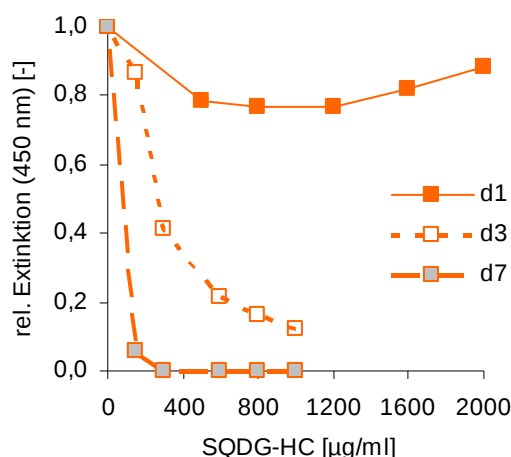


Abb. 40 Einfluss der SQDG-Fraktion aus *Heterosigma carterae* (SQDG-Hc) auf die WST-1-Extinktion nach 1-, 3- und 7-tägiger Behandlung von MRC-5-Fibroblasten (Mittelwerte aus $n = 5$).

Tab. 24 Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Zellen (CC_{50}) und antivirale Aktivität gegenüber HCMV (IC_{50}) der extrahierten SQDG-Fractionen im Vergleich zur therapeutischen Referenzsubstanz GCV.

Substanz	CC_{50} [µg/ml] (d1)	CC_{50} [µg/ml] (d3)	IC_{50} [µg/ml]	SI [-]
SQDG-Hc	>2000	95 ±60	226 ⁺⁵⁰ ₋₅₂	>9
SQDG-Pt6	>1250	70 ±20	113 ⁺⁷⁷ ₋₇₃	>11
SQDG-Pt1a	>2000	275 ⁺⁵⁰ ₋₅₅	127 ⁺⁴⁸ ₋₃₂	>16
SQDG-Pt1b	>1750	80 ⁺⁵⁰ ₋₃₀	150 ⁺⁵⁶ ₋₅₀	>12
SQDG-Pp	>660	115 ±15	192 ⁺³⁸ ₋₃₁	>3
SQDG-Ap46	>750	150 ⁺⁴⁵ ₋₅₀	200 ⁺⁶⁰ ₋₆₆	>3,75
SQDG-Sh	110 ⁺³⁰ ₋₄₀	55 ±25	<25	>4
SQDG-Np	315 ⁺¹⁰⁰ ₋₉₅	185 ⁺⁸⁵ ₋₇₅	38 ⁺²² ₋₂₀	8
GCV	6000		14 ±5	430

Die beschriebenen SQDG-Fractionen SQDG-Hc, SQDG-Pp, SQDG-Ap, SQDG-Np bestanden in ihrer massenspektrometrisch nachweisbaren Zusammensetzung aus Typ 1-SQDGs (Abb. 39). Die Fractionen SQDG-Pt1a, SQDG-Pt6, SQDG-Pt1b und SQDG-Sh enthalten sowohl die Strukturen des Typ 1 als auch des Typ 2. Zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit der Typ 2 SQDG-Strukturen wurden diese beispielhaft in der Fraction Fr I und Fr II aus der SQDG-Pt1b-Fraction isoliert und hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Fibroblasten untersucht. Abb. 41 zeigt, dass sowohl Typ 1- als auch Typ 2-SQDGs bei mehrtägiger Behandlung gleichfalls zytotoxisch für MRC-5-Zellen sind.

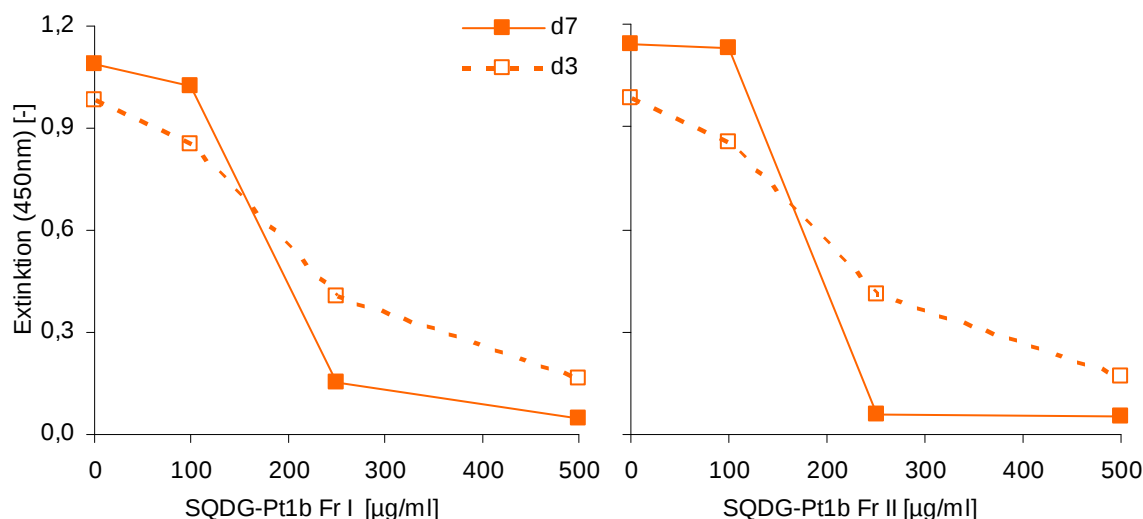


Abb. 41 Einfluss der Typ 2-SQDGs Fr I und Fr II aus *Pheodactylum tricornutum* 1b (SQDG-Pt1b) auf die WST-1-Extinktion nach 3- und 7-tägiger Behandlung von MRC-5-Fibroblasten (Mittelwerte aus n = 5).

Im Hinblick auf bereits beschriebene antivirale SQDG-Aktivitäten (Kap. 1.2.4.2) wurden trotz der hohen Zytotoxizitäten der SQDG-Fractionen ihre anti-HCMV-Aktivitäten untersucht. Abb. 42 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für die Fractionen SQDG-Ap46 und SQDG-Hc. Die anti-HCMV-Aktivitäten aller Fractionen im Vergleich zum Standardtherapeutikum GCV sind ebenfalls in Tab. 24 dargestellt. Bei allen untersuchten SQDG wurde bei Konzentrationen ab 400 µg/ml (und partiell bereits ab 320 µg/ml) ein geschädigter Zellrasen beobachtet, was mit der beschriebenen Zytotoxizität der Substanzen erklärt werden kann. In Abb. 42 fällt auf, dass die Fraction SQDG-Hc die Infektion bei kleinen Substanzmengen zu stimulieren scheint. Dieser Effekt wurde in verschiedenen starker Ausprägung für den Großteil der SQDG-Extrakte beobachtet.

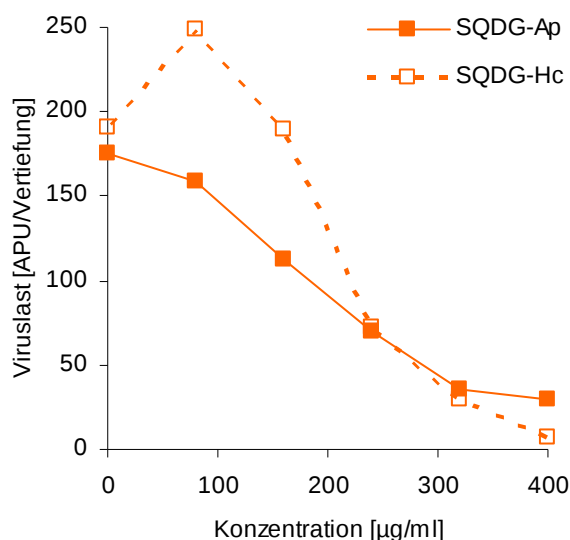


Abb. 42 Antivirale Aktivität von SQDG-Ap46 aus *Arthrospira platensis* und SQDG-Hc aus *Heterosigma carterae*. Die Viruslast ist angegeben als Antigen produzierende Units (APU) pro Vertiefung. (Mittelwerte aus n = 5)

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass die SQDG-Fraktionen zwar antiviral, aber bei längerer Inkubationsdauer auch sehr zytotoxisch wirken und in geringen Konzentrationen die Infektion zu stimulieren scheinen. TOA-Versuche sollten die Frage klären, ob die SQDGs zu frühen Zeitpunkten der Infektion eine Rolle spielen und unter Umständen, wie die aPS aufgrund ihrer anionischen Reste die Infektion durch Inaktivierung freier Viruspartikel hemmen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 43 in absoluten Viruslasten [APU pro Vertiefung] dargestellt. Insbesondere bei hohen Konzentrationen scheinen die SQDGs-Fraktionen die geringste antivirale Wirksamkeit aufzuweisen, wenn sie 30 min p. i. zum Ansatz gegeben werden. Ein minimal größerer antiviraler Effekt ergibt sich, wenn die Viruspartikel mit den Substanzen präinkubiert werden. Genauso, wie bei der IC₅₀-Bestimmung waren die Zellrasen auch bei den TOA-Experimenten nach Behandlung mit höheren Konzentrationen beschädigt. Dabei war der Zellrasen bei 400 µg/ml der Extrakte SQDG-Pt1b und SQDG-Pp so stark beschädigt, dass eine Auszählung nicht mehr sinnvoll erschien. Bei kleineren Konzentrationen wiederum waren die Viruslasten wegen der großen Anzahl APU in den Vertiefungen nicht auszählbar. Dies spricht dafür, dass die Substanzen in kleinen Konzentrationen die Infektion in noch nicht geklärter Weise fördern.

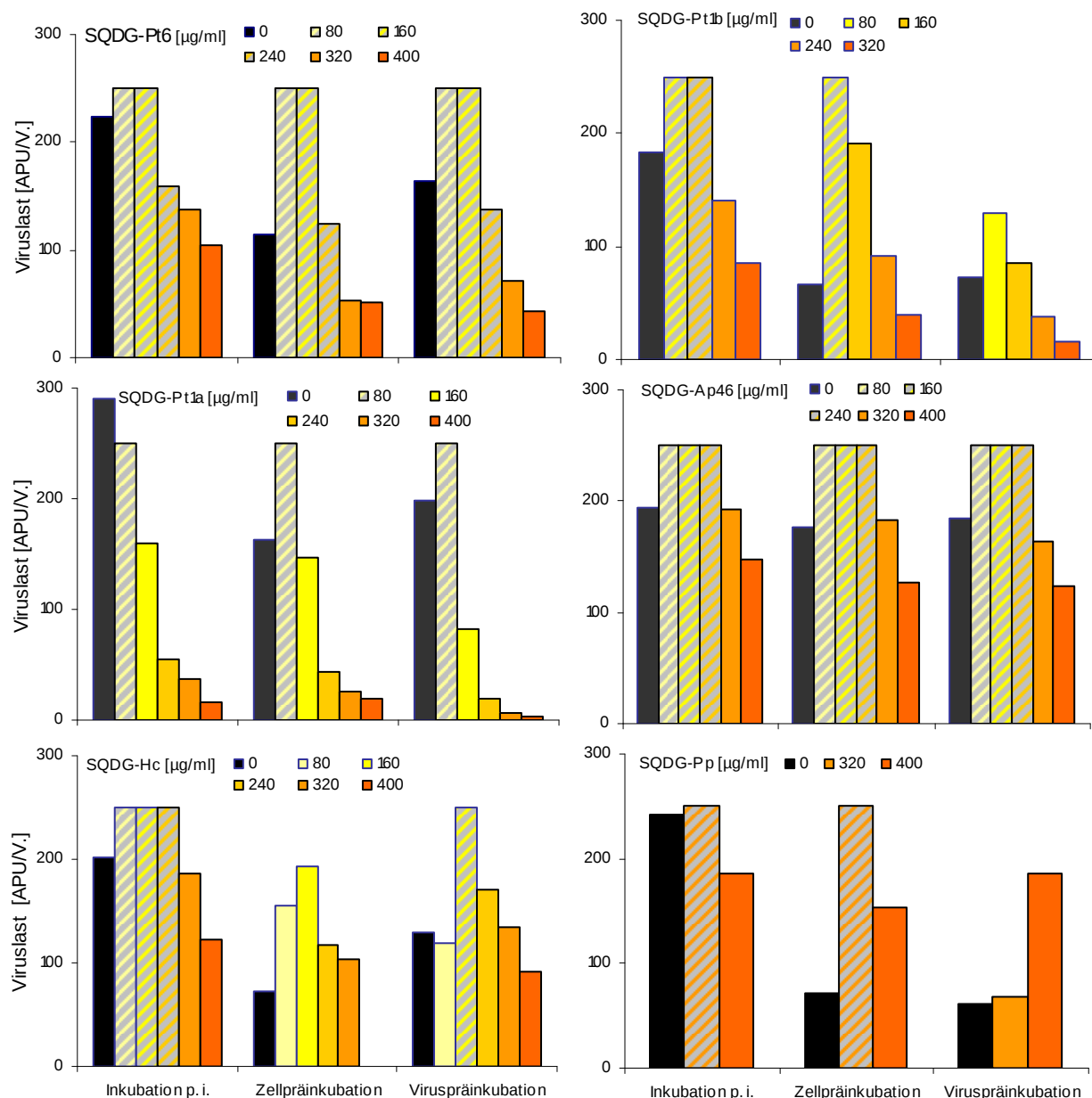


Abb. 43 Ergebnisse von TOA-Experimenten mit verschiedenen SQDG-Fractionen.

Bei den drei Ansätzen wurden der Extrakt jeweils 30 min nach HCMV-Infektion (Inkubation p. i.) zu den infizierten Zellen gegeben, die Zellen vor HCMV-Infektion mit dem jeweiligen Extrakt 30 min präinkubiert (Zellpräinkubation) bzw. HCMV vor Infektion 30 min mit dem jeweiligen Extrakt präinkubiert (Viruspräinkubation). Alle Substanzen haben bei kleinen Konzentrationen die Infektion stimuliert, so dass die Zellen in den Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen (V.) nicht mehr zählbar waren (> 250 Zellen pro Vertiefung, grau gestreifte Balken). (Mittelwerte aus n = 5)

Abb. 44 zeigt beispielhaft Ausschnitte des Zellrasens aus einzelnen Vertiefungen bei Behandlung mit dem Extrakt SQDG-Hc. Der defekte Zellrasen bei höheren Konzentrationen, die Zunahme der APU mit sinkender SQDG-Konzentration und schließlich die Abnahme der APU im Ansatz ohne SQDG-Hc sind dabei gut zu erkennen.

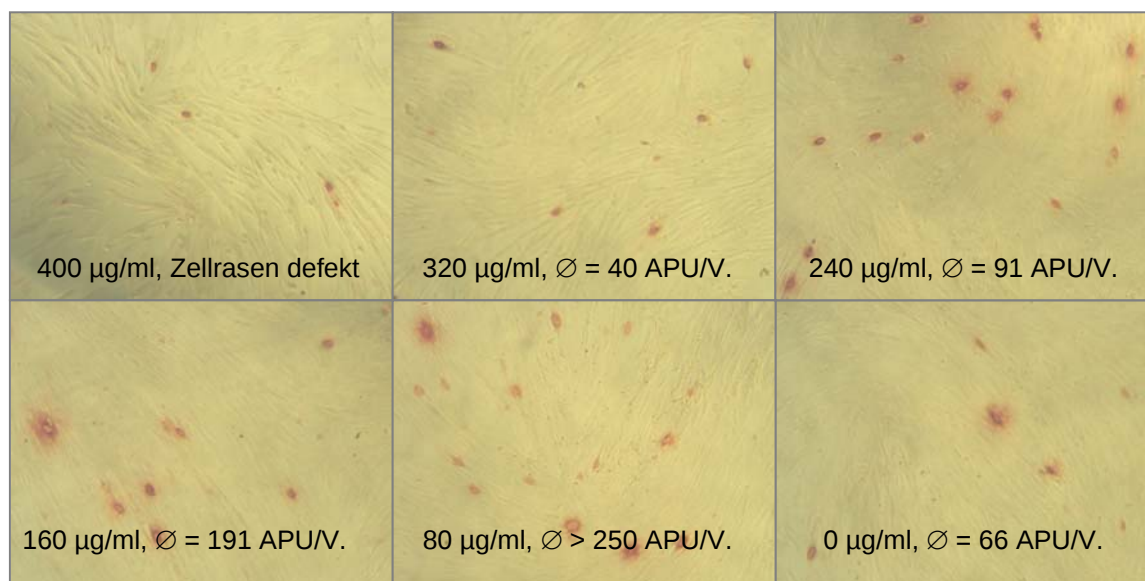


Abb. 44 HCMV-infizierte MRC-5-Zellen (rot) bei gleichzeitiger Behandlung mit zunehmenden Konzentrationen von SQDG-Hc 3 Tage p. i. (V. – Vertiefung)

Zur Untersuchung, ob die Zytotoxizität der SQDG-Fraktionen ihre antivirale Aktivität beeinflusst, wurden beispielhaft für die Fraktionen SQDG-Hc, SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b HCMV-Infektionskinetiken mit und ohne SQDG-Behandlung durchgeführt und die auf die Zellmengen bezogenen Viruslasten mit Hilfe der QPCR bestimmt (Abb. 45a,b). Aufgrund ihrer Zytotoxizität wurden die Substanzen jeweils etwa in ihrer mit Hilfe der POX bestimmten IC_{50} eingesetzt. Anhand der Kurvenverläufe ist zu erkennen, dass sich bei dieser Konzentration die zellbezogene Viruslast durch Zugabe der jeweiligen SQDG-Fraktion nicht verändert. Deshalb wurden die SQDG-Fraktionen in einem weiteren Versuch in höheren Konzentrationen eingesetzt und die Viruslast bereits nach einem Tag bestimmt, an dem mikroskopisch noch keine Schädigung des Zellrasens zu erkennen war. Hierbei ist eine deutliche Reduktion der zellbezogenen Viruslast nach Zugabe der Fraktionen SQDG-Pt1a bzw. SQDG-Pt1b auf 26 % bzw. 34 % zu erkennen (Abb. 45c).

