

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Lars Dölken**

**Untersuchung der Wirkung potentieller Inhibitoren der Masernvirus-Infektion**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Christina Lieberherr  
aus Ebnat-Kappel**

**Würzburg, August 2017**

**Referent:** Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

**Koreferent/Koreferentin:** Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 24.09.2018

**Die Promovendin ist Ärztin**

Gewidmet meiner Familie.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Taxonomie .....	5
1.3	Pathogenese .....	7
1.4	Klinik.....	8
1.5	Komplikationen der MV-Infektion.....	9
1.5.1	Pneumonie .....	10
1.5.2	Keratitis .....	10
1.5.3	Enzephalitis.....	11
1.6	Ziel der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
2.1	Material.....	13
2.1.1	Zellen .....	13
2.1.2	Viren .....	13
2.1.3	Kulturmedien und Seren .....	13
2.1.4	Lösungen und Puffer.....	14
2.1.5	Lösungen für zellbiologische Methoden.....	14
2.1.6	Inhibitorische Substanzen .....	14
2.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.8	Geräte.....	18
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	18
2.2.2	Virologische Methoden.....	21
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
3.1	Vorversuche mit potentiell antiviralen Substanzen .....	26
3.1.1	Etablierung des Versuchsaufbaus und -ablaufs.....	26
3.1.2	Inhibitionstests mit CA-Substanzen.....	27
3.1.3	Inhibitionsversuche mit anderen Naturstoffen .....	32
3.1.4	Weitere Versuche mit Droseronderivaten.....	39
3.1.5	Inhibitionsversuche mit Plumbagin .....	41

3.1.6	Inhibitionsversuche mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie .....	43
3.2	Testung der in den Vorversuchen besten Inhibitoren .....	47
3.2.1	JK80.....	48
3.2.2	QD6-8 .....	50
3.2.3	Droseron .....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
4.1	Potentielle Inhibitionsmechanismen der Maserninfektion .....	58
4.1.1	Eintritt des Virus in die Zelle.....	58
4.1.2	Replikation des Virus.....	59
4.1.3	Morphogenese und Freisetzung neuer Viren .....	60
4.2	Inhibitionstests mit CA-Substanzen.....	60
4.3	Inhibitionsversuche mit anderen Naturstoffen.....	61
4.4	Weitere Versuche mit Droseronderivaten.....	62
4.5	Inhibitionsversuche mit Plumbagin .....	62
4.6	Inhibitionsversuche mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie .....	63
4.7	Weitere Testung der in den Vorversuchen besten Inhibitoren .....	64
4.7.1	JK80.....	64
4.7.2	QD 6-8.....	65
4.7.3	Droseron .....	67
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGS UND LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	71
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	81

# 1 EINLEITUNG

Die Masern sind eine weltweit endemisch vorkommende hoch kontagiöse, systemische Erkrankung, die durch eine Infektion mit dem Masernvirus (MV) verursacht wird. Ihr lateinischer Name „Morbilli“ ist der Diminutiv von Morbus (Krankheit) und bedeutet so viel wie „kleine Pest“ oder „kleine Krankheit“. Er geht zurück auf ausgedehnte Epidemien des Mittelalters, in deren Zuge viele Kinder starben. Auch heute noch gehören Masern weltweit zu den führenden Todesursachen bei Kindern unter 5 Jahren.

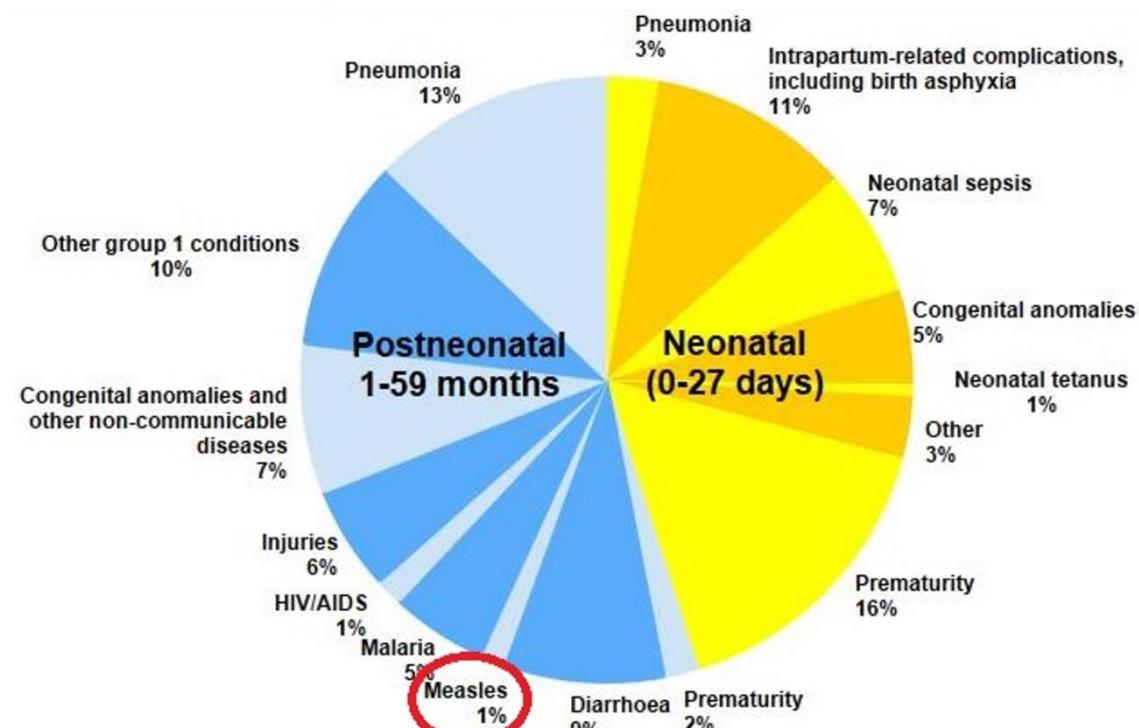


Abbildung 1.1 Todesursachen der Kinder unter 5 Jahren 2015

(Quelle: Verändert nach WHO 01/2016)

## 1.1 EPIDEMIOLOGIE

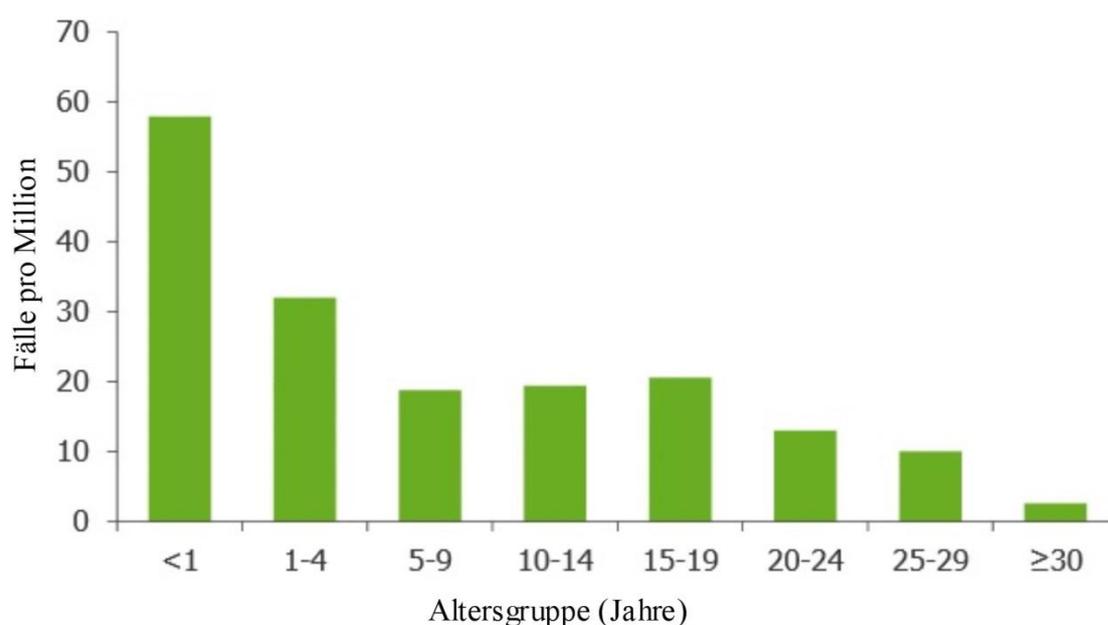
Das MV ist auf den Menschen als einzigen Wirt angewiesen und kommt als ein Serotyp mit relativ geringer genomischer Variabilität vor, was eine komplette Ausrottung ermöglichen könnte (Bellini and Rota 2011). Das erklärte Ziel der WHO ist eine Elimination der Masern in mindestens fünf der sechs WHO-Regionen bis 2020. Dies

soll vor allem durch konsequente Impfkampagnen erreicht werden. Die zunächst geplante Masernelimination in WHO/Europa bis 2010 und dann bis 2015 scheiterte jeweils an der zu niedrigen Durchimpfungsrate der Bevölkerung (WHO 2010; WHO Europe 2010 und 2012; Matysiak-Klose, D. 2013, ECDC Surveillance Report Measles and rubella monitoring, October 2015). Laut der WHO wurden im Jahr 2011 weltweit 344.276 Masernerkrankungen gemeldet, davon starben 158.000 Menschen. Im Vergleich zum Vorjahr bedeutet dies einen Anstieg der Todesfälle, da im Jahr 2010 139.300 Menschen an den Folgen einer Maserninfektion starben. Im Jahr 2013 forderte das MV weltweit 145.700 Todesopfer, 2014 war die Zahl deutlich auf 114.900 gesunken, was als Erfolg der durchgeführten Impfkampagnen gewertet wird. Erhielten im Jahr 2000 ca. 73 % aller Kinder weltweit eine Masernimpfung um den ersten Geburtstag herum, waren es 2014 schon 85 %. Die Zahl der Maserninfektionen mit tödlichem Verlauf sank von 2000 bis 2014 um 79 % (WHO factsheet). Diese Zahlen sind besonders erschreckend, wenn man bedenkt, dass es schon seit Jahrzehnten eine effektive Masernschutzimpfung gibt. Der Lebendimpfstoff gegen Masern enthält einen attenuierten MV-Stamm. Die ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt zwei Impfungen zur Grundimmunisierung, die als Kombinationsimpfung Masern-Mumps-Röteln verabreicht werden. Die erste Impfung sollte zwischen dem vollendeten 11. und dem 14. Lebensmonat erfolgen, die zweite zwischen dem 15.-23. Lebensmonat.

95 % der oben genannten Todesfälle aus dem Jahr 2010 traten in Ländern mit niedrigem Einkommen, schlechter Gesundheitsversorgung und mangelhafter Infrastruktur auf. Diese Faktoren stellen das größte Hindernis für eine flächendeckende Durchimpfung dar.

Aber nicht nur die Entwicklungsländer haben mit der Erkrankung zu kämpfen. Auch in Europa kam es infolge allgemeiner Impfmüdigkeit und einer weitverbreiteten impfkritischen Haltung vieler Eltern immer wieder zu regionalen Masernausbrüchen (CDC 2011; Kremer, JR. 2009), wie zum Beispiel Anfang 2015 in Berlin. So verzeichnete Deutschland von Oktober 2014 - September 2015 2630 Masernfälle und führte damit die europäische Statistik von insgesamt 4202 gemeldeten Masernerkrankungen deutlich, mit 62,6 % aller Fälle, an (CDC, Oct. 2015). Vielen Eltern ist nicht mehr bewusst, wie schwerwiegend die Erkrankung verlaufen kann, gerade auch weil durch die jahrelange Impfpraxis kaum noch negative Beispiele im

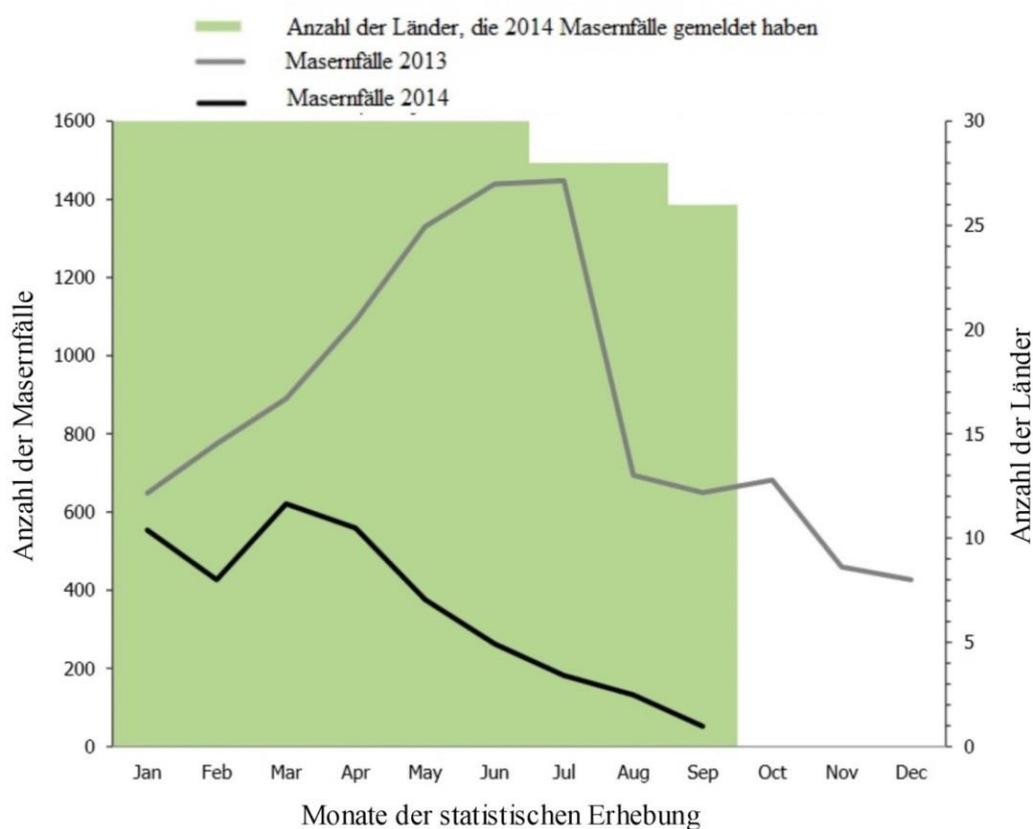
Bekanntenkreis vorhanden sind. Dies führt von einer impfkritischen Haltung bis zu sogenannten Masernpartys, bei denen sich die Kinder absichtlich infizieren sollen. Diese Praxis trifft allerdings vor allem die am meisten von der Infektion und ihren Folgen gefährdete Gruppe der Säuglinge unter einem Jahr. Diese können aufgrund ihres unreifen Immunsystems und mütterlichen Antikörpern noch nicht geimpft werden (Gans et al, 1998; de Vries et al, 2008) und sind auf eine ausreichende Herdenimmunität angewiesen, wie sie bei einer Durchimpfungsrate von mind. 95 % (Griffin et al, 2008) erreicht wird. Die Masern sind bei Säuglingen besonders gefährlich, da Komplikationen, wie die SSPE (Subakute sklerosierende Panenzephalitis) vermehrt auftreten. Wie Abbildung 1.2 zeigt, traten in dieser Altersgruppe die meisten Erkrankungsfälle auf. Impfgegner schaden so also nicht nur ihren eigenen Kindern.



**Abbildung 1.2 Masernerkrankungen pro Altersgruppe Oktober 2014-September 2015**

in EU/EEA Ländern (n= 4 197 Fälle mit bekanntem Alter der Erkrankten)

Quelle: Verändert nach ECDC Surveillance Report Measles and rubella monitoring, October 2015



**Abbildung 1.3 Anzahl der Masernfälle 2013 und 2014 in EU/EEA Ländern**

und Anzahl der Länder, die die Fälle in 2014 gemeldet haben (pro Monat)

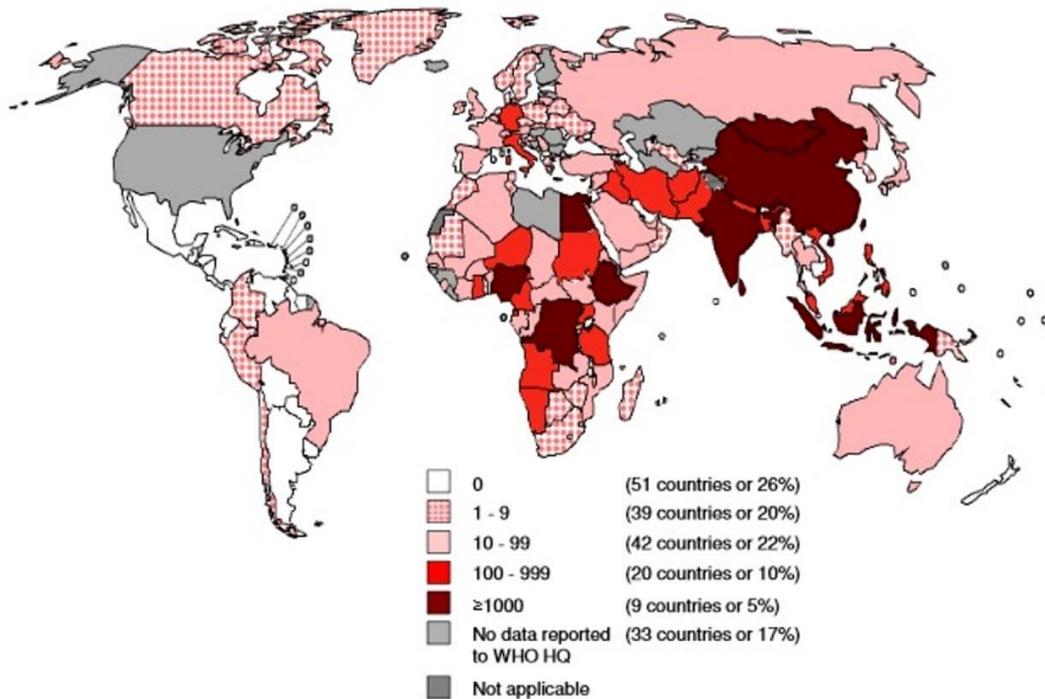
Quelle: Verändert nach ECDC Surveillance Report Measles and rubella monitoring, October 2014

Die beiden hier gezeigten Abbildungen stammen von der Internetseite der ECDC (European Centers for Disease Control and Prevention). Die Abbildung 1.3 zeigt einen Rückgang der Masern im Jahr 2014 im Vergleich zum Vorjahr.

Wie eine Veröffentlichung der WHO im Frühjahr 2012 zeigt, konnte die Zahl der weltweiten Todesfälle in den Jahren zwischen 2000 und 2010 um 74 % von 535.300 auf 139.300 gesenkt werden. Das eigentliche Ziel, eine Reduktion um 90 % wurde jedoch verfehlt. Leider ist es schwierig, genaue Zahlen zu bekommen, da es in 128 von 193 Ländern der Erde noch keine verlässlichen Sterberegister gibt. So konnte nur über ein Zustandsraummodell eine grobe Schätzung der Masernmortalität erfolgen.

Das 95 %-Konfidenzintervall reicht jedoch von 347 200 bis 976 400 Maserntodesfälle im Jahr 2000 und von 71.200 bis 447.800 im Jahr 2010. (Simons et al. 2012) Die

Abbildung 1.4 zeigt die weltweite Verteilung der Masernfälle von Juni bis November 2015. Es ist zu erkennen, dass Masern weiterhin ein weltweites Problem darstellen und eine kurative Therapiemöglichkeit von großem Nutzen sein könnte.



**Abbildung 1.4 Anzahl der gemeldeten Masernerkrankungen weltweit**  
pro Land von Juni bis November 2015 (Verändert nach WHO Measles Surveillance Data)

## 1.2 TAXONOMIE

Das Masernvirus gehört zur Ordnung der Mononegavirales, zur Familie der Paramyxoviridae, zur Unterfamilie der Paramyxovirinae und zum Genus Morbillivirus. Es ist ein behülltes, etwa 120-260 nm großes Virus mit einem helikalen Nukleokapsid. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen, nicht-segmentierten RNA negativer Polarität. Die Lipidhülle, die zur hohen Kontagiosität beiträgt entstammt der Zellmembran der Wirtszelle und enthält das Glykoprotein Hämagglutinin, jedoch keine Neuraminidase. Das Virus reagiert sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie erhöhten Temperaturen, Licht, UV-Strahlen, Detergenzien und Desinfektionsmitteln.

*Systematik der Paramyxoviridae:*

I. Paramyxoviridae

A. Paramyxovirinae

1. *Respirovirus*
2. *Morbillivirus*
  - a) Masernvirus
  - b) Pest der kleinen Wiederkäuer-Virus
  - c) Rinderpest-Virus
  - d) Hundestaube-Virus
  - e) Seehund-Staupevirus
  - f) Delphin- und Tümmler-Morbillivirus
3. *Rubulavirus*

B. Pneumovirinae

1. *Pneumoviren*
2. *Metapneumoviren*

### 1.3 PATHOGENESE

Die Infektion erfolgt aerogen über Tröpfchen, meist im Kindes- und Jugendalter. Zunächst ging man davon aus, dass das Virus zuerst respiratorische Epithelzellen infiziert und sich dort vermehrt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das MV zuerst die Makrophagen und dendritische Zellen des oberen Respirationstraktes infiziert (de Swart RL. 2008). Um in die Zellen einzudringen, benutzt das MV den zellulären Rezeptor CD150, auch SLAM (signalling lymphocytic activation molecule) genannt (Ferreira, C. S. et al 2010; Lemon, K. et al. 2011; Leonard et al, 2010; Tatsuo et al, 2000; Pfeuffer et al., 2003). Eine Expression von CD150 wurde bisher nur für hämatopoetische Zellen beschrieben. Das MV wird dann von den Makrophagen und dendritischen Zellen in die drainierenden Lymphknoten transportiert. Dort infiziert es Lymphozyten, bevor es zu einer hämatogenen Aussaat kommt, in deren Zuge das Virus seine Zielorgane befällt. De Swart et al. zeigte 2007 in Versuchen mit Makaken, dass das MV nach hämatogener Aussaat in der Haut, dem Respirations- und dem Gastrointestinaltrakt zu finden ist. Die höchste Infektionsrate fand sich allerdings in allen lymphatischen Geweben (de Swart et al, 2007). Das MV ist ausgesprochen lymphotrop und die Maserninfektion geht mit einer transienten Lymphopenie mit Immunsuppression einher (Schneider-Schaulies, S. & Schneider-Schaulies, J. 2009).

Bis 2011 war unklar, wie das Virus zurück in den Respirationstrakt und von dort in die Atemluft gelangt, um so den nächsten Menschen infizieren zu können. Mühlebach et al machte eine funktionale Analyse von Oberflächenproteinen, die auf menschlichen Epithelzelllinien vorkommen, die von MV infiziert werden können. "Wir haben gezielt nach einem Protein gesucht, das auf der Innenseite der Epithelzellen sitzt und damit für die Viren zugänglich ist und ihnen den Weg durch die Epithelzelle ermöglicht", erläuterte Mühlebach nach der Veröffentlichung. Es konnte gezeigt werden, dass das Transmembranprotein Nectin-4, auch bekannt als poliovirus-receptor-like-4 (PVRL4) (Reymond, N. et al, 2001), als Rezeptor für das MV auf Epithelzellen dient (Mühlebach et al 2011; Noyce, RS. et al 2011). Damit konnte eine wichtige Lücke im Verständnis der Pathogenese der Maserninfektion geschlossen werden.

## 1.4 KLINIK

Typisch für die Maserninfektion ist der zweiphasige Verlauf der Erkrankung. Nach einer Inkubationszeit von acht bis zehn Tagen kommt es zum uncharakteristischen Prodromalstadium oder auch Initialstadium, das etwa drei bis vier Tage dauert. Typisch für diese Phase ist eine Entzündung der Schleimhäute des oberen, teilweise auch des mittleren Atemtraktes und der Augenbindehäute. Es treten meist katarrhalische Beschwerden wie Rhinitis, trockene Bronchitis, Konjunktivitis, Hals- und Kopfschmerzen, Fieber bis 41°C und Übelkeit auf (Hilleman, M.R. 2001; Robbins, FC.1962). Da die Symptome in diesem Stadium sehr unspezifisch sind, ist es schwierig, die richtige Diagnose zu stellen.

Erst das Auftreten der pathognomonischen Koplik-Flecken, einem kalkspritzerartigen Enanthem der Wangenschleimhaut ca. zwei Tage vor Auftreten des typischen Masernexanths (Suringa, DW. et al 1970), lässt an Masern denken. Zu diesem Zeitpunkt ist der Patient allerdings schon seit Tagen hochinfektiös, denn normalerweise beginnt die Ansteckungsfähigkeit 5 Tage vor Exanthembeginn und endet ca. vier Tage nach Auftreten des Exanths. Das makulopapulöse, zum Teil konfluierende Masern-Exanthem beginnt typischerweise im Gesicht sowie retroaurikulär und breitet sich von dort über den Stamm und die Extremitäten aus. Es leitet das Exanthemstadium am 12. - 14. Tag nach Infektion ein. Dieses Stadium dauert ca. vier bis fünf Tage bis die Symptome allmählich abklingen. Das Exanthem blasst bräunlich ab und es kann kleieförmig zu schuppen beginnen. Auch der Fieberverlauf ist meist zweigipflig, mit dem ersten Gipfel im Verlauf des Prodromalstadiums und dem zweiten im Exanthemstadium. Verläuft die Erkrankung unkompliziert, ist im Normalfall mit einer Restitutio ad integrum zu rechnen und der Patient erhält eine lebenslange Immunität.

Allerdings treten bei ca. 20 % der Masernpatienten Komplikationen auf. Dies ist einerseits durch eine transitorische Immunschwäche von vier bis sechs Wochen nach der Erkrankung bedingt, die anderen Erregern die Infektion erleichtert. Andererseits sind schon vor Infektion immuninkompetente Personen und unterernährte, in schlechten hygienischen Verhältnissen lebende Kinder prädestiniert für einen komplizierten Krankheitsverlauf (Scheifele, DW. et al 1972; Morley, DC. 1974; Caulfield, LE. et al 2004; Perry, RT. 2004; Halsey, NA. 2006).