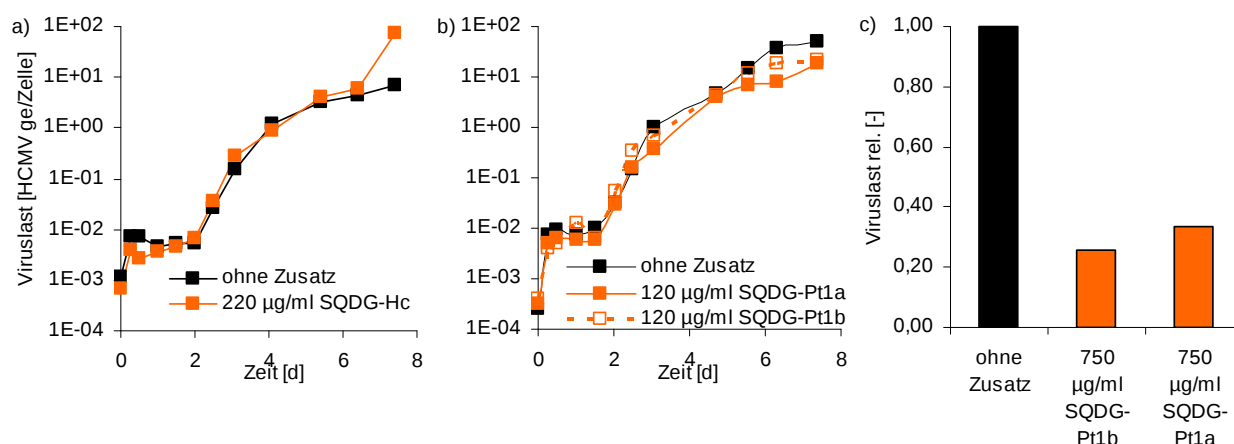


Abb. 45 Kinetik der HCMV-Infektion bei Zugabe der Substanzen SQDG-Hc (a), SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b (b). Relative Viruslast bezogen auf eine unbehandelte Kontrollinfektion nach Zugabe von SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b einen Tag nach Infektion (c). Die Viruslasten wurden mit Hilfe der QPCR bestimmt. (MOI = 0,01; Mittelwerte aus n = 2)

Im Rahmen weiterer Untersuchungen hat Ivonne Naumann am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik analog zur POX im Screeningsystem infizierte und gleichzeitig mit den jeweiligen SQDG-Fractionen behandelte MRC-5 Zellen bereits einen Tag p. i. gegen ein HCMV-IE-Antigen gefärbt und den Anteil an APU ermittelt. Im Gegensatz dazu wurde im Screeningsystem stets drei Tage p. i. gegen ein HCMV-DE-Antigen gefärbt. Interessanterweise zeigten in diesen Experimenten alle SQDG-Fractionen eine sehr viel stärkere antivirale Aktivität, die sich in einer etwa halb so großen IC_{50} widerspiegelt. Beispielfhaft ist dies für die SQDG-Hc-Fraktion dargestellt (Abb. 46).

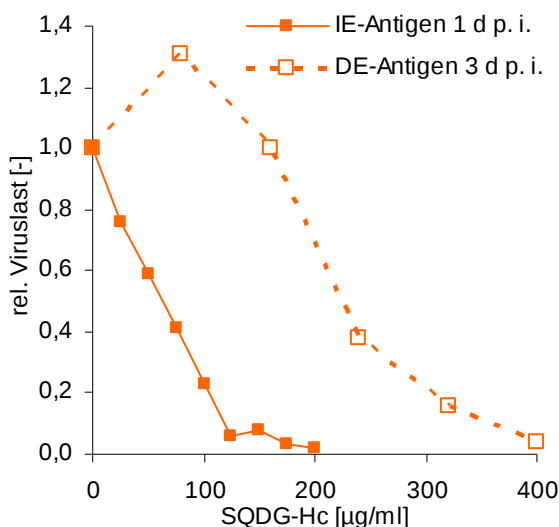


Abb. 46 Antivirale Aktivität von SQDG-Hc gegenüber HCMV infizierten MRC-5-Fibroblasten im Screeningsystem (Färbung von HCMV-DE-Antigen 3 d p. i.) im Vergleich zu einer Färbung von HCMV-IE-Antigen 1 d p. i.)

Die Färbung der IE-Antigene wurde von Ivonne Naumann (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt.

4.2.5 Chlorosulfolipide aus *Ochromonas danica*

Aus dem Flagellaten *Ochromonas danica* wurden intrazelluläre Chlorosulfolipidfraktionen isoliert. Hierfür erfolgte zunächst eine mehrfache Extraktion der Biomasse mit organischen Lösungsmitteln (Rohextrakt I) und anschließend eine Auftrennung in verschiedene Fraktionen (I-1 bis I-5) durch Normalphasenchromatographie. Die Fraktionen enthalten hauptsächlich Docosandisulfate verschiedener Chlorierungsgrade (0-6 Chloratome). Kultivierung, Aufarbeitung und Strukturaufklärung erfolgten von Tanja König, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Universität Erlangen-Nürnberg¹⁵¹. Ähnlich wie SQDG weisen Chlorosulfolipidfraktionen eine antivirale Aktivität gegenüber HCMV auf. Dabei sind sie allerdings in Konzentrationen der gleichen Größenordnung auch sehr zytotoxisch und die SI damit sehr klein (Tab. 25). Von diesen Substanzen konnten weitere Bioaktivitäten (antimykotisch, antibakteriell und andere) von Tanja König nachgewiesen werden¹⁵¹. Aufgrund der hohen Zytotoxizität wurden mit den Substanzen keine weiteren antiviralen Studien durchgeführt.

Tab. 25 Übersicht über die Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Zellen und die antivirale Aktivität gegen HCMV einzelner Chlorosulfolipidfraktionen aus *Ochromonas danica*.

	CC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	SI [-]
Rohextrakt I	170	60	2,8
Fraktion I-1	230	70	3,3
Fraktion I-2	100	30	3,3
Fraktion I-3	100-150	80	1,3-1,9
Fraktion I-4	670	100-400	1,5-6,0
Fraktion I-5	> 560	> 560	-

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Screeningsystem etabliert, um Wirkstoffe aus phototrophen, aquatischen Mikroorganismen hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegen die β -Herpesviren HCMV und HHV-6 zu untersuchen. Im Screeningverfahren sollte möglichst wenig der mikrobiellen Extrakte verbraucht werden und die Methode für einen vergleichsweise hohen Durchsatz zu untersuchender Substanzen geeignet sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit diesem Screeningsystem aus fast 500 Extrakten von 19 verschiedenen aquatischen, phototrophen Mikroorganismen folgende Substanzen als antivirale Wirkstoffe identifiziert und teilweise in ihrer *in vitro* Wirksamkeit näher charakterisiert:

- aPS aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis*,
- unterschiedliche SGDGs aus verschiedenen Organismen und
- Chlorosulfolipidfraktionen aus *Ochromonas danica*.

5.1 Etablierung des antiviralen Screeningsystems

Die charakteristische Größe für die antivirale *in vitro* Aktivität einer Substanz stellt der Selektivitätsindex (SI) dar, der das Verhältnis aus Zytotoxizität und antiviraler Aktivität der Substanz, jeweils angegeben in der letalen Dosis von 50 %, darstellt. Dieser Wert ist umso größer, desto kleiner die Zytotoxizität (hohe wirksame Konzentration) und desto größer die antivirale Aktivität (kleine wirksame Konzentration) ist. Im antiviralen Screeningsystem wurden sowohl Methoden zur Bestimmung der CC_{50} , als auch zur Bestimmung der IC_{50} etabliert. Beide Konzentrationen sind unter anderem abhängig vom verwendeten Zell- / Virussystem, der Methode zum Nachweis von Zellvitalität bzw. Virusreplikation, von der Einwirkzeit der zu untersuchenden Substanz und der MOI, mit der die Zellen infiziert werden. Die Methoden zur Bestimmung der antiviralen Aktivität wurden zunächst mit GCV und DS etabliert. GCV ist das Standardtherapeutikum gegen HCMV-Erkrankungen (Kap. 1.2.2.1). Ferner ist eine *in vitro* Aktivität gegen HHV-6 nachgewiesen¹⁵³. DS ist ein sulfatiertes Polysaccharid und gehört damit zur gleichen Stoffgruppe, wie ein Großteil der mikrobiellen Extrakte. Das Alkylsulfat SDS sollte aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Sulfolipiden, zu denen ebenfalls ein Teil der Extrakte gehörte, als weitere Referenz im Screeningsystem dienen. Es erwies sich allerdings als sehr zytotoxisch, so dass es im weiteren Verlauf nicht mehr verwendet wurde.

5.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität antiviraler Substanzen

Für die Bestimmung der CC_{50} als Maß der Zytotoxizität einer Substanz stehen verschiedene Methoden, die die Zellvitalität erfassen, zur Verfügung. Die einfachste Methode, vitale Zellen zu bestimmen, ist die Zählung Trypan-Blau gefärbter Zellen im

Hämozytometer. Alternativ zum subjektiven Verfahren der Zellzählung mittels Hämozytometer gibt es die Möglichkeit einer automatisierten Zählung im Coulter Counter, der Spannungsänderungen, verursacht durch Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrahl, erfasst. Beide Methoden erfordern in Suspension vorliegende Zellen, was bei den MRC-5-Fibroblasten, den HCMV-Wirtszellen, nicht der Fall ist. Sie hätten hierfür vorher aufwendig trypsiniert werden müssen.

Im Rahmen des Screenings wurde deshalb das Tetrazoliumsalz WST-1 verwendet, das ähnlich dem MTT durch metabolische Aktivität zum farbigen Formazan gespalten wird, welches spektrophotometrisch gemessen werden kann. Der Test kann im kleinen Volumen (Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen) durchgeführt werden, wodurch nur geringe Mengen mikrobieller Extrakte verbraucht wurden. Um im Screening möglichst schnell Ergebnisse zu gewinnen, wurde die Behandlung der Zellen mit mikrobiellem Extrakt nach einem Tag abgebrochen und die Zellvitalität bestimmt. Der Test wurde zunächst für alle drei verwendeten Wirtszelllinien (MRC-5, HSB-2 und Molt-3) etabliert, um geeignete Zellkonzentrationen für den linearen Extinktionsbereich des Messgerätes zu bestimmen. Anschließend wurden Versuche durchgeführt, die untersuchen sollten, inwiefern Zelllysate die Messung beeinflussen könnten. Der Einfluss von Zelllysaten auf die Extinktionsmessung konnte ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde festgestellt, dass FKS des Zellkulturmediums die CC_{50} einer Substanz verändern kann: Je mehr FKS im Zellkulturmedium vorhanden war, desto geringer war die Zytotoxizität von SDS. Dies kann daran liegen, dass FKS als Zellsupstrat die Zellproliferation forciert und dadurch parallel zum zytotoxischen Effekt von SDS eine entgegengesetzte Wirksamkeit entwickelt oder dass geladene Proteine des FKS SDS-Moleküle binden und dadurch als Zytotoxin unwirksam machen. Zur Annäherung an eine möglichst reale Toxizität wurde die CC_{50} -Bestimmung im Screening mit 5 % FKS im Zellkulturmedium durchgeführt.

Der Verlauf der Extinktion über den Substanzkonzentrationen folgt einer sigmoidalen Kurve, wobei in kleineren Substanzkonzentrationen keine toxische Wirkung abzuleiten ist. Mit ansteigender Konzentration vermindert sich die Zellvitalität bis die Extinktion gleich der Nullkontrolle ohne Substanz ist. GCV und DS (MW 500 kD) besitzen im etablierten System mit einer CC_{50} von 6,0 bzw. 21,4 mg/ml nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Fibroblasten. Die CC_{50} für HSB-2 und Molt-3-Zellen haben eine ähnliche Größenordnung. Im Vergleich zu den CC_{50} für GCV aus Angaben verschiedener Literaturstellen (Tab. 26, 0,1-1,5 mg/ml^{63,131,154,155}) ist der ermittelte Wert etwas größer. Das muss in erster Linie damit erklärt werden, dass beim WST-1-Test eine kürzere Einwirkzeit erfolgte. Ein Vergleich der ermittelten CC_{50} für DS mit Literaturwerten (Tab. 27) ist schwer möglich, da in den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen der Einfluss auf die Zellen nur mit DS mit einem kleineren Molekulargewicht von maximal 70 kD ermittelt wurde. So besitzt DS mit 1 bis 70 kD eine CC_{50} von $> 0,5$ mg/ml⁶⁴, bei 5 kD eine $CC_{50} > 0,1$ mg/ml¹²⁶ und bei 10 kD eine CC_{50} von $> 0,4$ mg/ml⁶³. Die einzige konkret

bestimmte CC_{50} liegt bei 2,5 mg/ml bei einem Molekulargewicht von 50 kD¹⁵⁶. Sie ist damit etwa 10fach kleiner, als die im Screeningsystem ermittelten CC_{50} von DS (500 kD), was wiederum mit der längeren Inkubationszeit und vielleicht auch dem 10fach kleineren Molekulargewicht erklärt werden kann.

Mit dem WST-1-Test wurde somit eine Methode etabliert, mit der die Zytotoxizität der mikrobiellen Extrakte schnell und vor allem mit geringem Substanzverbrauch untersucht werden kann. Die Referenzsubstanzen GCV und DS verhalten sich in diesem System etwas weniger toxisch als in anderen Systemen, die in der Literatur beschrieben wurden. Der WST-1-Test ist einfach durchzuführen und das Ergebnis liegt bereits nach einem Tag vor. Da der Test in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt wurde, wird nur ein geringes Probenvolumen benötigt. Der Test war somit für das durchzuführende Wirkstoffscreening sehr gut geeignet. Da es sich bei dem Test um eine Extinktionsmessung des bräunlich-gelben Formazanproduktes handelt, erwies er sich lediglich für farbstoffhaltige Extrakte (Chlorophyll oder andere Pigmente) als ungeeignet.

5.1.2 Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HCMV

5.1.2.1 Immunoperoxidasefärbung

Klassische Methoden zur Bestimmung der IC_{50} einer antiviralen Substanz sind vor allem der Plaquetest und die Bestimmung des zytopathischen Effektes (*engl.* cytopathic effect, CPE). Der Nachteil bei diesen Methoden ist, dass sie materialaufwendig sind (Zellkulturplatten mit 6-24 Vertiefungen) und eine längere Inkubationszeit beanspruchen (6-9 Tage). Bedard *et al.*¹⁵⁰ etablierten eine Methode, bei der die IC_{50} durch den Zellproliferationstest WST-1 erfasst wird. Dabei geht man davon aus, dass infizierte Zellen schlechter proliferieren, wobei dieser Effekt durch ein Virostatikum wieder aufgehoben wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man die antivirale Aktivität indirekt durch den Farbumsatz der WST-1-Reaktion spektrophotometrisch erfasst, was subjektive Fehler beim Auszählen von Plaques oder gefärbten Zellen vermeidet. Andererseits ist der antivirale Effekt des Virostatikums erst sieben Tage p. i. messbar. Ein anderes innovatives Verfahren zur Bestimmung der antiviralen Aktivität einer Substanz ist die Verwendung rekombinanter HCMV-Stämme, die das sogenannte grün-fluoreszierende Protein (*engl.* green-fluorescent proteins, GFP) exprimieren. Sieben Tage p. i. werden die Zellen lysiert und anschließend die Fluoreszenz gemessen¹⁵⁷. Der Nachteil dieser Methode ist wiederum der relativ lange Zeitraum, der nötig ist, bis sich das Virus ausreichend repliziert hat, um messbare GFP-Mengen zu produzieren. Ferner handelt es sich bei dem GFP-markierten HCMV-Stamm um einen rekombinanten Stamm. Das kann unter Umständen seine Infektiosität beeinflussen und damit Auswirkungen auf die Bestimmung der Aktivität antiviraler Substanzen haben. Darüber hinaus erfordern Arbeiten mit rekombinanten HCMV-Stämmen Labore der Sicherheitsstufe 2. Den gleichen Nachteilen rekombinanter Stämme

unterliegt der rHCMVLuc-Stamm, der Luziferasereportergene exprimiert; infizierte Kulturen sind bei Verwendung dieses Stamms allerdings schon nach zwei Tagen auswertbar¹⁵⁸. Nur der *in situ* ELISA bei dem drei bis fünf Tage p. i. die antivirale Aktivität einer antiviralen Substanz gemessen wird und der in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt wird, käme für ein schnelles, materialsparendes Screeningsystem in Frage¹⁵⁹.

Für die Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HCMV wurde im Rahmen dieser Arbeit eine immunzytochemische Methode etabliert, bei der MRC-5-Wirtszellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit HCMV infiziert und gleichzeitig mit antiviraler Substanz behandelt wurden. Drei Tage p. i. wurden infizierte Zellen durch Peroxidasefärbung viraler Antigene markiert und mikroskopisch gezählt. Dieser Zeitraum entspricht etwa einem HCMV-Replikationszyklus. Die Methode ist damit relativ schnell und es wird wenig mikrobielle Substanz verbraucht.

Tab. 26 Zytotoxizität und antivirale Aktivität von GCV gegenüber HCMV - Literaturvergleich

Zellen	Zytotoxizität		Antivirale Aktivität gegen HCMV					Referenz
	Methode, Inkubationszeit	CC ₅₀ [µg/ml]	HCMV-Stamm	MOI	Methode, Inkubationszeit	IC ₅₀ [µg/ml]	SI	
WI-38			Towne	k.A.	Plaque-Assay, 9d	0,4		Mar <i>et al.</i> 1983 ¹⁶⁰
MRC-5			AD169, Towne	k.A.	Plaque-Assay, 7d	0,4-1,6 0,1-1,6		Field <i>et al.</i> 1983 ¹⁶¹
HEL			AD169	0,1	Plaque-Assay, 5d	0,08		Rasmussen <i>et al.</i> 1984 ¹⁶²
MRC-5	Coulter Counter	89,4	AD169	k.A.	Plaque-Assay, 8d	0,43	208	Biron <i>et al.</i> 1985 ¹⁵⁴
MRC-5	Hämatocytozometer	110	AD169 Davis	k.A.	Plaque-Assay, 8d	7 7	16 16	Freitas <i>et al.</i> 1985 ¹⁶³
MRC-5	Hämatocytozometer, 3d	300	AD169, Ø von 12 Stämmen	k.A.	Plaque-Assay	3,1 0,65	97 462	Shigeta <i>et al.</i> 1991 ¹⁵⁵
MRC-5 HEL	Coulter Counter	100 100	AD169	k.A.	Plaque-Assay, 6d	0,48 0,7	208 143	Andrei <i>et al.</i> 1991 ⁶³
HEL	Hämatocytozometer, 5d	1500	Towne	k.A.	Plaque-Assay, 5d	2,8	560	Lee <i>et al.</i> 1999 ¹³¹
Hs-68			AD169	0,0004 0,1	Plaque-Assay, 7d WST-1-Test, 7d	0,3 0,5		Bedard <i>et al.</i> 1999 ¹⁵⁰
HFF	LDH-Aktivität, 7d	>130	AD169	0,002	GFP-markiert, 7d	0,13	>1000	Marschall <i>et al.</i> 2000 ¹⁵⁷

k. A. – Keine Angabe, LDH-Laktatdehydrogenase

Da sich SDS im WST-1-Test als sehr zytotoxisch erwiesen hatte, wurden für das antivirale Screening nur noch die Referenzsubstanzen GCV und DS getestet. Für GCV wurde ein IC₅₀ von etwa 14 µg/ml und für DS ein IC₅₀ von etwa 1,3 µg/µl ermittelt. Beim Vergleich der IC₅₀ (GCV / HCMV) mit anderen Publikationen (Tab. 26) ist festzustellen, dass die

Werte ähnlich der CC_{50} -Bestimmung kleiner sind: Das Spektrum reicht von 3 ng/ml bis 7 µg/ml^{63,131,154,155,160-164}. Alle Werte wurden mit dem Plaque-test ermittelt. Innerhalb dieser Gruppe treten bereits je nach verwendetem Virusstamm, Zelllinie, Inkubationszeitraum etc. Unterschiede zwischen den Arbeitsgruppen auf. Im Screening dieser Arbeit war die Inkubationszeit zwischen GCV und Infektion wesentlich kürzer als bei den Plaque-tests, was die größere IC_{50} im Screeningsystem erklärt. Ein Vergleich der IC_{50} von DS mit Literaturwerten ist genauso wie bei der Bestimmung der CC_{50} schwer möglich. Es gibt nur sehr wenige Literaturangaben (Tab. 27) für DS mit einem Molekulargewicht von 500 kD. Witvrouw und DeClercq (1997) geben die IC_{50} (DS, 500 kD) mit 0,1 µg/ml für den HCMV-Stamm AD169 und mit 0,3 µg/ml für den HCMV-Stamm Davis an, was dem Wert des Screeningsystems nahe kommt. Für weitere DS zwischen 1,5 kD und 110 kD wurden in der gleichen Arbeit IC_{50} im Bereich von 0,3 µg/ml bis 0,8 µg/ml angegeben. Für DS (5-10 kD) gibt es Angaben zwischen 0,1 und 0,77 µg/ml bei verschiedenen Virus- / Zellsystemen⁷³. Je größer das Molekulargewicht, desto kleiner die antivirale Aktivität von DS⁶⁹.

In weiteren Versuchen wurde die etablierte Screeningmethode zur IC_{50} (HCMV)-Bestimmung optimiert. So wurde wiederum der Einfluss von Proteinen (FKS und BSA) auf die antivirale Aktivität überprüft. Beide Substanzen vermindern die Virusreplikation, was zu einer höheren IC_{50} von z. B. DS führte. Wahrscheinlich ist der antivirale Effekt von Serumalbumin auf die negativ geladenen schwefelhaltigen Aminosäuren im Albumin zurückzuführen, die mit den positiv geladenen Glycoproteinen der Virusmembran eine ionische Wechselwirkung eingehen⁶². Um der realen IC_{50} der zu untersuchenden mikrobiellen Substanzen möglichst nahe zu kommen, wurden im Screeningsystem nur 5 % FKS eingesetzt.

Nachdem hiermit ein geeignetes System für die Bestimmung der antiviralen Aktivität von Substanzen gefunden war, wurden zunächst Substanzen überprüft, die im Rahmen des Aufarbeitungsprozesses der mikrobiellen Substanzen eine Rolle spielen könnten. Dazu gehören z. B. niedermolekulare Mikroalgenmetaboliten, die beim Aufarbeitungsprozess verschleppt werden und ihrerseits einen antiviralen Effekt haben könnten. Beispielhaft wurden D-Glucose und Pyruvat untersucht, deren antivirale Aktivität (IC_{50} = 13 bzw. 3,75 mg/ml) in einem für das Screening nicht mehr relevanten Konzentrationsbereich liegt. Ferner wurde der antivirale Effekt von DMSO, Methanol und PBS untersucht, da sie als Lösungsmittel für die mikrobiellen Substanzen verwendet wurden. PBS ist im relevanten Konzentrationsbereich nicht antiviral wirksam (IC_{50} > 50 % v/v). DMSO und Methanol sind dagegen sehr zytotoxisch (CC_{50} = 5 % v/v) bei geringerer antiviraler Aktivität (IC_{50} (DMSO) > 5 % v/v). Lipophile Substanzen wurden deshalb in maximal 2,5 % (v/v) DMSO bzw. Methanol im Screening verwendet.

Die etablierte Methode der Immunoperoxidasefärbung viraler Antigene war somit ein gut geeignetes Verfahren, die antivirale Aktivität von Substanzen relativ schnell und bei

geringem Materialverbrauch zu bestimmen. Die IC_{50} der Referenzsubstanzen GCV und DS haben eine Größenordnung, die der von Literaturangaben vergleichbar ist.

Tab. 27 Zytotoxizität und antivirale Aktivität von DS gegenüber HCMV - Literaturvergleich

MW [kDa]	Zytotoxizität			Antivirale Aktivität gegen HCMV					Referenz
	Zellen	Methode, Inkuba- tionszeit	CC_{50} [mg/ml]	HCMV- Stamm	MOI	Methode, Inkuba- tionszeit	IC_{50} [µg/ml]	SI	
10	HEL			Davis	k.A.	Plaque- Assay, 6- 7d	0,5		Baba <i>et al.</i> 1988 ⁷³
10	MRC-5	Coulter Counter	>0,4	AD169	k.A.	Plaque- Assay	0,77	>520	Andrei <i>et al.</i> 1991 ⁶³
10	HEL	Coulter Counter	>0,4				0,25	>1.600	
1			>0,5				3	>167	
5			>0,5	AD169,	k.A.	CPE	0,7	>714	Neyts <i>et al.</i>
40	HEL		>0,5	Davis			0,3	>1.670	1992 ⁶⁴
70			>0,5				0,6	>830	
5	HEL	Coulter Counter	>0,2	AD169 Davis	0,0005	CPE	0,4 0,1	>500 >2.000	Damonte <i>et al.</i> 1994 ¹⁶⁵
1							2,5		
1,5							0,3		
3,4							0,7		
5				AD169			0,7		
10							0,6		
40							0,3		
70							0,6		
110							0,1		
500	HEL						0,1		Witvrouw und de Clercq 1997 ⁶⁹
1							3		
1,5							0,8		
3,4							0,8		
5							0,7		
10				Davis			0,5		
40							0,3		
70							0,6		
110							0,3		
500							0,3		
50	HEL	Hämato- zytometer, 5d	2,5	Towne	0,2	Plaque- Assay, 5d	2,9	862	Hoshino <i>et al.</i> 1998 ¹⁵⁶

k.A. – keine Angabe

5.1.2.2 Quantitative real-time PCR

Die Immunoperoxidasefärbung ist zwar für ein Screening sehr gut geeignet, aber um z. B. Infektionskinetiken unter Einfluss antiviraler Substanzen zu untersuchen, kann sie nicht verwendet werden. Ferner sollte eine Methode etabliert werden, um die Ergebnisse des Screeningsystems zu verifizieren. Hierfür wurde ein QPCR-System verwendet, bei dem Zellen in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen infiziert und mit antiviraler Substanz behandelt wurden. Drei Tage p. i. wurden die Zellen trypsiniert, die DNA isoliert und die Viruslast (Anteil der HCMV ge/Zelle) mittels QPCR bestimmt. Die damit bestimmten IC_{50}

von GCV und DS (500 kD) sind 6,7 bzw. 0,3 µg/ml etwas kleiner als die mittels POX bestimmten Werte von 14 und 1,3 µg/ml, liegen aber in der gleichen Größenordnung. Ferner ist der Fehlerbereich bei dieser Methode etwas größer, was an der Exponentialfunktion der PCR-Reaktionszyklen liegt. Trotzdem konnten mit der QPCR die Ergebnisse der Immunoperoxidasefärbung etwa in der gleichen Größenordnung reproduziert werden. Wie am Beispiel von GCV gezeigt wurde, ist diese Methode darüber hinaus sehr gut geeignet, um HCMV-Infektionskinetiken unter Einfluss antiviraler Substanzen zu beobachten.

Zum Nachweis, ob die virale mRNA-Expression durch isolierte Wirkstoffe möglicherweise beeinflusst wird, wurden außerdem QPCR-Assays für die Untersuchung der Genexpression charakteristischer HCMV-mRNAs von je zwei IE-, DE- und L-Proteinen etabliert (Kap. 4.1.4). Auch diese Assays sind geeignet, die viralen Viruslasten zu quantifizieren: Infektionen mit Unterschieden in der MOI um den Faktor 10 führen zu einer Differenz der ΔC_t -Werte von etwa drei. Das ist mit dem PCR-Prinzip begründbar, bei dem mit jedem Zyklus die Zahl der Amplifikate idealerweise verdoppelt wird. Daraus ergibt sich bei einer 10fach höheren Ausgangskonzentration eine Differenz der ΔC_t -Werte von: $\Delta\Delta C_t = \log_2 10 \cong 3,2$. Ferner konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von DS zur Infektion die virale RNA-Expression reduziert wird, wogegen die von GCV etwa konstant bleibt. Dies lässt sich mit dem Wirkmechanismus beider Substanzen erklären. DS inhibiert die Anheftung des Viruspartikels an die Wirtszelle. Wenn weniger Zellen infiziert werden oder weniger Viruspartikel eine Zelle infizieren, muß die virale RNA-Expression auch reduziert sein. GCV hemmt dagegen die virale DNA-Synthese. Diese findet aber erst statt, nachdem die virale RNA-Expression bereits begonnen hat. Dass heißt, solange man nur einen Infektionszyklus betrachtet, wird durch GCV das Expressionsniveau viraler RNA kaum reduziert. Auf diese Weise sind die QPCR-RNA-Assays unter Umständen sogar geeignet, Rückschlüsse auf die Wirkungsweise einzelner antiviraler Substanzen zu treffen.

5.1.3 Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HHV-6

Die Bestimmung der antiviralen Aktivität gegenüber HHV-6 erfolgte ebenfalls mittels QPCR. Hierfür musste zunächst ein geeignetes Zellkultursystem gefunden werden, dass einerseits eine optimale HHV-6-Replikation gewährleistet und andererseits möglichst wenig antivirale Substanz verbraucht. HHV-6-Infektionen in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen erwiesen sich für diese Anforderungen als geeignetes System. Im Folgenden stellte sich die Frage nach der Inkubationsdauer: Einerseits erwiesen sich gerade die HSB-2-Zellen als empfindlich hinsichtlich zytotoxischer Effekte z. B. durch GCV, andererseits ist der Replikationszyklus von HHV-6 im Vergleich zu anderen Viren relativ lang. Die Ergebnisse zeigen, dass mittels QPCR die Viruslast bereits zu relativ frühen Zeitpunkten nach Infektion, abhängig von der GCV-Konzentration, messbar ist. Für HHV-6A erwies sich eine Inkubation von einem Tag p. i. und für HHV-6B drei Tage p. i. als geeignet. Die

IC₅₀ von GCV mit je etwa 12 µg/µl für HHV-6A und HHV-6B liegen damit in einer Größenordnung, die der von HCMV vergleichbar ist. Literaturangaben (Tab. 28) für die IC₅₀ (HHV-6A bzw. HHV-6B) von GCV schwanken zwischen 0,7 und 7 µg/ml bzw. 1,6 und 7,6 µg/ml je nach Wirtszelle, Virusstamm und Inkubationszeitraum^{51,52,153,166}. Die Inkubationszeiträume sind für die entsprechenden Systeme ≥ 3 Tage, was den hauptsächlichen Unterschied zu dem in dieser Arbeit gemessenen Werten erklären könnte. Insgesamt ist die IC₅₀ aber in einer ähnlichen Größenordnung. Für DS wurde im Rahmen dieser Arbeit eine IC₅₀ (HHV-6A) von etwa 16 µg/ml gemessen. Leider konnten in der Literatur keine Angaben über die IC₅₀ (HHV-6A) von DS gefunden werden. Im Vergleich zum IC₅₀(DS / HCMV) ist der gegenüber HHV-6A ermittelte um eine Zehnerpotenz größer und demnach DS gegenüber HHV-6A weniger wirksam.

Mit dem HHV-6-QPCR-System wurde ein Verfahren etabliert, das geeignet ist, die antivirale Aktivität von Substanzen gegenüber HHV-6A und HHV-6B in einem frühen Stadium der Virusreplikation zu messen. Der Nachteil dieser Methode ist der relativ hohe Materialverbrauch in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen. Deshalb wurden mit diesem System nur Substanzen untersucht, für die bereits eine antivirale Aktivität gegenüber HCMV nachgewiesen werden konnte. Außerdem kann man aufgrund der Verwandtschaft von HHV-6 und HCMV davon ausgehen, dass die im Fokus der Arbeit stehenden aPS oder Sulfolipide mit einem die HCMV-Replikation inhibierenden Effekt auch eine Wirksamkeit gegen weitere β -Herpesviren aufweisen sollten.

Tab. 28 Aktivität von GCV gegenüber HHV-6A und HHV-6B - Literaturvergleich

Zellen / Stamm	HHV-6A		Zellen / Stamm	HHV-6B		Referenz
	IC ₅₀ [µg/ml]	Methode, Inkubationszeit		IC ₅₀ [µg/ml]	Methode	
CB-MNC / U1102	1,7	Antigenexpression - Absorption, 6d	CB-MNC / HST	7,6	Antigenexpression - Absorption, 6d	Takahashi <i>et al.</i> 1997 ⁵¹
CB-MNC / GS	0,7	Dot-Blot viraler Antigene, 7d				Yoshida <i>et al.</i> 1998 ⁵²
CB-MNC / U1102	0,6					
HSB-2 / GS	7	CPE und DNA-Slot-Blot				Molt-3 / Z29
CBL / GS	1		Qavi <i>et al.</i> 2002 ¹⁶⁶			

CB-MNC mononukleäre Nabelschurblutzellen (*engl.* cord blood mononuclear cells), IFA Immunofluoreszensassay

Neben den QPCR-Assays zur Ermittlung der HHV-6-DNA wurden ferner QPCR-Assays verwendet, die die Expression verschiedener HHV-6A-mRNAs quantifizieren. Damit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass DS die virale mRNA-Expression über einen Zeitraum von mehr als zehn Tagen konzentrationsabhängig reduziert (Kap. 4.1.4).

Genauso wie für HCMV lässt sich dies mit dem antiviralen Wirkmechanismus von DS erklären (Kap. 5.1.2.2).

5.2 Antivirale Aktivität mikrobieller anionischer Polysaccharide, Sulfoglycolipide und Chlorosulfolipide

Mit dem beschriebenen Screeningsystem wurden antivirale Aktivitäten von anionischen Polysacchariden und Sulfolipiden aus aquatischen, phototrophen Mikroorganismen identifiziert. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zu den antiviralen Aktivitäten der mikrobiellen Substanzen diskutiert.

5.2.1 Anionische Polysaccharide aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis*

Aus dem Rhodophyten *Porphyridium purpureum* wurde das anionische Exopolysaccharid EPS und aus dem Cyanobakterium *Arthrospira platensis* wurden die anionischen Polysaccharide TK V2 (intrazelluläres Produkt) und TK V3 (extrazelluläres Produkt) isoliert. Im Folgenden werden zunächst ihre Zytotoxizität und antivirale Aktivität und im Anschluss der antivirale Wirkmechanismus diskutiert.

5.2.1.1 Zytotoxizität und antivirale Aktivität der mikrobiellen, anionischen Polysaccharide

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte das Screening der aus den phototrophen Mikroalgen isolierten Substanzen durch Test auf antivirale Aktivität gegenüber HCMV. Die wirksamen Substanzen EPS, TK V2 und TK V3¹⁵¹ wurden außerdem hinsichtlich einer Aktivität gegen HHV-6 untersucht und zum Test auf weitere Aktivitäten an kooperierende Arbeitsgruppen gegeben. In Tab. 29 sind alle in dieser Arbeit und die im Rahmen von Kooperationsprojekten ermittelten Werte der aPS EPS, TK V2 und TK V3 hinsichtlich Zytotoxizität und antiviraler Aktivität im Vergleich zum Standardtherapeutikum GCV und zur Referenzsubstanz DS zusammengefasst.

Oberhalb einer Konzentration von 5 mg/ml konnten aufgrund der hohen Viskosität (v. a. bei EPS) und aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Substanzen keine Zytotoxizitätstests durchgeführt werden. Alle drei Substanzen zeichnen sich im WST-1-Test mit MRC-5- (1, 3 und 7 Tage) und HSB-2-Zellen (1 Tag) durch eine sehr geringe Zytotoxizität aus. Die Toxizität gegenüber HFF-Zellen im Laktatdehydrogenase-Nachweis nach 7-tägiger Behandlung ist dagegen etwas höher, aber mit der von GCV vergleichbar. Mit den bereits im Kapitel 5.1.1 diskutierten Unterschieden hinsichtlich der verwendeten Methoden, Inkubationszeiten etc. sind die isolierten mikrobiellen Naturstoffe damit ähnlich gering toxisch wie die aPS anderen Ursprungs (vgl. Tabelle 1 im Anhang).

Tab. 29 Zusammenfassung der antiviralen Aktivitäten von EPS, TK V2 und TK V3 gegenüber GCV und DS.

	Methoden		GCV	DS	EPS*	TK V2**	TK V3**
MRC-5	WST-1, d1	CC ₅₀ [mg/ml]	6	21,4	> 5	> 5	> 5
	WST-1, d3	CC ₅₀ [mg/ml]	n.e.	n.e.	1,7	n.e.	2,5
	WST-1, d7	CC ₅₀ [mg/ml]	> 5	n.e.	3,9	n.e.	1,2
HCMV	APU, d3	IC ₅₀ [µg/ml]	14	1,3	90	39	4
		SI	430	16.000	> 56	> 128	> 1250
HFF ^a	LDH, d7	CC ₅₀ [mg/ml]	0,42	n.e.	n.e.	0,54	0,4
HCMV ^a	GFP, d7	IC ₅₀ [µg/ml]	0,7	n.e.	n.e.	31	2,2
		SI	601	n.e.	n.e.	17,3	209
HSB-2	WST-1, d1	CC ₅₀ [mg/ml]	>2	38	> 5	2,8	3,6
HHV-6A	QPCR, d1	IC ₅₀ [µg/ml]	13	16	< 25	< 25	< 250
		SI	> 150	2390	> 200	> 112	> 14
Hep-2 ^b	WST-1, 3d	CC ₅₀ [mg/ml]	n.e.	> 0,05	> 0,5	n.e.	> 0,5
VV ^b	GFP, d2	IC ₅₀ [µg/ml]	n.e.	1,24	0,65	>250	0,78
		SI	n.e.	> 40	> 770	n.e.	> 640
HSV-1 ^a	PFU, d4	IC ₅₀ [µg/ml]	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	2,4
EBV ^a	d6	IC ₅₀ [µg/ml]	n.e.	n.e.	n.e.	30-90	93,5
Influenza A Virus ^a	GFP, d1	IC ₅₀ [µg/ml]	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	94,6
HIV-1 ^a	GFP, d5	IC ₅₀ [µg/ml]	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	3,2

* Extrakt aus *Porphyridium purpureum*; ** Extrakte aus *Arthrospira platensis*; ^aDiese Werte wurden von Sabine Rechter in der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Marschall, Virologie, Erlangen ermittelt¹⁵²; ^bDiese Werte wurden von John Achenbach in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Nitsche, Robert Koch-Institut, Berlin ermittelt;

n.e. nicht ermittelt; QPCR Quantitative real-time PCR; LDH Laktatdehydrogenase-Nachweis; GFP - Rekombinantes Virus, das grün fluoreszierendes Protein (*engl.* green fluorescent protein) exprimiert

Wie die Daten dieser Arbeit und die der Kooperationspartner zeigen, zeichnen sich die drei aPS weiterhin durch ein breites Spektrum antiviraler Aktivitäten aus (Tab. 29). Erstmals wurden mit dieser Arbeit antivirale Aktivitäten aus *Porphyridium* gegenüber HHV-6 und HCMV (Tabelle 1 im Anhang) gezeigt. Im Vergleich zu Substanzen aus *Arthrospira platensis* ist EPS aus *Porphyridium purpureum* gegenüber HCMV nur bei höheren Konzentrationen wirksam. Insgesamt sind die ermittelten Aktivitäten mit denen anderer aPS natürlichen Ursprungs vergleichbar (vgl. Tabelle 1 des Anhangs). Im intrazellulären Produkt aus *Arthrospira platensis* TK V2 ist wahrscheinlich das von der israelischen Arbeitsgruppe um Hayashi^{120,121} isolierte Ca-Spirulan (Kap. 1.2.4.3) enthalten. Die extrazelluläre Substanz TK V3 aus *Arthrospira platensis* ist dagegen neu und im direkten Vergleich mit TK V2 etwa zehnfach wirksamer (Tab. 29). Darüber hinaus ist es etwa 3,5fach aktiver als das bisher verwendete Standardtherapeutikum GCV. Die sehr gute Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen HCMV-Aktivitäten mit denen, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Marschall bestimmt wurden, ist ein weiteres Indiz für die sehr gute Qualität des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Screeningsystems.