## 1.5 KOMPLIKATIONEN DER MV-INFEKTION

Zu den häufigsten Komplikationen zählen laut Robert Koch Institut und CDC, die durch bakterielle Superinfektionen ausgelöste Otitis media (7-9 %), die Bronchitis, die Pneumonie (1-6 %) und Diarrhöen (8 %) (CDC Factsheet). In die nekrotisierenden Oberflächen z.B. im Gastrointestinal- und Respirationstrakt können andere Erreger leichter eindringen und so z.B. die oben genannten schweren Diarrhöen und Lungenentzündungen hervorrufen (Hilleman, M.R. 2001). Die transitorische Immunsuppression trägt zusätzlich zur Anfälligkeit des Organismus gegenüber sekundären Infektionen bei (Avota, E. 2010; Rima and Duprex 2006; Schneider-Schaulies, S. 2006; Schneider-Schaulies; S. 2001). Neben der Pneumonie zählen die, durch das Eindringen des Virus ins zentrale Nervensystem ausgelösten Erkrankungen zu den gravierendsten Komplikationen der Masernerkrankung (Moss and Griffin, 2006; Griffin, 2007). Dabei haben Kinder unter 5 Jahren und Erwachsene über 20 Jahren das höchste Risiko eine schwerwiegende Komplikation zu bekommen (Wichmann, O. et al 2009; Engelhardt, SJ. 1980; Barkin, RM. 1975). In Entwicklungsländern ist das Risiko schwerwiegender Komplikationen mit und ohne Todesfolge aufgrund der Unterernährung inkl. Vitamin A-Mangel und des schlechten Zugangs zu guter medizinischer Versorgung darüber hinaus deutlich erhöht. 1990 zeigten Hussey GD et al in einer randomisierten, klinischen doppelblind Studie, dass die Gabe von Vitamin A die Morbidität und Mortalität der Maserninfektion reduzieren konnte (Hussey, GD. et al 1990), dies wurde auch in anderen Studien belegt (Barclay et al,1987; D'Souza, RM. 2002; Villamor, E. 2000). Die WHO empfiehlt, allen in Entwicklungsländern erkrankten Kindern zwei Dosen Vitamin A im Abstand von 24h zu geben (WHO Treatment).

Zu Komplikationen durch Maserninfektion in der Schwangerschaft gibt es kaum kontrollierte Studien, sie deuten darauf hin, dass für Schwangere das Risiko Komplikationen zu bekommen erhöht ist, v.a. im letzten Trimenon kann eine Infektion zur Frühgeburt und zur konnatalen Infektion des Kindes führen. Die konnatale Infektion erhöht das Risiko, an einer Subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) zu erkranken. Es gibt keine Hinweise dafür, dass eine MV-Infektion während der Schwangerschaft zu kongenitalen Missbildungen führen kann (Matysiak-Klose, D.

(2013); Guillet, M. et al 2012; Manikkavasagan, G. 2009; Enders, M. et al 2007; Chiba, ME. 2003; Ornoy, A. 2006; Ali, ME. 1997; Eberhart-Phillips, JE. 1993).

### **1.5.1 PNEUMONIE**

#### ***Primäre Masernpneumonie***

Es handelt sich um eine interstitielle Pneumonie mit lymphozytären Infiltraten und Bronchiolitis. Die Diagnose ist klinisch nicht einfach zu stellen und bedarf meist noch weiterer Untersuchungen, z.B. Röntgen.

#### ***Sekundäre Bronchopneumonie***

Sie ist entweder Folge einer bakteriellen Superinfektion, einer interstitiellen Viruspneumonie oder bedingt durch die vorübergehende Immunsuppression der Masernpatienten.

### **1.5.2 KERATITIS**

Im Verlauf der Erkrankung kann es zu einer Konjunktivitis und zu einer Entzündung der Cornea mit multiplen, punktförmigen, epithelialen Läsionen kommen (Sandford-Smith & Whittle, 1979; Kayikcioglu, O. et al 2000). Kayikcioglu, O. et al zeigten in einer klinischen Studie, dass bei 57,4 % der Patienten neben einer Konjunktivitis auch epitheliale und subepitheliale Läsionen auftreten. In dieser Studie heilte die Keratitis bei den vorher gesunden Patienten ohne weitere Komplikationen ab. Die Behandlung mit Diclofenac-haltigen Augentropfen hatte dabei keinen Einfluss auf den Ausheilungszeitraum und das Endergebnis.

Anders ist dies in Entwicklungsländern, dort kann die Maserninfektion zur Erblindung im Kindesalter führen, da die Keratitis in Kombination mit Unterernährung und insbesondere Vitamin-A-Mangel zu irreparablen Hornhautnarben führt. (Foster, A. et al. 1986 und 1987)

### **1.5.3 ENZEPHALITIS**

#### ***Akute postinfektiöse Enzephalitis***

Die akute postinfektiöse Enzephalitis ist eine gefürchtete Komplikation, die bei ca. 0,1 % der Patienten auftritt. 4-7 Tage nach Exanthembeginn kommt es zu Fieber, Kopfschmerzen, meningealer Reizung mit Nackensteifigkeit und Erbrechen sowie Bewusstseinsstörungen, die bis zum Koma reichen können. Diese Komplikation tritt häufiger bei Betroffenen, die älter als sechs Jahre sind, als bei Kleinkindern auf. Die Letalität liegt bei 10-20 %, bei weiteren 20-30 % der Betroffenen kommt es zu einer Defektheilung mit bleibender Schädigung des zentralen Nervensystems.

#### ***Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE)***

Hierbei handelt es sich um eine seltene Spätkomplikation, die sich nach durchschnittlich 6-8 Jahren manifestiert und zu 100 % tödlich endet. Die Literaturangaben schwanken zwischen 1-10 SSPE-Fälle pro 10.000-100.000 Masernerkrankungen (Bellini et al, 2005). Bei einer Maserninfektion im ersten Lebensjahr ist das Risiko allerdings erhöht. Es handelt sich um eine „slow virus infection“ mit einem langsam progredienten Verlauf über durchschnittlich 1-3 Jahre. Im ersten Stadium treten psychische und intellektuelle Veränderungen sowie Demenz auf. Epileptische Anfälle und Myoklonien kommen im zweiten Stadium dazu, bevor es im dritten Stadium zum Dezerebrationssyndrom kommt (Gutierrez et al, 2010). Der Radermecker-Komplex im EEG ist eine typische Veränderung bei SSPE.

## **1.6 ZIEL DER ARBEIT**

Die Einleitung hat deutlich gezeigt, dass die Infektion mit dem MV weltweit immer noch ein großes Problem darstellt. Trotz des vorhandenen Lebendimpfstoffs, der eine Erkrankung sicher zu verhindern vermag, haben nicht nur die Entwicklungsländer, in denen ein flächendeckender Impfschutz schwieriger zu erreichen ist, mit der Erkrankung und ihren Komplikationen zu kämpfen. Gerade in den armen Ländern treten allerdings sehr viel häufiger die gefährlichen Komplikationen der Erkrankung auf (Clements et al, 1995). Hat sich die Erkrankung klinisch manifestiert gibt es keine kausalen Therapiemöglichkeiten und es kann nur noch symptomatisch behandelt werden. Dies ist v.a. auch in Hinblick auf die schweren Komplikationen (s.1.5) der Maserninfektion von Bedeutung. Bei Erstkontakt mit dem Masernvirus ist die Suszeptibilität nicht geimpfter Menschen sehr hoch (Hope Simpson RE. 1952). Das bedeutet, dass es in 95-98 % der Fälle nach einer Infektion mit dem Masernvirus auch zum klinischen Bild der Masern kommt, unabhängig von Alter und Geschlecht.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, potentielle Hemmstoffe der Maserninfektion auf ihre Wirkung zu testen und zu verstehen, wo im Infektions- und Replikationszyklus des MV sie eingreifen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 ZELLEN

Zelllinie	Vero-hSLAM
Zelltyp	Epithelzelle stabil mit humanem CD150 transfiziert
Herkunft	Afrikan. Grüne Meerkatze ( <i>Chlorocebus aethiops</i> ) (eine Gabe von Herrn Prof. Dr. Y. Yanagi, Fukuoka, Japan)

#### 2.1.2 VIREN

rMV <sup>IC323</sup> EGFP	rekombinantes wildtypisches MV, mit GFP Expressionskassette (eine Gabe von Herrn Prof. Dr. Y. Yanagi, Fukuoka, Japan)
---------------------------	--

#### 2.1.3 KULTURMEDIEN UND SEREN

FCS	Fötale Kälberserum wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, im Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg vor Gebrauch einmalig bei 56°C für 30 min inaktiviert und dann bei 4°C gelagert.
MEM	(minimal essential medium) Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Doppel MEM	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
NaHCO <sub>3</sub> 5,6 %	(Natriumhydrogencarbonat) Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg

## 2.1.4 LÖSUNGEN UND PUFFER

Einfriermedium:	90 % FCS, 10 % DMSO Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Extraktionlösung	0,4 g SDS , 0.87 ml 1 M HCl in 8,75 ml 100 % DMSO
MTT-Lösung:	2,5 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in 1 ml PBS

## 2.1.5 LÖSUNGEN FÜR ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

ATV: Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg

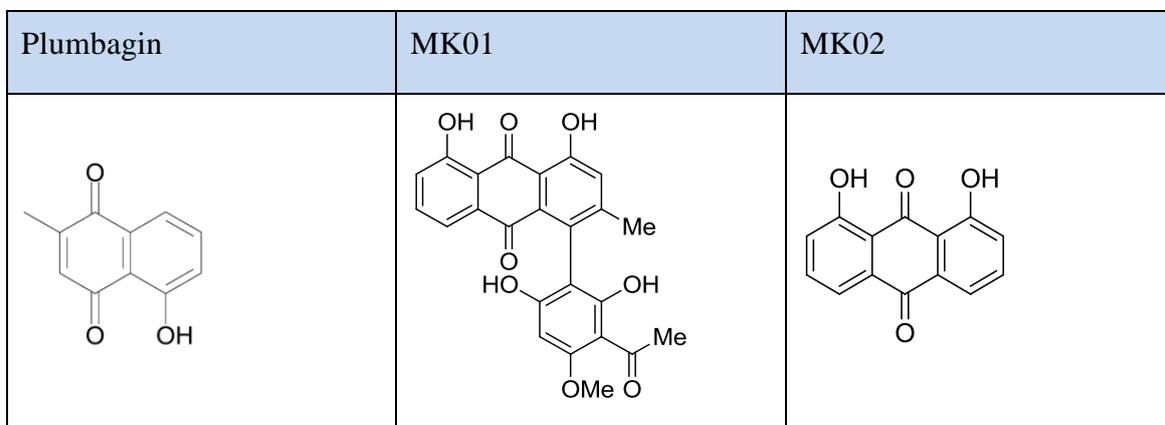
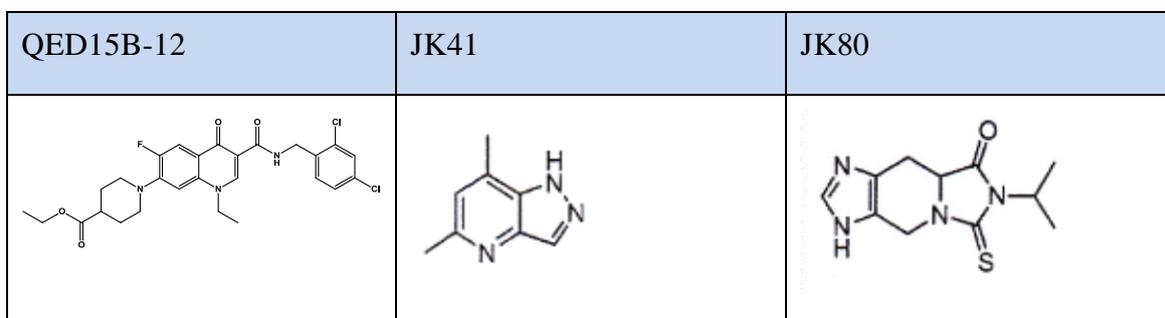
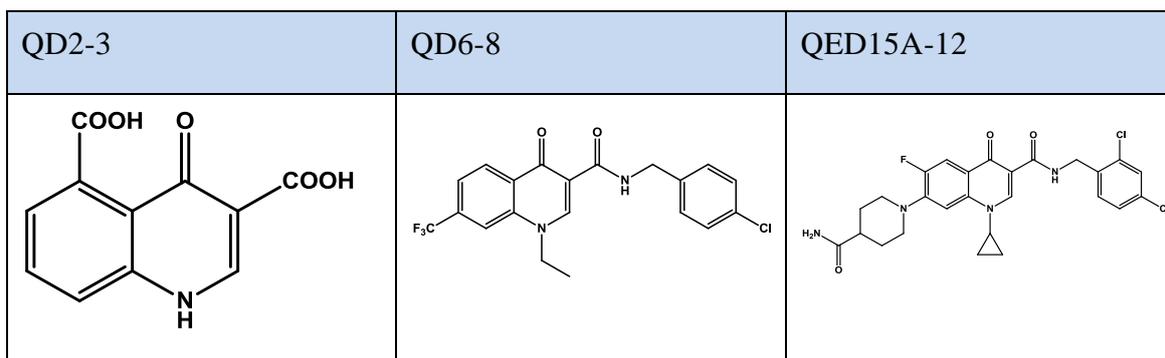
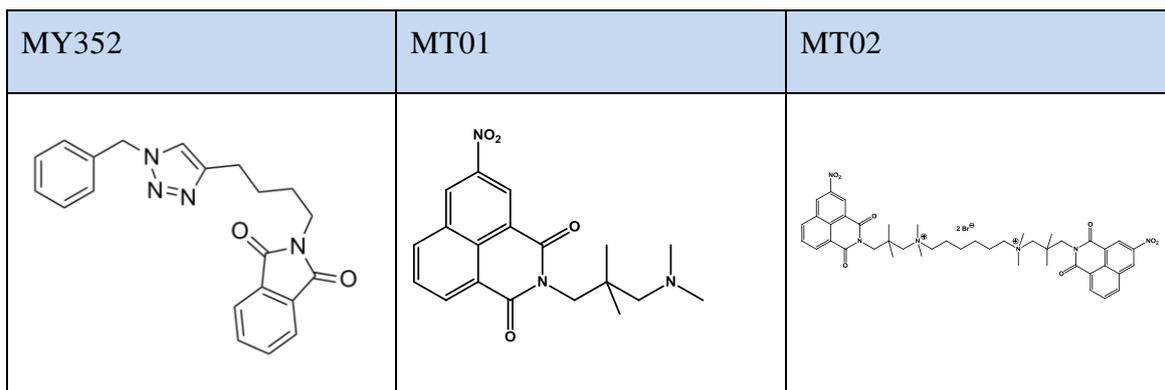
PBS: Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg

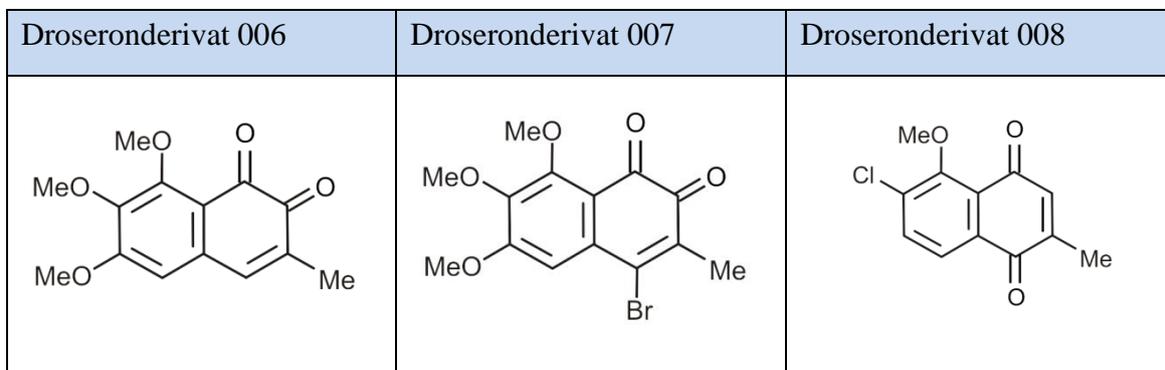
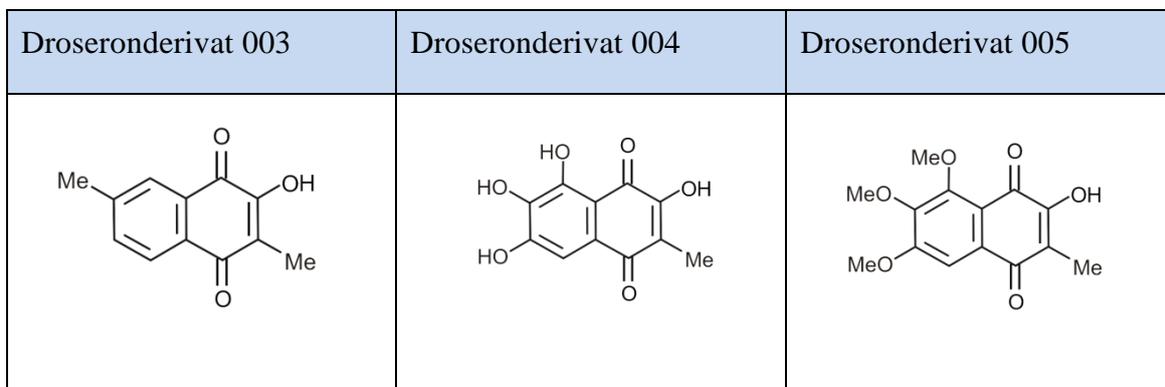
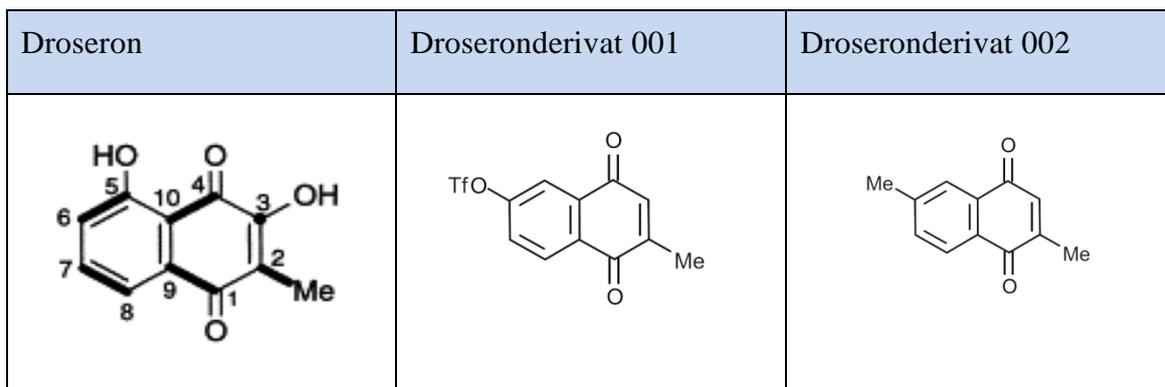
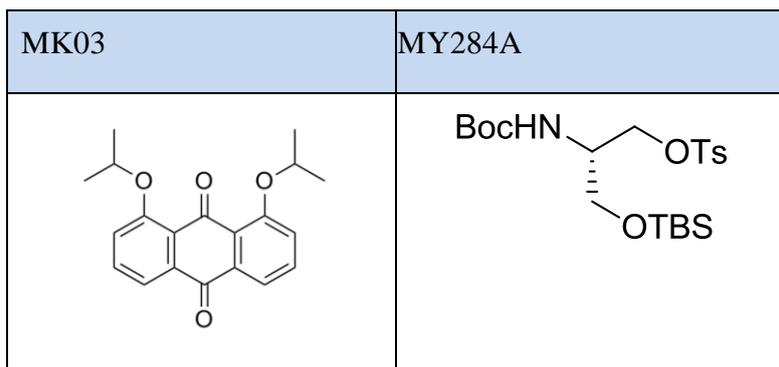
## 2.1.6 INHIBITORISCHE SUBSTANZEN

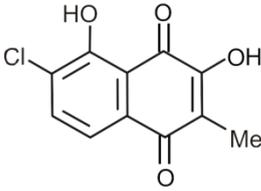
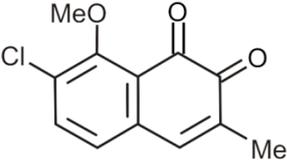
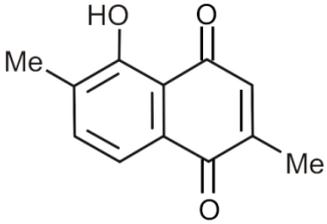
MK-, MY-, DinB-, CA-Substanzen und Derivate und Naturstoffe (Droseron und Derivate) wurden uns von Herrn Prof. G. Bringmann, Institut für organische Chemie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. QED-, JK-, MT-Substanzen wurden von Frau Prof. U. Holzgrabe, Pharmazeutischen Chemie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

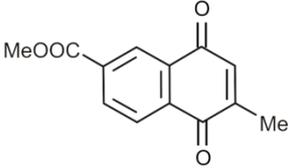
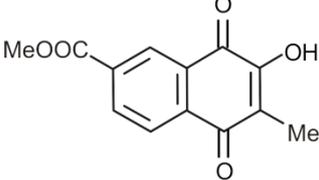
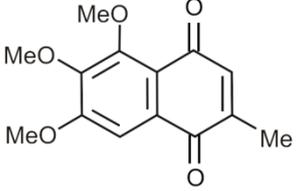
CA61, CA62, CA63, CA64, CA65, CA66, CA67, CA68, CA69, CA70, CA72, CA82, CA92, CA108, CA157.9, CA186.2, CA243, CA304, MY352

CA 262	CA 194	Din B





Droseronderivat 009	Droseronderivat 010	Droseronderivat 011
		

Droseronderivat 012	Droseronderivat 013	Droseronderivat 014
		

## 2.1.7 VERBRAUCHSMATERIALIEN

15ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
50ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
96 Well-ELISA-Platten	Nunc(Langensfeld)
Deckgläser	A. Hartenstein (Würzburg)
Durchfluscytometrie-Röhrchen	Becton Dickinson
Einmal-Handschuhe	Acid Bonz Proline
Einmalpipetten	Greiner (Frickenhausen)
Einmalpipettenspitzen	Roth (Karlsruhe)
Eppendorfgefäße verschiedene Größen	Eppendorf
Kryo-Konservierungsröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen Cellstar™ mit Filter	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen Cellstar™ ohne Filter	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturplatten 6 Wells	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber	A. Hartenstein (Würzburg)

## 2.1.8 GERÄTE

Analysewaage	Sartorius (Göttingen)
Autoklav 23	MELAG Medizintechnik (Berlin)
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Fluoreszenzmikroskop	Leica (Solms)
Fluoreszenzreader Safire 2	Tecan (Crailsheim)
Gefriertruhe -20° C	Siemens (München)
Gefriertruhe -80° C	Revco (USA)
Homogenisator	A. Hartenstein (Würzburg)
Kühlschrank 4° C	Siemens (München)
Laborwaage	Kern (Balingen)
Lichtmikroskop	Leica (Solms)
Magnetrührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowellengerät	Panasonic
Pipettierhilfe	Brand (Wertheim)
Standzentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Sterilwerkbank	Gelaire (Australien)
Tischzentrifuge	Heraeus (Hanau)
Vortexer	Bender + Hobein
Wasserbad	Köttermann
Zählkammer (Thoma)	Superior Marienfeld (Lauda)

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.1.1 KULTIVIERUNG ADHÄRENTER ZELLEN

Zum Kultivieren adhärenter Zellen, wie Vero-Zellen wird MEM-Medium mit NaHCO<sub>3</sub> gepuffert (15 ml auf 500 ml MEM, entspricht 3 %) und 5 % FCS, sowie Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 240µg/ml dazugegeben. Das Medium-Zellen-Gemisch wird in geeigneten Zellkulturflaschen gegeben, so dass der Flaschenboden vollständig mit Medium bedeckt ist und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-

Begasung im Brutschrank kultiviert. Im Lichtmikroskop lässt sich die Dichte des Zellrasens beurteilen, so dass bei optimaler Zelldichte ein Ablösen und Aufsplitten der Zellen erfolgen kann. Hierfür wird das MEM-Medium komplett entfernt und die Zellen werden kurzzeitig mit erwärmten ATV (bei mittleren Flaschen 2-2,5 ml, bei großen Flaschen 4 ml) inkubiert. Je nach Bedarf kann nun die gewünschte Menge Zellen entnommen werden, es sollten jedoch genügen Zellen in der Flasche verbleiben, um eine optimale Weiterkultivierung zu gewährleisten. Die Zellen werden mit frischem Medium versetzt und die gewonnenen Zellen können nach Bedarf gebraucht oder verworfen werden.

### **2.2.1.2 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON ZELLEN**

Das Aufbewahren von Zellen über längere Zeiträume wird durch die Kryokonservierung ermöglicht. Hierzu werden die Zellen erst abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4°C) und das Pellet dann in kaltem Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) resuspendiert. Im Anschluss können Aliquots von  $4-5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kryoröhrchen verteilt werden. Diese werden dann in einer Einfrierbox mit Isopropanol in die -80°C-Gefriertruhe gestellt und können so langsam, ca. 1°C pro Minute heruntergekühlt werden. Zuletzt werden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt wo sie bei -80°C lange gelagert werden können.

Das Auftauen sollte möglichst zellschonend erfolgen. Hierzu werden die Kryoröhrchen schnell im lauwarmen Wasserbad erwärmt und die Suspension dann möglichst rasch in ein 15 ml Falconröhrchen mit kaltem Kulturmedium gegossen, um das DMSO zu verdünnen, da DMSO zelltoxisch wirkt, sobald der Zellstoffwechsel wieder anläuft. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine kleine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt.

### **2.2.1.3 ZELLQUANTIFIZIERUNG**

Die Anzahl von Zellen in einem bestimmten Volumen kann durch eine Thoma-Zählkammer bestimmt werden. Diese besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils aus 4x4 kleinen Quadraten bestehen. Nachdem man ein Deckglas auf der Kammer befestigt hat, gibt man 10 µl der zuvor gut homogenisierten Zellsuspension unter das Glas. Die Menge Flüssigkeit, die auf einem grossen Quadrat zu liegen kommt, entspricht dann 0,1 µl. Man zählt nun die Zellen in drei grossen Quadraten aus und errechnet den Mittelwert für ein grosses Quadrat (entspricht 0,1 µl). Dieser Wert  $\times 10^4$  ergibt die Anzahl der Zellen in einem Milliliter der Suspension.

### **2.2.1.4 MTT-TEST**

Der MTT-Test ist ein Cytotoxizitätstest, der dazu dient die toxische Wirkung von Substanzen auf die Vitalität von Zellen zu quantifizieren. Namensgebend ist der für den Test verwendete Farbstoff, ein gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz namens 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT).

Zunächst werden  $1,5 \times 10^5$  adhärente Zellen (in dieser Arbeit Vero-hSLAM) pro Napf auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach ca. 24 h wird das Medium komplett entfernt und pro Napf mit 1ml Medium ersetzt, das die zu testende Substanz in verschiedenen Konzentrationen (100 µM, 30 µM, 10 µM, 3 µM, 1 µM) enthält. Die Negativkontrolle ist 1 µl DMSO auf 999 µl Medium, da die Substanzen normalerweise in DMSO gelöst sind und die entsprechenden Konzentrationen auch mit 1µl Substanz in 999 µl Medium erreicht werden. Die Positivkontrolle ist 1ml reines DMSO.

Die Zellen werden dann für 48 h mit den verschiedenen Ansätzen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach 48 h werden die Ansätze komplett abgenommen und durch reines Medium ersetzt. Dieses wird für 2 h auf den Zellen belassen, so dass sie sich von der Wirkung der Substanz erholen können. Danach wird das Medium entfernt, 750 µl MTT-Lösung (2,5mg MTT pro 1 ml PBS) in jeden Napf gegeben und für 1-2 h inkubiert. Je nach Zellvitalität findet eine Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTTs in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan statt. Beteiligt an diesem Prozess ist unter anderem die mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen. Das bedeutet, dass die Zellen für diesen Vorgang vital sein müssen bzw. in einer frühen Phase der Apoptose. Bei

toten Zellen bzw. bei fortgeschrittener Apoptose wird das MTT nicht mehr reduziert. Durch die Menge an Formazan kann so auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden. Nach 1-2 h wird die restliche MTT-Lösung vorsichtig entfernt. Das entstandene, wasserunlösliche Formazan muss im Napf belassen werden und wird dann in 750 µl Extraktionslösung gelöst.

Extraktionslösung: - 0,4 g SDS wird gelöst in:  
- 8,75 ml DMSO  
- 0,87 ml 1 M HCl

Damit das Formazan vollständig gelöst ist, lässt man das Gemisch 30-45 min bei Raumtemperatur stehen. Wird die Extraktionslösung in dieser Zeit violett, spricht das für die Vitalität der Zellen. Quantifiziert wird die entstandene Menge Formazan mit Hilfe der Extinktionsmessung. Die Überstände der einzelnen Näpfe werden hierfür in je 6 Näpfe zu je 50 µl pro Napf einer 96-Well-ELISA-Platte verteilt, um so einen Mittelwert berechnen zu können. Die Extinktionen werden dann bei einer Wellenlänge von 570nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen.

## **2.2.2 VIROLOGISCHE METHODEN**

### **2.2.2.1 VIRUSANZUCHT VON MV**

Für die Anzucht von MV (rMV<sup>IC323</sup>EGFP) werden Vero-hSLAM-Zellen in große Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bis zu einer Zellrasendichte von 60-80 % inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit einer MOI von 0,1 mit MV infiziert. Nun muss der richtige Moment abgepasst werden, in welchem eine Maximale Virusdichte in den Zellen vorhanden ist, bevor Zellen und Viren absterben. Bei MV erkennt man dies durch eine Syncytienbildung der Zellen, mit möglichst vielen und großen Syncytien, die sich noch nicht abgelöst haben. Ist diese maximale Virusmenge erreicht, wird das Medium in den Flaschen vorsichtig bis auf 3 ml abgenommen und die Kulturflaschen bei -80°C eingefroren. Die Virusmenge pro ml Flüssigkeit wird dadurch erhöht und durch das schnelle Einfrieren werden die Zellen zerstört. Die Viruspräparation erfolgt nun mindestens 24 h später. Hierzu werden die Kulturflaschen zunächst bei 4°C aufgetaut und dann auf Eis gelegt. Die Kälte ist wichtig, um die Viren zu schonen. Die

infizierten Zellen werden nun mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in den 3 ml Medium resuspendiert. Die Viruspartikel sind größtenteils membrangebunden, so dass man zum Ablösen einen Homogenisator verwendet, um die Konzentration von freiem Virus weiter zu erhöhen. Hierzu werden die die 3 ml Medium aus allen vorhandenen Kulturflaschen vereinigt und circa zehnmals homogenisiert. Um die Zellreste nun endgültig von den Viren zu trennen, wird die Suspension bei 4500 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert, so dass nur das Virus im Überstand verbleibt. Dieser wird nun auf vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.2.2 TITRATION VON MV

Um zu erfahren wie hoch die Konzentration an MV (rMV<sup>IC323</sup>EGFP) nach einer Präparation oder nach einem Inhibitionsversuch ist, stellt man eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  der zu testenden Probe her. Die Verdünnungsreihe wird auf Eis und mit kaltem, serumfreiem MEM-Medium hergestellt, da die Proteine die Infektion stören. Für eine Mehrfachbestimmung muss die entsprechende Menge an Verdünnung hergestellt werden. 24h vorher sollten  $1,5 \times 10^5$  Vero-hSLAM-Zellen pro Napf in 6-Well-Platten ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert werden. Für die Titration wird dann das Kulturmedium entfernt und pro Virusverdünnung werden 3 Nöpfe mit jeweils 1 ml Verdünnung beschichtet und für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit infiziert jedes in der Verdünnung vorhandene MV eine Zelle. Anschließend wird die Flüssigkeit komplett abgenommen und jeder Napf mit einer ~40°C warmen Mischung aus 25 % MEM (mit Zusatz von 5 % FCS), 37,5 % zweiprozentigem Agar und 37,5 % Doppel-MEM überschichtet. Dadurch erreicht man, dass sich pro, durch ein MV infizierter Zelle, genau ein Infektionsplaque bildet, da die Beschichtung die Infektion neuer Zellen durch die neu entstandenen Viren an anderen Stellen verhindert. Ist die Mischung kalt und fest geworden stellt man die 6-Well-Platten verkehrt herum für 5 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in den Brutschrank. Danach wird eine Neutralrot-Lösung 1,6 % 1:1000 mit PBS verdünnt, von diesem Gemisch je 1 ml auf jeden Napf gegeben und die 6-Well-Platten für eine Stunde bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Nachdem man die Färbelösung entfernt hat, müssen die Platten nochmal für 24 h in den Brutschrank. Danach können die durch die Färbung sichtbar gemachten Plaques pro Napf ausgezählt werden. Bei einer dreifach

Bestimmung bildet man den Mittelwert der 3 Nöpfen einer Verdünnung, der Titer der eingesetzten Viruspräparation ist dann dieser Mittelwert multipliziert mit dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe. Da wie oben erläutert, jedes vorhandene infektiöse MV genau einen Plaque bildet.

### 2.2.2.3 INHIBITIONSVERSUCHE

Um herauszufinden inwieweit die zu testenden Substanzen in der Lage sind, die Inhibition oder Replikation von MV zu hemmen, werden diese potentiellen Inhibitoren zunächst in DMSO gelöst. Es werden Lösungen von 30 mM, 10 mM, 3 mM, 1 mM hergestellt und in Gefäßen der Firma Eppendorf im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung des Inhibitionsversuchs werden am Vortag  $1 \times 10^5$  Vero-hSLAM Zellen pro Napf in 6-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die entsprechenden Verdünnungen der Substanzen auf Eis hergestellt, indem jeweils 1 µl Substanz in 994 µl kaltem MEM-Medium mit 5 % FCS gegeben werden. Die für die Infektion benötigte Menge Virus berechnet man mit der Formel:

$$\frac{MOI \times Zellzahl}{pfu}$$

Bei einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,01 und einem rMV<sup>IC323</sup>EGFP -Titer von  $2 \times 10^5/ml$  ergibt sich daher eine Virusmenge von:

$$\frac{0,01 \times 1 \times 10^5}{2 \times 10^5/ml} = 5 \times 10^{-3}ml = 5\mu l$$

Die Ansätze müssen für die korrekte Verdünnung ein Volumen von 1 ml haben, daher ergibt sich pro Ansatz ein Mischverhältnis von:

994µl	+	1µl	+	5µl	=	1 ml
Kaltes MEM-Medium mit 5%FCS		Substanz gelöst in DMSO		rMV <sup>IC323</sup> EGFP Titer 2 x 10 <sup>5</sup>		

Um das Virus zu schonen werden die Ansätze auf Eis hergestellt, gut gemischt und kurz inkubiert. Pro zu testender Substanz werden 4 Ansätze hergestellt, für 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich wird noch eine Negativkontrolle mit 1  $\mu\text{l}$  reinem DMSO und eine Positivkontrolle mit dem Inhibitor GH02 hergestellt. Von den am Vortag mit VerohSLAM- Zellen vorbereiteten 6-Well-Platten wird nun zunächst das Kulturmedium vollständig entfernt und dann pro Napf einer der oben beschriebenen Ansätze auf die Zellen gegeben. Die Platten werden dann bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert.

Nach 48 h werden die Platten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops beurteilt und eine Fluoreszenzmessung (s. Methode 2.2.2.4) zur Quantifizierung des EGFPs durchgeführt. Zur Quantifizierung der infektiösen Viruseinheiten kann der Inhalt der Nöpfe titriert werden. Hierfür werden die Platten nach der Fluoreszenzmessung bei -80°C eingefroren und nach mind. 24 h bei 4°C langsam aufgetaut. Auf Eis werden dann die Zellen mit Hilfe von Zellschabern vom Boden der Nöpfe abgelöst und der gesamte Inhalt eines Napfes in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Die Gefäße werden bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert und die Überstände in Eppendorfgefäße bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wird eine Titration der Ansätze durchgeführt. (s. Methode 2.2.2.2)

#### **2.2.2.4 FLUORESZENZMESSUNG**

Das rMV<sup>IC323</sup>EGFP exprimiert in infizierten Zellen EGFPs (enhanced green fluorescent protein). Durch die Messung der Fluoreszenz kann somit eine Quantifizierung des EGFPs erfolgen und ein Rückschluss auf die Replikationsaktivität des Virus gezogen werden. Für diese Messungen wird der Fluoreszenzreader „Safire 2“ der Firma Tecan (Crailsheim) verwendet. Die Kultivierung und Infektion der zu messenden Zellen erfolgt in 6-Well-Platten der Firma Greiner. Die 6-Well-Platten werden nach 48 h mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die relative Emission bei 509 nm aufgezeichnet (Extinktions- bzw. Emissions-Maxima von EGFP). Die anderen am Gerät vorgenommenen Einstellungen sind:

- Measurement mode Fluorescence Bottom
- Excitation bandwidth 10 nm
- Emission bandwidth 10 nm

- Gain Manual
- Number of reads 5
- FlashMode High sensitivity
- Integration time 40  $\mu$ s
- Lag time 0  $\mu$ s
- Plate definition file GRE6ft.pdf
- Plate with cover
- Multiple reads per well (Circle) 13  $\times$  13
- Time between move and flash 1 ms

Mit Hilfe der Software „XFLUOR4 Version 4.51“ (Firma Tecan Crailsheim) können die Werte aufgezeichnet werden. Die relativen Fluoreszenzintensitäten können dann mit „Excel Version 97-2003“ der Firma Microsoft (USA) dargestellt werden.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 VORVERSUCHE MIT POTENTIELL ANTI-VIRALEN SUBSTANZEN**

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bringmann am Institut für organische Chemie der Universität Würzburg wurden verschiedene Naturstoffe und ihre Derivate hergestellt, die auf ihre potentiell antivirale Wirkung getestet werden sollten. Hierzu wurden zunächst Vortests durchgeführt, um die Substanzen auf ihre Hemmfähigkeit hin zu screenen und eine Vorauswahl zu treffen. Zumindest die wichtigsten Versuche wurden mehrfach durchgeführt, um eine Fehlergrenze und Mittelwerte angeben zu können. Alle Versuche wurden mit Vero-hSLAM-Zellen durchgeführt, die mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP infiziert wurden. Während der intrazellulären Virusreplikation entsteht bei diesem rekombinanten Virus neben den viralen Proteinen auch grün fluoreszierendes Protein (EGFP), welches mittels Fluoreszenzreader gemessen und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurde (siehe Methode 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Da die virale Polymerase die EGFP-mRNA transkribiert, ist das gemessene EGFP ein direktes Maß für die Polymeraseaktivität.

##### **3.1.1 ETABLIERUNG DES VERSUCHSAUFBAUS UND -ABLAUFS**

Zunächst musste ein geeigneter Versuchsaufbau und -ablauf für die Inhibitionstests etabliert werden. Es wurden Zellen in verschiedener Anzahl auf 6-Well-Platten ausgesät und im Anschluss mit verschiedenen MOIs infiziert. Der Verlauf der Infektion mit und ohne Inhibitor wurde nach 24, 48, 72 und 96 h mit dem Lichtmikroskop, dem Fluoreszenzmikroskop und dem Immunfluoreszenzreader beurteilt. Die Versuchsdauer war auf 4d angesetzt. Es zeigte sich schnell, dass die Infektion v.a. in den Kontrollen in dieser Zeit zu weit fortschreiten konnte und die Zellen bereits am dritten Tag begannen sich abzulösen, so dass ab diesem Zeitpunkt keine aussagekräftigen Messwerte mehr erhoben werden konnten. Als optimaler Messzeitpunkt konnte 48 hpi etabliert werden, da sich hier schon eine ausreichende Durchinfektion und Replikation des Virus in den Kontrollen zeigte, ohne dass eine Verfälschung der Werte durch absterbende Zellen zu befürchten war.

Die optimale Zahl an ausgesäten Zellen wurde mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Napf festgelegt, da dann die Zellen nach 48 hpi weder zu dicht noch zu dünn gewachsen waren und sich eine gute Durchinfektion in den Kontrollen zeigte. Die Zellen wurden in MEM in die Nöpfe gegeben, nach 3-4 h wurde im Lichtmikroskop kontrolliert, ob die Zellen sich am Boden festgesetzt hatten. War dies der Fall, wurde das Medium komplett entfernt und mit 1 ml MEM ersetzt, in welchem sich rMV<sup>IC323</sup>EGFP befand und ggf. eine Inhibitorsubstanz. Diese enge Zeitfolge von der Aussaat der Zellen bis zur Infektion wurde gewählt, da hierbei eine genaue Bestimmung der Anzahl an Zellen pro Napf erfolgen und somit auch eine genaue MOI errechnet werden konnte. Da sich im Versuchsverlauf kein Nachteil dieser engen Zeitfolge ergab und die Versuche äquivalent zu Versuchen durchgeführt werden konnten bei denen erst 24 h nach Aussaat der Zellen die Infektion erfolgt, wurde diese enge Zeitfolge beibehalten.

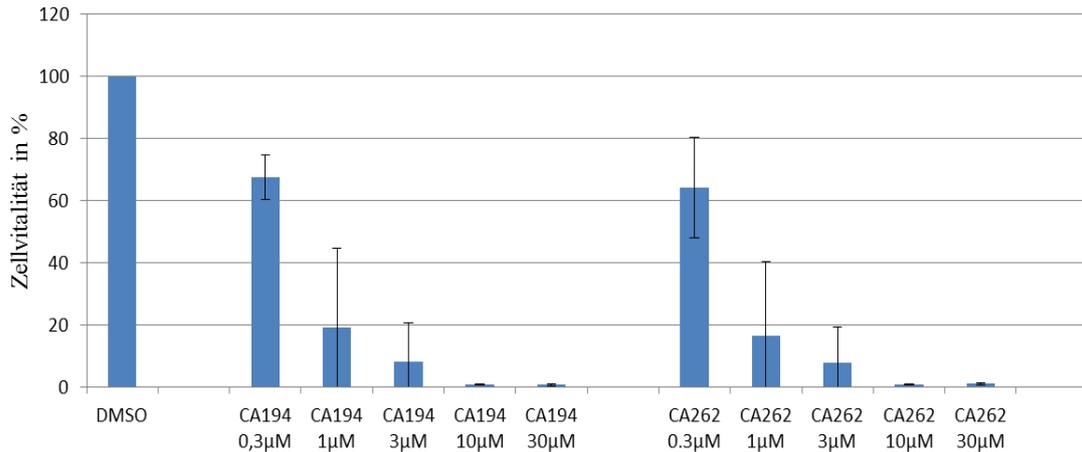
Als optimale MOI für die Versuche zeigte sich nach mehreren Versuchen eine MOI von 0,01, da die Infektion nach 48 h nicht zu wenig und auch nicht zu weit fortgeschritten war.

### **3.1.2 INHIBITIONSTESTS MIT CA-SUBSTANZEN**

Die CA- Substanzen, CA194 und CA262 (benannt nach Christian Albert, Arbeitsgruppe Prof. G. Bringmann) hatten im Vorfeld schon eine antivirale Wirkung gegen MV-EdtagCAMHeGFP auf Vero-Zellen gezeigt (s. Diplomarbeit von Johannes Weirather). Daher lag der Schwerpunkt der Tests zunächst auf dieser Substanzgruppe. Die ersten Versuche ergaben von den bereits erhobenen Daten abweichende Ergebnisse. Bei Konzentrationen von CA194 und CA262 höher als 3  $\mu$ M war lichtmikroskopisch ein deutlich zelltoxischer Effekt der Substanzen zu erkennen, welcher auch mittels MTT-Test verifiziert werden konnte. Zunächst wurde angenommen, dass diese vorher nicht aufgetretene toxische Wirkung, auf einer Strukturänderung, der lange im Kühlschrank aufbewahrten Substanzen liegen könnte. Es wurden daher Proben zur Strukturanalyse an das Institut für organische Chemie zurückgesandt und im Gegenzug frisch synthetisierte Substanzen erhalten. Aber auch bei dem neu erhaltenen CA194 und CA262 bestand ein hoher zelltoxischer Effekt ab 3  $\mu$ M, so dass die Versuche mit diesen Substanzen eingestellt wurden. Die Strukturanalyse der alten Substanzen ergab zudem keine Veränderung der primären Struktur. Es wurden noch verschiedene Derivate der

CA-Substanzgruppe getestet unter denen sich eine Reihe zelltoxischer Substanzen befanden, die übrigen Derivate zeigten keine oder nur eine geringe antivirale Wirkung auf rMV<sup>IC323</sup>EGFP, gemessen an der Reduktion der EGFP-Fluoreszenz.

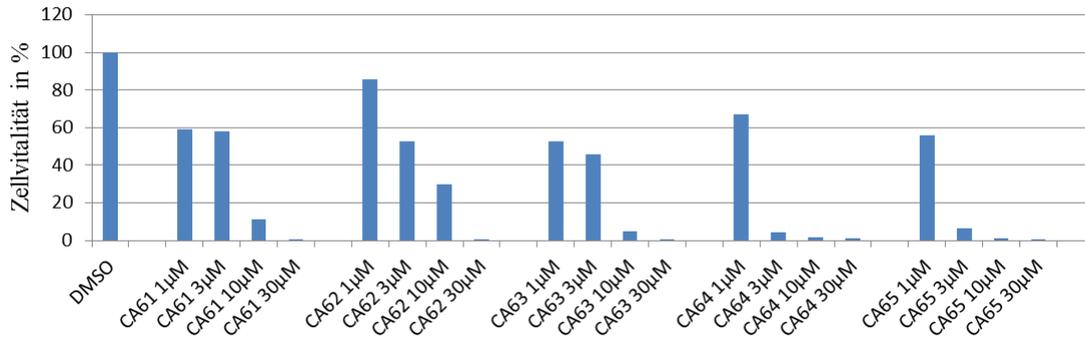
Auf den Folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der MTT-Zytotoxizitätstests und der Inhibitionstests dargestellt:



**Abbildung 3.1 MTT-Zytotoxizitätstest CA194 und CA262**

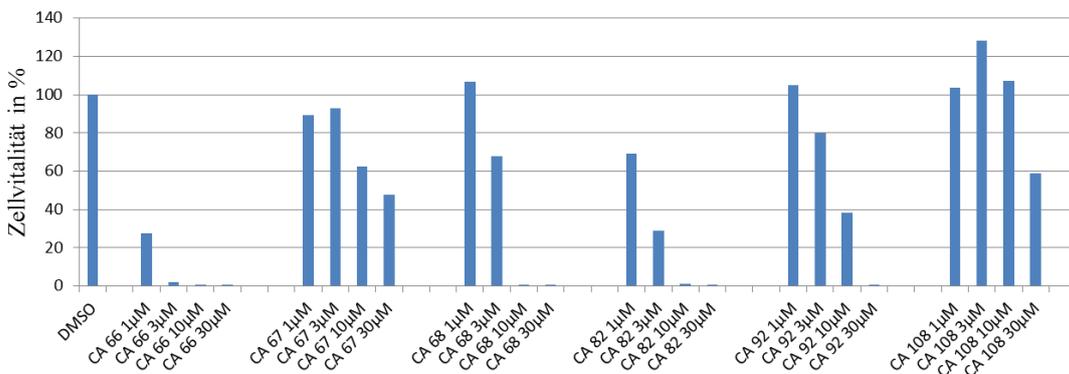
Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 3)

In Abb. 3.1 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl CA194 als auch CA262 schon in niedrigen Konzentrationen wie 3 µM die Zellvitalität auf unter 20 % senkt. Die Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen die Anwesenheit des Inhibitors überlebt, wird als CC<sub>50</sub>-Wert bezeichnet. Für CA194 und CA 262 kann der CC<sub>50</sub>-Wert somit auf 0,5 µM geschätzt werden. Die mit diesen Substanzen durchgeführten Inhibitionstests zeigten daher vielmehr den zelltoxischen Effekt, als eine antivirale Wirkung.



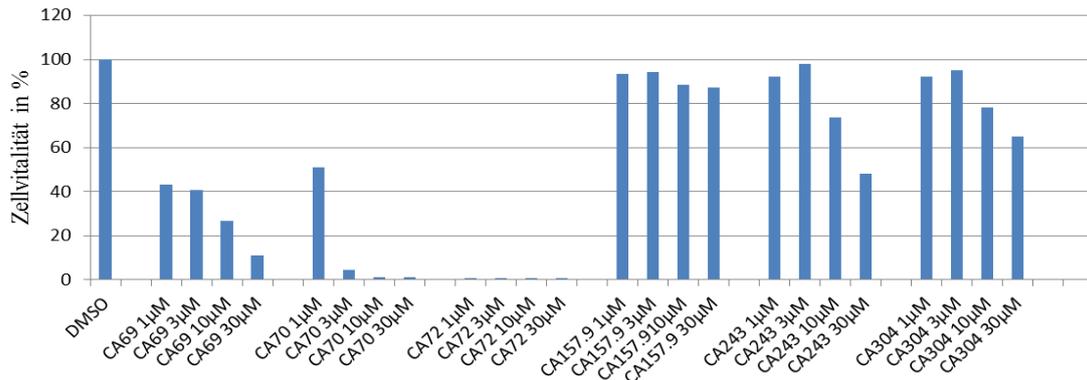
**Abbildung 3.2 MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1)



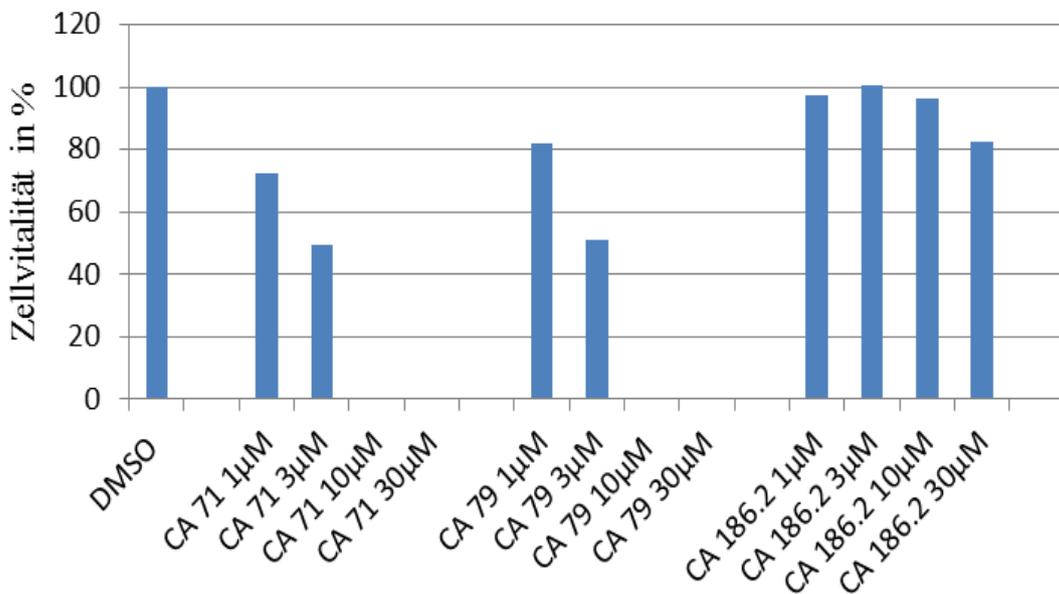
**Abbildung 3.3 MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1)



**Abbildung 3.4 MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1)

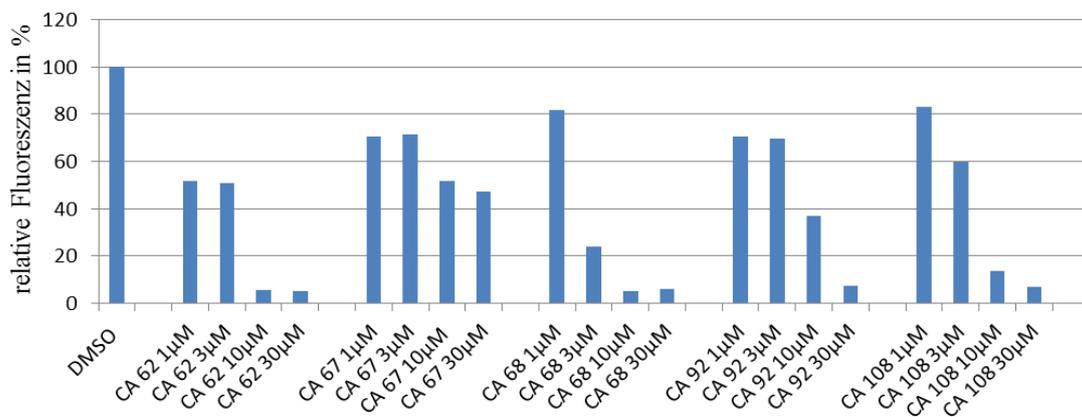


**Abbildung 3.5 MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1)

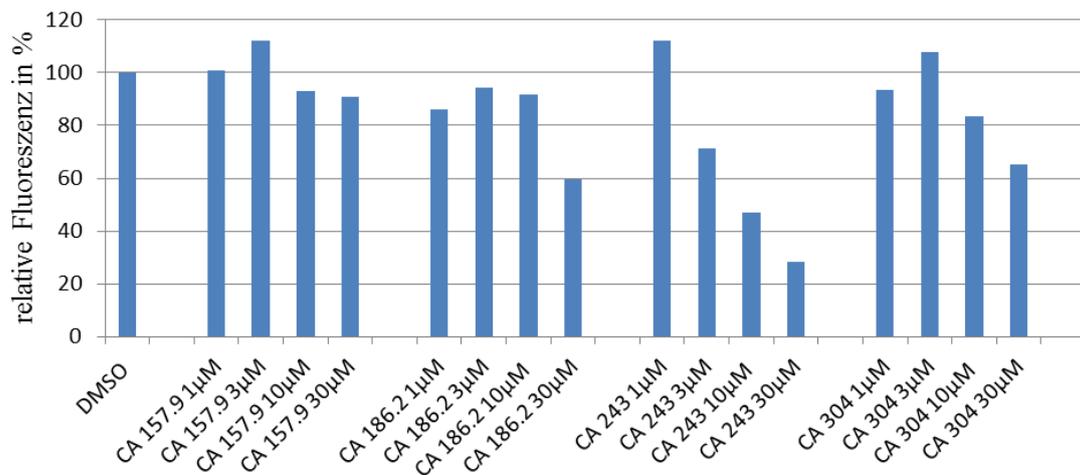
Die Abbildungen 3.2 - 3.5 zeigen die MTT-Tests der CA-Derivate. Bei einigen, wie CA64, CA65, CA66, CA70 und CA72 ist ein starker zytotoxischer Effekt ab 3  $\mu\text{M}$  oder niedrigeren Konzentrationen zu erkennen. Andere Substanzen wie CA157.9 oder CA304 waren nur wenig zytotoxisch. Eine CA157.9 Konzentration von 30 $\mu\text{M}$  überlebten über 80 % der Zellen, bei 30  $\mu\text{M}$  von CA304 waren noch 65 % der Zellen am Leben.