Im Vergleich zu den meisten in der Literatur beschriebenen antiviralen Produkten aus phototrophen Organismen (zum Teil in natürlichen Biotopen gesammelt, Tabelle 1 des Anhang) ist weiterhin hervorzuheben, dass *Porphyridium purpureum* sowie *Arthrospira*

platensis in sterilisierbaren Photobioreaktionen monoseptisch kultiviert wurden und sowohl Produktbildung als auch antivirale Aktivitäten mehrfach reproduziert wurden¹⁵¹.

Infektionskinetiken zeigten außerdem, dass auch nach einwöchiger Infektion bei gleichzeitiger Behandlung mit einer der drei Substanzen die viralen DNA- und RNA-Lasten reduziert sind. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeitsgruppe von Prof. Marschall überein, die für TK V3 mittels Westernblot zeigte, dass es die Expression der viralen Produkte von UL86 (MCP), UL44, p86 (IE2) und p72 (IE1) reduziert¹⁵². Die mRNA-Expressionskinetiken der sechs viralen Gene UL36, US22, UL54, UL70, UL46 und UL86) zeigten bei Zugabe der aPS im Gegensatz zu GCV einen ähnlichen Verlauf wie nach Zugabe von DS, was für einen vergleichbaren Wirkmechanismus sprechen könnte.

5.2.1.2 Antiviraler Wirkmechanismus der mikrobiellen, anionischen Polysaccharide

Hypothetischer Wirkmechanismus

Die im antiviralen Screening identifizierten mikrobiellen Wirkstoffe aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis* gehören genauso wie DS zur Stoffgruppe der aPS. Aufgrund von Größe und Ladung ist es unwahrscheinlich, dass aPS zur antiviralen Wirkung in die Zellen gelangen⁶⁹. Die Arbeitsgruppe um de Clerq⁶⁹ formulierten die Hypothese, nach der aPS aufgrund ionischer Wechselwirkungen mit den Glycoproteinen der Virusmembran die Adsorption und Membranfusion mit der Targetzelle blockieren (Kap. 1.2.3.2).

Sowohl DS als auch TK V3 aus *Arthrospira platensis* konnten entsprechend der Ergebnisse des Immunoperoxidaseassays die HCMV-Replikation vollständig hemmen. Trifft die These der Hemmung des Zell-Virus-Kontakts zu, könnten die mikrobiellen Wirkstoffe und DS während der Infektion im Überschuss vorgelegen haben und die HCMV-Replikation zu 100 % inhibieren. Ein Zusatz von GCV führte dagegen entsprechend der Ergebnisse der POX nie zu einer vollständige Inhibierung von HCMV innerhalb des beobachteten Replikationszyklus von drei Tagen. Diese Beobachtung lässt bereits auf einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus schließen. Die Wirkung von GCV beruht auf einer Hemmung der viralen DNA-Synthese (siehe Kap. 1.2.2). Dies bedeutet für unsere Methode, dass sich in infizierten Zellen trotz Zugabe von GCV virales Antigen bilden kann. Je mehr GCV auf die Einzelzelle einwirkt, desto geringer ist die virale DNA-Synthese, desto weniger DNA liegt als Matritze für die Transkription vor und desto geringer ist möglicherweise die Antigensynthese und damit die Färbung der Zelle. Die Ergebnisse der Immunoperoxidasefärbung bestätigen somit die theoretischen Vorstellungen. Im Folgenden werden weitere Ergebnisse diskutiert, die den antiviralen Wirkungsmechanismus klären sollen.

Time of Addition- und Adsorptionsexperimente

TOA-Experimente mit DS, EPS aus *Porphyridium purpureum* sowie TK V2 und V3 aus *Arthrospira platensis* haben gezeigt, dass diese Substanzen im Gegensatz zu GCV zu sehr frühen Zeitpunkten im HCMV-Infektionsprozess eine Rolle spielen. Je später diese Substanzen p. i. dazugegeben wurden, desto geringer war ihre Wirksamkeit. Dieser Effekt ließ sich bereits 15 min p. i. zeigen, wogegen bei GCV frühestens nach 4 h eine derartige Wirkung messbar war. Der Versuch zeigt, dass sPS zum frühen Zeitpunkt der Infektion eine Rolle spielen. Im Folgenden wurden die Zellen mit den Substanzen bzw. das Virus mit den Substanzen vor HCMV-Infektion 30 min präinkubiert. Zum Vergleich wurden die Substanzen wiederum 30 min nach der Infektion dazugegeben. GCV hat bei allen drei Ansätzen etwa gleich gewirkt. DS, EPS aus *Porphyridium purpureum* sowie TK V3 aus *Arthrospira platensis* inhibierten die HCMV-Replikation am besten, wenn das Virus damit präinkubiert wurde. Dieser Effekt konnte auch für TK V2 aus *Arthrospira platensis* gezeigt werden, das allerdings genauso gut bei Präinkubation der Zellen die HCMV-Replikation hemmte. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Versuche mit TK V2 und TK V3 an HCMV und HSV-1 der Arbeitsgruppe von Prof. Marschall¹⁵².

Die Ergebnisse der TOA-Versuche stimmen mit der These von Witvrouw und de Clercq⁶⁹ überein, wonach sPS zu den Glycoproteinen der Virushülle eine ionische Wechselwirkung aufweisen, wodurch die frühen Prozesse von Virusadsorption und Membranfusion verhindert werden. Für das intrazelluläre Produkt aus TK V2 kann es noch einen weiteren Wirkmechanismus geben. Eine mögliche Ursache wäre, dass der Extrakt mindestens vier verschiedene Komponenten enthält. Es wäre z. B. vorstellbar, dass die sPS-Komponenten entsprechend der Theorie an die Virusmembran binden, wogegen die proteinhaltigen Komponenten synergistisch agieren und entweder in die Zelle eindringen und wirken oder rezeptorvermittelte Signalkaskaden aktivieren, die die Virusreplikation blockieren. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Affinität zwischen TK V2 und den Viruspartikeln sehr hoch ist, wodurch die Bindung beider Komponenten so schnell erfolgt, dass eine Präinkubation der Zellen mit TK V2 keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von TK V2 hat.

TOA-Versuche mit HHV-6A konnten die Hypothese ionischer Wechselwirkungen zwischen aPS und Glycoproteinen der Virusmembran nicht bestätigen. Dort war die HHV-6A-Replikation in allen drei Ansätzen bei allen Substanzen etwa gleich. Bisher ist nicht geklärt, warum der HHV-6-Replikationszyklus deutlich länger dauert als der anderer Viren. So ist z. B. bekannt, dass HHV-6 keine Affinität zu HSPG der Zellmembran hat, was bei anderen Viren den ersten Kontakt zur Targetzelle vermittelt²⁷. Vielleicht ist dies die Ursache dafür, dass der Prozess der Virusbindung an die Targetzelle vergleichsweise länger dauert. Für diesen Fall sollte in zukünftigen Experimenten mehr als 30 min Inkubationsdauer gewählt werden. Wenn hingegen HSPG für die HHV-6A-Infektion eine untergeordnete Rolle spielen und HSPG und aPS zur selben Stoffgruppe gehören, müssten aPS auch nur eine geringe Affinität zu diesen HHV-6-Membranglycoproteinen besitzen.

Das würde auf einen anderen Wirkmechanismus der aPS bei HHV-6A hindeuten.

Setzt man voraus, dass sich aPS gezielt an einzelne Glycoproteine der Virusmembran lagern, dann müsste der Zell-Virus-Kontakt entweder bei der Virusadsorption an die Targetzelle oder bei der Fusion von Virus- und Zellmembran unterbrochen werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem Zellen zunächst fixiert und anschließend bei 4 °C zusammen mit den antiviralen Substanzen mit HCMV „infiziert“ wurden. Fixierung und Infektion bei 4 °C sollten den Prozess der Membranfusion vermeiden und lediglich die Virusadsorption ermöglichen. Für DS konnte gezeigt werden, dass die Adsorption konzentrationsabhängig inhibiert wurde, für die drei mikrobiellen Extrakte nicht. EPS aus *Porphyridium purpureum* scheint die Virusadsorption sogar zu forcieren. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass die Viruslast mittels QPCR gemessen wurde, wobei die vorher durchzuführende DNA-Isolation als sehr problematisch zu betrachten ist. Da bei diesem Versuch die Zellen vor DNA-Isolation nicht gewaschen wurden, waren im Zelllysat sehr viele aPS-Reste enthalten, die im Laufe der DNA-Isolation herausgewaschen werden mussten, weil sie sehr starke PCR-Inhibitoren sind. Aufgrund dieser Aufarbeitung und der sehr empfindlichen Meßmethode der QPCR sind die Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten.

Demnach lässt sich festhalten, dass die mikrobiellen Substanzen genauso wie DS die HCMV-Zell-Adsorption und/oder die Membranfusion inhibieren, indem sie einen Effekt auf die freien Viruspartikel ausüben, was mit der Theorie übereinstimmt. Für HHV-6A scheint es einen anderen Mechanismus zu geben.

5.2.2 Mikrobielle Sulfoquinovosyldiacylglycerole

SQDG-Fractionen aus verschiedenen phototrophen Mikroorganismen wiesen im Screening des WST-1-Tests nach eintätiger Behandlung zunächst nur einen geringen Einfluss auf die Zellvitalität auf. Weitere Versuche mit Inkubationszeiten von drei und sieben Tagen zeigten jedoch eine sehr hohe Toxizität dieser Substanzen gegenüber MRC-5-Zellen und ebenso gegenüber SUP-T1-Zellen (T-Lymphoblastomzellen, finden Verwendung als HIV-Wirtszellen, Daten nicht gezeigt). Dabei waren SQDGs vom Typ 1 (Acylreste ausschließlich am Glycerol) und vom Typ 2 (Acylreste sowohl am Glycerol als auch an der Glucose) gleichermaßen zytotoxisch. Dies stimmt mit den Daten anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls vergleichsweise hohe Zytotoxizitäten von SQDGs gegenüber verschiedenen Zellen beschrieben haben^{167,168}. Die Toxizität der SQDGs könnte auf ihren amphipolaren Charakter zurückzuführen sein. Demnach könnten sie als Detergentien die Zellmembran lysieren.

Da andererseits bereits antivirale Aktivitäten von SQDGs publiziert sind (Kap. 1.2.4.2), wurde in weiteren Experimenten die antivirale Aktivität der isolierten SQDG-Fractionen untersucht. Sie zeichnen sich einerseits durch eine antivirale Aktivität gegenüber der HCMV-Replikation im Screeningsystem und andererseits durch die Inhibierung der

Reversen HIV-Transkriptase aus (Daten von Ivonne Naumann, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Universität Erlangen-Nürnberg). Interessanterweise verbesserten kleine Konzentrationen einer SQDG-Fraktion im HCMV-Screening sogar die Infektiosität. Letzteres könnte ebenfalls auf den amphipolaren Charakter der SQDGs zurückzuführen sein, der für kleine SQDG-Konzentrationen unter Umständen die Membranfusion von Virus- und Zellmembran beim initialen Infektionsprozess stimuliert.

Zur Untersuchung, inwiefern die gemessene, SQDG-vermittelte Reduktion der Viruslasten im Screeningsystem eine Folge der verringerten Zellzahlen drei Tage p. i. ist, wurden HCMV-Infektionen mit der IC_{50} von SQDG-Hc, SQDG-Pt1a bzw. SQDG-Pt1b behandelt und die zellbezogene Viruslast im zeitlichen Verlauf mittels QPCR ermittelt. Höhere Konzentrationen konnten für diese Versuche aufgrund der Zytotoxizität nicht eingesetzt werden. Für diese Konzentrationen konnten mit der QPCR keine virusinhibierenden Eigenschaften gezeigt werden. Dies kann zwei Ursachen haben: Einerseits ist die QPCR-Methode dahingehend begrenzt, dass die Differenzierung von PCR-Amplifikaten mit Unterschieden von kleiner bzw. gleich der Hälfte nicht quantifizierbar sind. Andererseits könnten diese Ergebnisse auf eine Korrelation von Zytotoxizität und antiviraler Aktivität hinweisen. Zur Klärung dieser Frage wurden nachfolgend hohe SQDG-Konzentrationen verwendet und die zellbezogene Viruslast bereits einen Tag p. i. und Behandlung bestimmt. Hiermit konnte beispielhaft anhand von SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b (SQDGs mit Fraktionen vom Typ 1 und Typ 2) gezeigt werden, dass sie den Anteil viraler DNA bezogen auf den Anteil zellulärer Aktin-DNA sehr stark inhibieren. Da zytotoxische Effekte einen Tag nach Infektion unter Umständen noch keine Auswirkung auf den Anteil zellulärer DNA haben, blieb die Frage durch diese Versuche nach wie vor ungeklärt.

Anschließend Färbungen gegen ein HCMV-IE-Antigen beweisen letztendlich deutlich die antivirale Aktivität aller SQDG-Fraktionen unabhängig von ihrer Zytotoxizität. Interessanterweise sind die mit letztgenannter Methode gemessenen IC_{50} (IE- Antigen) etwa halb so groß, wie die mit dem HCMV-DE-Antigen im Screeningsystem drei Tage p. i. gemessenen Aktivitäten. Dies stellt einen Hinweis auf den antiviralen Wirkmechanismus der SQDGs dar. Somit könnte die Expression des IE-Antigens (viraler transaktivatorischer Transkriptionsfaktor) direkt oder indirekt durch SQDGs inhibiert werden. Da die Funktion dieses Transkriptionsfaktors wahrscheinlich nicht komplett inhibiert wird, kann die weitere HCMV-Replikation - wenn auch verzögert - trotzdem ablaufen, wobei DE-Antigen gebildet wird. Dies könnte erklären, warum die antivirale Aktivität geringer ist, wenn DE-Antigen präsentierende Zellen erfasst werden. Andererseits geben die TOA-Experimente für höhere Konzentrationen der jeweiligen SQDG-Fraktionen deutliche Hinweise auf eine Inhibierung der HCMV-Infektion durch Hemmung der initialen Infektionsprozesse (Virusadsorption an Targetzelle, Membranfusion). Dies könnte unter Umständen auf die negative Ladung der SQDGs zurückzuführen sein und wäre damit ein den aPS vergleichbarer antiviraler Mechanismus

(Kap. 1.2.3). Der Effekt, der die SQDG-vermittelte Inhibierung der Reversen HIV-Transkriptase verursacht, ist damit nicht zu erklären. Dies deutet offensichtlich auf multiple antivirale Wirkmechanismen durch SQDGs, die tiefergehend untersucht werden könnten.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass SQDGs in der verwendeten Form aufgrund ihrer Zytotoxizität als antivirale Substanzen eher ungeeignet sind. Zwar wurden mikrobielle, antiviral wirksame SQDGs bereits mehrfach beschrieben^{104,105,108}, aber der Nachweis der antiviralen Wirksamkeit beschränkte sich zumeist auf die Beschreibung der Inhibierung der Reversen HIV-Transkriptase bzw. eukaryotischer DNA-Polymerasen. Aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit SQDGs unterschiedlicher chemischer Struktur getestet wurden, muss man davon ausgehen, dass diese Substanzgruppe aufgrund ihrer Zytotoxizität generell als antivirale Wirkstoffgruppe eher ungeeignet ist. Das Paradigma des antiviralen Potentials dieser Substanzgruppe sollte somit neu diskutiert werden.

Da die beschriebenen SQDGs hinsichtlich ihrer Struktur sehr gut analysiert sind und die Isolierung ebenfalls optimiert wurde, sind Anwendungen für andere Zwecke oder gezielte chemische Modifizierungen überlegenswert. So wurden neben der Hemmung verschiedener DNA-Polymerasen¹⁶⁹⁻¹⁷¹ ebenfalls angiogenetische, die DNA-Bindung von p53 und Telomerase-inhibierende Eigenschaften von Sulfoglykolipiden etwas verschiedener Molekülstruktur festgestellt¹⁶⁹⁻¹⁷⁴. Diese Charakteristika machen Sulfoglykolipide im Allgemeinen als potentielle Substanzen für die Behandlung solider, maligner Tumore interessant. Ferner gibt es Indizien für eine mögliche Anwendung als Immunsuppressiva^{171,172,175}.

Da die anionische Sulfogruppe für die biologische Wirksamkeit der SQDG wahrscheinlich ebenso wie die Sulfatgruppe für die antivirale Wirksamkeit der sPS entscheidend ist, wäre es aussichtsreich, die SQDGs chemisch oder enzymatisch derart zu modifizieren, dass sich die Zytotoxizität von der antiviralen Aktivität trennen lässt. Die verringerte Zytotoxizität bei gleichzeitiger immunogener Aktivität konnte so für diacetylierte Sulfodisaccharide aus der Membran von *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt werden¹⁷⁶.

5.2.3 Chlorosulfolipide aus *Ochromonas danica*

Die CC₅₀ der Chlorosulfolipidfraktionen aus dem Flagellaten *Ochromonas danica* beträgt in ihrer aufgereinigsten Form 100 µg/ml und die IC₅₀ 30 µg/ml. Daraus ergibt sich ein SI von 3,3. Die Substanz ist damit einerseits *in vitro* gegen HCMV gut wirksam, andererseits aber auch sehr zytotoxisch und damit als Virustatikum ungeeignet. Cininiemello *et al.*¹⁷⁷ haben ein Chlorosulfolipid aus *Mytilus* isoliert, welches ebenfalls eine sehr hohe Zytotoxizität aufweist: 13,5 und 20 µg/ml gegenüber WEHI 164 Mausfibrosarkomzellen bzw. RAW 274.7 Mausmonozyten bei dreitägiger Behandlung der Zellen. Genauso wie SQDG sind Chlorosulfolipide amphipatisch. Möglicherweise ist ihre Zytotoxizität auf eine Zerstörung der Zellmembran zurückzuführen (5.2.2).

5.3 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Screeningsystem etabliert und anhand der Referenzsubstanzen DS und GCV optimiert, mit dem zuverlässig, schnell und bei vergleichsweise geringem Verbrauch Naturstoffe hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegenüber HCMV getestet werden können. Die Ergebnisse des Screeningsystems konnten für die Referenzsubstanzen mit einer weiteren Methode (QPCR) verifiziert werden. Mit diesem System wurden aPS aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis*, Chlorosulfolipide aus *Ochromonas danica* und verschiedene SQDG aus unterschiedlichen aquatischen, phototrophen Mikroorganismen positiv für anti-HCMV-Aktivitäten getestet. Im Falle der aPS aus dem Cyanobakterium *Arthrospira platensis* wurde eine neue, extrazelluläre Substanz gefunden, mit einer etwa zehnfach besseren Wirksamkeit als der des intrazellulären Produktes, das wahrscheinlich das bereits bekannte Ca-Spirulan enthält. Das extrazelluläre Produkt ist in seiner anti-HCMV Aktivität im Screeningsystem außerdem etwa 3,5fach besser als das Standardtherapeutikum GCV und hemmt die HCMV-Replikation zu 100 % bei nur 20 µg/ml, was mit GCV bis zu 40 µg/ml nicht erzielt werden konnte.

Ferner wurde unter Verwendung der QPCR eine Methode zum Nachweis von anti-HHV-6-Aktivitäten etabliert und optimiert. Die aPS weisen zudem eine Wirksamkeit gegen HHV-6 auf. Für ein Polysaccharid des Rhodophyten *Porphyridium purpureum* ist dies erstmalig der Fall.

Die antivirale Wirksamkeit der aPS scheint in erster Linie auf der Inhibierung der Virusadsorption und/oder -Fusion an die bzw. mit der Zellmembran zu beruhen. Im Vergleich zu bisher in der Anwendung befindlichen Virustatika, die direkt die virale DNA-Replikation inhibieren, weisen diese Substanzen damit einen neuartigen Wirkmechanismus auf und hätten das Potential zur synergistischen Verwendung z. B. mit GCV. Im Gegensatz zu bereits beschriebenen aPS aquatischer Organismen wurden die Substanzen außerdem im Hinblick auf eine weitere pharmakologische Entwicklung einschließlich klinischen Anwendung in monoseptischen Kulturen aus sterilisierbaren Photobioreaktoren gewonnen und ferner die Herstellung der Substanzen hinsichtlich Produktausbeute und -Qualität optimiert¹⁵¹.

Die als antiherpal identifizierten Chlorosulfolipide und SQDGs sind aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität für klinische Anwendungen eher irrelevant. Für die SQDGs, die in der Literatur als Inhibitoren der Reversen HIV-Transkriptase propagiert werden, konnte die uneingeschränkte Eignung nicht bestätigt werden. Da die Substanzen trotzdem eine interessante, potentielle bioaktive Stoffgruppe darstellen, sind weitere Untersuchungen nach struktureller Modifikation denkbar.

6 Ausblick und Perspektiven

6.1 Antivirales Screeningsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zum Screening von Naturstoffen hinsichtlich einer antiviralen Aktivität gegen HCMV und HHV-6 erfolgreich etabliert. In Anbetracht des steigenden Bedarfs neuer Virostatika steht damit ein geeignetes *in vitro* System für die Testung weiterer potentieller Wirkstoffe zur Verfügung. Darüber hinaus bieten die etablierten QPCR-Assays die Möglichkeit, HCMV- und HHV-6-Infektionen näher zu charakterisieren und gegebenenfalls erste Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der Substanzen zu erzielen.

6.2 Potential zur klinischen Verwendbarkeit der anionischen Polysaccharide aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis*

Hinsichtlich einer möglichen klinischen Verwendung der identifizierten antiviralen Substanzen sollen im Folgenden Aspekte der Pharmakokinetik, mögliche Nebenwirkungen, das Therapiepotential und das Präventionspotential der isolierten aPS diskutiert werden.

Mögliche Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

Für verschiedene sPS wurden folgende pharmakokinetischen Informationen von Lüscher-Mattli ⁶² zusammengefasst:

- Oral aufgenommenes DS wird nur gering absorbiert und stark degradiert, was zu keiner nachweisbaren DS-Akkumulation im Plasma führt. Bei intravenöser Applikation steigt die DS-Konzentration im Plasma dosisabhängig an und nimmt mit einer Halbwertszeit von 1,5-2 h wieder ab.
- Die Anwesenheit von Humanserum reduziert die antivirale *in vitro* Aktivität von DS sehr stark, was an der Adsorption durch unspezifische, kationische Serumkomponenten liegen kann.
- Das pharmakokinetische Verteilungsvolumen von Dermatansulfat beträgt 5,1-7,2 l, ist also etwas größer als das gesamte Plasmavolumen. Bei intravenöser Applikation scheint es jedoch auf den Blutkreislauf beschränkt zu sein.
- Pentosansulfat und möglicherweise DS werden durch das retikulohistiozytäre System abgebaut und in Niere, Leber und Milz gespeichert.

Hiebert beschreibt ebenfalls eine geringe Plasmakonzentration nach oraler Applikation von Heparin in Experimenten mit Ratten. Er zeigte allerdings, dass orale genauso wie parenterale Heparinapplikation zu einer Akkumulation in den Endothelzellen führt. Daher könnte eine niedrige plasmatische Heparinkonzentration auf eine sehr viel höhere im

Endothel hinweisen. Ferner wurde auch bei oraler Applikation ein systemischer Effekt (verminderte Thromboshäufigkeit) nachgewiesen¹⁷⁸.

Die hauptsächliche, unerwünschte Nebenwirkung von Polyanionen ist die inzwischen sehr gut untersuchte blutgerinnungshemmende Wirkung durch Aktivierung von Antithrombin und/oder Heparin Cofaktor II. Durch strukturelle Änderungen kann dieser Effekt reduziert werden. Ferner wurde von starker, aber reversibler Thrombozytopenie berichtet¹⁷⁹. Tabelle 2 im Anhang gibt eine Übersicht über Berichte von *in vivo* Applikationen einschließlich klinischer Studien von sPS und verwandten (poly-) anionischen Substanzen.

Diese Erkenntnisse machen für die isolierten Substanzen aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis* die Untersuchung von Pharmakokinetik sowie Hämostase und Thrombozytopenie beeinflussende Aktivitäten zwingend erforderlich. Weiterhin könnte man untersuchen, wie sich gegebenenfalls auftretende Nebenwirkungen durch strukturelle Modifizierungen (z.B. enzymatische Hydrolyse) reduzieren lassen.

Therapie viraler Erkrankungen

Die Wirkung von aPS im Rahmen der Infektion von Zelle zu Zelle also im Gewebe ist bisher noch wenig untersucht⁸³. Sie erscheint für diese Substanzen aufgrund der Molekülgröße eher unwahrscheinlich. Für die strukturverwandten, kleineren Moleküle Suramin und PI-88 (sulfatierte Oligosaccharide) konnte dagegen gezeigt werden, dass sie die HSV-Infektion von Zelle zu Zelle inhibieren, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist^{74,180}.

Obwohl zahlreiche Berichte über die antivirale *in vitro* Aktivität von Polyanionen existieren, gibt es derzeit nur wenige *in vivo* Erkenntnisse. Meist beschränken sie sich auf lokale Applikationen und die Substanzen sind bereits beim initialen Infektionsprozess vorhanden. Abgesehen von den beschriebenen, nachteiligen pharmakokinetischen Eigenschaften und den unerwünschten Nebenwirkungen muss man zusätzlich bedenken, dass körpereigene HSPG selbst antivirale Effekte ausüben könn(t)en:

- So können HSPG die Bindung von HHV auch an Zellen vermitteln, die keinen HHV-Eintritts-Rezeptor haben und damit verhindern, dass HHV Zellen mit Rezeptor erreichen¹⁸¹.
- Außerdem wird Heparansulfat auch an der Basalmembran zwischen Geweben exprimiert¹⁸¹. So wurde aufkonzentriertes HSV-1 schon an der Basalmembran von Organkulturen aus Hautbiopsaten gefunden¹⁸². Ebenso wurde die Basallamina als eine physikalische Barriere für die HSV-1-Infektion von Muskelzellen beschrieben¹⁸³.
- Blut enthält ebenfalls Heparin oder heparinbindende Komponenten, die die Bindung von HHV an Zellen behindern. Insofern werden HHV-Infektionen nicht nur durch das Immunsystem eingeschränkt, sondern auch durch lösliches oder

Daher bleibt zu klären, ob xenobiotische aPS diese körpereigenen, physiologischen und metabolischen Prozesse additiv unterstützen können. Weiterhin gibt es inzwischen einige Indizien, dass die HSPG bei *in vivo* Infektionen weniger relevant sind, als bei *in vitro* Infektionen¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

Untersuchungen zu antiviraler *in vivo* Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen strukturverwandter, niedermolekularerer Verbindungen, wie z. B. für Suramin und PI-88, stehen noch aus. In diesem Sinne wären auch die in dieser Arbeit vorgestellten aPS aus *Porphyridium purpureum* und *Arthrospira platensis* verwendbar. Hierfür müssten sie chemisch ggf. modifiziert werden, z. B. durch spezifische enzymatische Hydrolyse. Sollten die Substanzen auch in diesen Analysen befriedigende, positive Ergebnisse aufweisen, könnte man Kombinationstherapien mit Inhibitoren der viralen DNA-Replikation, wie z. B. GCV und Foscarnet in Betracht ziehen. Idealerweise sollten beide Substanzen synergistische Effekte aufweisen und die Inzidenz von resistenten Stämmen vermindert sein.

Prävention viraler Infekte

Aufgrund der Molekülgröße liegt das primäre Potential von aPS demnach in ihrer Wirkung auf freie Viruspartikel und zielt auf eine prophylaktische Anwendung, z. B. als Mikrobizid (Vaginalcreme) zur Vermeidung von HIV-Infektionen oder *Herpes genitalis* (HSV-2)⁸³. Derartige Anwendungen umgehen außerdem die Nachteile intravenöser Applikationen, wie kurze Halbwertszeit im Plasma, Thrombozytopenie, Gerinnungshemmung, Inaktivierung durch Plasmakomponenten und mangelnde Fähigkeit, in infiziertes Gewebe einzuwandern. Hierbei wird ihr Wirkmechanismus ausgenutzt, wobei Viruspartikel vor Eindringen in den Organismus am aPS immobilisiert werden. Im Falle von Emelle, VivaGel, Invisible Condom, Carraguard und Pro 2000 laufen derzeit bereits klinische Studien der Phasen I-III¹⁸⁸ (siehe Tabelle 2 im Anhang).

Die Häufigkeit von HIV/AIDS in Populationen, bei denen Algen eine regelmäßige Nahrungsgrundlage bilden (z.B. im Tschad, Korea, Japan), ist um ein Vielfaches (bis zu 1000fach) geringer, als in vergleichbaren Populationen¹⁸⁹. Dabei setzen sich die beschriebenen Algenextrakte größtenteils aus aPS zusammen. Eine direkte Kausalität ist jedoch nicht erwiesen. Trotzdem behaupten die Autoren Teas *et al.*¹⁸⁹, dass wässrige Algenextrakte (aus *Arthrospira*, *Undaria* oder *Sargassum*) als regelmäßiger Nahrungsbestandteil HIV-Infektionsraten verringern sowie bei bestehender HIV-Infektion die Virusreplikation reduzieren, außerdem HIV-verursachte Symptome und das Auftreten opportunistischer Infektionen vermindern und damit das Fortschreiten zu AIDS hinauszögern könnten. Teas *et al.* stützen ihre Hypothese wird gestützt auf folgende Indizien:

- Nachweisliche anti-HIV *in vitro* (und *in vivo*) Wirksamkeit von Algenextrakten (siehe auch Kap. 1.2.4).
- Nachweisliche Immunomodulation durch Algenextrakte: IFN- γ -Produktion und Zytolyse durch natürliche Killerzellen¹⁹⁰, Stimulation der T-Lymphozytenproliferation, der zytotoxischen T-Zellaktivität, der Ig-Produktion durch B-Lymphozyten und der TNF-Produktion durch Monozyten¹⁹¹. Durch das intestinale Immunsystem (*engl.* gut-associated lymph tissue, GALT) werden große Moleküle absorbiert und anschließend durch Zellen des Immunsystems präsentiert und transportiert¹⁹². Dies wäre ein Weg, über den Komponenten aus Algen die Proliferation oder Funktion von Zellen des Immunsystems stimulieren könnten.

Zusammenfassend bleibt für die in dieser Arbeit beschriebenen mikrobiellen aPS EPS, TK V2 und TK V3 ebenfalls eine Anwendung als Mikrobizid denkbar, zumal sie in der Arbeitsgruppe von Prof. Marschall (Virologie Erlangen) auch als antiviral wirksam gegenüber HIV-1 und HSV-1 getestet wurden. Eine evidenzbasierte, prophylaktische Anwendung im Rahmen einer Nahrungsergänzung zur Vermeidung viraler Infekte (insbesondere HIV) ist eher unwahrscheinlich, da sie zunächst sehr aufwendigen Studien erfordert und keinen sicheren Schutz vor Infektion bietet.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-carbazol
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (<i>engl.</i> acquired-immune-deficiency-syndrome)
aPS	Anionisches Polysaccharid
APU	Antigen produzierenden Einheiten (<i>engl.</i> antigen producing units)
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca-SP	Calcium-Spirulan
CB-MNC	Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut (<i>engl.</i> cord blood – mononuclear cells)
CC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die die Zellaktivität um 50 % reduziert, (<i>engl.</i> cytotoxic concentration 50 %)
CD	Differenzierungscluster ursprünglich für hämatopoetische Zellen anhand charakteristischer Oberflächenantigene (<i>engl.</i> cluster of differentiation)
dCMP	Didesoxycytidinmonophosphat
dCTP	Didesoxycytidintriphosphat
dGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
CPE	Zytopathischer Effekt (<i>engl.</i> cytopathic effect)
Cyc	Cyclophilin A
DE-Protein	„Verzögert“ früh exprimiertes Herpesvirusprotein (<i>engl.</i> delayed early protein)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
dNTP	Didesoxyribonukleotid-Triphosphat
DS	Dextransulfat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (<i>engl.</i> epidermal growth factor receptor)
EPS	Anionisches Exopolysaccharid aus <i>Porphyridium purpureum</i>
ERK	Durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (<i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase)
FKS	Fötales Kälberserum
GC	Glycoproteinkomplex (<i>engl.</i> glycoprotein complex)
GCV	GCV
ge	Genomäquivalent (<i>engl.</i> genomic equivalent)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> green-fluorescent-protein)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (<i>engl.</i> graft-versus-host-disease, GvHD)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die Virusreplikation um 50 % reduziert, (<i>engl.</i> inhibitory concentration 50 %)
IE	Sehr früh exprimiertes (<i>engl.</i> immediate early protein) Protein im Verlauf der Virusreplikation

IFA	Immunfluoreszenzassay
IFN	Interferon
IL	Interleukin
k.A.	Keine Angaben
Kap.	Kapitel
L13	L13, ribosomales Protein
LB	spez. Bakterienkulturmedium (<i>engl.</i> lysogeny broth)
LDH	Laktat-Dehydrogenase-Nachweis
L-Protein	Spät exprimiertes Herpesvirusprotein (<i>engl.</i> late protein)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCP	Major Kapsidprotein (<i>engl.</i> major capsid protein)
MIEP	Major-IE-Promotor
MOI	Infektiöse Partikel pro Zelle (<i>engl.</i> multiplicity of infection)
MuLV	Murines Leukämievirus
MuSV	Murines Sarkomavirus
n.e.	Nicht ermittelt
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered Sodium Solution)
PFU	Plaque verursachende Einheiten (<i>engl.</i> plaque forming Units)
p. i.	Nach Infektion (<i>lat.</i> post infektionem)
POX	Immunzytochemische Peroxidasefärbung
QPCR	Quantitative real-time PCR
RLT-Puffer	Zelllysepuffer für eine anschließende RNA-Extraktion
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
SDS	Natrium-Dodezylsulfat (<i>engl.</i> Sodium-Dodecylsulphate)
SI	Selektivitätsindex
SQDG	Sulfoquinovosyldiazylglyzerol
sPS	Sulfatiertes Polysaccharid
Sp1	Spezifisches Promotorprotein 1
Tab.	Tabelle
TK V2	Anionisches Polysaccharid aus der Biomasse von <i>Arthrospira platensis</i>
TK V3	Anionisches Exopolysaccharid von <i>Arthrospira platensis</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TOA	Variation der Reihenfolge oder des Zeitpunktes der Zugabe einer Substanz in einem Experiment (<i>engl.</i> time of addition)
VCV	Variella-Zoster-Virus
VV	Vacciniavirus
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Aufbau eines HCMV-Virions. (nach Reschke und Eickmann ¹²)	- 4 -
Abb. 2	Modell zu HCMV-Targetzell-Adsorption und Membranfusion (nach Compton, 2004 ¹⁶)	- 5 -
Abb. 3	Struktur eines Heparansulfatproteoglycans (HSPG)	- 6 -
Abb. 4	Links gesunde Retina, mitte und rechts durch HCMV verursachte Retinitiden bei AIDS-Patienten ⁴⁰ .	12 -
Abb. 5	Postfebriles <i>Exanthema subitum</i> infolge HHV-6B-Infektion ⁴⁴	- 12 -
Abb. 6	Strukturformeln von a) GCV und b) Aciclovir (PubChem Compound, CID 3454 und CID 2022).	- 15 -
Abb. 7	Wirkmechanismus von GCV	- 16 -
Abb. 8	Strukturformeln von a) Foscarnet und b) Cidofovir (PubChem Compound CID 3415 und CID 60613).	- 16 -
Abb. 9	Mikroskopische Aufnahmen von Zellen von a) <i>Porphyridium</i> speizes ¹³⁸ ; b) <i>Arthrospira platensis</i> ¹³⁹ . Calcium Spirulan (Ca-SP)	- 30 -
Abb. 10	Beispielauswertung zur Bestimmung der CC ₅₀	- 43 -
Abb. 11	WST-1-Reaktionskinetik an MRC-5-Zellen einen Tag nach Einsaat der angegebenen Zellzahlen pro Vertiefung. (Mittelwerte aus n = 5)	- 47 -
Abb. 12	Einfluss von Zelllysaten auf den WST-1-Test: a) Messung der Extinktion mit und ohne Eliminierung der Zelllysate durch Zentrifugation. b) Messung der Extinktion mit und ohne Referenzfilter bei 650 nm. (n = 5)	- 48 -
Abb. 13	Einfluss von FKS auf die Zytotoxizität von SDS. (Mittelwerte aus n = 5)	- 48 -
Abb. 14	Bestimmung der Zytotoxizität von DS und GCV gegenüber MRC-5-, HSB-2- und Molt-3-Zellen mittels WST-1-Test. (Mittelwerte aus n = 5) Die Messwerte von GCV an MRC-5-Fibroblasten wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bestimmt ¹⁴⁷ und die Messwerte von DS an HSB-2 Zellen im Rahmen einer Studienarbeit ¹⁴⁸	- 49 -
Abb. 15	WST-1-Test von GCV an MRC-5-Zellen sieben Tage nach Einsaat. Einsaat von 3000 Zellen pro Vertiefung und 1:10 Verdünnung des WST-1-Reagenz.	- 50 -
Abb. 16	Peroxidasemarkierung (POX) viraler Antigene HCMV-infizierter MRC-5-Zellen.	- 51 -
Abb. 17	IC ₅₀ -Bestimmung von DS. Dargestellt sind sechs unabhängige Versuche (Mittelwerte aus n = 5).	- 51 -
Abb. 18	Einfluss von Proteinen auf die HCMV-Replikation im antiviralen Screening. a) Einfluss von BSA auf die Viruslast bei verschiedenen DS-Konzentrationen b) Veränderung der IC ₅₀ (HCMV) von DS bei verschiedenen FKS-Konzentrationen bezogen auf die IC ₅₀ bei 5 % FKS (Standard FKS-Anteil im Zellkulturmedium im antiviralen Screening). (APU – Antigen producing units, Mittelwerte aus n = 5)	- 53 -
Abb. 19	Einfluss von GCV auf die HCMV-Last im zeitlichen Verlauf. (Mittelwerte aus n = 3, MOI = 0,35)	- 55 -
Abb. 20	Etablierung des HHV-6 Screeningsystems: a) Kinetik einer HHV-6A-Infektion von HSB-2-Zellen, verfolgt mittels Peroxidasefärbung (POX, linke y-Achse) und mittels QPCR (rechte y-Achse); b) Vergleich der Kinetik einer HHV-6A-Infektion in Zellkulturplatten mit 12 und 24 Vertiefungen (V.).	- 56 -
Abb. 21	Viruslast einen Tag p. i. mit HHV-6A (a) bzw. drei Tage p. i. mit HHV-6B (b) bei gleichzeitiger Behandlung mit GCV.	- 56 -
Abb. 22	mRNA-Expression der HCMV-Gene US22, UL36, UL70, UL46 und UL86 im Verlauf einer HCMV-Infektion, MOI = 0,35 (a) und mRNA-Expression der HHV-6A-Gene U73 (origin binding protein), U95 (immediate protein 2, IE2), U31 (large tegument protein), U41 (major DNA-binding protein), U53 (protease/assembly protein), U57 (major capsid protein) im zeitlichen Verlauf einer HHV-6A-Infektion (b).	- 58 -
Abb. 23	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI = 0,01 und 0,001 bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne 2 µg/ml DS. Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC _T -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Mittelwerte aus n = 3, DS MW = 500.000)	- 59 -
Abb. 24	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI = 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit DS, GCV und ohne Zusatz. Das Expressionsniveau	