Für die weiteren Inhibitionsversuche kamen nur Substanzen mit einem niedrigen zytotoxischen Potenzial in Frage, die Ergebnisse dieser Versuche sind in den nächsten Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 3.6 Infektions-Hemmtest mit CA-Derivaten.**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n = 1)



**Abbildung 3.7 Infektions-Hemmtest mit CA-Derivaten.**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>-EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n = 1)

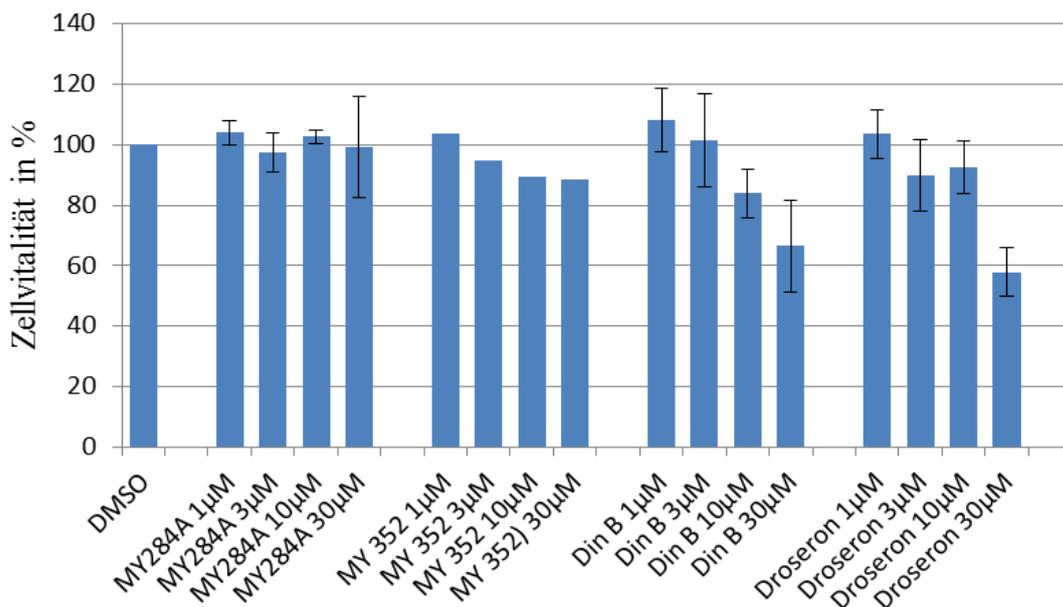
### 3.1.3 INHIBITIONSVERSUCHE MIT ANDEREN NATURSTOFFEN

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bringmann stellte uns noch andere Naturstoffe mit potentieller antiviraler Wirkung zur Verfügung:

- Din B
- MK01
- MK02
- MK03
- MY352
- MY284A
- Droseron

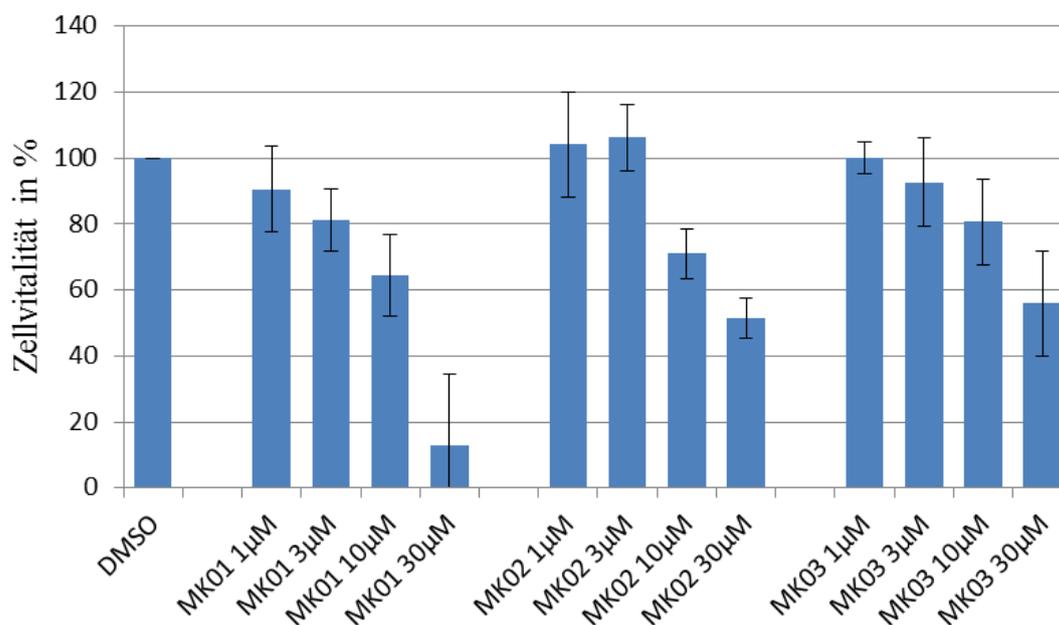
Auch diese Substanzen wurden in Vortests auf ihre Wirkung geprüft. Die Ansätze dieser Versuche unterschieden sich zwar in ausgesäter Zellzahl und MOI, da sie jedoch durch die DMSO-Kontrolle auf Prozent genormt werden konnten, wurden sie so untereinander vergleichbar. Um den Effekt der Zytotoxizität zu quantifizieren wurde der MTT-Test durchgeführt. In Abbildung 3.8 und 3.9 sind die Ergebnisse der 3 unabhängig voneinander durchgeführten MTT-Tests dargestellt. Einzig für MY352 wurde nur ein

MTT durchgeführt. Es zeigt sich, dass diese Naturstoffe insgesamt viel weniger zelltoxisch sind, als die meisten der getesteten CA-Derivate. Die höchste zelltoxische Wirkung in dieser Gruppe hat MK01. Es überleben noch 13 % der Zellen eine MK01 Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ , wobei bei 10  $\mu\text{M}$  noch 64,5 % der Zellen am Leben sind. Am wenigsten zelltoxisch ist dagegen MY284A. Hier überleben bei allen MY284A Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  nahezu 100 % der Zellen. Bei Droseron ist auffällig, dass bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  kaum eine zelltoxische Wirkung zu sehen ist, bei 10  $\mu\text{M}$  überleben 92,5 % der Zellen. Bei Droseron 30  $\mu\text{M}$  sind noch 57,8 % der Zellen am Leben, die Standardabweichung beträgt 8 %. Din B 10  $\mu\text{M}$  überleben 83,8 % der Zellen. DinB 30  $\mu\text{M}$  überleben 66,4 % der Zellen, die Standardabweichung beträgt 15 %.



**Abbildung 3.8 MTT-Zytotoxizitätstest der Naturstoffe**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test  
 Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 3)



**Abbildung 3.9 MTT-Zytotoxizitätstest der Naturstoffe**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test

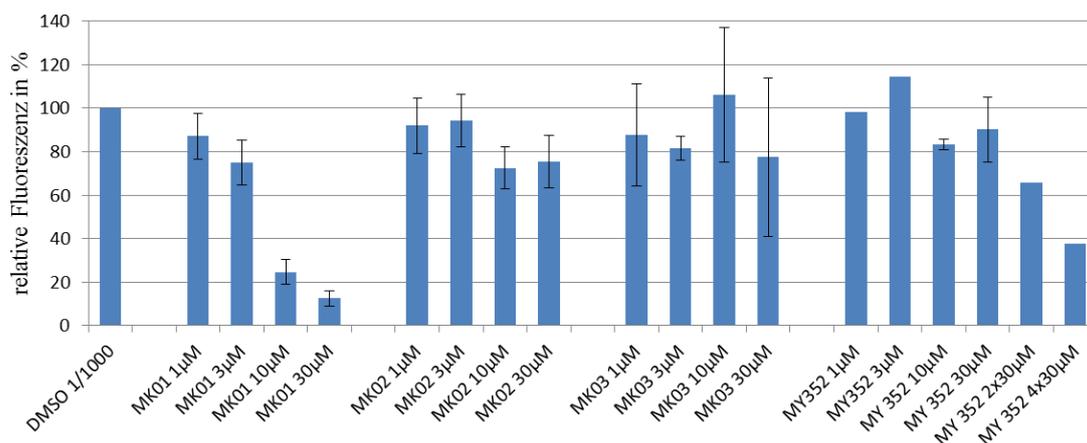
Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 3)

Alle sieben Substanzen wurden ebenfalls auf ihre Wirkung auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP getestet und mittels EGFP-Fluoreszenz quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 und 3.11 dargestellt. Die scheinbar gute antivirale Wirkung von MK01 bei 30 µM lässt sich am ehesten durch dessen Zytotoxizität erklären. Bei einer MK01 Konzentration von 30 µM beträgt die Fluoreszenz noch 12,5 %, bei der gleichen Konzentration überleben im MTT-Test 13 % der Zellen. Die zytotoxische Wirkung von MK01 30 µM konnte in den Inhibitionsversuchen auch Lichtmikroskopisch verifiziert werden. Eine MK01 Konzentration von 10 µM führt zu einer Reduktion der Fluoreszenz auf 24,7 %, im MTT-Test sind bei dieser Konzentration allerdings noch 64,5 % der Zellen am Leben. Eine antivirale Wirkung dieser Substanz scheint also bei 10 µM, eine Rolle zu spielen. Dagegen haben MK02, MK03, MY284A und MY 352 kaum einen Einfluss auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP, gemessen an der

EGFP-Fluoreszenz. Die im MTT-Test gezeigte Zytotoxizität von MK02 und MK03 haben weniger Einfluss auf die Fluoreszenz als MK01. Bei MK02 30  $\mu\text{M}$  ist die Fluoreszenz 75,2 %, obwohl im MTT-Test bei dieser Konzentration nur noch 51,3 % der Zellen am Leben sind. Ähnlich ist es bei MK03, hier überleben im MTT-Test bei 30  $\mu\text{M}$  55,9 % der Zellen, die Fluoreszenz wird im Vergleich auf 77,4 % reduziert.

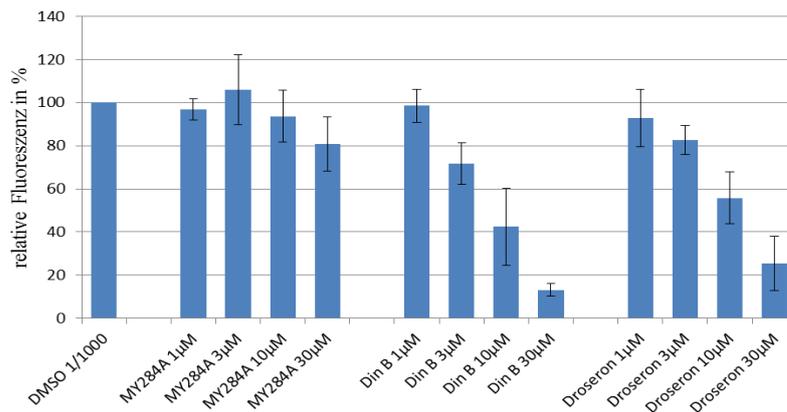
Die beste Reduktion der Fluoreszenz durch rMV<sup>IC323</sup>EGFP hatten Din B und Droseron. Din B reduziert bei 10  $\mu\text{M}$  die Fluoreszenz auf 42,3 % und bei 30  $\mu\text{M}$  auf 13 %. Obwohl der CC50 bei Din B etwa bei 40 $\mu\text{M}$  geschätzt werden konnte, zeigte die Substanz in nachfolgenden Versuchen eine starke Zytotoxizität bei 30 $\mu\text{M}$ , welche lichtmikroskopisch festgestellt wurde. Warum die Substanz diese Zytotoxizität entfaltet blieb unklar, es wurden aber aufgrund dieser keine weiteren Tests mit Din B durchgeführt. Die oben beschriebene Fluoreszenzminderung ist somit auch, im Rahmen der starken Zytotoxizität zu erklären.

Bei Droseron wird die Fluoreszenz bei 10  $\mu\text{M}$  auf 55,8 % und bei 30  $\mu\text{M}$  auf 25,4 % gesenkt. Diese Reduktion kann nicht nur auf die Zytotoxizität der Substanz zurückgeführt werden. Droseron hat bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{M}$  kaum eine zelltoxische Wirkung, bei 10 $\mu\text{M}$  überleben 92,5 % der Zellen. Bei Droseron 30  $\mu\text{M}$  sind noch 57,8 % der Zellen am Leben, die Standardabweichung beträgt 8 %.



**Abbildung 3.10 Infektions-Hemmtest mit Naturstoffen**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 oder 0,05 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)



**Abbildung 3.11 Infektions-Hemmtest mit Naturstoffen**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 oder 0,05 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)

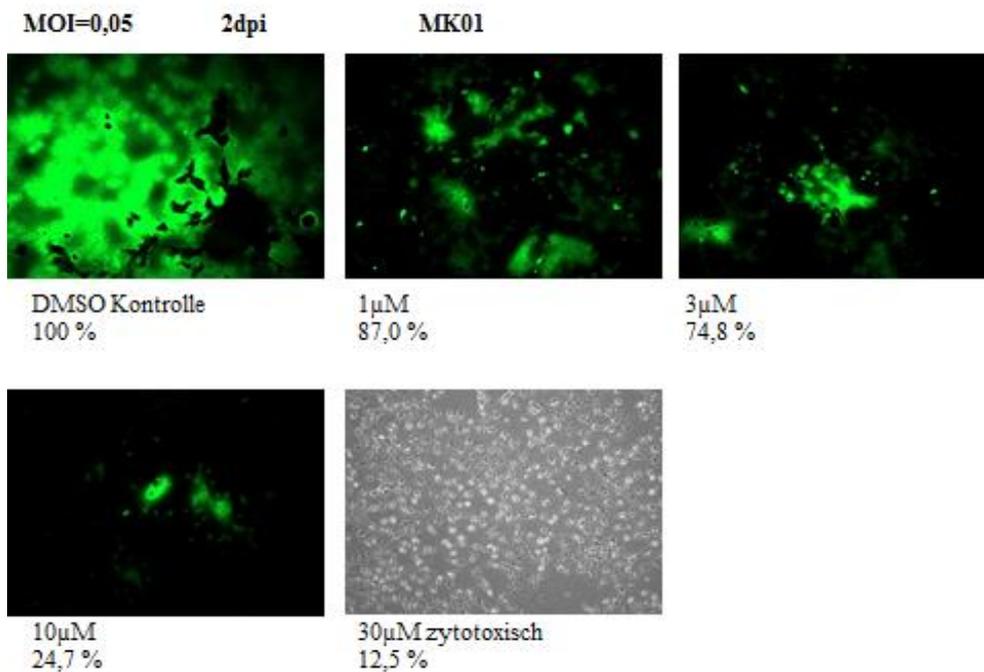
Diese Ergebnisse konnten auch fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. In Abbildungen 3.12 bis 3.16 sind die entsprechenden Bilder dargestellt. Die Aufnahmen wurden 48 h nach Infektion von Vero-hSLAM mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP aufgenommen. Über jeder Bildgruppe steht der verwendete Inhibitor und unter jedem Bild die verwendete Konzentration und die erreichte Fluoreszenzreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei den meisten ist zudem noch eine Hellfeldaufnahme angefügt.

Wie man auf der Hellfeldaufnahme von MK01 30µM gut sehen kann (Abb. 3.12), bestätigt sich die im MTT-Test gezeigte Zytotoxizität.

MK03 und MY284A zeigen, wie in den anderen Tests, keine Zytotoxizität, dafür aber auch kaum eine Hemmung der Infektion.

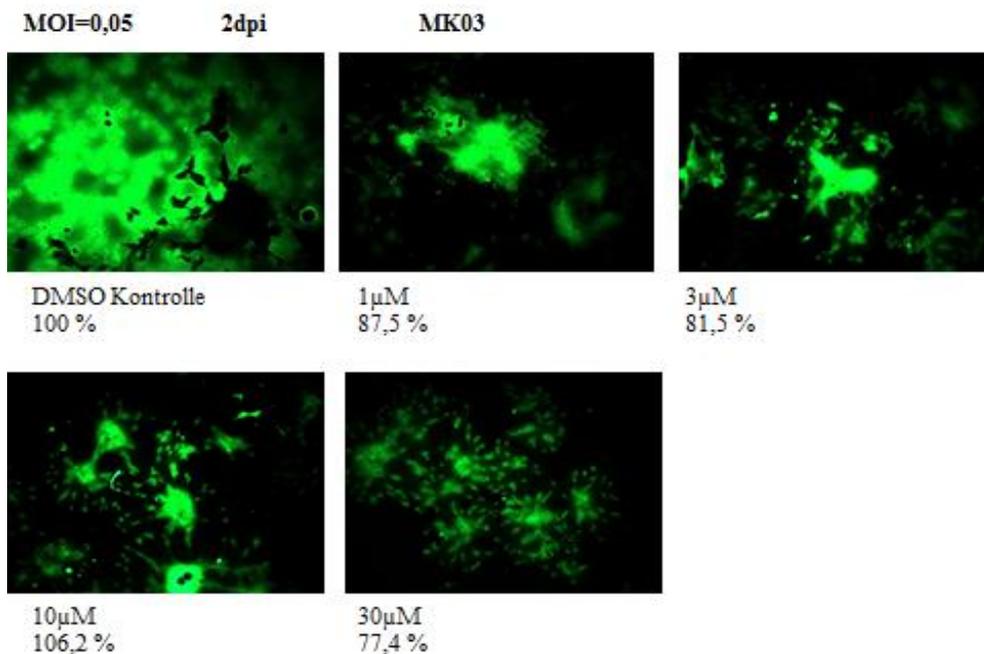
Din B und Droseron zeigen auch fluoreszenzmikroskopisch eine gute Hemmung der Infektion von rMV<sup>IC323</sup>EGFP. In den dazugehörigen Hellfeldbildern ist bei jeweils 30 µM der Substanzen kaum Zytotoxizität zu erkennen. Wie oben beschrieben, entfaltete Din B in weiteren Versuchen doch eine lichtmikroskopisch sichtbare Zytotoxizität. Der Grund dafür blieb unklar.

Aufgrund der guten Ergebnisse in den Vortests, wurde es als interessant eingestuft, Derivate von DinB und Droseron auf ihre mögliche Hemmung der MV-Infektion zu testen und zu untersuchen, ob eventuell eine bessere spezifische Hemmung der Virusreplikation erzielt werden könnte. Nur von Droseron konnten wir Derivate erhalten und testen (siehe 3.1.4).



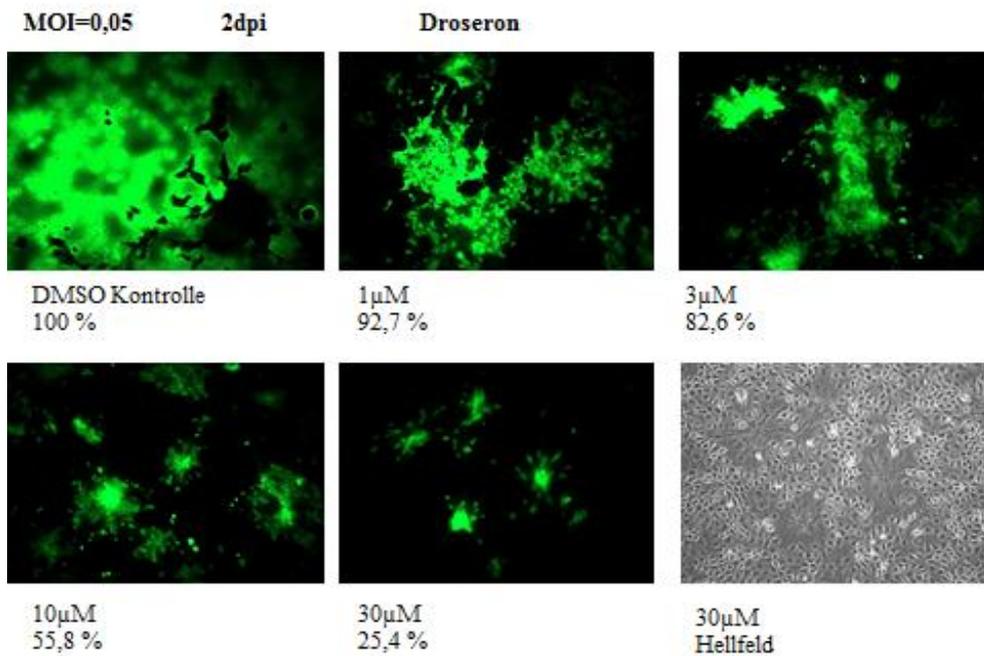
**Abbildung 3.12** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MK01.

Unter jedem Bild steht die verwendete Konzentration von MK01 und die gemessene Fluoreszenz in % im Verhältnis zur Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde.



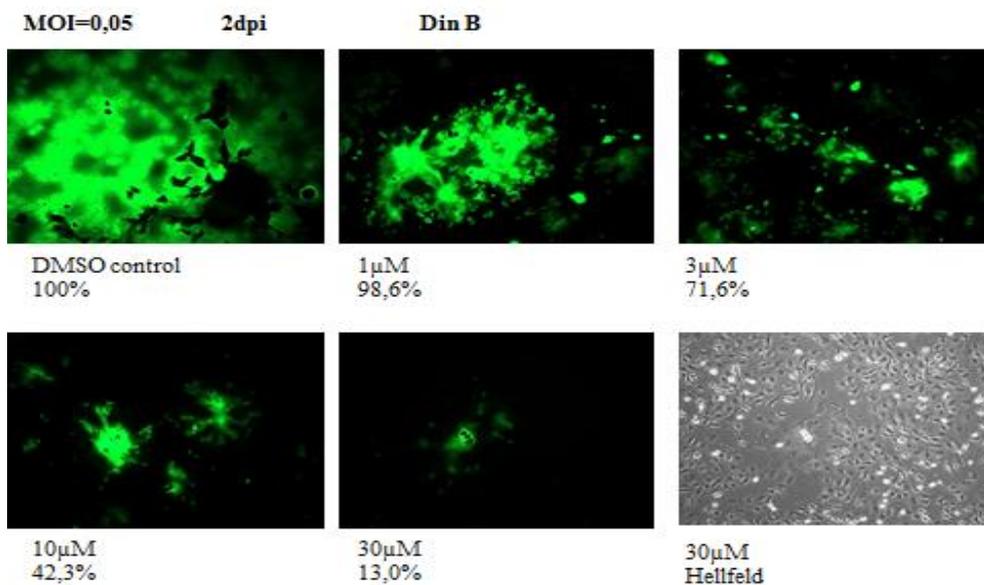
**Abbildung 3.13** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MK03.