	ist angegeben als ΔC_T -Wert zwischen dem Referenzgen L13 (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Mittelwerte aus n = 2)	- 60 -
Abb. 25	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HHV-6A-Infektion von HSB-2-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit DS (MW 500.000). Das Expressionsniveau ist angegeben als ΔC_T -Wert zwischen dem Referenzgen Cyclophilin A (zelluläres housekeeping Gen) und dem jeweiligen viralen Gen. (Logarithmische Ausgleichskurven mit n = 2 pro Zeitpunkt)	- 61 -
Abb. 26	Zytotoxizität gegen MRC-5-Zellen (a) und antivirale Aktivität gegen HCMV (b) von EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> und GCV im antiviralen Screening. (Mittelwerte aus n = 5)	- 63 -
Abb. 27	Kinetik der HCMV-Infektion unter Einfluss von EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> . Die Viruslast wurde durch QPCR ermittelt. (MOI = 0,01; Mittelwerte aus n = 2)	- 64 -
Abb. 28	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit EPS und ohne Zusatz. (Mittelwerte aus n = 2)	- 66 -
Abb. 29	Abhängigkeit der HHV-6A-Viruslast von der EPS-Konzentration aus <i>Porphyridium purpureum</i> einen Tag p. i. (Mittelwerte aus n = 3)	- 67 -
Abb. 30	Zytotoxizität gegen MRC-5-Zellen (a) und antivirale Aktivität gegen HCMV (b) von TK V2 und TK V3 aus <i>Arthrospira platensis</i> sowie GCV im antiviralen Screening. (Mittelwerte aus n = 5). -	- 68 -
Abb. 31	Kinetik der HCMV-Infektion unter Einfluss der antiviralen Substanzen TK V3 (a) und TK V2 (b) aus <i>Arthrospira platensis</i> . (Mittelwerte aus n = 2, MOI = 0,1)	- 69 -
Abb. 32	Einfluss der MOI auf die antivirale Aktivität von GCV und das extrazellulären Extrakt TK V3 aus <i>Arthrospira platensis</i> . Die HCMV-Viruslast wurde 3d p. i. mittels QPCR bestimmt. (Mittelwerte aus n = 2)	- 70 -
Abb. 33	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit TK V3 und ohne Zusatz.	- 71 -
Abb. 34	Expression verschiedener viraler mRNAs nach HCMV-Infektion von MRC-5-Zellen mit einer MOI von 0,01 bei gleichzeitiger Behandlung mit TK V2 und ohne Zusatz.	- 72 -
Abb. 35	Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe antiviraler Substanz nach HCMV-Infektion auf die Viruslast. ...	- 74 -
Abb. 36	TOA-Experiment mit den antiviralen Wirkstoffen DS (MW 500.000), GCV, EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> , TK V2, TK V3 und TK IV aus <i>Arthrospira platensis</i> an HCMV und MRC-5-Zellen. -	- 75 -
Abb. 37	Bestimmung der Adhäsion von HCMV-Partikeln an die Targetzelle unter Einfluss der mikrobiellen antiviralen aPS. (Mittelwerte aus n = 2)	- 76 -
Abb. 38	TOA-Experiment mit den antiviralen Wirkstoffen DS (MW 500.000), EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> , TK V2 und TK V3 aus <i>Arthrospira platensis</i> an HHV-6A und HSB-2-Zellen.	- 77 -
Abb. 39	Zusammensetzung der mikrobiellen SQDG-Fraktionen	- 79 -
Abb. 40	Einfluss der SQDG-Fraktion aus <i>Heterosigma carterae</i> (SQDG-Hc) auf die WST-1-Extinktion nach 1-, 3- und 7-tägiger Behandlung von MRC-5-Fibroblasten (Mittelwerte aus n = 5).	- 80 -
Abb. 41	Einfluss der Typ 2-SQDGs Fr I und Fr II aus <i>Pheodactylum tricornutum</i> 1b (SQDG-Pt1b) auf die WST-1-Extinktion nach 3- und 7-tägiger Behandlung von MRC-5-Fibroblasten (Mittelwerte aus n = 5)	- 81 -
Abb. 42	Antivirale Aktivität von SQDG-Ap46 aus <i>Arthrospira platensis</i> und SQDG-Hc aus <i>Heterosigma carterae</i> . Die Viruslast ist angegeben als Antigen produzierende Units (APU) pro Vertiefung. (Mittelwerte aus n = 5)	- 81 -
Abb. 43	Ergebnisse von TOA-Experimenten mit verschiedenen SQDG-Fraktionen.	- 83 -
Abb. 44	HCMV-infizierte MRC-5-Zellen (rot) bei gleichzeitiger Behandlung mit zunehmenden Konzentrationen von SQDG-Hc 3 Tage p. i. (V. – Vertiefung)	- 84 -
Abb. 45	Kinetik der HCMV-Infektion bei Zugabe der Substanzen SQDG-Hc (a), SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b (b). Relative Viruslast bezogen auf eine unbehandelte Kontrollinfektion nach Zugabe von SQDG-Pt1a und SQDG-Pt1b einen Tag nach Infektion (c). Die Viruslasten wurden mit Hilfe der QPCR bestimmt. (MOI = 0,01; Mittelwerte aus n = 2)	- 84 -
Abb. 46	Antivirale Aktivität von SQDG-Hc gegenüber HCMV infizierten MRC-5-Fibroblasten im Screeningsystem (Färbung von HCMV-DE-Antigen 3 d p. i.) im Vergleich zu einer Färbung von HCMV-IE-Antigen 1 d p. i.)	- 85 -

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Kurze Charakteristik der humanpathogenen Herpesviren	- 2 -
Tab. 2	Klinischer Status einiger ausgewählter HCMV-Vakzine nach Schleiss ³⁴	- 14 -
Tab. 3	Substanzen zur Prophylaxe und Therapie von HCMV-Infektionen, die derzeit Verwendung finden.	- 18 -
Tab. 4	Antivirale Aktivitäten einiger ausgewählter Polyanionen	- 20 -
Tab. 5	Anheftungsrezeptoren der Zellmembran für verschiedene humanpathogene Viren nach Olofson und Bergstrom ⁸³	- 22 -
Tab. 6	Indizien für einen gemeinsamen evolutionsbiologischen Ursprung von Phycodnaviren und Herpesviren	- 24 -
Tab. 7	Beispiele für antiviral wirksame Sulfolipide aus marinen Organismen	- 27 -
Tab. 8	Beispiel für antiviral wirksame Lektine und lektinähnlicher Verbindungen aus phototrophen Organismen.	- 27 -
Tab. 9.	Beispiele für antiviral wirksame sPS aus marinen Organismen	- 29 -
Tab. 10:	Zellzahlen pro Vertiefung für die Einsaat zur Ermittlung der Standardgeraden für den WST-1-Test	- 35 -
Tab. 11	Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Temperaturbedingungen	- 39 -
Tab. 12	Sequenzen für die verwendeten PCR-Assays	- 40 -
Tab. 13	Zytotoxizität von DS (MW 500.000) und GCV gegenüber MRC-5, HSB-2 und Molt-3-Zellen im Screeningsystem, als Wirtszellen von HCMV, HHV-6A bzw. HHV-6B.	- 49 -
Tab. 14	IC ₅₀ -Bestimmung von DS	- 52 -
Tab. 15	Antivirale Aktivität von DS und GCV im HCMV-Screeningsystem.	- 52 -
Tab. 16	Zytotoxizität und antivirale Aktivität von Pyruvat, D-Glucose, PBS und DMSO im HCMV-Screeningsystem.	- 52 -
Tab. 17	IC ₅₀ von DS und GCV gegenüber HCMV ermittelt mittels QPCR im Vergleich zur Peroxidasefärbung (POX).	- 54 -
Tab. 18	IC ₅₀ und SI von DS und GCV gegenüber HHV-6A (ein Tag p. i.) und HHV-6B (drei Tage p. i.)	- 57 -
Tab. 19	Liste der Mikroalgen, deren aPS- und Sulfolipidextrakte im antiviralen Screening untersucht wurden.	- 62 -
Tab. 20.	Zytotoxizität von EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> gegenüber MRC-5-Zellen nach 1-, 3- und 7-tägiger Behandlung. Die CC ₅₀ wurde mit dem WST-1-Zellproliferationstest bestimmt.	- 64 -
Tab. 21	Zytotoxizität und antivirale Aktivität von EPS aus <i>Porphyridium purpureum</i> gegenüber HCMV und HHV-6A	- 67 -
Tab. 22	Zytotoxizität von TK V3 gegenüber MRC-5-Zellen bei Behandlung der Zellen über 1, 3 und 7 Tage.	- 69 -
Tab. 23	Zytotoxizität und antivirale Aktivität von TK V2 und TK V3 aus <i>Arthrospira platensis</i> gegenüber HCMV und HHV-6A	- 73 -
Tab. 24	Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Zellen (CC ₅₀) und antivirale Aktivität gegenüber HCMV (IC ₅₀) der extrahierten SQDG-Fractionen im Vergleich zur therapeutischen Referenzsubstanz GCV.	- 80 -
Tab. 25	Übersicht über die Zytotoxizität gegenüber MRC-5-Zellen und die antivirale Aktivität gegen HCMV einzelner Chlorosulfolipidfraktionen aus <i>Ochromonas danica</i> .	- 86 -
Tab. 26	Zytotoxizität und antivirale Aktivität von GCV gegenüber HCMV - Literaturvergleich	- 90 -
Tab. 27	Zytotoxizität und antivirale Aktivität von DS gegenüber HCMV - Literaturvergleich	- 92 -
Tab. 28	Aktivität von GCV gegenüber HHV-6A und HHV-6B - Literaturvergleich	- 94 -
Tab. 29	Zusammenfassung der antiviralen Aktivitäten von EPS, TK V2 und TK V3 gegenüber GCV und DS.	- 96 -

9 Anhang

Tabelle 1 Literaturwerte von natürlichen sPS

Substanz	Quell- organismus	Zellen / Virus	CC ₅₀ - Methode	CC ₅₀ [mg/ml]	IC ₅₀ - Methode	IC ₅₀ [µg/ml bzw. µg/Ei*]	SI	Referenz
Cyano- bacteria								
Calcium Spirulan, (sPS)	Arthrospira platensis	HeLa / HSV-1	Trypanblau, 3d	7,9	PFU, d1	16,5	479	Hayashi <i>et al.</i> 1996 ^{120,121}
		MT-4 / HIV-1	Trypanblau	2,9	ELISA p24, d5	11,4	254	
		HEL / HCMV (Town)	Trypanblau, 5d	4,8	PFU, d5	41	117	
		Vero / Masern- virus		6,3		39	162	
		Vero / Mumps- virus	Trypanblau, 3d	6,3	PFU, d1	92	68	
		MDCK / Influenza A Virus		5,4		230	23	
Nostoflan (Polysaccharid)	Nostoc flagelliforme	Vero / HSV-1	Trypanblau, 3d	4,9	PFU, d1	0,37	13.000	Kanekiyo <i>et al.</i> 2005 ¹²²
		Vero / HSV-2		7,8		2,9	2.700	
		HEL / HCMV (Town)		>10	PFU, d4	0,47	>21.000	
		MDCK / Infl. A Virus		8,1	PFU, d1	78	104	
Mikroalgea								
sPS	Porphyridium sp.	Vero / HSV-1				1		
		Vero / HSV-2			CPE	5		
		Vero / VZV				0,7		
sPS	Porphyridium aerugineum	Vero / HSV-1				100		Huleihel <i>et al.</i> 2001 ^{123,124} , Talyshinsky, 2002 ¹²⁴
		Vero / HSV-2			CPE	200		
		Vero / VZV				100		
sPS	Rhodella reticulata	Vero / HSV-1				10		
		Vero / HSV-2			CPE	20		
		Vero / VZV				8		

Substanz	Quell- organismus	Zellen / Virus	CC ₅₀ - Methode	CC ₅₀ [mg/ml]	IC ₅₀ - Methode	IC ₅₀ [µg/ml bzw. µg/Ei*]	SI	Referenz
Polysaccharid	<i>Porphyridium cruentum</i>	Ei / Infl. A Virus			<i>in ovo</i>	<50*		Minkova <i>et al.</i> 1996 ¹²⁵
<i>Makroalgae</i>								
Sulfatiertes Galaktan	<i>Grateloupia longifolia</i>	PBMNC / HIV						Wang <i>et al.</i> 2007 ¹⁹³
Sulfatiertes Galaktan	<i>Grateloupia filicina</i>	PBMNC / HIV						Wang <i>et al.</i> 2007 ¹⁹³
Sulfatiertes Galaktan	<i>Grateloupia indica</i>	Vero / HSV-1	MTT	>0,85	PFU, d2	0,12- 1,06		Chattopadhyay <i>et al.</i> 2007 ¹⁹⁴
Sulfatiertes Galactan	<i>Aghardhiella tenera</i>	Vero / HSV-1				0,7		Witvrouw <i>et al.</i> 1994 ⁶⁸
		Vero / HSV-2			CPE, 3d	2,5		
		HEL / HCMV (Davis)			PFU, d6	4,0		
		VV			CPE, 3d	7		
		MDCK / Infl. A Virus			CPE, 3d	4		
		MT-4 / HIV-1	MTT, d5	>0,25	MTT, d5	0,6	417	
Sulfatiertes XyloGalactan	<i>Nothogenia fastigiata</i>	MT-4 / HIV-2				0,5	500	Damonte <i>et al.</i> 1994 ¹²⁶
		Vero / HSV-1				1,5	78	
		Vero / HSV-2		0,118	PFU, 3d	2,5	75	
		HEL / HCMV (AD169)	Coulter Counter, 5d			10	10	
		HEL / HCMV (Town)		0,1	CPE, d7	2,8	36	
		MDCK / Infl. A Virus			CPE, d5	0,2		
Rhamnan- Sulfat	<i>Monostroma latissimum</i>	MT-4 / HIV-1	MTT, 5d	0,033	MTT, d5	13,7	2,4	Lee <i>et al.</i> 1999 ¹³¹
		MT-4 / HIV-2				13,4	2,5	
		Vero / HSV-1	Trypanblau, d3	6,3	PFU, d1	0,78	8.100	
Sulfatiertes α- (1-3) D- Mannan	<i>Nothogenia fastigiata</i>	HEL / HCMV (Towne)	Trypanblau, d5	3,7	PFU, d5	1,7	2.180	Kolender <i>et al.</i> 1997 ¹³²
		MT-4 / HIV-1	Trypanblau, d3	2,61	Trypan- blau, d5	1,5	1.740	
		Vero / HSV-1	Trypanblau, 2d	0,12	PFU, 2d	0,7	171	
		Vero / HSV-2				0,7	171	

Tabelle 2 *In vivo* Applikationen sulfatierter Polysaccharide und verwandter Substanzen

Substanz	Appli- kation	Virus	Infektion	Modell- organismus	Effekt, Nebenwirkung	Ref.
Synthetische Produkte						
Dextransulfat	Oral			Human	Kaum absorbiert	Lorentsen <i>et al.</i> ¹⁹⁵
Dextransulfat	i.v., kontinuierlich über 3d			Human	Reversible, aber schwere Thrombozytopenie; starker, aber reversibler Haarausfall	Flexner <i>et al.</i> ¹⁷⁹
Dextransulfat	i.v., kontinuierlich über 3d	HIV	Bereits erkrankter Patient	Human	HIV p24- Antigenkonzentration im Plasma steigt trotzdem an	Flexner <i>et al.</i> ¹⁷⁹
Dextransulfat	Intra- vaginal	HIV	Intra- vaginal	Maus	Schutz vor Virusvermehrung nur partiell	Neyts und de Clercq ⁶⁵
PAVAS*	Intra- vaginal	HIV	Intra- vaginal	Maus	Kompletter Schutz vor HIV-Infektion	Neyts und de Clercq ⁶⁵
Suramin**	Intra- vaginal	HIV	Intra- vaginal	Maus	Kompletter Schutz vor HIV-Infektion	Neyts und de Clercq ⁶⁵
Natriumlaurylsulfat	Kutan bzw. intra- vaginal	HSV	Kutan bzw. intra- vaginal	Maus	Schutz vor HSV- Infektion	Piret <i>et al.</i> ¹⁹⁶
Emmelle***	Vaginalgel	HIV	Intra- vaginal	Klinische Studien Phase I/II	HIV-präventives Mikrobizid bei geringen Nebenwirkungen	D'Cruz und Uckun ¹⁸⁸
VivaGel	Vaginalgel	HIV, HSV	Intra- vaginal	Klinische Studie Phase I	HIV-präventives Mikrobizid	Starpharma ¹⁹⁷
Invisible Condom (SDS)	Vaginalgel	HIV, HSV	Intra- vaginal	Klinische Studie Phase I/II	HIV-präventives Mikrobizid	Laval University ¹⁹⁸
Pro 2000****	Vaginalgel	HIV, HSV	Intra- vaginal	Derzeit klinische Studie Phase III	HIV-präventives Mikrobizid bei geringen Nebenwirkungen	Indevus ¹⁹⁹
Naturprodukte						
Carrageenan 1T1 aus <i>Gigarina skottbergii</i>	Intra- vaginal	HSV-2	Intra- vaginal	Maus	Schutz vor HSV-2- Infektion	Carlucci <i>et al.</i> ²⁰⁰
Carrageenan 1C3 aus <i>Gigarina skottbergii</i>	i.v.			Maus	Nicht toxisch, Plasmakonzentration nimmt schnell ab	Pujol <i>et al.</i> ²⁰¹
	i.p.	HSV-1	i.p.	Maus	Schutz vor letaler HSV-Infektion	
	i.v.	HSV-1	i.p.	Maus	Partieller Schutz vor lethaler HSV- Infektion	

Substanz	Appli- kation	Virus	Infektion	Modell- organismus	Effekt, Nebenwirkung	Ref.
sPS aus P. spezie	s.c.	HSV-1	Intra- korneal	Kaninchen- auge	Nicht toxisch, Verringerung der Infektionssymptome	Huheihel <i>et al.</i> ¹³⁵
sPS aus P. spezie	i.p.	HSV-1	Intra- epidermal	Ratte	Nicht toxisch, Verringerung der Infektionssymptome	Huheihel <i>et al.</i> ¹³⁵
Cellulosesulfat	Vaginalgel	HIV-1, - 2, HSV- 1, -2	Intra- vaginal	Klinische Studien Phase II	HIV-präventives Mikrobizid bei geringen Nebenwirkungen	Conrad ²⁰²
				Klinische Studie Phase III	Studie abgebrochen, weil mehr Frauen HIV-positiv also ohne	WHO ²⁰³
Carraguard (Carrageenan)	Vaginalgel	HIV, HSV	Intra- vaginal	Derzeit klinische Studie Phase III	HIV-präventives Mikrobizid bei geringen Nebenwirkungen	Popcouncil ²⁰⁴

* PAVAS -Kopolymer aus Akrylsäure und Vinylalkohol; **Suramin symmetrisches Polysulfonsäure-, Naphtylaminderivat des Harnstoffs ⁷⁴; ***Emmelle – Dextrin-2-Sulfat 1T1 -λ-Carrageenan, **** Pro 2000 – Polymer der Naphthalensulfonsäure

Literaturverzeichnis

1. Fishman, J. A. et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin. Transplant.* **21**, 149-158 (2007).
2. Villereal, E. C. Current and potential therapies for the treatment of herpes-virus infections. *Progress in Drug Research* **56**, 77-118 (2001).
3. Modrow, S. & Falke, D. *Molekulare Virologie.*, pp. 410-463 (Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 1998).
4. Clark, D. A. Human herpesvirus 6. *Rev. Med. Virol.* **10**, 155-173 (2000).
5. Clark, D. A., Emery, V. C. & Griffiths, P. D. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in hematological patients. *Semin. Hematol.* **40**, 154-162 (2003).
6. Dockrell, D. H. & Paya, C. V. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev. Med. Virol.* **11**, 23-36 (2001).
7. Naesens, L., Bonnafous, P., Agut, H. & De, C. E. Antiviral activity of diverse classes of broad-acting agents and natural compounds in HHV-6-infected lymphoblasts. *J. Clin. Virol.* **37 Suppl 1**, S69-S75 (2006).
8. Gandhi, M. K. & Khanna, R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 725-738 (2004).
9. Evers, D. L., Wang, X. & Huang, E. S. Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection. *Microbes. Infect.* **6**, 1084-1093 (2004).
10. Fortunato, E. A. & Spector, D. H. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv. Virus Res.* **54**, 61-128 (1999).
11. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-740 (2006).
12. Reschke, M. & Eickmann, M. Detailed 2d Model of Human Cytomegalovirus. www.biografics.de. 2005.
13. Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G. & Landini, M. P. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev. Med. Virol.* **14**, 383-410 (2004).
14. Froberg, M. K. Review: CMV escapes! *Ann. Clin. Lab Sci.* **34**, 123-130 (2004).
15. Rajcani, J. & Durmanova, V. Mechanisms of replication of alpha- and betaherpesviruses and their pathogenesis. *Bratisl. Lek. Listy* **102**, 505-514 (2001).
16. Compton, T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* **14**, 5-8 (2004).
17. Lobert, P. E., Hober, D., Dewilde, A. & Wattre, P. Cell membrane bound N-acetylneuraminic acid is involved in the infection of fibroblasts and phorbol-ester differentiated monocyte-like cells with human cytomegalovirus (HCMV). *Arch. Virol.* **140**, 1357-1371 (1995).
18. Wang, X., Huang, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-461 (2003).
19. Compton, T., Nepomuceno, R. R. & Nowlin, D. M. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**, 387-395 (1992).
20. Huber, M. T. & Compton, T. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**, 3886-3892 (1999).
21. Lopper, M. & Compton, T. Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J. Virol.* **78**, 8333-8341 (2004).
22. Wang, X., Huang, D. Y., Huang, S. M. & Huang, E. S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* **11**, 515-521 (2005).

23. Tugizov, S., Maidji, E., Xiao, J. & Pereira, L. An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *J Virol.* **73**, 8677-8688 (1999).
24. Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. & Johnson, D. C. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J. Virol.* **80**, 710-722 (2006).
25. De Bolle, L., Naesens, L. & De Clercq, E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 217-245 (2005).
26. Santoro, F. et al. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**, 817-827 (1999).
27. Conti, C. et al. Early interactions of human herpesvirus 6 with lymphoid cells: role of membrane protein components and glycosaminoglycans in virus binding. *J. Med. Virol.* **62**, 487-497 (2000).
28. Greber, U. F. & Way, M. A superhighway to virus infection. *Cell* **124**, 741-754 (2006).
29. Mettenleiter, T. C. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* **76**, 1537-1547 (2002).
30. Mettenleiter, T. C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* **106**, 167-180 (2004).
31. Torrisi, M. R. et al. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology* **257**, 460-471 (1999).
32. Kinzler, E. R. & Compton, T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J. Virol.* **79**, 7827-7837 (2005).
33. Mori, Y. et al. Human Herpesvirus 6 Variant A but Not Variant B Induces Fusion from Without in a Variety of Human Cells through a Human Herpesvirus 6 Entry Receptor, CD46. *J. Virol.* **76**, 6750-6761 (2002).
34. Schleiss, M. Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes.* **12**, 66-75 (2005).
35. Ganepola, S. et al. Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8+ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 293-299 (2007).
36. Schetelig, J. et al. Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 695-701 (2003).
37. Gentile, G. et al. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC. Infect. Dis.* **6**, 167 (2006).
38. Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C. A., Landt, O. & Siegert, W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin. Chem.* **45**, 1932-1937 (1999).
39. Nitsche, A. et al. Quantitative real-time PCR compared with pp65 antigen detection for cytomegalovirus (CMV) in 1122 blood specimens from 77 patients after allogeneic stem cell transplantation: which test better predicts CMV disease development? *Clin. Chem.* **49**, 1683-1685 (2003).
40. South Texas Retina Consultants. http://strc.cc/pages/disease_cytomegalovirus.asp . 2006.
41. Zerr, D. Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes.* **13**, 20-24 (2006).
42. Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H. & Miyoshi, I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* **94**, 1545-1549 (1999).
43. Tanaka-Taya, K. et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med. Virol.* **73**, 465-473 (2004).

44. Rautenstrauch T. www.paediatric-in-bildern.de . 2003.
45. Dewhurst, S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes*. **11 Suppl 2**, 105A-111A (2004).
46. Ablashi, D. & Loomis, K. Introduction from the organizers of the 5th International Conference on HHV-6&7. *J. Clin. Virol.* **37 Suppl 1**, S1 (2006).
47. Radonic, A. et al. Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **131**, 480-482 (2005).
48. Nitsche, A. et al. Inhibition of cord blood cell expansion by human herpesvirus 6 in vitro. *Stem Cells Dev.* **13**, 197-203 (2004).
49. Plotkin, S. A. Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr. Infect. Dis. J* **18**, 313-325 (1999).
50. Biron, K. K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* **71**, 154-163 (2006).
51. Takahashi, K. et al. Selective activity of various nucleoside and nucleotide analogues against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **8**, 24-34 (1997).
52. Yoshida, M. et al. Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Res.* **40**, 73-84 (1998).
53. DeClercq, E. & Naesens, L. In search of effective anti-HHV-6 agents. *J. Clin. Virol.* **37 Suppl 1**, S82-S86 (2006).
54. Clarke, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-1663 (2000).
55. Rosin & Henschler *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Forth, W. (ed.), pp. 753-762 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg ; Berlin ; Oxford,1996).
56. Drew, W. L. et al. Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* **163**, 716-719 (1991).
57. Jabs, D. A., Enger, C., Dunn, J. P. & Forman, M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. CMV Retinitis and Viral Resistance Study Group. *J. Infect. Dis.* **177**, 770-773 (1998).
58. Drew, W. L., Paya, C. V. & Emery, V. Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *Am. J Transplant.* **1**, 307-312 (2001).
59. Ito, M. et al. NOD/SCID/gamma(null)(c) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**, 3175-3182 (2002).
60. Nakashima, H. et al. Sulfation of polysaccharides generates potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus infection and replication in vitro. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**, 1164-1168 (1987).
61. Ueno, R. & Kuno, S. Dextran sulphate, a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudine. *Lancet* **1**, 1379 (1987).
62. Luscher-Mattli, M. Polyanions--a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases? *Antivir. Chem. Chemother.* **11**, 249-259 (2000).
63. Andrei, G. et al. Comparative activity of selected antiviral compounds against clinical isolates of human cytomegalovirus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 1026-1033 (1991).
64. Neyts, J. et al. Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology* **189**, 48-58 (1992).
65. Neyts, J. & De Clercq, E. Effect of polyanionic compounds on intracutaneous and intravaginal herpesvirus infection in mice: impact on the search for vaginal microbicides with anti-HIV activity. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10**, 8-12 (1995).
66. Neyts, J. et al. Differential antiviral activity of derivatized dextrans. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 743-751 (1995).

67. Schols, D. et al. Sulphated polymers are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex viurs, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, respiratory syncitial virus, and toga-, arena- and retroviruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 1(4), 233-240. 1990.
68. Witvrouw, M. et al. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 5, 297-303 (1994).
69. Witvrouw, M. & De Clercq, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* 29, 497-511 (1997).
70. BENGTTSSON, S. Mechanism of dextran sulfate inhibition of attenuated poliovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 47-53 (1965).
71. Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* 11, 2399-2419 (2004).
72. Bengsson, S. Mechanism of dextran sulfate inhibition of attenuated poliovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 47-53 (1965).
73. Baba, M. et al. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 6132-6136 (1988).
74. Aguilar, J. S., Rice, M. & Wagner, E. K. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral difusion of herpes simplex virus type-1 in vero cells. *Virology* 258, 141-151 (1999).
75. Leydet, A. et al. Polyanion inhibitors of human immunodeficiency virus and other viruses. Part 2. Polymerized anionic surfactants derived from amino acids and dipeptides. *J. Med. Chem.* 39, 1626-1634 (1996).
76. Baba, M. et al. Novel sulfated polysaccharides: dissociation of anti-human immunodeficiency virus activity from antithrombin activity. *J. Infect. Dis.* 161, 208-213 (1990).
77. Hosoya, M., Balzarini, J., Shigeta, S. & De Clercq, E. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2515-2520 (1991).
78. Mitsuya, H. et al. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science* 226, 172-174 (1984).
79. Lederman, S., Gulick, R. & Chess, L. Dextran sulfate and heparin interact with CD4 molecules to inhibit the binding of coat protein (gp120) of HIV. *J. Immunol.* 143, 1149-1154 (1989).
80. Batinic, D. & Robey, F. A. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 267, 6664-6671 (1992).
81. Herrmann, A., Korte, T., Arnold, K. & Hillebrecht, B. The influence of dextran sulfate on influenza A virus fusion with erythrocyte membranes. *Antiviral Res.* 19, 295-311 (1992).
82. Mulloy, B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 651-664 (2005).
83. Olofsson, S. & Bergstrom, T. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med.* 37, 154-172 (2005).
84. Huleihel, M., Talyshinsky, M., Souprun, Y. & Erukhimovitch, V. Spectroscopic evaluation of the effect of a red microalgal polysaccharide on herpes-infected Vero cells. *Appl. Spectrosc.* 57, 390-395 (2003).
85. Singh, S., Kate, B. N. & Banerjee, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev. Biotechnol.* 25, 73-95 (2005).
86. Borowitzka Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.* 7, 3-15 (1995).

87. Chen High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Tibtech* **14**, 421-426 (1996).
88. Cohen High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Tibtech* **14**, 421-426 (1999).
89. Shimizu Microalgal metabolites. *Chem. Rev.* , **93**, 1685-1698 (1993).
90. Mayer, A. M. & Hamann, M. T. Marine pharmacology in 2001--2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* **140**, 265-286 (2005).
91. Wommack, K. E. & Colwell, R. R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 69-114 (2000).
92. Heckman, D. S. et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**, 1129-1133 (2001).
93. McGeoch, D. J. & Gatherer, D. Integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. *J. Virol.* **79**, 725-731 (2005).
94. Villarreal, L. P. & DeFilippis, V. R. A hypothesis for DNA viruses as the origin of eukaryotic replication proteins. *J. Virol.* **74**, 7079-7084 (2000).
95. Van Etten, J. L., Graves, M. V., Muller, D. G., Boland, W. & Delaroque, N. Phycodnaviridae--large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* **147**, 1479-1516 (2002).
96. Mann, N. H. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 17-34 (2003).
97. Chen, F. & Suttle, C. A. Evolutionary relationships among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology* **219**, 170-178 (1996).
98. Davison, A. J. et al. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* **86**, 41-53 (2005).
99. Iyer, L. M., Aravind, L. & Koonin, E. V. Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J. Virol.* **75**, 11720-11734 (2001).
100. Potin, P., Bouarab, K., Kupper, F. & Kloareg, B. Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 276-283 (1999).
101. Mehdy, M. C. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* **105**, 467-472 (1994).
102. Chapman, R. L. & Lang, N. J. Virus-like particles and nuclear inclusions in the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) drew et ross. *Journal of phycology* **9**, 117-122 (1973).
103. Bouarab, K., Potin, P., Correa, J. & Kloareg, B. Sulfated Oligosaccharides Mediate the Interaction between a Marine Red Alga and Its Green Algal Pathogenic Endophyte. *Plant Cell* **11**, 1635-1650 (1999).
104. Gustafson, K. R. et al. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1254-1258 (1989).
105. Loya, S. et al. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency. *J. Nat. Prod.* **61**, 891-895 (1998).
106. Reshef, V. et al. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *J. Nat. Prod.* **60**, 1251-1260 (1997).
107. Ohta, K. et al. Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a new potent inhibitor of eukaryotic DNA polymerases and HIV-reverse transcriptase type 1 from a marine red alga, *Gigartina tenella*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **46**, 684-686 (1998).

108. Ohta, K. et al. Action of a new mammalian DNA polymerase inhibitor, sulfoquinovosyldiacylglycerol. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 111-116 (1999).
109. Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* **109**, 347-352 (1995).
110. Balzarini, J. et al. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 410-416 (1991).
111. Balzarini, J. et al. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res.* **18**, 191-207 (1992).
112. Balzarini, J. et al. Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins. *J. Virol.* **78**, 10617-10627 (2004).
113. Balzarini, J. et al. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3858-3870 (2004).
114. Barrientos, L. G. & Gronenborn, A. M. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. *Mini. Rev. Med. Chem.* **5**, 21-31 (2005).
115. Dey, B. et al. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J. Virol.* **74**, 4562-4569 (2000).
116. O'Keefe, B. R. et al. Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2518-2525 (2003).
117. Ohta, S. et al. Anti-Herpes Simplex Virus substances produced by the marine green alga, *Dunaliella primolecta*. *Journal of Applied Phycology* **10**, 349-355 (1998).
118. Boyd, M. R. et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1521-1530 (1997).
119. Matsubare, K. Recent Advances in Marine Biotechnology - Biomaterials and Bioprocessing. Fingerman & Nagabhushanam (eds.), pp. 127-141 (Science Publishers, 2003).
120. Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1463-1471 (1996).
121. Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M. & Kojima, I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* **59**, 83-87 (1996).
122. Kanekiyo, K. et al. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1037-1041 (2005).
123. Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J. & Arad, S. M. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *Journal of Applied Phycology* **13**, 127-134 (2001).
124. Talyshinsky, M. M., Souprun, Y. Y. & Huleihel, M. M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.* **2**, 8 (2002).
125. Minkova, K., Michailov, Y., TonchevaPanova, T. & Houbavenska, N. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie* **51**, 194 (1996).

126. Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S. & Coto, C. E. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Chemotherapy* **42**, 57-64 (1996).
127. Carlucci, M. J. et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **20**, 97-105 (1997).
128. Carlucci, M. J., Ciancia, M., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S. & Damonte, E. B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Res.* **43**, 93-102 (1999).
129. Naesens, L., De Bolle, L. & De Clercq, E. Antiviral activity of antiherpetic drugs in lymphoblast cells infected with human herpesvirus 6. *Hommes, O. R., Wekerle, H., and Clanet, M. Genes and viruses in Multiple Sclerosis.* 241-249. 2001. Elsevier Science B.V.
Ref Type: Generic
130. Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta Med.* **63**, 429-432 (1997).
131. Lee, J. B., Hayashi, K., Hayashi, T., Sankawa, U. & Maeda, M. Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Med.* **65**, 439-441 (1999).
132. Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. The system of sulfated alpha-(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydr. Res.* **304**, 53-60 (1997).
133. Duarte, M. E. et al. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. *Phytomedicine*. **8**, 53-58 (2001).
134. Talarico, L. B. et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res.* **66**, 103-110 (2005).
135. Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J. & Arad, S. M. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods* **50**, 189-200 (2002).
136. Geresh, S., Mamontov, A. & Weinstein, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Biophys. Methods* **50**, 179-187 (2002).
137. Matsui, M. S., Muizzuddin, N., Arad, S. & Marenus, K. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **104**, 13-22 (2003).
138. *Porphyridium* sp.
<http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/100images/nies-1034.jpg> . 2000.
139. UTEX. *Arthrospira platensis*.
<http://www.bio.utexas.edu/research/utex/photo-gallery/s/2340%20Spirulina%20platensis.htm> . 2007.
140. Lee, J. B. et al. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* **61**, 1101-1104 (1998).
141. Lee, J. B., Hayashi, T., Hayashi, K. & Sankawa, U. Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* **63**, 136-138 (2000).
142. Lee, J. B. et al. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **49**, 108-110 (2001).
143. Hayakawa, Y. et al. Mechanism of activation of heparin cofactor II by calcium spirulan. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 47-52 (2003).