Unter jedem Bild steht die verwendete Konzentration von MK03 und die gemessene Fluoreszenz in % im Verhältnis zur Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde.



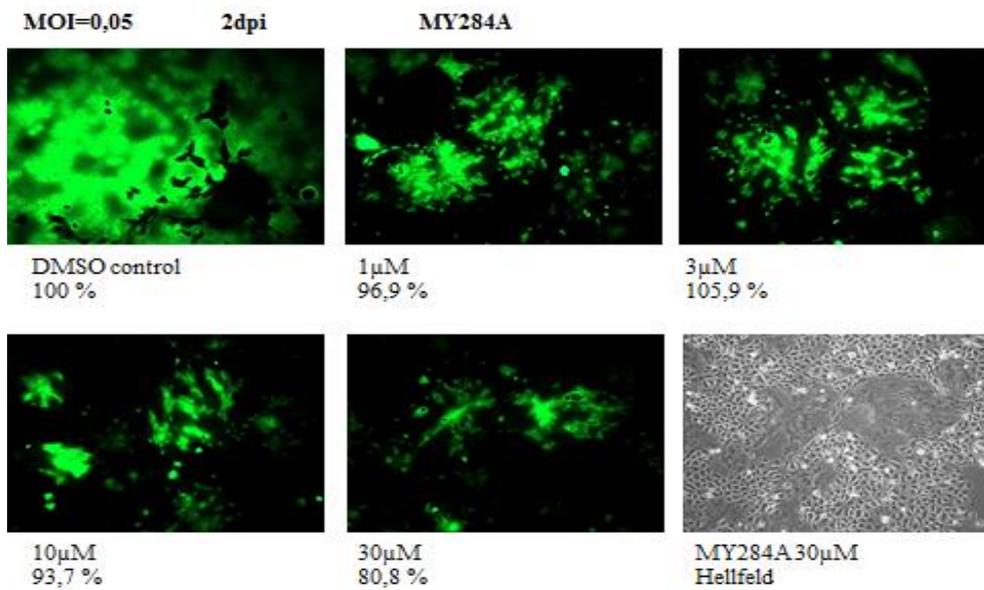
**Abbildung 3.14** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV<sup>1C323</sup>EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von Droseron.

Unter jedem Bild steht die verwendete Konzentration von Droseron und die gemessene Fluoreszenz in % im Verhältnis zur Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde.



**Abbildung 3.15** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV<sup>1C323</sup>EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von Din B.

Unter jedem Bild steht die verwendete Konzentration von Din B und die gemessene Fluoreszenz in % im Verhältnis zur Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde.



**Abbildung 3.16** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MY284.

Unter jedem Bild steht die verwendete Konzentration von MY284A und die gemessene Fluoreszenz in % im Verhältnis zur Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde.

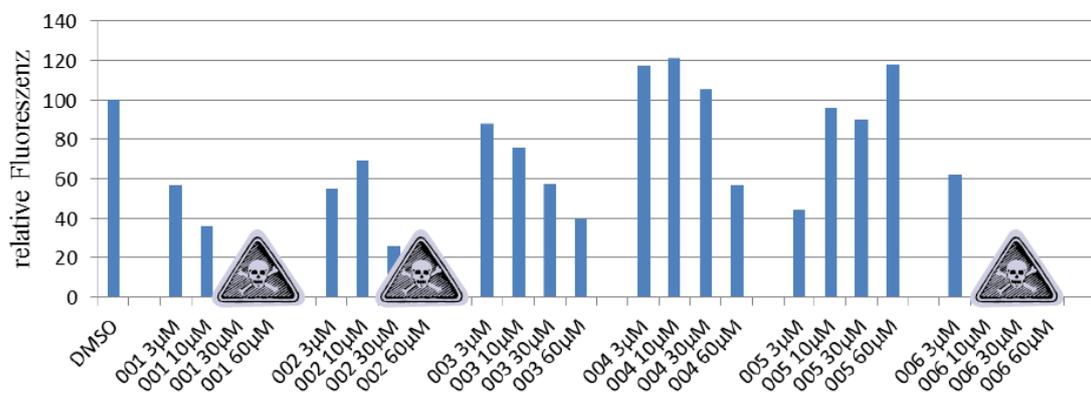
### 3.1.4 WEITERE VERSUCHE MIT DROSERONDERIVATEN

Droseron war in den Vorversuchen eine der vielversprechendsten Substanzen, weshalb auch seine Derivate getestet wurden. Die Droseronderivate sind unter 2.1.6 dargestellt. Es wurde ein Hemmtest angesetzt, bei dem Vero-hSLAM-Zellen mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP unter Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors für 48 h infiziert wurden. Es wurden jeweils die Konzentrationen 3, 10, 30 und 60 μM getestet. Nach 48 h wurden die 6-Well-Platten im Fluoreszenzreader gemessen und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Insgesamt zeigten die meisten der Substanzen eine starke zytotoxische Wirkung, welche im Mikroskop gut zu beurteilen war. Die weniger toxischen Substanzen zeigten nur wenig Fluoreszenzreduktion und wurden daher nicht weiter getestet. Ein MTT-Test wurde von Valentin Vogt durchgeführt und in seiner Doktorarbeit veröffentlicht. Seine Ergebnisse decken sich größtenteils mit den hier gezeigten Daten.

Die Abbildungen 3.17 und 3.18 zeigen den oben beschriebenen Versuch. Die Substanzkonzentrationen die nach 48 h lichtmikroskopisch gut erkennbare Zytotoxizität

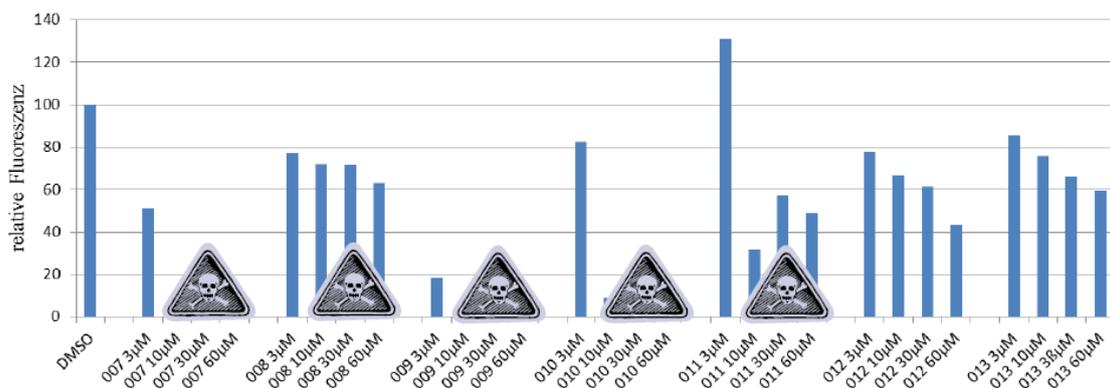
zeigten sind mit diesem Zeichen  gekennzeichnet.

Keine lichtmikroskopisch erkennbare Zytotoxizität haben demnach 003, 004, 005, 012 und 013 (Abb. 3.17). Die beste Fluoreszenzminderung zeigt dabei 003, welches bei 60  $\mu\text{M}$  die Fluoreszenz auf 39,5 % reduziert. Da Droseron im Vergleich zu diesen Ergebnissen als besser wirksam erschien, wurde auf weitere Versuche mit den Droseronderivaten verzichtet.



**Abbildung 3.17 Infektions-Hemmtest mit Droseronderivaten**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Droseronderivate oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)



**Abbildung 3.18 Infektions-Hemmtest mit Droseronderivaten**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Droseronderivate oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)

### 3.1.5 INHIBITIONSVERSUCHE MIT PLUMBAGIN

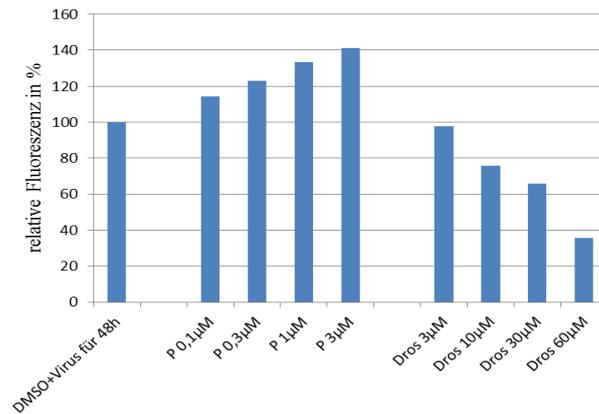
Plumbagin gehört, wie Droseron zur chemischen Substanzklasse der Naphtoquinone. In verschiedenen Publikationen wurde die Substanz als antimikrobiell und fungizid wirksam beschrieben. Da die nahe Substanzklassenverwandtschaft zu Droseron besteht, wurde die Wirkung von Plumbagin auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP ebenfalls getestet.

Hierfür wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Da die Ergebnisse der ersten Versuche nicht besonders vielversprechend aussahen, wurde pro Versuchsansatz nur ein Versuch durchgeführt. Die Ergebnisse können damit nur Hinweise geben und müssten nochmals verifiziert werden. Wie auf den folgenden Abbildungen zu sehen ist, reduziert Plumbagin in den getesteten Konzentrationen kaum die Fluoreszenz. Es scheint daher keine hemmende Wirkung, auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP, gemessen an der EGFP-Fluoreszenz, zu haben. Getestet wurden die für Vero-Zellen nicht toxischen Konzentrationen unter 3 µM. Zu den Versuchen mit Plumbagin wurde parallel Droseron mit den gleichen Versuchsansätzen getestet, die hier erhaltenen Ergebnisse waren mit den Ergebnissen der anderen Vorversuche vergleichbar.

Im Versuchsaufbau A wurden Vero-hSLAM-Zellen gleichzeitig mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,01) und Plumbagin bzw. Droseron in verschiedenen Konzentrationen für 48 h inkubiert und danach die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen.

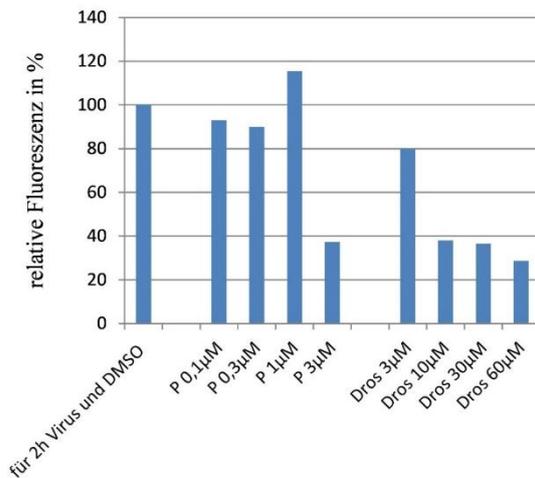
Im Versuchsaufbau B wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,01) und Plumbagin bzw. Droseron in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 2 h wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h im Brutschrank wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen.

Im Versuchsaufbau C wurden die Vero-hSLAM-Zellen zuerst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. Plumbagin wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen.



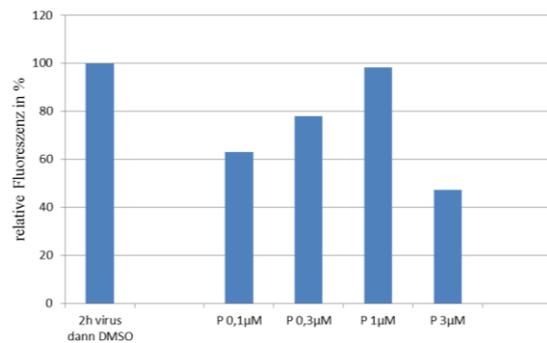
**Abbildung 3.19 Infektions-Hemmtest mit Plumbagin und Droseron Versuchsaufbau A**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart von DMSO (1/1000), Plumbagin (P) oder Droseron (Dros) in den angegebenen Konzentrationen infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)



**Abbildung 3.20 Infektions-Hemmtest mit Plumbagin und Droseron Versuchsaufbau B**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart von DMSO (1/1000), Plumbagin (P) oder Droseron (Dros) in den angegebenen Konzentrationen infiziert und das Virus-Inhibitor-Gemisch nach 2 h durch normales Medium ersetzt. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach weiteren 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)



**Abbildung 3.21 Infektions-Hemmtest mit Plumbagin Versuchsaufbau C**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 infiziert und 2 h inkubiert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und ein Inhibitor-Medium-Gemisch mit Plumbagin (P) in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) auf die Zellen gegeben. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)

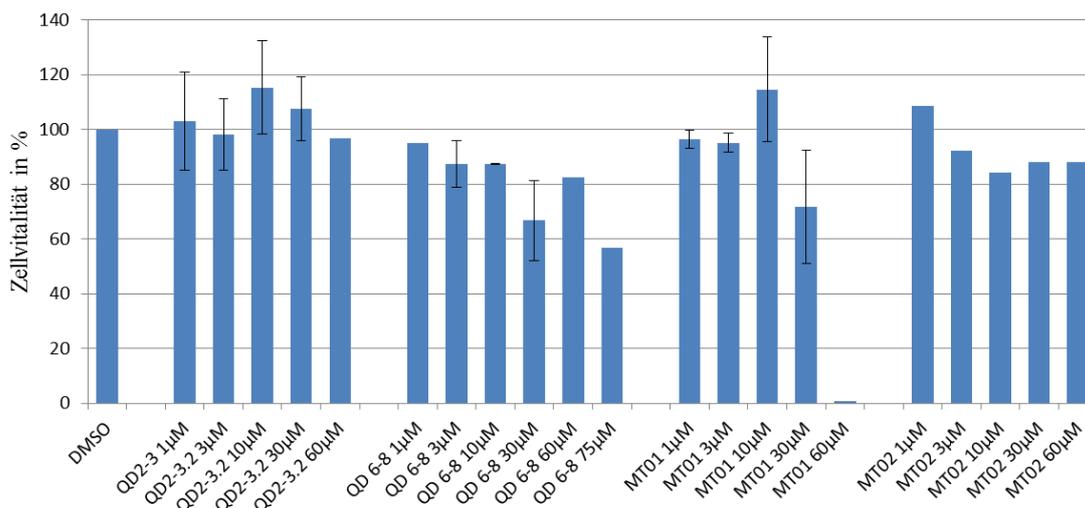
### **3.1.6 INHIBITIONSVERSUCHE MIT SUBSTANZEN AUS DER PHARMAZEUTISCHEN CHEMIE**

Aus der Pharmazeutischen Chemie der Universität Würzburg Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe erhielten wir noch weitere Moleküle. Diese Substanzen wurden zum Teil schon in anderen Arbeiten getestet. Insbesondere QED15A-12 und QED15B-12 (compounds 19, 20) wurden als Inhibitoren der Nipahvirus- und MV-induzierten Zellfusion beschrieben (Niedermeier et al., 2009).

QD2-3	/	QD6-8
QED15A-12	/	QED15B-12
JK41	/	JK80
MT01	/	MT02

Zuerst wurde die Zelltoxizität der Substanzen auf Vero-hSLAM-Zellen mittels MTT-Test quantifiziert. Dafür wurden die Zellen für 60 h mit der jeweiligen Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Zellvitalität wurde dann, wie in 2.2.1.4 beschrieben, bestimmt. Da die Substanzen in den folgenden Hemmtests eine gute inhibitorische Wirkung zeigten, wurden auch höhere Konzentrationen getestet, weshalb auch der MTT-Test für Konzentrationen bis 75  $\mu$ M durchgeführt wurde.

Für die meisten Substanzen wurden mindestens 2 voneinander unabhängige Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 und 3.23 dargestellt.

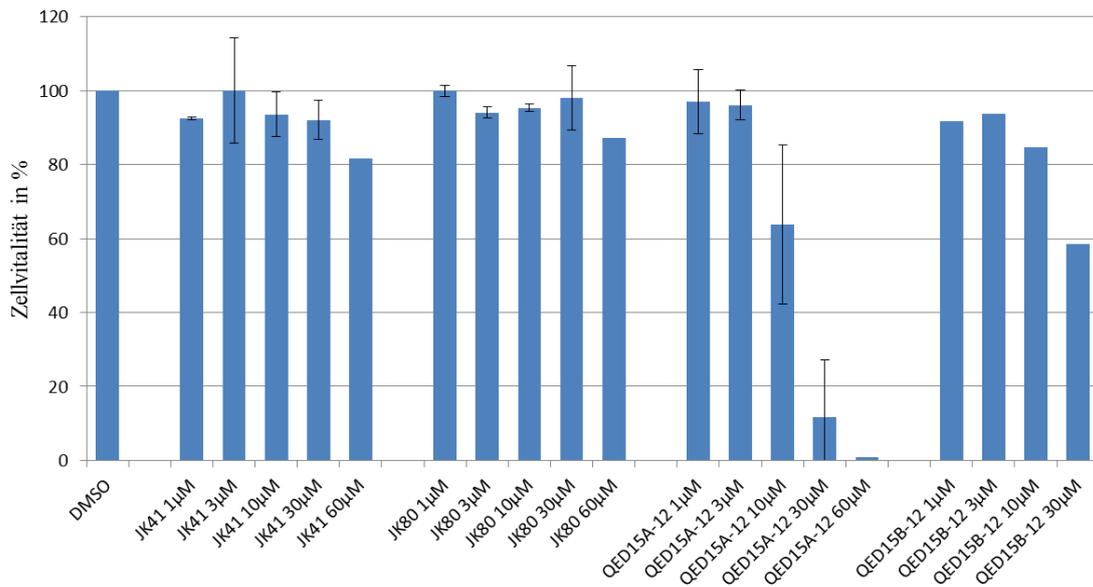


**Abbildung 3.22 MTT-Zytotoxizitätstest der Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test

Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1-3)

Man sieht, dass die acht Substanzen insgesamt wenig zelltoxisch sind. Eine Ausnahme bildet hierbei QED15A-12, welches bei 60 μM alle Zellen abtötet. Bei 30 μM überleben 11,76 % der Vero-Zellen und bei 10 μM 63,8 % der Zellen. Ebenfalls in hohen Konzentrationen zelltoxisch ist MT01, auch hier überlebt 60 μM keine Zelle. Bei 30 μM sind allerdings noch 71,79 % der Zellen am Leben, was für einen  $CC_{50}$ -Wert zwischen 30 und 60 μM spricht. Bei 10 μM ist noch keine zytotoxische Wirkung erkennbar.



**Abbildung 3.23 MTT-Zytotoxizitätstest Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie**

Quantifizierung der Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Test

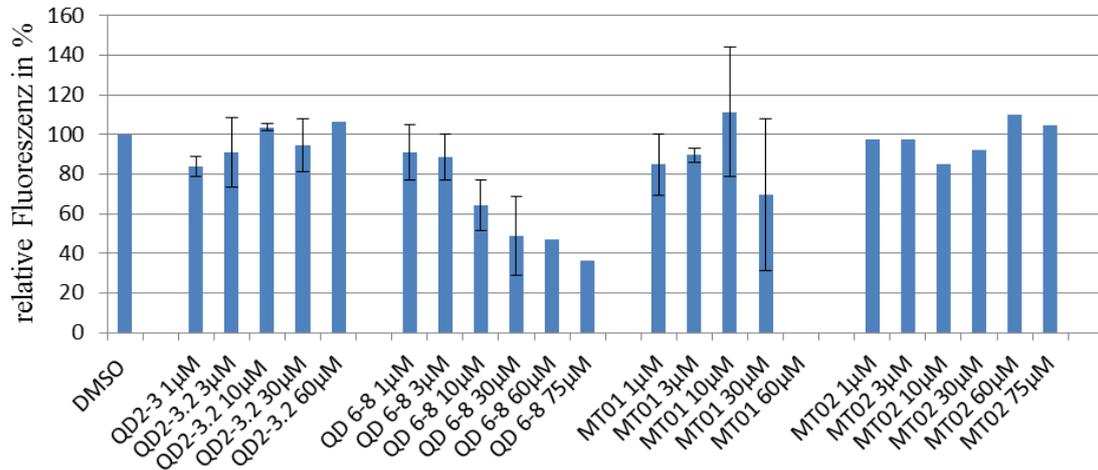
Vero-hSLAM-Zellen wurden für 48 h mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (1/1000) inkubiert. Danach wurde der MTT-Test wie unter 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Extinktionsmessung der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Extinktionsmessung der anderen Ansätze als relative Extinktion dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Extinktionsmessung ist ein direkter Indikator für die Zellvitalität und kann daher mit dieser gleichgesetzt werden. (n = 1-3)

Die für die Zellen am besten verträgliche Substanz ist hier QD2-3, eine Konzentration von 60 µM überleben 96,57 % der Zellen. QD6-8 ist mit 56,9 % überlebenden Zellen bei 75 µM zelltoxischer. Das Ergebnis bei QD6-8 60 µM von 82,6 % überlebenden Zellen hätte man mit einem zweiten MTT-Test verifizieren sollen, da der Gesamtverlauf eher für einen Wert zwischen 66 % und 56 % spricht. Anzunehmen ist bei QD6-8, dass der CC50-Wert über 75 µM liegt.

MT02 wird in allen Konzentrationen bis 60 µM von über 80 % der Zellen überlebt.

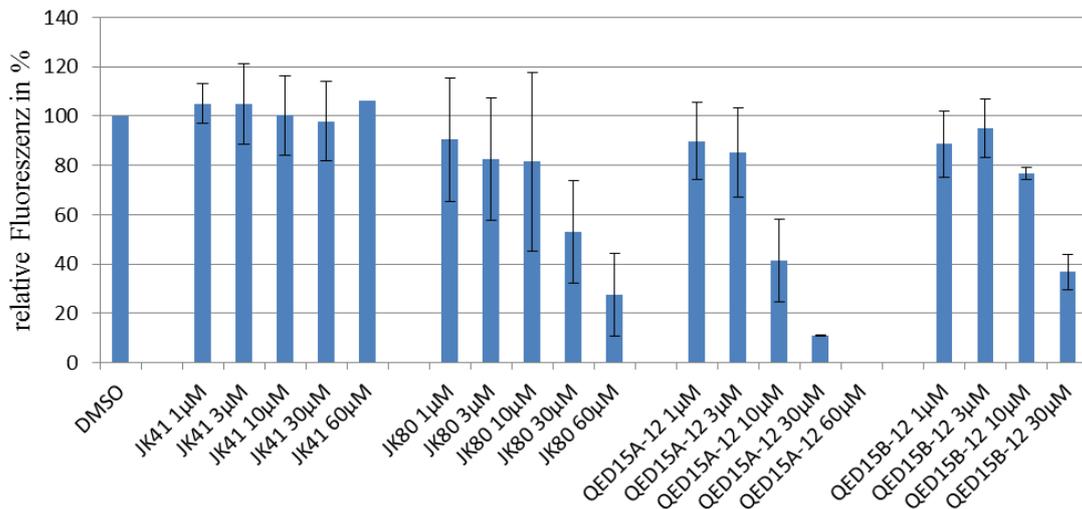
Auch JK41 und JK80 sind mit 81,55 % und 87,09 % Zellvitalität bei 60 µM wenig zelltoxisch, v.a. auch weil bei beiden Substanzen bis zu einer Konzentration von 30 µM über 90 % der Zellen überleben.

Die Ergebnisse der Vortests zur Einschätzung des inhibitorischen Potenzials sind in Abbildung 3.24 und 3.25 dargestellt.



**Abbildung 3.24 Infektions-Hemmtest mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)



**Abbildung 3.25 Infektions-Hemmtest mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)

Es ist zu erkennen, dass JK80 bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  die Fluoreszenz auf 27,5 % reduziert. Da die zelltoxische Wirkung wie oben gezeigt eher gering ist lässt dies auf eine spezifische antivirale Wirkung schliessen. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert gibt die Inhibitor-Konzentration an, mit der die Infektion auf 50 % reduziert werden kann. Bei JK80 lässt sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von ca. 30  $\mu\text{M}$  schätzen, da bei 30  $\mu\text{M}$  noch 52,9 % der Fluoreszenz vorhanden ist.

Ähnlich sieht die Fluoreszenzreduktion bei QED15A-12 aus, hier muss jedoch angenommen werden, dass die Reduktion v.a. bei 30  $\mu\text{M}$  und 60  $\mu\text{M}$  durch die hohe Zytotoxizität zustande kommt und nicht auf eine antivirale Wirkung zurückzuführen ist. Dasselbe gilt für MT01.

Auch bei QED15B-12 ist anzunehmen, dass die Fluoreszenzreduktion auf 36,7 % bei 30  $\mu\text{M}$  teilweise durch die Zytotoxizität zustande kommt, denn bei dieser Konzentration überleben im MTT-Test 58,55 % der Vero-Zellen.

QD6-8 zeigt eine Hemmung auf 48,6 % der Fluoreszenz bei 30  $\mu\text{M}$  und 64,1 % bei 10  $\mu\text{M}$ . Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert kann daher auf ca. 30  $\mu\text{M}$  geschätzt werden. Der  $\text{CC}_{50}$ -Wert liegt, wie oben beschrieben, bei über 75  $\mu\text{M}$ . Der Selektivitätsindex liegt damit bei ca. 2,5. QD6-8 wurde daher in weiteren Versuchen getestet, die unter 3.2.2 beschrieben sind.

Bei JK41, MT02 und QD2-3 zeigt sich keine Fluoreszenzreduktion, in den getesteten Konzentrationen verhindern diese Substanzen also kaum den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von  $\text{rMV}^{\text{IC323}}$ EGFP.

### **3.2 TESTUNG DER IN DEN VORVERSUCHEN BESTEN INHIBITOREN**

Nach Abschluss der Vorversuche wurden die gesammelten Daten miteinander verglichen. Die besten Inhibitoren wurden ausgewählt um mit ihnen weitere Testungen durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die aus den Vorversuchen besten Inhibitoren mit ihrem Selektivitätsindex (SI), sowie  $\text{CC}_{50}$  und  $\text{IC}_{50}$  aufgeführt.

	CC50	IC50	SI
JK80	> 60 $\mu\text{M}$	ca. 30 $\mu\text{M}$	> 2
QD6-8	> 75 $\mu\text{M}$	ca. 30 $\mu\text{M}$	> 2,5
Droseron	> 30 $\mu\text{M}$	ca. 10 $\mu\text{M}$	> 3

**Tabelle 3.1 Beste Inhibitoren aus den Vorversuchen Testsystem: Fluoreszenzreader**

### 3.2.1 JK80

In den Vorversuchen (s. 3.1.6) konnte gezeigt werden, dass JK80 bei geringer Zytotoxizität eine spezifische antivirale Wirkung hat. Der  $\text{CC}_{50}$ -Wert liegt sicher über 60  $\mu\text{M}$ , da bei 60  $\mu\text{M}$  im MTT-Test nach 48 h noch 87 % der Zellen am Leben waren. Bei 30  $\mu\text{M}$  waren über 90 % der Zellen noch vital.

In den Hemmtests konnte JK80 bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  die Fluoreszenz auf 27,5 % reduziert. Es lässt sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert zwischen 30  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  abschätzen, da bei 30  $\mu\text{M}$  noch 52,9 % der Fluoreszenz vorhanden ist.

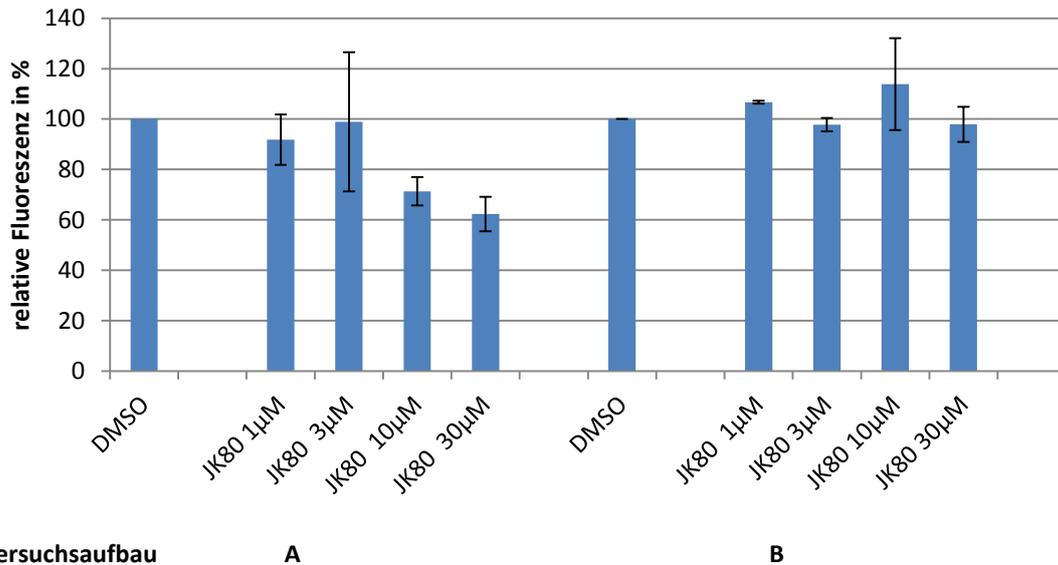
Der Selektivitätsindex SI, also der Quotient aus  $\text{CC}_{50}$ -Wert und  $\text{IC}_{50}$ -Wert, ist damit sicher größer als 2, die Berechnung eines genaueren Wertes ist aufgrund des unklaren  $\text{CC}_{50}$ -Werts nicht möglich.

Um einschätzen zu können, wo im Infektionszyklus von  $\text{rMV}^{\text{IC323}}$ EGFP JK80 eingreift, wurden zwei verschiedene Ansätze getestet.

Im Versuchsaufbau A wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit  $\text{rMV}^{\text{IC323}}$ EGFP (MOI=0,01) und JK80 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 2 h wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h im Brutschrank wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen. Dies misst also (vorwiegend) die potentielle Wirkung des Inhibitors während des Viruseintritts („entry“).

Im Versuchsaufbau B wurden die Vero-hSLAM-Zellen zuerst für 2 h mit  $\text{rMV}^{\text{IC323}}$ EGFP infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. JK80 wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen. Hiermit wird die potentielle Wirkung des Inhibitors auf die intrazelluläre Replikation des Virus gemessen.

Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzmessungen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.26 Infektions-Hemmtest mit JK80**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Ansatz A in Gegenwart von JK80 oder DMSO (1/1000) infiziert, für 2 h inkubiert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. In Ansatz B wurden die Zellen zunächst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP inkubiert. Danach wurde das Virus komplett entfernt und die Zellen wurden für 48 h mit JK80 oder DMSO (1/1000) inkubiert. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=2)

Versuchsaufbau A zeigt eine Fluoreszenzminderung, die weniger stark ist als die der Vorversuche. So ist bei 30 µM noch 62,3 % der Fluoreszenz vorhanden, in den Vorversuchen waren es 52,9 %.

Im Versuchsaufbau B zeigt sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinerlei Fluoreszenzminderung. Bei einer Konzentration von 30 µM JK80 ist noch 97,9 % der Fluoreszenz vorhanden. Dies spricht dafür, dass JK80 nach dem Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen, keinen Einfluss mehr auf das Fortschreiten der Infektion hat. Insgesamt spricht dieses Versuchsergebnis dafür, dass JK80 den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen verhindert.

### 3.2.2 QD6-8

In den Vorversuchen (s. 3.1.6) konnte gezeigt werden, dass QD6-8 bei geringer Zytotoxizität eine spezifische antivirale Wirkung hat. Der  $CC_{50}$ -Wert liegt über  $75 \mu\text{M}$ , da im MTT-Test bei  $75 \mu\text{M}$  nach 48 h noch 56,9 % der Zellen am Leben waren.

In den Hemmtests zeigte QD6-8 bei  $30 \mu\text{M}$  eine Reduktion der Fluoreszenz auf 48,6 % und bei  $10 \mu\text{M}$  auf 64,1 %. Der  $IC_{50}$ -Wert liegt daher bei ca.  $30 \mu\text{M}$ .

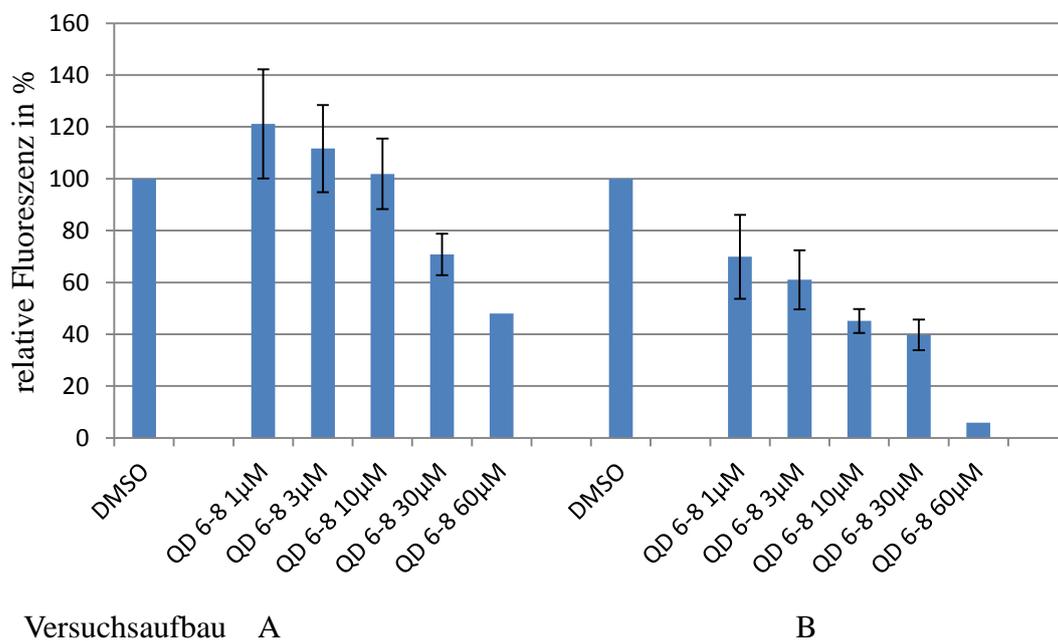
Der Selektivitätsindex SI, also der Quotient aus  $CC_{50}$ -Wert und  $IC_{50}$ -Wert ist damit sicher größer als 2,5. Die Berechnung eines genaueren Wertes ist aufgrund des unklaren  $CC_{50}$ -Wertes nicht möglich.

Um einschätzen zu können, wo im Infektionszyklus von  $rMV^{IC323}EGFP$  QD6-8 eingreift, wurden zwei verschiedene Ansätze getestet.

Im Versuchsaufbau A wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit  $rMV^{IC323}EGFP$  ( $MOI=0,01$ ) und QD 6-8 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 2 h wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h im Brutschrank wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen. Dies misst (vorwiegend) die potentielle Wirkung des Inhibitors während des Viruseintritts („entry“) in die Zelle.

Im Versuchsaufbau B wurden die Vero-hSLAM-Zellen zuerst für 2 h mit  $rMV^{IC323}EGFP$  infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. QD6-8 wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen. Hiermit wird die potentielle Wirkung des Inhibitors auf die intrazelluläre Replikation des Virus gemessen.

Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzmessungen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.27 Infektions-Hemmtest mit QD6-8**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Ansatz A in Gegenwart von QD6-8 oder DMSO (15/1000) infiziert, für 2 h inkubiert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. In Ansatz B wurden die Zellen zunächst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP inkubiert. Danach wurde das Virus komplett entfernt und die Zellen für 48 h mit QD6-8 oder DMSO (15/1000) inkubiert. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)

Im Versuchsaufbau A ist die Fluoreszenzreduktion deutlich geringer als in den Vorversuchen. So zeigt sich bei QD6-8 zwischen 1 und 10 µM im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinerlei Fluoreszenzminderung. Was dafür spricht, dass QD6-8 den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen wenig beeinflusst

Versuchsaufbau B zeigt dagegen den bereits bekannten Kurvenverlauf der Infektionshemmung. Bei 30 µM sind noch 39,8 % der Fluoreszenz vorhanden, bei 10 µM 45,1 %. Dies spricht dafür, dass QD6-8 nach dem Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen in den Replikationszyklus eingreift und das weitere Fortschreiten der Infektion verhindert.

### 3.2.3 DROSERON

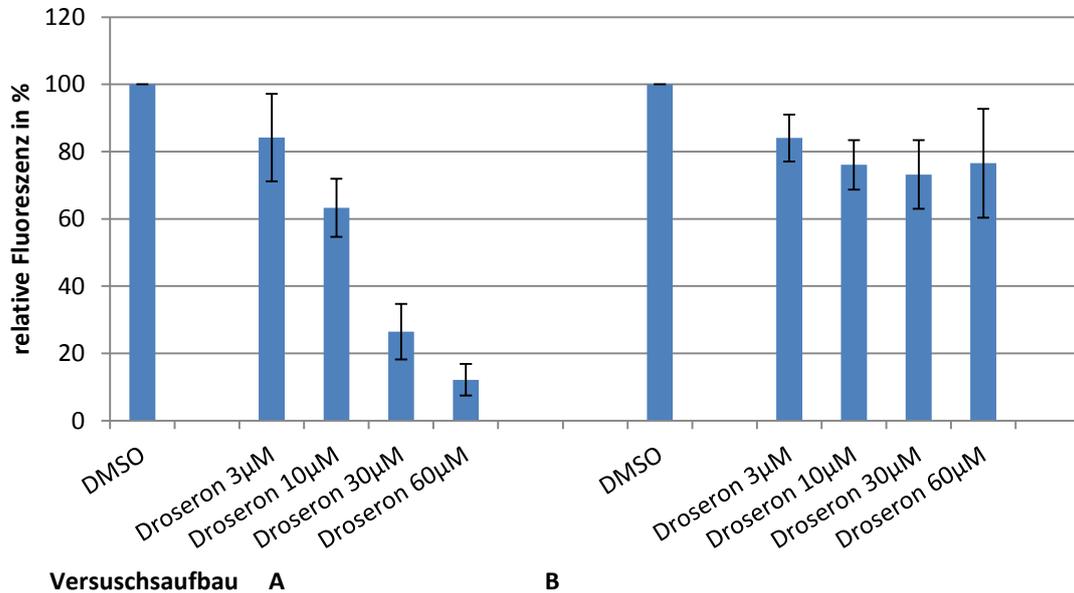
Droseron überzeugte in den Vorversuchen durch seine gute inhibitorische Wirkung bei verhältnismäßig geringer Zytotoxizität. Im MTT-Test überlebten bei 10  $\mu\text{M}$  92,5 % der Zellen. Bei Droseron 30  $\mu\text{M}$  waren noch 57,8 % der Zellen am Leben. Daher liegt der  $\text{CC}_{50}$ -Wert sicher über 30  $\mu\text{M}$ . Die Inhibitionsversuche zeigten bei Droseron 10  $\mu\text{M}$  eine Fluoreszenzreduktion auf 55,8 % und bei 30  $\mu\text{M}$  auf 25,4 %. Daraus geht hervor, dass der  $\text{IC}_{50}$ -Wert über 10  $\mu\text{M}$  liegt. Der Selektivitätsindex SI, der sich aus den Fluoreszenzreaderdaten ergibt, also der Quotient aus  $\text{CC}_{50}$ -Wert und  $\text{IC}_{50}$ -Wert ist damit sicher grösser als 3. Um einschätzen zu können, wo im Infektionszyklus von  $\text{rMV}^{\text{IC}323}\text{EGFP}$  Droseron eingreift, wurden verschiedene Ansätze getestet.

Im Versuchsaufbau A wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit  $\text{rMV}^{\text{IC}323}\text{EGFP}$  ( $\text{MOI}=0,01$ ) und Droseron in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 2 h wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt. Nach weiteren 48 h im Brutschrank wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen. Dies misst (vorwiegend) die potentielle Wirkung des Inhibitors während des Viruseintritts („entry“).

Im Versuchsaufbau B wurden die Vero-hSLAM-Zellen zuerst für 2 h mit  $\text{rMV}^{\text{IC}323}\text{EGFP}$  infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. Droseron wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen. Hiermit wird die potentielle Wirkung des Inhibitors auf die intrazelluläre Replikation des Virus gemessen.

Dieser Versuch mit Aufbau A und B wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Versuch wurden pro Inhibitor Konzentration 3 Näpfe angesetzt.

Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 3.28 dargestellt.



**Abbildung 3.28 Infektions-Hemmtest mit Droseron**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Ansatz A in Gegenwart von Droseron oder DMSO (1/1000) infiziert, für 2 h inkubiert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. In Ansatz B wurden die Zellen zunächst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP inkubiert. Danach wurde das Virus komplett entfernt und die Zellen wurden für 48 h mit Droseron oder DMSO (1/1000) inkubiert. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=3)

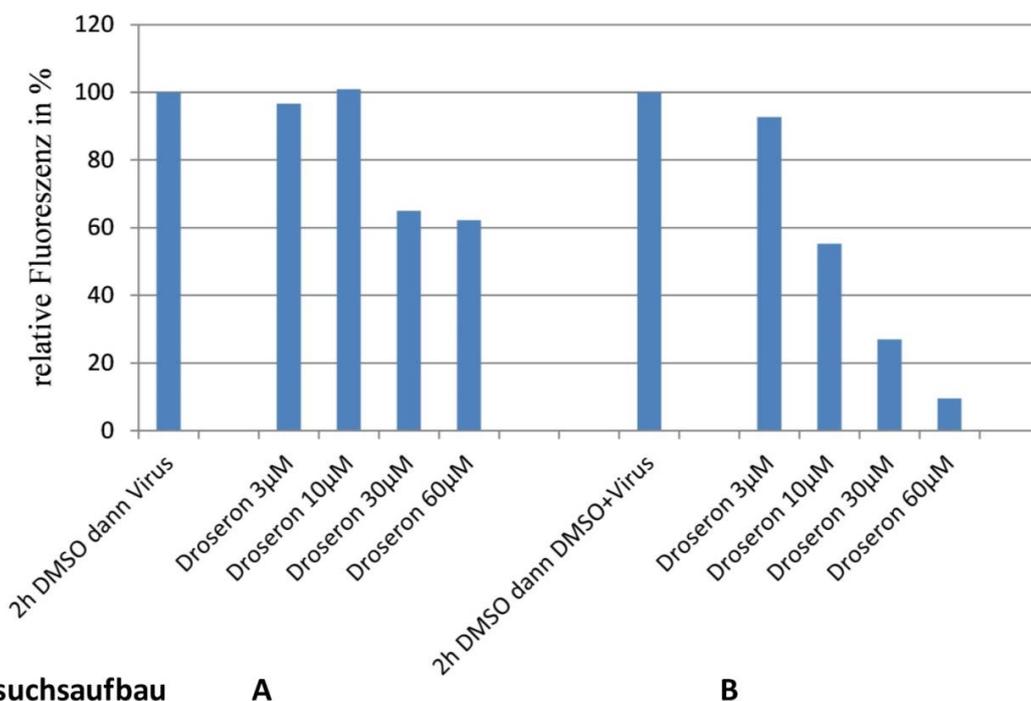
Versuchsaufbau A zeigt eine deutliche Fluoreszenzminderung, die vergleichbar mit der der Vorversuche ist. Zusätzlich zu diesen wurde noch 60 µM getestet. Bei 30 µM ist noch 26,4 % der Fluoreszenz vorhanden, bei 60 µM 12,1 %.

Im Versuchsaufbau B zeigt sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kaum eine Fluoreszenzminderung. Bei einer Konzentration von 30 µM Droseron ist noch 73,2 % der Fluoreszenz vorhanden, Droseron 60 µM reduziert die Fluoreszenz auf 76,5 %. Dies spricht dafür, dass Droseron nach dem Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen, kaum mehr Einfluss auf das Fortschreiten der Infektion hat.

Insgesamt spricht dieses Versuchsergebnis dafür, dass Droseron den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen verhindert.

Da es in den oben gezeigten Versuchen so aussieht, als ob Droseron den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zelle hemmt, wurden noch Versuche angesetzt, um die Interaktion zwischen Droseron und den Zellen zu testen. Hierfür wurden die VerohSLAM Zellen zuerst für 1 bzw. 2 h mit Droseron in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde entweder das Virus dazugegeben oder das Droseron komplett entfernt und dann Virus auf die Zellen gegeben. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsansätze.

In beiden Versuchen ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzreduktion bei dauerhafter Anwesenheit von Droseron grösser ist als nach nur 1 bzw. 2 h Inkubation mit Droseron. Da diese Versuche nur je einmal durchgeführt wurden, sollte das Ergebnis nochmals verifiziert werden und kann hier lediglich als Hinweis benutzt werden.



**Abbildung 3.29 Infektions-Hemmtest mit Droseron**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit Droseron oder DMSO (1/1000) für 2 h inkubiert. In Ansatz A wurde die Substanz nach 2 h vollständig entfernt und rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 auf die Zellen gegeben. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. In Ansatz B wurde nach 2 h rMV<sup>IC323</sup>EGFP dazugegeben und die Zellen 48 h mit Droseron oder DMSO (1/1000) und rMV<sup>IC323</sup>EGFP inkubiert. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)

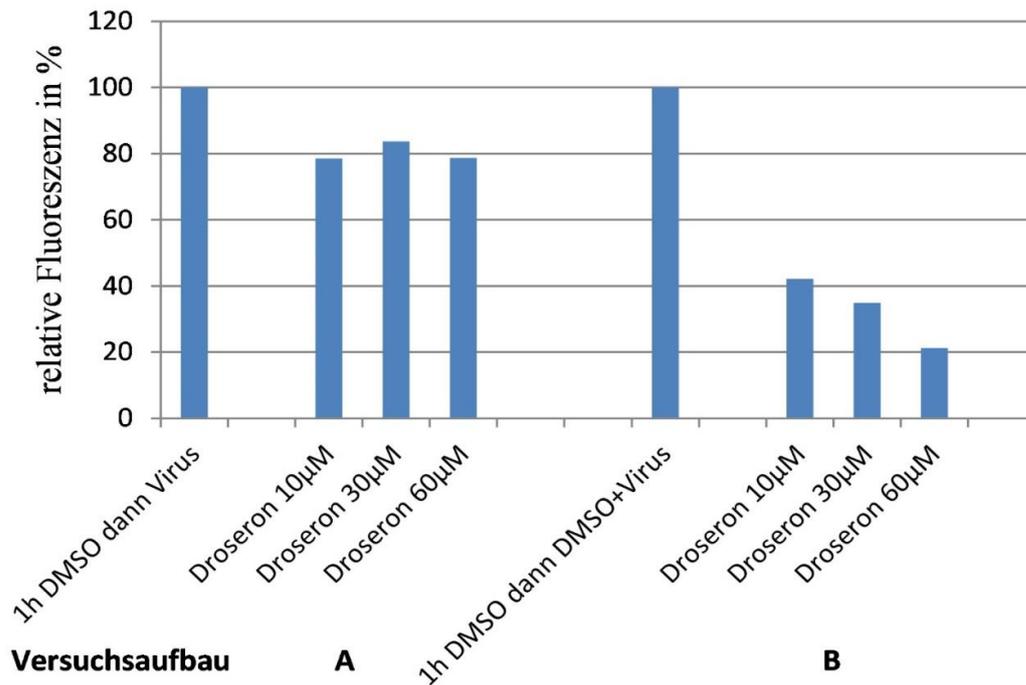
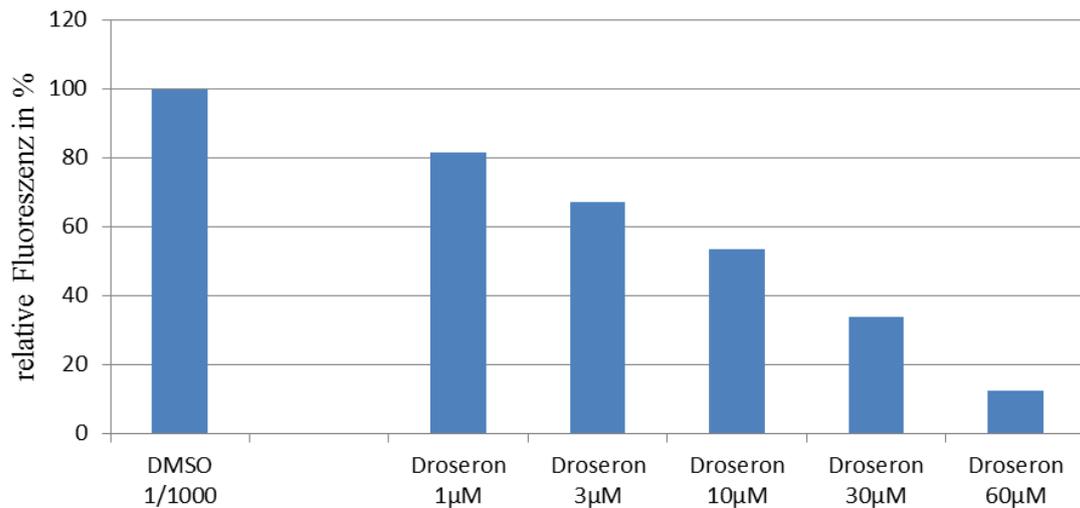


Abbildung 3.30 Infektions-Hemmtest mit Droseron

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit Droseron oder DMSO (1/1000) für 1 h inkubiert. In Ansatz A wurde die Substanz nach 1 h vollständig entfernt und rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 auf die Zellen gegeben. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. In Ansatz B wurde nach 1 h rMV<sup>IC323</sup>EGFP dazugegeben und die Zellen 48 h mit Droseron oder DMSO (1/1000) und rMV<sup>IC323</sup>EGFP inkubiert. Die EGFP-Fluoreszenz wurde nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=1)

### Titration

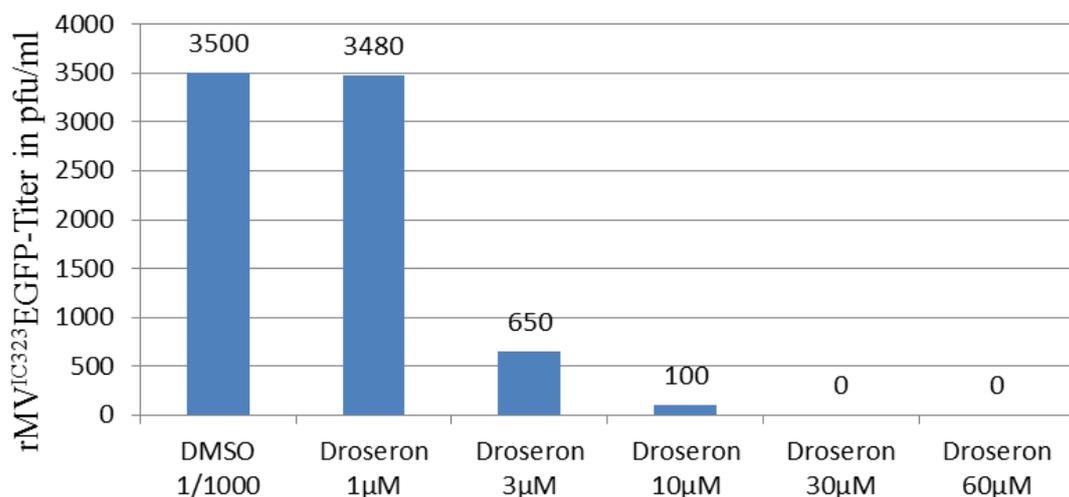
Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung auf einem zweiten Weg zu bestätigen und die inhibitorische Wirkung von Droseron zu quantifizieren, wurde eine Titration durchgeführt. Zuerst wurden an zwei Tagen zwei voneinander unabhängige Inhibitionsversuche angesetzt und durchgeführt. Hierfür wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Vero-hSLAM Zellen pro Napf in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden dann für 48 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI= 0.01) und Droseron in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 48 h wurden die Platten im Fluoreszenzreader gemessen und danach bei -80 C eingefroren. Das weitere Vorgehen der Titration ist unter 2.2.2.2 beschrieben. Die Ergebnisse der beiden Fluoreszenzmessungen sind in der nächsten Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.31 Infektions-Hemmtest mit Droseron**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart von Droseron oder DMSO (1/1000) infiziert und die EGFP-Fluoreszenz nach 48 h im Fluoreszenzreader gemessen. Die Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normalisiert und die Fluoreszenzen der anderen Ansätze als relative Fluoreszenz dazu ins Verhältnis gesetzt. (n=2)

Mittels Titration konnte der Virustiter in den einzelnen Proben bestimmt werden, die Werte sind in Abbildung 3.32 dargestellt.