144. Nitsche, A. et al. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **183**, 130-133 (2001).
145. Radonic, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 856-862 (2004).
146. Mirandola, P. et al. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J. Virol.* **72**, 3837-3844 (1998).
147. Stich, S. Etablierung einer Routineanalytik zum Nachweis der antiviralen Aktivität unbekannter Substanzen gegenüber CMV. 2004.
148. Walentin, K. Etablierung von Methoden zur Bestimmung der EC50 gegenüber dem Humanen Herpesvirus 6A am Beispiel von Ganciclovir und Dextransulfat. 2005. TU-Berlin.
149. Ziehra, T. Bestimmung des Selektivitätsindex von Dextransulfat gegenüber dem Humanen Herpesvirus-6A. 2005.
150. Bedard, J. et al. A high throughput colorimetric cell proliferation assay for the identification of human cytomegalovirus inhibitors. *Antiviral Res.* **41**, 35-43 (1999).
151. König, T. Gewinnung und Charakterisierung antiviraler Wirkstoffe aus aquatischen Mikroorganismen. 2007. Technische Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.
Ref Type: Thesis/Dissertation
152. Rechter, S. et al. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res.* **72**, 197-206 (2006).
153. De Clercq E. et al. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev. Med. Virol.* **11**, 381-395 (2001).
154. Biron, K. K. et al. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 2473-2477 (1985).
155. Shigeta, S., Konno, K., Baba, M., Yokota, T. & De, C. E. Comparative inhibitory effects of nucleoside analogues on different clinical isolates of human cytomegalovirus in vitro. *J. Infect. Dis.* **163**, 270-275 (1991).
156. Hoshino, T. et al. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 730-734 (1998).
157. Marschall, M., Freitag, M., Weiler, S., Sorg, G. & Stamminger, T. Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1588-1597 (2000).
158. Cushing, T. D. et al. Discovery of a novel series of inhibitors of human cytomegalovirus primase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 4879-4883 (2006).
159. Tatarowicz, W. A., Lurain, N. S. & Thompson, K. D. In situ ELISA for the evaluation of antiviral compounds effective against human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* **35**, 207-215 (1991).
160. Mar, E. C., Cheng, Y. C. & Huang, E. S. Effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on human cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**, 518-521 (1983).
161. Field, A. K. et al. 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 4139-4143 (1983).
162. Rasmussen, L., Chen, P. T., Mullenax, J. G. & Merigan, T. C. Inhibition of human cytomegalovirus replication by 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine alone and in combination with human interferons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 441-445 (1984).
163. Freitas, V. R., Smee, D. F., Chernow, M., Boehme, R. & Matthews, T. R. Activity of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 240-245 (1985).

164. Matthews, T. & Boehme, R. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* **10 Suppl 3**, S490-S494 (1988).
165. Damonte, E. et al. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 2187-2192 (1994).
166. Qavi, H. B., Wyde, P. R. & Khan, M. A. In vitro Inhibition of HHV-6 replication by sophocarpines. *Phytother. Res.* **16**, 154-156 (2002).
167. Ohta, K. et al. Studies on a novel DNA polymerase inhibitor group, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols: inhibitory action on cell proliferation. *Mutat. Res.* **467**, 139-152 (2000).
168. Quasney, M. E. et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells by the plant sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J Nutr. Biochem.* **12**, 310-315 (2001).
169. Hanashima, S. et al. Structure-activity relationship of a novel group of mammalian DNA polymerase inhibitors, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols. *Jpn. J Cancer Res.* **91**, 1073-1083 (2000).
170. Matsumoto, K. et al. Effective form of sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) vesicles for DNA polymerase inhibition. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **46**, 175-181 (2005).
171. Mizushina, Y. et al. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase alpha and beta: sulfolipids from a pteridophyte, *Athyrium niponicum*. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 537-541 (1998).
172. Eitsuka, T., Nakagawa, K., Igarashi, M. & Miyazawa, T. Telomerase inhibition by sulfoquinovosyldiacylglycerol from edible purple laver (*Porphyra yezoensis*). *Cancer Lett.* **212**, 15-20 (2004).
173. Iijima, H. et al. Structure-activity relationship of a glycolipid, sulfoquinovosyl diacylglycerol, with the DNA binding activity of p53. *Int. J Mol. Med.* **19**, 41-48 (2007).
174. Matsubara, K. et al. Inhibitory effect of glycolipids from spinach on in vitro and ex vivo angiogenesis. *Oncol. Rep.* **14**, 157-160 (2005).
175. Matsumoto, K. et al. Design of vesicles of 1,2-di-O-acyl-3-O-(beta-D-sulfoquinovosyl)-glyceride bearing two stearic acids (beta-SQDG-C18), a novel immunosuppressive drug. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2379-2386 (2004).
176. Gilleron, M. et al. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **199**, 649-659 (2004).
177. Ciminiello, P. et al. Structure and stereochemistry of a new cytotoxic polychlorinated sulfolipid from Adriatic shellfish. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13114-13120 (2002).
178. Hiebert, L. M. Oral heparins. *Clin. Lab* **48**, 111-116 (2002).
179. Flexner, C. et al. Pharmacokinetics, toxicity, and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 2544-2550 (1991).
180. Nyberg, K. et al. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* **63**, 15-24 (2004).
181. Shukla, D. & Spear, P. G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J. Clin. Invest* **108**, 503-510 (2001).
182. Yura, Y. et al. Heparan sulfate as a mediator of herpes simplex virus binding to basement membrane. *J. Invest Dermatol.* **98**, 494-498 (1992).
183. Huard, J. et al. The basal lamina is a physical barrier to herpes simplex virus-mediated gene delivery to mature muscle fibers. *J. Virol.* **70**, 8117-8123 (1996).
184. Hulst, M. M. et al. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J. Virol.* **75**, 9585-9595 (2001).

185. Klimstra, W. B., Ryman, K. D. & Johnston, R. E. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* **72**, 7357-7366 (1998).
186. Reddi, H. V. et al. Heparan sulfate-independent infection attenuates high-neurovirulence GDVII virus-induced encephalitis. *J. Virol.* **78**, 8909-8916 (2004).
187. Sa-Carvalho, D. et al. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**, 5115-5123 (1997).
188. D'Cruze, O. J. & Uckun, F. M. Preclinical and Clinical Profile of Emmelle (Dextrin-2-Sulfate)-a Potential Anti-HIV Microbicide. *The Journal of Applied Research* **5**, 26-34 (2005).
189. Teas, J., Hebert, J. R., Fitton, J. H. & Zimba, P. V. Algae -- a poor man's HAART? *Med. Hypotheses* **62**, 507-510 (2004).
190. Hirahashi, T. et al. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 423-434 (2002).
191. Shan, B. E., Yoshida, Y., Kuroda, E. & Yamashita, U. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**, 59-70 (1999).
192. Weiner, M. L. Intestinal transport of some macromolecules in food. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 867-880 (1988).
193. Wang, S. C. et al. Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*. *Int. J. Biol. Macromol.* (2007).
194. Chattopadhyay, K. et al. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry* **68**, 1428-1435 (2007).
195. Lorentsen, K. J. et al. Dextran sulfate is poorly absorbed after oral administration. *Ann. Intern. Med.* **111**, 561-566 (1989).
196. Piret, J. et al. In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 110-119 (2000).
197. Starpharma. VivaGel. www.starpharma.com. 2007.
198. New female "condom" to be trialled. *British medical journal* **320**, 1626 (2000).
199. Indevus. Pro 2000. www.indevus.com. 2007.
200. Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Noseda, M. D., Cerezo, A. S. & Damonte, E. B. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Res.* **64**, 137-141 (2004).
201. Pujol, C. A. et al. Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. *Planta Med.* **72**, 121-125 (2006).
202. Conrad. Cellulosesulfat. www.conrad.org. 2007.
203. World Health Organisation. Cellulose sulfat microbicide trial stopped. 31-1-2007.
204. Popcouncil. Carraguard. www.popcouncil.org. 2007.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Wohnort Stefanie Thulke, Bruno-Wille-Str. 69, 12587 Berlin
Geburtstag, -Ort 03. April 1975, Berlin
Familienstand: Verheiratet

Berufliche Tätigkeit

Seit 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus-Charité-Mitte; unter Leitung von Prof. Kurt Possinger; zunächst in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Siegert, anschließend selbständige Tätigkeit.

Seit 2003 Dissertation im Rahmen des Projekts:

- Screening antiviraler Komponenten aus aquatischen Mikroorganismen. Gefördert durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V.

Außerdem Tätigkeit in folgenden weiteren Projekten:

- Myelosuppression durch das humane Herpesvirus-6 bei Patienten nach Knochenmark- und Stammzelltransplantation. Gefördert durch die Deutsche Krebshilfe
- Proliferation hämatopoetischer Stammzellen durch Kokultur mit Zellen mesenchymalen Ursprungs, insbesondere Osteoblasten. Gefördert durch die Monika Kutzner-Stiftung

Ausbildung

1994 bis 2000 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin, Abschluss als Diplom-Ingenieur

- Diplomarbeit am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch zum Thema: Differenzierung von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen humanen Zellen nach Engrafting in immundefizienten Mäusen.

1994 Abitur am I. Gymnasium Berlin Hellersdorf

Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel

Stefanie Thulke, Tanja König, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz, Aleksandar Radonić, Andreas Nitsche, Christian Walter. Anionic polysaccharides from *Porphyridium purpureum* and *Arthrospira platensis* feature anti-HCMV activity. Manuskript in Vorbereitung

Stefanie Thulke, John Achenbach, Andreas Kurth, Anna Dunkhorst, Tanja König, Christian Walter, Aleksandar Radonić, Wolfgang Siegert, Andreas Nitsche. Antiviral activity of seaweed anionic polysaccharides against vaccinia virus. Manuskript in Vorbereitung

Tanja König, Stefanie Thulke, Andreas Nitsche, Berit S. Paulsen, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz, Christian Walter. Production, isolation and chemical structure of antiviral extracellular polysaccharides from *Arthrospira platensis*. Manuskript in Vorbereitung

Tanja König, Christian Walter, Stefanie Thulke, Andrew Marston, David Guilet, Kurt Hostettmann, Wolfgang Siegert, and Rainer Buchholz. Bioactivities of a chlorosulfolipid extract from the unicellular microalga *Ochromonas danica*. *Planta Medica*, Manuskript eingereicht

Sabine Rechter, Tanja König, Sabrina Auerochs, Stefanie Thulke, Heike Dörnenburg, Christian Walter, Wolfgang Siegert and Manfred Marschall. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research*, 2006 Dez 72 (3):197-206

Stefanie Thulke, Aleksandar Radonić, Andreas Nitsche and Wolfgang Siegert. Quantitative expression analysis of HHV-6 cell receptor CD46 on cells of human cord blood, peripheral blood and G-CSF mobilised leukapheresis cells. *Virology Journal*, 2006 Sep 3(1):77

Aleksandar Radonić, Olivia Oswald, Stefanie Thulke, Nina Brockhaus, Andreas Nitsche, Wolfgang Siegert and Johannes Schetelig. Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2005 Nov 131(4): 480-482

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Hi Gung Bae, Müller MA, Wolfgang Siegert, Andreas Nitsche. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Virol J.* 2005 Feb 10;2(1):7

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Ian Mc.Mackay, Olfert Landt, Wolfgang Siegert, Andreas Nitsche. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 23;313(4):856-62.

Andreas Nitsche, Jessika Fleischmann, Klima KM, Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Wolfgang Siegert. Inhibition of cord blood cell expansion by human herpesvirus 6 in vitro. *Stem Cells Dev.* 2004 Apr;13(2):197-203.

Stefanie Thulke, Aleksandar Radonić, Wolfgang Siegert, Andreas Nitsche. Highly sensitive quantification of human cells in chimeric NOD/SCID mice by real-time PCR. *Haematologica.* 2003 Jun;88(6):ELT18.

Andreas Nitsche, Olivia Oswald, Nina Steuer, Johannes Schetelig, Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Wolfgang Siegert. Quantitative real-time PCR compared with pp65 antigen detection for cytomegalovirus (CMV) in 1122 blood specimens from 77 patients after allogeneic stem cell transplantation: which test better predicts CMV disease development? Clin Chem. 2003 Oct;49(10):1683-5.

Johannes Schetelig, Olivia Oswald, Nina Steuer, Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Thomas K. Held, Joachim Oertel, Andreas Nitsche, Wolfgang Siegert. Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia. Bone Marrow Transplantation. 2003 Oct;32(7):695-701.

Andreas Nitsche, Ilse Junghahn, Stefanie Thulke, Jutta Aumann, Aleksandar Radonić, Iduna Fichtner, Wolfgang Siegert. Interleukin-3 promotes proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells but reduces their repopulation potential in NOD/SCID mice. Stem Cells. 2003;21(2):236-44

Patentanmeldung

Christian Walter, Tanja König, Rainer Buchholz, Stefanie Thulke, Manfred Maschall, Berit S. Paulsen. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem extrazellulären Polyanion aus Arthrospira. DE-10 2006 029 448.3

Tagungsbeiträge

Stefanie Thulke, Ivonne Naumann, Rainer Buchholz, Wolfgang Siegert, Aleksandar Radonić, Harald Lange, Christian Walter: SQDG – potential antiviral agents? Third European Congress of Virology, 1.-5. September 2007, Nürnberg, Posterbeitrag

Tanja König, Stefanie Thulke, Manfred Marschall, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz, Christian Walter*: Production of Antiviral Compounds of Phototrophic Microorganisms. 7ter Workshop der Europäischen European Gesellschaft für Microalgen Biotechnologie. 11.-13. Juni 2007, Potsdam, Vortrag.

Ivonne Naumann, Stefanie Thulke, Tanja König, Wolfgang Siegert, Christian Walter, and Rainer Buchholz: Establishment of a Screening System for Accelerated Identification of New Target-based Antiviral Compounds Towards HCMV. European BioPerspectives 30. Mai bis 1. Juni 2007, Köln, Posterbeitrag.

Tanja König*, Stefanie Thulke, Sabine Rechter, Ivonne Naumann, Andreas Nitsche, Manfred Marschall, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz and Christian Walter: Screening and biosynthesis of microalgae compounds with activities against human pathogen viruses. DECHEMA-Jahrestagung 26.-28. September 2006, Wiesbaden, veröffentlicht in Chemie Ingenieur Technik. 2006; 78 (9): 1382-83, Vortrag

Tanja König*, Stefanie Thulke, Sabine Rechter, Ivonne Naumann, Andreas Nitsche, Manfred Marschall, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz and Christian Walter: Screening and biosynthesis of microalgae compounds with activities against human pathogen viruses. Tagung: "From functional genomics to naturel products of marine microorganisms." Institut für Marine Biotechnologie e. V., Alfred-Krupp-Wissenschaftskolleg, 21.-24. Juni 2006, Greifswald, Vortrag

Stefanie Thulke, Tanja König, Aleksandar Radonić, Christian Walter, Rainer Buchholz and Wolfgang Siegert. Testing of microalgae extracts which exhibits a high activity towards HCMV in vitro by inhibition of virus attachment. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 15.-18. März 2006, München, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Wolfgang Siegert and Andreas Nitsche. Expression analysis of apoptosis relevant genes in human herpesvirus-6 infected cord blood mononuclear cells Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 15.-18. März 2006, München, Posterbeitrag

Sabine Rechter, Tanja König, Sabrina Auerochs, Stefanie Thulke, Heike Dörenburg, Christian Walter, Manfred Marschall. Spirulan-like polysaccharides derived from mikroalgae Arthrospira possess a broad spectrum of antiviral activity. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 15.-18. März 2006, München, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Wolfgang Siegert, Andreas Nitsche: Reference Gene Selection for quantitative real-time PCR in virus infected cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 16.-20. März 2005, Hannover, Posterbeitrag

Stefan Stich, Aleksandar Radonić, Tanja König, Christian Walter, Rainer Buchholz, Wolfgang Siegert, Stefanie Thulke: Etablierung eines Wirkstoffscreenings gegen das Humane Cytomgalievirus. DECHEMA BioPerspectives 2004 (22rd Annual Congress Biotechnology), Wiesbaden, Posterbeitrag

Stefanie Thulke, Stefan Stich, Aleksandar Radonić, Wolfgang Siegert. Development of a screening method to detect natural antiviral compounds against HCMV: Gemeinsame Jahrestagung von DGHO, ÖGHO, SGH und SGMO 2.-6. Oktober 2004, Innsbruck; Onkologie, Vol. 27, Suppl. 3, October 2004, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Wolfgang Siegert and Andreas Nitsche. Expression analysis of apoptosis relevant genes in a Human Herpesvirus-6 infected T-Cell line: Gemeinsame Jahrestagung von DGHO, ÖGHO, SGH und SGMO 2.-6. Oktober 2004, Innsbruck; Onkologie, Vol. 27, Suppl. 3, October 2004, Posterbeitrag

Yuhong Lu, Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Andreas Nitsche, Wolfgang Siegert. Quantitative Analysis of the Correlation of Human Polyomavirus and Hematuria in Patients after Stem Cell Transplantation: Meeting of the American Society of Hematology 2004, Blood, Vol. 104 (11), November 2004, Posterbeitrag

Stefanie Thulke; Aleksandar Radonić; Andreas Nitsche; Wolfgang Siegert: HHV-6 Cell Surface Receptor Expression In Different Human Blood Cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 26.-29. März 2003, Berlin, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić; Stefanie Thulke, Andreas Nitsche and Wolfgang Siegert. Detection of HHV-6A and HHV-6B DNA in tissue samples from bone marrow transplant recipients: Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 26.-29. März 2003, Berlin, Posterbeitrag

Jörg-Christian Lechner, Andreas Nitsche, Aleksandar Radonić, Wolfgang Siegert and Stefanie Thulke: Quantitative expression analysis of hematopoietic stem cell marker genes in different leukocyte populations. Gemeinsame Jahrestagung von DGHO, ÖGHO, SGH und SGMO 5.-8. Oktober 2003, Basel, Onkologie 2003, Vol. 26, Suppl. 5, Posterbeitrag

Tanja König, Christian Walter, Stefanie Thulke, Harald Lange, Wolfgang Siegert, Rainer Buchholz: Optimized screening program of bioactive compounds of phototrophic microorganisms. Biomolecular Engineering 20 (2003) 65, Posterbeitrag

Stefanie Thulke; Jessika Fleischmann; Aleksandar Radonić; Andreas Nitsche; Wolfgang Siegert. Quantitative Analyse der CD46 Expression in Zellen aus humanem Nabelschnurblut, Peripherem Blut und G-CSF mobilisierten Stammzellapheresaten: Gemeinsame Jahrestagung von DGHO und ÖGHO 25.-30. Oktober 2002, München, Onkologie 2002, Band 25, Suppl. 4, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić, Stefanie Thulke, Nina Steuer, Andreas Nitsche, und Wolfgang Siegert. Analyse der Housekeeping-Gen Expression in malignen und benignen Geweben mittels real-time PCR: Gemeinsame Jahrestagung von DGHO und ÖGHO 25.-30. Oktober 2002, München, Onkologie 2002, Band 25, Suppl. 4, Posterbeitrag

Aleksandar Radonić, Nina Steuer, Stefanie Thulke, Andreas Nitsche und Wolfgang Siegert. Bestimmung der Bax, Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-xS mRNA Expression mittels quantitativer Real-Time PCR in der T-Zelllinie CCRF-HSB-2 nach Camptothecin Behandlung: Gemeinsame Jahrestagung von DGHO und ÖGHO 30. September - 3. Oktober 2001, Mannheim, Onkologie 2001, Band 24, Suppl. 6, Posterbeitrag

Andreas Nitsche, Ilse Junghahn, Stefanie Thulke, Jutta Aumann, Iduna Fichtner, Burkhardt Wittig, Wolfgang Siegert. IL-3 Promotes Proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells but reduces repopulation potential in NOD/SCID mice: 27th Annual Meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation and 17th Meeting of the Nurses Group Maastricht, Niederlande, 25.-28. März 2001, Bone Marrow Transplantation, April 2001, Volume 27, Supplement 1, Posterbeitrag