**Abbildung 3.32 Titration von rMV<sup>IC323</sup>EGFP mittels Plaquetest**

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP mit einer MOI von 0,01 in Gegenwart von Droseron oder DMSO (1/1000) infiziert und die Platten nach 48 h bei -80 C eingefroren. Zur Titerbestimmung von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in den einzelnen Well wurde der Inhalt wie unter 2.2.2.2 beschrieben titriert. Dargestellt ist der somit ermittelte Titer in pfu/ml. (n=2)

In den Titrationen zeigt sich, dass die Anzahl infektiöser MV geringer ist, als es die Fluoreszenzreadermessung annehmen lässt.

Die Titration zeigen bei Droseron 3  $\mu\text{M}$  eine Titerreduktion auf 18,6 % des Titors in der DMSO-Kontrolle. Daher liegt hier der  $\text{IC}_{50}$ -Wert zw. 1-3  $\mu\text{M}$ . Der  $\text{CC}_{50}$ -Wert liegt nach MTT-Test bei über 30  $\mu\text{M}$ .

Der Selektivitätsindex SI, also der Quotient aus  $\text{CC}_{50}$ -Wert und  $\text{IC}_{50}$ -Wert, ist damit in der Titration grösser als 15.

## **4 DISKUSSION**

Die Infektion mit dem Masernvirus gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen bei Kindern unter 5 Jahren. Zwar ist ein effektiver Lebendimpfstoff verfügbar, aber in Ländern mit niedrigem Einkommen und schlechter Infrastruktur gestaltet sich die flächendeckende Impfung schwierig. In Deutschland dagegen führen eine zunehmende Impfmüdigkeit und die impfkritische Haltung vieler Eltern immer wieder zu lokalen Ausbrüchen der Erkrankung.

Hat sich die Erkrankung klinisch manifestiert, gibt es keine kausalen Therapiemöglichkeiten und es kann nur noch symptomatisch behandelt werden. Dies ist v.a. auch in Hinblick auf die Komplikationen (s.1.5) der Maserninfektion von Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, potentielle Hemmstoffe der Maserninfektion auf ihre Wirkung zu testen.

### **4.1 POTENTIELLE INHIBITONSMECHANISMEN DER MASERNINFEKTION**

Allgemein gibt es im Infektions- und Replikationszyklus des Masernvirus verschiedene Schritte, die potentiell medikamentös gehemmt werden könnten.

#### **4.1.1 EINTRITT DES VIRUS IN DIE ZELLE**

Bevor das Virus in die Zelle gelangt kann die Fusion von Virushülle und Zellmembran gehemmt werden. Beim MV geschieht der Eintritt in die Zelle in mindestens zwei Schritten. Zuerst bindet das Transmembranprotein H an seinen zellulären Rezeptor CD150 oder nectin-4 (Yanagi et al, 2006; Tatsuo et al, 2000; Mühlebach et al, 2011). Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung im H- und im assoziierten F-Protein. Aus der Prä-Fusions-Konformation wird die Fusionskonformation und das fusogene Peptid kann in die Zellmembran eingelagert werden. Die potentiellen Inhibitoren können an verschiedenen Stellen eingreifen. Eine Möglichkeit ist, dass die Substanz die Bindungsstelle blockiert, eine andere, dass die Substanz das F-Protein stabilisiert und somit eine Konformationsänderung des Proteins und die dadurch ausgelöste Membranfusion verhindert (Singethan, K. et al, 2010). Außerdem kann eine

Substanz auch an der Zellmembran ansetzen und dort die Konformationsänderung blockieren (Richardson et al, 1983).

Substanzen, die den Replikationszyklus in diesem frühen Stadium inhibieren, vermindern im Falle von rMV<sup>IC323</sup>EGFP somit die Neusynthese von EGFP und sollten eine Fluoreszenzminderung zeigen. Unterschiede der Fluoreszenzintensität sollten sich in den verwendeten Versuchsanordnungen zeigen. Die Substanz reduziert die Fluoreszenz am effektivsten, wenn sie gleichzeitig mit oder vor dem MV auf die Zellen gegeben wird. Inkubiert man die Zellen zuerst mit dem MV und gibt den Inhibitor erst nach 2 h dazu, hat das Virus die Zellen schon infiziert und die Substanz führt kaum mehr zu einer Fluoreszenzreduktion. Sehr wahrscheinlich ist jedoch, dass sie dann immer noch die Synzytienbildung einschränkt und somit die Ausbreitung des Virus verhindern kann.

#### **4.1.2 REPLIKATION DES VIRUS**

Viren mit ss(-)RNA-Genom, wie das MV, bringen ihre eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase mit in die Wirtszelle, die das virale Genom in mRNA umschreiben kann. Diese RNA-Polymerase ist virusspezifisch, so dass ihre Hemmung der Wirtszelle nicht schadet. Ideal wäre es somit einen Wirkstoff zu finden, der selektiv an die virale RNA-Polymerase L bindet und diese inhibiert. In der Realität interagieren jedoch die meisten potentiellen Hemmstoffe auch oder ausschließlich mit ähnlichen, zelleigenen Molekülen, so dass die virale Replikation zwar indirekt vermindert wird, aber auch die körpereigene Zelle darunter leidet.

Im Jahr 2012 publizierte Ndungu et al einen nicht-nukleosidanologen Hemmstoff der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des MV. Im Tiermodell wurde dieser Hemmstoff an Frettchen, die mit dem, dem MV nah verwandten canine distemper virus (CDV) infiziert wurden, getestet. Es zeigte sich eine deutliche bis komplette Hemmung der Infektion (Krumm et al, 2014).

Substanzen, die den Replikationszyklus in diesem Stadium inhibieren, vermindern im Falle von rMV<sup>IC323</sup>EGFP ebenfalls die Herstellung von EGFP und sollten eine Fluoreszenzminderung zeigen. Unterschiede der Fluoreszenzintensität zeigen sich in den verschiedenen Versuchsanordnungen. Die Substanz reduziert die Fluoreszenz am effektivsten, wenn sie gleichzeitig mit oder vor dem MV auf die Zellen gegeben und

nicht wieder entfernt wird. Inkubiert man die Zellen gleichzeitig mit der Substanz und dem MV und wechselt nach 2 h das Medium, konnte das Virus die Zellen ungehindert infizieren und die Substanz ist nicht lange genug vorhanden, um die intrazelluläre Replikation des MV zu inhibieren. Somit führt dieser Versuchsaufbau nicht zur gewünschten Fluoreszenzreduktion.

#### **4.1.3 MORPHOGESE UND FREISETZUNG NEUER VIREN**

Diese Vorgänge wurden für das Masernvirus mechanistisch weitgehend noch nicht untersucht, da sie experimentell schwer zugänglich sind. Man weiß noch nicht genau wie der intrazelluläre Zusammenbau neuer Viren aus den synthetisierten Bausteinen koordiniert wird und wie die fertigen Viren dann aus der Wirtszelle freigesetzt werden. Wirkstoffe die hier ihre Hemmung entfalten würden, könnten im Falle von rMV<sup>IC323</sup>EGFP nicht mit Hilfe der Fluoreszenzmessung erfasst werden, da die Replikation des viralen Genoms (inklusive EGFP-Expression) in Gegenwart eines solchen Inhibitors normal funktionieren würde und nur die Virusfreisetzung gehemmt wäre. Es kommt danach nicht zur Bildung von kompletten Viren, was z.B. mithilfe einer Virustitration gemessen werden kann, mit der die Zahl infektiöser Viruspartikel bestimmt wird.

#### **4.2 INHIBITIONSTESTS MIT CA-SUBSTANZEN**

Die CA- Substanzen, CA194 und CA262 (benannt nach Christian Albert, Arbeitsgruppe Prof. G. Bringmann) hatten im Vorfeld schon eine antivirale Wirkung gegen MV-EdtagCAMHeGFP auf Vero-Zellen gezeigt (s. Diplomarbeit von Johannes Weirather). Daher lag der Schwerpunkt der Tests zunächst auf dieser Substanzgruppe. Die ersten Versuche ergaben von den bereits erhobenen Daten abweichende Ergebnisse. Bei Konzentrationen von CA194 und CA262 höher als 3 µM war lichtmikroskopisch ein deutlich zelltoxischer Effekt der Substanzen zu erkennen, welcher auch mittels MTT-Test verifiziert werden konnte. Zunächst wurde angenommen, dass diese vorher nicht wahrgenommene toxische Wirkung auf einer Strukturänderung, der lange im Kühlschrank aufbewahrten Substanzen liegen könnte. Es wurden daher Proben zur Strukturanalyse an das Institut für organische Chemie zurückgesandt und im Gegenzug

frisch synthetisierte Substanzen erhalten. Aber auch bei dem neu erhaltenen CA194 und CA262 bestand ein hoher zelltoxischer Effekt ab 3  $\mu\text{M}$ , so dass die Versuche mit diesen Substanzen eingestellt wurden. Die Strukturanalyse der alten Substanzen ergab zudem keine Veränderung der primären Struktur. Es wurden noch verschiedene Derivate der CA-Substanzgruppe getestet unter denen sich eine Reihe zelltoxischer Substanzen befanden. Die übrigen Derivate zeigten keine oder nur eine geringe antivirale Wirkung auf rMV<sup>IC323</sup>EGFP, gemessen an der EGFP-Fluoreszenz, so dass keine weiteren Testungen durchgeführt wurden.

### **4.3 INHIBITIONSVERSUCHE MIT ANDEREN NATURSTOFFEN**

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bringmann stellte uns noch andere Naturstoffe mit potentieller antiviraler Wirkung zur Verfügung: Din B, MK01, MK02, MK03, MY352, MY284A und Droseron. Zunächst wurde mittels MTT-Test und einem einfachen Inhibitionsversuch eine Auswahl getroffen, welche der Substanzen die beste Wirkung zeigte und weiter getestet werden sollte. Es wurde ein Hemmtest angesetzt, bei dem Vero-hSLAM-Zellen mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP unter Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors für 48 h infiziert wurden. Es wurden jeweils die Konzentrationen 1, 3, 10 und 30  $\mu\text{M}$  getestet. Nach 48 h wurden die 6-Well-Platten im Fluoreszenzreader gemessen und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

MK01 wurde wegen seiner hohen, im MTT-Test ermittelten Zytotoxizität nicht weiter untersucht. MK02, MK03, MY352 und MY284A waren zwar im MTT-Test weniger oder kaum zytotoxisch, zeigten aber in den Inhibitionsversuchen über 48 h wenig Fluoreszenzreduktion und wurden aus diesem Grund nicht weiter getestet.

Din B und Droseron waren im MTT-Test zwar erkennbar zytotoxisch, aber noch in einem akzeptablen Ausmaß. Beide Substanzen zeigten im Vergleich zu den anderen Naturstoffen eine signifikante Fluoreszenzreduktion nach Infektion der Zellen mit dem rekombinanten MV. Obwohl der  $\text{CC}_{50}$  bei Din B etwa bei 40  $\mu\text{M}$  geschätzt werden konnte, zeigte die Substanz in weiteren Versuchen eine neu aufgetretene, starke Zytotoxizität bei 30  $\mu\text{M}$ , welche lichtmikroskopisch festgestellt wurde. Warum die Substanz diese Zytotoxizität entfaltet blieb unklar, es wurden aber aufgrund dieser keine weiteren Tests mit Din B durchgeführt.

Die Inhibitionsversuche zeigten bei 10  $\mu\text{M}$  Droseron eine Fluoreszenzreduktion auf 55,8 % und bei 30  $\mu\text{M}$  auf 25,4 %. Daraus geht hervor, dass der  $\text{IC}_{50}$ -Wert über 10  $\mu\text{M}$  liegt. Im MTT-Test überlebten bei 10  $\mu\text{M}$  92,5 % der Zellen. Bei 30  $\mu\text{M}$  Droseron waren noch 57,8 % der Zellen am Leben. Daher liegt der  $\text{CC}_{50}$ -Wert sicher über 30  $\mu\text{M}$ . Der Selektivitätsindex SI, der sich aus den Fluoreszenzreaderdaten ergibt, also der Quotient aus  $\text{CC}_{50}$ -Wert und  $\text{IC}_{50}$ -Wert ist damit sicher grösser als 3.

#### **4.4 WEITERE VERSUCHE MIT DROSERONDERIVATEN**

Droseron war in den Vorversuchen eine der vielversprechendsten Substanzen, weshalb in der organischen Chemie der Universität Würzburg Derivate synthetisiert und hier getestet wurden. Die getesteten Droseronderivate sind unter 2.6. dargestellt.

Es wurde ein Hemmtest angesetzt, bei dem Vero-hSLAM-Zellen mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP unter Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors für 48 h infiziert wurden. Es wurden jeweils die Konzentrationen 3, 10, 30 und 60  $\mu\text{M}$  getestet. Nach 48 h wurden die 6-Well-Platten im Fluoreszenzreader gemessen und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Insgesamt zeigten die meisten der Substanzen eine starke zytotoxische Wirkung, welche im Mikroskop gut zu beurteilen war. Die weniger toxischen Substanzen zeigten nur wenig Fluoreszenzreduktion im Hemmtest und wurden daher nicht weiter getestet. Ein MTT-Test wurde von Valentin Vogt durchgeführt und in seiner Doktorarbeit veröffentlicht. Seine Ergebnisse decken sich größtenteils mit den hier gezeigten Daten.

Da Droseron im Vergleich zu diesen Ergebnissen als besser wirksam erschien, wurde auf weitere Versuche mit den Droseronderivaten verzichtet.

#### **4.5 INHIBITIONSVERSUCHE MIT PLUMBAGIN**

Plumbagin und Droseron gehören beide zur chemischen Substanzklasse der Naphtoquinone. In verschiedenen Publikationen wurde die Substanz als anti-inflammatorisch, antimikrobiell, fungizid und antihelminthisch (Cesari et al, 2013; Lorsuwannarat et al, 2013; Padhye et al, 2012) wirksam beschrieben. Ausserdem zeigt es eine Hemmung des Wachstums und der Metastasierung von verschiedenen Tumoren (Hafeez et al, 2012; Lee et al, 2012). Da die nahe Substanzklassenverwandtschaft zu

Droseron besteht, wurde die Wirkung von Plumbagin auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP ebenfalls in verschiedene Versuchsansätze getestet. Da die Ergebnisse der ersten Versuche nicht besonders vielversprechend aussahen, wurde pro Versuchsansatz nur ein Versuch durchgeführt. Die Ergebnisse können damit nur Hinweise geben und müssten nochmals verifiziert werden. Plumbagin vermochte in den getesteten Konzentrationen kaum die Fluoreszenz zu vermindern. Es scheint daher keine hemmende Wirkung auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation von rMV<sup>IC323</sup>EGFP, gemessen an der EGFP-Fluoreszenz, zu haben. Getestet wurden die für Vero-Zellen nicht toxischen Konzentrationen unter 3 µM. Zu den Versuchen mit Plumbagin wurde parallel Droseron mit den gleichen Versuchsansätzen getestet, die hier erhaltenen Ergebnisse waren mit den Ergebnissen der anderen Vorversuche vergleichbar, was für die Aussagekraft der Versuche spricht.

#### **4.6 INHIBITIONSVERSUCHE MIT SUBSTANZEN AUS DER PHARMAZEUTISCHEN CHEMIE**

Aus der Pharmazeutischen Chemie der Universität Würzburg Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe erhielten wir noch weitere Moleküle. Diese Substanzen (QD2-3, QD6-8, QED15A-12, QED15B-12, MT01, MT02, JK41 und JK80) wurden zum Teil schon in anderen Arbeiten getestet. Insbesondere QED15A-12 und QED15B-12 (compounds 19, 20) wurden bereits als Inhibitoren der Nipahvirus- und MV-induzierten Zellfusion beschrieben (Niedermeier et al., 2009).

Zuerst wurde die Zelltoxizität der Substanzen auf Vero-hSLAM-Zellen mittels MTT-Test quantifiziert. Insgesamt waren die Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie, bis auf zwei Ausnahmen nur wenig zytotoxisch. Eine starke Zytotoxizität zeigten QED15A-12 und MT01, weshalb sie nicht weiter untersucht wurden. Bei allen anderen Substanzen lag der CC<sub>50</sub>-Wert bei über 60µM.

In den Vortests zur Einschätzung des inhibitorischen Potenzials waren JK80 und QD6-8 die potentesten Substanzen. Für JK80 wurde der IC<sub>50</sub>-Wert auf ca. 30 µM geschätzt. Der CC<sub>50</sub>-Wert konnte nicht berechnet werden da nur bis 60 µM getestet wurden und bei 60 µM 87 % der Zellen überlebten. Der Selektivitätsindex SI ist damit sicher größer als 2.

Für QD6-8 konnte der IC<sub>50</sub>-Wert auf ca. 30 µM geschätzt werden. Der CC<sub>50</sub>-Wert von QD6-8 liegt bei über 75 µM. Der Selektivitätsindex liegt damit sicher bei über 2,5. QD6-8 und JK80 wurden daher in weiteren Versuchen getestet, die unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben sind. JK41, MT02, QED15B-12 und QD2-3 zeigten, gemessen an der EGFP-Fluoreszenzreduktion, keine bzw. nur eine geringe inhibitorische Wirkung und wurden daher nicht weiter getestet.

#### 4.7 WEITERE TESTUNG DER IN DEN VORVERSUCHEN BESTEN INHIBITOREN

Eine Vielzahl von Substanzen wurde auf ihren antiviralen Wirkeffekt gescreent. Die drei in den Vorversuchen besten Inhibitoren sind in der folgenden Tabelle dargestellt und wurden weiter untersucht.

	CC50	IC50	SI	Testsystem
JK80	> 60 µM	ca. 30 µM	> 2	Fluoreszenzreader
QD6-8	> 75 µM	ca. 30 µM	> 2,5	Fluoreszenzreader
Droseron	> 30 µM	ca. 10 µM	> 3	Fluoreszenzreader
Droseron	> 30 µM	ca. 2 µM	> 15	Titration

**Tabelle 4.1 Beste Inhibitoren aus den Vorversuchen**

##### 4.7.1 JK80

JK80 ist eine Substanz die uns vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Würzburg Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe zur Verfügung gestellt wurde.

In den Vorversuchen zeigte JK80 mit einem CC<sub>50</sub>-Wert größer 60 µM und einem IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 30 µM eine inhibitorische Wirkung auf die Infektion des MV, gemessen an der EGFP-Fluoreszenzreduktion. Der SI ist grösser als 2, genauere Angaben sind aufgrund des unklaren CC<sub>50</sub>-Werts nicht möglich. Allerdings müsste der SI eines klinisch einsetzbaren Inhibitors noch um einiges höher sein. Trotzdem wurde im Weiteren untersucht, wo im Infektionszyklus des MV JK80 eingreift. Es wurden zwei

verschiedene Versuchsaufbauten verwendet. Versuchsaufbau A diente dazu, die potentielle Wirkung des Inhibitors während des Viruseintritts („entry“) in die Zelle zu testen. Hierzu wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,01) und JK80 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt und nach 48 h wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen. Versuchsaufbau B diente dazu, die potentielle Wirkung des Inhibitors auf die intrazelluläre Replikation des Virus zu testen. Die Vero-hSLAM-Zellen wurden dazu zuerst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. JK80 wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen.

Versuchsaufbau A zeigte eine größere Reduktion der Fluoreszenz als Versuchsaufbau B. Jedoch war die Fluoreszenzminderung weniger stark als in den Vorversuchen. So war in Versuchsaufbau A bei JK80 30 µM noch 62,3 % der Fluoreszenz vorhanden, in den Vorversuchen waren es noch 52,9 %.

Im Versuchsaufbau B zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinerlei Fluoreszenzminderung. Bei einer Konzentration von 30 µM JK80 war noch 97,9 % der Fluoreszenz vorhanden. Dies spricht dafür, dass JK80 nach dem Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen, keinen Einfluss mehr auf das Fortschreiten der Infektion hat. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass JK80 den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen beeinflussen bzw. verhindern kann. Dagegen kann es nach Infektion der Zelle durch rMV<sup>IC323</sup>EGFP nicht in den Replikationszyklus eingreifen und das weitere Fortschreiten der Infektion verhindern.

#### **4.7.2 QD 6-8**

QD6-8 ist eine Substanz die uns vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Würzburg Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe zur Verfügung gestellt wurde.

In den Vorversuchen zeigte QD6-8 mit einem CC<sub>50</sub>-Wert größer 75 µM und einem IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 30µM eine inhibitorische Wirkung auf die Infektion des MV, gemessen an der EGFP-Fluoreszenzreduktion. Der SI ist damit sicher grösser als 2,5, die Berechnung eines genaueren Wertes ist aufgrund des unklaren CC<sub>50</sub>-Werts nicht möglich. Allerdings

müsste der SI eines klinisch einsetzbaren Inhibitors noch um einiges höher sein. Trotzdem wurde im Weiteren untersucht, wo im Infektionszyklus des MV QD6-8 eingreift.

Es wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten verwendet. Versuchsaufbau A diente dazu, die potentielle Wirkung des Inhibitors während des Viruseintritts („entry“) in die Zelle zu testen. Hierzu wurden Vero-hSLAM-Zellen für 2 h gleichzeitig mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP (MOI=0,01) und QD6-8 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde das Gemisch entfernt und durch normales Medium ersetzt und nach 48 h die Fluoreszenz mittels Fluoreszenzreader gemessen. Versuchsaufbau B diente dazu, die potentielle Wirkung des Inhibitors auf die intrazelluläre Replikation des Virus zu testen. Die Vero-hSLAM-Zellen wurden dazu zuerst für 2 h mit rMV<sup>IC323</sup>EGFP infiziert. Danach wurde das Virus-Medium-Gemisch komplett entfernt und durch ein Inhibitor-Medium-Gemisch ersetzt. QD6-8 wurde dann in verschiedenen Konzentrationen für 48 h auf den Zellen belassen und danach die Fluoreszenz gemessen. QD6-8 zeigte eine grössere Fluoreszenzreduktion in Versuchsaufbau B. Bei einer Konzentration von 30 µM QD6-8 wurde die Fluoreszenz auf 39,8 % reduziert. Im Versuchsaufbau A dagegen war die Fluoreszenz bei 30 µM QD6-8 noch 70,7 % der Fluoreszenz der DMSO-Kontrolle. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass QD6-8 den Eintritt von rMV<sup>IC323</sup>EGFP in die Zellen wenig beeinflusst, bzw. diesen nicht zu verhindern vermag. Dagegen kann es nach Infektion der Zellen durch rMV<sup>IC323</sup>EGFP in den Replikationszyklus eingreifen und das weitere Fortschreiten der Infektion verhindern. Der vermutete Inhibitionsmechanismus von QD6-8 wäre im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger, spezifischer Medikamente gegen die Maserninfektion von großem Interesse, auch wenn die Substanz selbst als potentielles Medikament wegen des viel zu niedrigen SI nicht in Frage kommt. Eine Zielmolekülanalyse der Substanz und die Testung ihrer Derivate könnten weiteren Aufschluss darüber geben, wie Substanzen aussehen müssten, die eine spezifische Hemmung der intrazellulären Replikation bewirken können.

### 4.7.3 DROSERON

Droseron gehört zur chemischen Substanzklasse der Naphtoquinone. Es ist ein Naturstoff und kann von verschiedenen fleischfressenden Pflanzen synthetisiert werden (Bringmann et al., 2000; Budzianowski, 2000). Andere Namen sind 3,5-dihydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone; 2,8-dihydroxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone; dihydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone oder 3-hydroxy-plumbagin. Wie aus dem Namen ersichtlich, handelt es sich um ein oxygeniertes Derivat von Plumbagin. Die Naphtoquinone wurden bereits in verschiedenen Publikationen als anti-inflammatorisch, antimikrobiell (Babula et al, 2009; Cesari et al, 2013), fungizid und antihelminthisch (Lorsuwannarat et al, 2013) wirksam beschrieben. Ausserdem zeigten sie eine Hemmung des Wachstums und der Metastasierung von verschiedenen Tumoren (Hafeez et al, 2012; Lee et al, 2012).

In den Vorversuchen zeigte Droseron mit einem  $CC_{50}$ -Wert von über 30  $\mu$ M, einem  $IC_{50}$ -Wert von ca. 10  $\mu$ M und einem SI von über 3, eine gute inhibitorische Wirkung auf die Infektion des MV, gemessen an der EGFP-Fluoreszenzreduktion. Allerdings müsste der SI eines klinisch einsetzbaren Inhibitors noch um einiges höher sein. Trotzdem wurde im Weiteren untersucht, wo im Infektionszyklus des MV Droseron eingreift. Hierfür wurden verschiedene Versuchsansätze getestet, in denen Droseron zu verschiedenen Zeitpunkten, nämlich vor, mit oder nach dem Virus auf die Zellen gegeben und mittels Fluoreszenzreader gemessen wurde, wann die Substanz den größten Einfluss auf die MV-Infektion bzw. die Fluoreszenzreduktion hatte.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche zeigten, dass Droseron, v.a. dann wirksam ist, wenn es gleichzeitig mit dem Virus auf die Zellen gegeben wird und solange anwesend ist, wie das MV (Abb. 3.28). Dagegen zeigten die Versuche in denen Droseron 2 h nach dem MV auf die Zellen gegeben wurde (Abb. 3.28) kaum eine Reduktion der Fluoreszenz, obwohl die Substanz in diesem Versuchsaufbau für 48 h auf den Zellen belassen wurde. Deshalb spricht dieses Versuchsergebnis dafür, dass Droseron den Eintritt von  $rMV^{IC323}EGFP$  in die Zellen verhindert, da es wenn das Virus die Zellen bereits infiziert hat, viel weniger Fluoreszenzreduktionpotential hatte. Unter der Hypothese, dass Droseron den Eintritt von  $rMV^{IC323}EGFP$  in die Zelle hemmt, wurden noch Versuche angesetzt um die Interaktion zwischen Droseron und den Zellen zu testen. Hierfür wurden die Vero-hSLAM Zellen zuerst für 1 bzw. 2 h mit Droseron in

verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde entweder das Virus dazugegeben oder das Droseron komplett entfernt und dann Virus auf die Zellen gegeben. In beiden Versuchen war zu erkennen, dass die Fluoreszenzreduktion bei dauerhafter Anwesenheit von Droseron größer ist, als nach 1 bzw. 2 h Inkubation mit Droseron und anschließender Entfernung der Substanz vor Infektion. Dies spricht gegen eine dauerhafte Interaktion der Substanz mit der Zelloberfläche, da die Substanz dann auf den Zellen verbleiben würde und immer noch fähig wäre, den Eintritt des MV in die Zelle zu verhindern. Dies war jedoch nicht der Fall. Da diese Versuche nur je einmal durchgeführt wurden, sollte das Ergebnis nochmals verifiziert werden und kann hier lediglich als Hinweis benutzt werden. Da jedoch in beiden Versuchen das Ergebnis ähnlich war, spricht dies für ihre Aussagekraft. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wäre es noch möglich, dass Droseron mit der Virusmembran oder den viralen Hüllproteinen interagiert und auf diese Weise den Eintritt in die Zelle verhindert. Um diese Hypothese weiter zu belegen, müssten Versuche gemacht werden, in denen zunächst das Virus mit Droseron inkubiert wird und das Gemisch danach auf die Zellen gegeben wird. Optimaler Weise müsste man Virus und Droseron zuvor wieder trennen, was nicht möglich ist. Daher kann lediglich verglichen werden, ob die Hemmung der Virusinfektion mit dieser Methode effektiver ist, als wenn man Substanz und Virus gleichzeitig auf die Zellen gibt. Sollte sich hierbei kein signifikanter Unterschied zeigen, ist damit eine Interaktion der Substanz mit dem Virus jedoch trotzdem möglich. Allerdings ist diese, mit den hier verwendeten Methoden, nur schwer nachzuweisen. Um die in der Fluoreszenzmessung bestimmten Werte als Virustiter von rMV<sup>IC323</sup>EGFP zu quantifizieren, wurde eine Titration (siehe 2.2.2.2) durchgeführt. Für die Quantifizierung von infektiösen Viruseinheiten ist diese Methode empfindlicher, aber auch aufwendiger als die Fluoreszenzmessung. Es zeigte sich, dass die Anzahl infektiöser MV geringer war, als es die Fluoreszenzreadermessung annehmen ließ. Aus der Reduktion des Masernvirustiters durch Droseron (Abb. 3.32) ergab sich ein IC<sub>50</sub> von 2 µM, womit der SI bei über 15 läge. Dies zeigt, dass die Titration neu synthetisierter Viren ein empfindlicheres Testsystem für die Wirkung von Inhibitoren darstellt, als die Messung der Fluoreszenz des intrazellulären EGFP. Weitere Testungen der Zytotoxizität von Droseron (Lieberherr et al, 2017) ergaben einen CC50 Wert von 60 µM, was den SI des Naturstoffes auf 6 (Fluoreszenzreader) bzw. 30 (Titration) erhöht.

Valentin Vogt untersuchte im Rahmen seiner Promotion die Wirkung von Droseron auf die Zellproliferation von Vero-Zellen. Es zeigte sich in seinen Versuchen, dass nach 72 h Inkubation mit 10 und 30  $\mu\text{M}$  Droseron die Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle viel weniger Zellteilungen hinter sich hatten. Bei Droseron 3  $\mu\text{M}$  ergab sich nur eine geringe Reduktion der Proliferationsrate. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Hemmung der MV-Infektion durch Droseron, insbesondere in der Dosierung von 3  $\mu\text{M}$ , kaum auf die Toxizität der Substanz noch auf eine Hemmung der Zellproliferation zurückzuführen ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Infektion mit dem Masernvirus (MV) stellt weltweit immer noch ein großes Problem dar. Trotz des vorhandenen Lebendimpfstoffs, der eine Erkrankung sicher zu verhindern vermag, haben nicht nur die Entwicklungsländer, in denen ein flächendeckender Impfschutz schwieriger zu erreichen ist, mit der Erkrankung und ihren Komplikationen zu kämpfen. Hat sich die Erkrankung klinisch manifestiert gibt es keine kausalen Therapiemöglichkeiten und es kann nur noch symptomatisch behandelt werden. Dies ist v.a. auch in Hinblick auf die schweren Komplikationen der Maserninfektion von Bedeutung. Bei Erstkontakt mit dem Masernvirus ist die Suszeptibilität nicht geimpfter Menschen sehr hoch. Das bedeutet, dass es in 95-98 % der Fälle nach einer Infektion mit dem Masernvirus auch zum klinischen Bild der Masern kommt, unabhängig von Alter und Geschlecht.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, potentielle Hemmstoffe der Maserninfektion auf ihre Wirkung zu testen und zu verstehen, wo im Infektions- und Replikationszyklus des MV sie eingreifen. Es wurden eine Reihe Substanzen mit potentiell-inhibitorischen Eigenschaften in Infektions-Hemmtests und im Zytotoxizitätstest untersucht, von denen im Anschluss die drei besten Inhibitoren (JK80, QD6-8 und Droseron) weiter untersucht wurden. JK80 und QD6-8 waren beide mit  $IC_{50}$ -Werten um  $30 \mu M$  und SI-Werten von über 2 nur mäßig spezifisch antiviral wirksam. Während JK80 vermutlich den Eintritt des MV in die Zellen verhindert, hemmt QD6-8 die intrazelluläre Virusreplikation und wäre im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger, spezifischer Medikamente gegen die Maserninfektion von grossem Interesse. Eine Zielmolekülanalyse der Substanz und die Testung anderer Derivate könnten Aufschluss darüber geben, wie Substanzen aussehen müssten, die eine spezifische Hemmung der intrazellulären Replikation bewirken können.

Der Naturstoff Droseron könnte mit einer spezifischen Hemmung ( $IC_{50}$  ca.  $10 \mu M$ ; SI-Wert 6 im Fluoreszenzreader, bzw.  $IC_{50}$  ca.  $2 \mu M$ ; SI-Wert 30 in der Titration) eine mögliche Leitsubstanz für einen neuen MV-Inhibitor darstellen. Allerdings waren alle bisher getesteten Droseron-Derivate entweder weniger inhibitorisch wirksam oder deutlich zytotoxischer als Droseron selbst. Die Ergebnisse der Infektionshemmversuche mit Zugabe von Droseron vor, während oder nach der Infektion mit MV sprechen dafür, dass Droseron den Eintritt des Virus in die Zelle stört.

## 6 ABBILDUNGS UND LITERATURVERZEICHNIS

### 6.1 LITERATURVERZEICHNIS

**Ali M.E. & Albar H.M. (1997).** Measles in pregnancy: maternal morbidity and perinatal outcome. *Int. J. Gynaecol Obstet*, 59: 109–113.

**Avota E., Gassert E. & Schneider-Schaulies S. (2010).** Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med. Microbiol. Immunol.*, 199: 227–237.

**Babula P., Adam V., Havel L. & Kizek R. (2009).** Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones - their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Curr. Pharm. Anal.*, 5: 47-68.

**Barclay A.J., Foster A. & Sommer A. (1987).** Vitamin A supplements and mortality related to measles: A randomised clinical trial. *Br. Med. J. (Clin Res Ed)*, 294: 294–296.

**Barkin R.M. (1975).** Measles mortality: a retrospective look at the vaccine era. *Am. J. Epidemiol.*, 102: 341–349.

**Bellini W.J., Rota J.S., Lowe L.E., Katz R.S., Dyken P.R., Zaki S.R., Shieh W.-J. & Rota P.A. (2005).** Subacute sclerosing panencephalitis: More cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than previously recognized. *J. Infect. Dis.*, 192: 1686-1693.

**Bellini W.J. & Rota P.A. (2011).** Biological feasibility of measles eradication. *Virus Res.*, 162: 72-79.

**Bringmann G., Rischer H., Wohlfarth M., Schlauer J. & Assi L.A. (2000).** Droserone from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic origin. *Phytochemistry*, 53: 339–343.

**Budzianowski J. (2000).** Naphthoquinone glucosides of *Drosera gigantea* from *in vitro* cultures. *Planta Medica.*, 66: 667–669.

**Caulfield L.E., de Onis M., Blossner M. & Black R.E. (2004).** Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 193-198.

**CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2011).** Increased transmission and outbreaks of measles - European Region. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 60: 1605-1610.

**CDC (Factsheet).**

<[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/measles/Pages/health\\_professionals.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/measles/Pages/health_professionals.aspx)>  
[Zugegriffen: 30.09.2013].

**CDC (SURVEILLANCE REPORT Measles and rubella monitoring, October 2014).**

<<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Measles-rubella-quarterly-Dec2014.pdf>> [Zugegriffen: 11.03.2015].

**CDC (SURVEILLANCE REPORT Measles and rubella monitoring, October 2015).**

<[http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2015\\_issue\\_5\\_%20Measles%20rubella%20monitoring\\_final.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2015_issue_5_%20Measles%20rubella%20monitoring_final.pdf)> [Zugegriffen: 20.02.2016].

**Cesari I., Hoerlé M., Simoes-Pires C., Grisoli P., Queiroz E.F., Dacarro C., Marcourt L., Moundipa P.F., Carrupt P.A., Cuendet M., Caccialanza G., Wolfender J.L. & Brusotti G. (2013).** Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gürke) extracts and its main constituents. *J. Ethnopharmacol.*, 146: 264-270.

**Chiba M.E., Saito M., Suzuki N., Honda, Y. & Yaegashi, N. (2003).** Measles infection in pregnancy. *J. Infect.*, 47: 40–44.

**Clements C.J. & Cutts F.T. (1995).** The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 191: 13-33.

**D'Souza R.M. & D'Souza R. (2002).** Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD001479.

**de Vries R.D., Stittelaar K.J., Osterhaus A.D. & de Swart R.L. (2008).** Measles vaccination: New strategies and formulations. *Expert Rev. Vaccines.*, 7: 1215–1223.

**de Swart, R. L., Ludlow M., de Witte L., Yanagi Y., van Amerongen G., McQuaid S., Yüksel S., Geijtenbeek T.B., Duprex W.P. & Osterhaus A.D. (2007).** Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog.*, 3: e178.

**de Swart R.L. (2008).** The pathogenesis of measles revisited. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 27: 84–88.

**Eberhart-Phillips J.E., Frederick P.D., Baron R.C. & Mascola L. (1993).** Measles in pregnancy: a descriptive study of 58 cases. *Obstet. Gynecol.*, 82: 797– 801.

**Enders M., Biber M. & Exler S. (2007).** Masern, Mumps und Röteln in der Schwangerschaft. Mögliche Auswirkungen auf Mutter, Schwangerschaft und Fetus. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 50: 1393–1398.

**Engelhardt S.J., Halsey N.A., Eddins D.L. & Hinman A.R. (1980).** Measles mortality in the United States 1971–1975. *Am. J. Public Health*, 70: 1166– 1169.

**Ferreira C. S., Frenzke M., Leonard V.H., Welstead G.G., Richardson C.D. & Cattaneo R. (2010).** Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J. Virol.*, 84: 3033–3042.

**Foster A. & Sommer A. (1986).** Childhood blindness from corneal ulceration in Africa: causes, prevention, and treatment. *Bull World Health Organ.*, 64: 619-623.

**Foster A. & Sommer A. (1987).** Corneal ulceration, measles, and childhood blindness in Tanzania. *Br. J. Ophthalmol.*, 71: 331-343.

**Gans H.A., Arvin A.M., Galinus J., Logan L., DeHovitz R. & Maldonado Y. (1998).** Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *J. Am. Med. Assoc.*, 280: 527–532.

**Griffin D. E. (2007).** Measles virus. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, & S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.: 1551-1585.

**Griffin D.E, Pan C.H. & Moss W.J. (2008).** Measles vaccines. *Front. Biosci.*, 13: 1352- 1370.

**Guillet M., Vauloup-Fellous C., Cordier A.G., Grangeot-Keros L., Benoist G., Nedellec S., Benachi A., Freymuth F. & Picone O. (2012).** Measles in pregnancy: a review. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, 41: 209-218.

**Gutierrez J., Issacson R.S. & Koppel B.S. (2010).** Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 52: 901-907.

**Hafeez B.B., Zhong W., Fischer J.W., Mustafa A., Shi X., Meske L., Hong H., Cai W., Havighurst T., Kim K. & Verma A.K. (2012).** Plumbagin, a medicinal plant (*Plumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. *Mol. Oncol.* 2013, 7: 428-439.

**Halsey N.A. (2006).** Measles in developing countries. *BMJ*, 333: 1234.

**Hilleman M.R. (2001).** Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine*, 20: 651–665.

**Hope Simpson R.E. (1952).** Infectiousness of communicable diseases in the household (measles, chicken pox, and mumps). *Lancet*, 2: 549-554.

**Hussey G.D. & Klein M. (1990).** A randomized, controlled trial of vitamin A in children with severe measles. *N. Engl. J. Med.*, 323: 160-164.

**Kayikcioglu O., Kir E., Soyler M., Guler C. & Irkec M. (2000).** Ocular findings in a measles epidemic among young adults. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 8: 59-62.

**Kremer J.R. & Muller C.P. (2009).** Measles in Europe - there is room for improvement. *Lancet*, 373: 356–358.

**Krumm S.A., Yan D., Hovingh E.S., Evers T.J., Enkirch T., Reddy G.P., Sun A., Saindane M.T., Arrendale R.F., Painter G., Liotta D.C., Natchus M.G., von Messling V. & Plemper R.K. (2014).** An orally available, small-molecule polymerase inhibitor shows efficacy against a lethal morbillivirus infection in a large animal model. *Sci. Transl. Med.*, 6: 232-252.

**Lee J.H., Yeon J.H., Kim H., Roh W., Chae J., Park H.O. & Kim D.M. (2012).** The natural anticancer agent plumbagin induces potent cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells by inhibiting a PI-5 kinase for ROS generation. *PLoS One*, 7: e45023.

**Lemon K., de Vries R.D., Mesman A.W., McQuaid S., van Amerongen G., Yüksel S., Ludlow M., Rennick L.J., Kuiken T., Rima B.K., Geijtenbeek T.B.H., Osterhaus A.D.M.E., Duprex W.P. & de Swart R.L. (2011).** Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog.*, 7: e1001263.

**Leonard V. H., Hodge G., Reyes-Del Valle J., McChesney M. B. & Cattaneo R. (2010).** Measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) is attenuated and induces strong adaptive immune responses in rhesus monkeys. *J. Virol.*, 84: 3413–3420.

**Lieberherr C., Zhang G., Grafen A., Singethan K., Kendl S., Vogt V., Maier J., Bringmann G. & Schneider-Schaulies J. (2017).** The Plant-Derived Naphthoquinone Droserone Inhibits In Vitro Measles Virus Infection. *Planta. Med.*, 83: 232-238.

**Lorsuwannarat N., Saowakon N., Ramasoota P., Wanichanon C. & Sobhon P. (2013).** The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 133: 18-27.

**Manikkavasagan G. & Ramsay M. (2009).** The rationale for the use of measles post-exposure prophylaxis in pregnant women: a review. *J. Obstet. Gynaecol.*, 29: 572–575.

**Matysiak-Klose D. (2013).** Hot Spot: Epidemiologie der Masern und Röteln in Deutschland und Europa. *Bundesgesundheitsbl.*, 56: 1231–1237.

<[http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/M/Masern/BGBL\\_09\\_2013\\_Hotspot.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/M/Masern/BGBL_09_2013_Hotspot.pdf?__blob=publicationFile)> [Zugegriffen: 28.09.2013].

**Moss W.J. & Griffin D.E. (2006).** Global measles elimination. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 900–908.

**Mühlebach M.D., Mateo M., Sinn P.L., Prüfer S., Uhlig K.M., Leonard V.H.J., Navaratnarajah C.K., Frenzke M., Wong X.X., Sawatsky B., Ramachandran S., McCray Jr. P.B., Cichutek K., von Messling V., Lopez M. & Cattaneo R. (2011).** Adherens junction protein nectin-4 (PVRL4) is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 480: 530–533.

**Morley D.C. (1974).** Measles in the developing world. *Proc. R. Soc. Med.*, 67: 1112-1115.

**Ndungu J.M., Krumm S.A., Yan D., Arrendale R.F., Reddy G.P., Evers T., Howard R., Natchus M.G., Saindane M.T., Liotta D.C., Plemper R.K., Snyder J.P. & Sun A. (2012).** Non-nucleoside inhibitors of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase: synthesis, structure-activity relationships, and pharmacokinetics. *J. Med. Chem.*, 55: 4220-4230.

**Niedermeier S., Singethan K., Rohrer S.G., Matz M., Kossner M., Diederich S., Maisner A., Schmitz J., Hiltensberger G., Baumann K., Holzgrabe U. & Schneider-Schaulies J. (2009).** A small molecule inhibitor of Nipah virus envelope protein-mediated membrane fusion. *J. Med. Chem.*, 52: 4257-4265.

**Noyce R.S., Bondre D.G., Ha M.N., Lin L.T., Sisson G., Tsao M.S. & Richardson C.D. (2011).** Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.*, 7: e1002240.

**Ornoy A. & Tenenbaum A. (2006).** Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephali - tis viruses. *Reprod. Toxicol.*, 21: 446–457.

**Padhye S., Dandawate P., Yusufi M., Ahmad A. & Sarkar F.H. (2012).** Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med. Res. Rev.*, 32: 1131-1158.

**Perry R.T. & Halsey N.A. (2004).** The clinical significance of measles: a review. *J. Infect. Dis.*, 189: 4-16.

**Pfeuffer J., Püschel K., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J. & Niewiesk S. (2003).** Extent of measles virus spread and immune suppression differentiates between wild-type and vaccine strains in the cotton rat model (*Sigmodon hispidus*). *J. Virol.*, 77: 150–158.

**Reymond N., Fabre S., Lecocq E., Adelaïde J., Dubreuil P. & Lopez M. (2001).** Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J. Biol. Chem.*, 276: 43205–43215.

**Richardson C.D. & Choppin P.W. (1983).** Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology*, 131: 518-532.

**Rima B.K. & Duprex W.P. (2006).** Morbilliviruses and human disease. *J. Pathol.*, 208: 199–214.

**Robbins F.C. (1962).** Measles: clinical features. Pathogenesis, pathology and complications. *Am. J. Dis. Child.*, 103: 266-273.

**Sandford-Smith J. H. & Whittle H. C. (1979).** Corneal ulceration following measles in Nigerian children. *Br. J. Ophthalmol.*, 63: 720-724.

**Scheifele D.W. & Forbes C.E. (1972).** Prolonged giant cell excretion in severe African measles. *Pediatrics*, 50: 867-873.

**Schneider-Schaulies S., Niewiesk S., Schneider-Schaulies J. & ter Meulen V. (2001).** Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr. Mol. Med.*, 1: 163-181.

**Schneider-Schaulies S. & Dittmer U. (2006).** Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J. Gen. Virol.*, 87: 1423-1438.

**Schneider-Schaulies S. & Schneider-Schaulies J. (2009).** Measles virus-induced immunosuppression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 330: 243–269.

**Simons E., Ferrari M., Fricks J., Wannemuehler K. Anand A., Burton A. & Strebel P. (2012).** Assessment of the 2010 global measles mortality reduction goal: results from a model of surveillance data. *Lancet*, 379: 2173–2178.

**Singethan K., Hiltensperger G., Kendl S., Wohlfahrt J., Plattet P., Holzgrabe U. & Schneider-Schaulies J. (2010).** N-(3-Cyanophenyl)-2-phenylacetamide, an effective inhibitor of morbillivirus-induced membrane fusion with low cytotoxicity. *J. Gen. Virol.*, 91: 2762-2772.

**Suringa D.W., Bank L.J. & Ackerman A.B. (1970).** Role of measles virus in skin lesions and Koplik's spots. *N. Engl. J. Med.*, 283: 1139-1142.

**Tatsuo H., Ono N., Tanaka K. & Yanagi Y. (2000).** SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 406: 893– 897.

**Villamor E. & Fawzi W.W. (2000).** Vitamin A supplementation: Implications for morbidity and mortality in children. *J. Infect. Dis.*, 182: 122–133.

**Wichmann O., Siedler A., Sagebiel D., Hellenbrand W., Santibanez S., Mankertz A., Vogt G., van Treeck U. & Krause G. (2009).** Further efforts needed to achieve measles elimination in Germany: results of an outbreak investigation. *Bull World Health Organ.*, 87: 108–115.

**Yanagi Y., Takeda M. & Ohno S. (2006).** Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.*, 87: 2767-2779.

**WHO (Immunization surveillance).**

<[http://www.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/measles/en/](http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/measles/en/)>

[Zugegriffen: 09/2013].

**WHO (Factsheet).** <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/index.html>>

[Zugegriffen: 2011,2013, zuletzt 02/2016].

**WHO (2010).** Monitoring progress towards measles elimination. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 85: 490–494.

**WHO Europe (2010).** Erneuerung des Engagements für die Eliminierung von Masern und Röteln und die Prävention der Rötelnembryopathie in der Europäischen Region der WHO bis zum Jahr 2015.

<[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0010/119548/RC60\\_gdoc15.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/119548/RC60_gdoc15.pdf)>

[Zugegriffen: 28.09.2013].

**WHO Europe (2012).** Eliminating measles and rubella, Framework for the verification process in the WHO European Region.

<[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/156776/e96153-Eng-final-version.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/156776/e96153-Eng-final-version.pdf)> [Zugegriffen: 28.09.2013].

**WHO Europe (2012).** Global measles and rubella strategic plan: 2012–2020.

<[http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles\\_Rubella\\_StrategicPlan\\_2012\\_2020.pdf](http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles_Rubella_StrategicPlan_2012_2020.pdf)> [Zugegriffen: 28.09.2013].

**WHO (Measles Surveillance Data).**

<[http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/active/measles\\_monthlydata/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/)> [Zugegriffen: 20.02.2016].

**WHO (2015).** Todesursachen der Kinder unter 5 Jahren.

<[http://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/causes/en/](http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/)> [Zugegriffen: 20.02.2016].

## 6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Todesursachen der Kinder unter 5 Jahren 2015.....	1
Abbildung 1.2	Masernerkrankungen pro Altersgruppe Oktober 2014-September 2015 .....	3
Abbildung 1.3	Anzahl der Masernfälle 2013 und 2014 in EU/EEA Ländern .....	4
Abbildung 1.4	Anzahl der gemeldeten Masernerkrankungen weltweit .....	5
Abbildung 3.1	MTT-Zytotoxizitätstest CA194 und CA262 .....	28
Abbildung 3.2	MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate .....	29
Abbildung 3.3	MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate .....	29
Abbildung 3.4	MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate .....	30
Abbildung 3.5	MTT-Zytotoxizitätstest der CA-Derivate .....	30
Abbildung 3.6	Infektions-Hemmtest mit CA-Derivaten.....	31
Abbildung 3.7	Infektions-Hemmtest mit CA-Derivaten.....	32
Abbildung 3.8	MTT-Zytotoxizitätstest der Naturstoffe.....	33
Abbildung 3.9	MTT-Zytotoxizitätstest der Naturstoffe.....	34
Abbildung 3.10	Infektions-Hemmtest mit Naturstoffen .....	35
Abbildung 3.11	Infektions-Hemmtest mit Naturstoffen .....	36
Abbildung 3.12	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV <sup>1C323</sup> EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MK01 .....	37
Abbildung 3.13	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV <sup>1C323</sup> EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MK03 .....	37
Abbildung 3.14	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV <sup>1C323</sup> EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von Droseron. ....	38
Abbildung 3.15	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV <sup>1C323</sup> EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von Din B.....	38
Abbildung 3.16	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-hSLAM-Zellen nach Infektion mit rMV <sup>1C323</sup> EGFP (MOI=0,05) für 48 h unter Anwesenheit von MY284.....	39
Abbildung 3.17	Infektions-Hemmtest mit Droseronderivaten .....	40
Abbildung 3.18	Infektions-Hemmtest mit Droseronderivaten .....	40
Abbildung 3.19	Infektions-Hemmtest mit Plumbagin und Droseron Versuchsaufbau A.....	42
Abbildung 3.20	Infektions-Hemmtest mit Plumbagin und Droseron Versuchsaufbau B .....	42
Abbildung 3.21	Infektions-Hemmtest mit Plumbagin Versuchsaufbau C.....	42
Abbildung 3.22	MTT-Zytotoxizitätstest der Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie .....	44
Abbildung 3.23	MTT-Zytotoxizitätstest Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie .....	45
Abbildung 3.24	Infektions-Hemmtest mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie.....	46
Abbildung 3.25	Infektions-Hemmtest mit Substanzen aus der pharmazeutischen Chemie.....	46
Abbildung 3.26	Infektions-Hemmtest mit JK80.....	49

Abbildung 3.27	Infektions-Hemmtest mit QD6-8 .....	51
Abbildung 3.28	Infektions-Hemmtest mit Droseron .....	53
Abbildung 3.29	Infektions-Hemmtest mit Droseron .....	54
Abbildung 3.30	Infektions-Hemmtest mit Droseron .....	55
Abbildung 3.31	Infektions-Hemmtest mit Droseron .....	56
Abbildung 3.32	Titration von rMV <sup>IC323</sup> EGFP mittels Plaquetest .....	56

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Beste Inhibitoren aus den Vorversuchen Testsystem: Fluoreszenzreader .....	48
Tabelle 4.1	Beste Inhibitoren aus den Vorversuchen .....	64

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich auf verschiedene Art und Weise darin unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, die sehr gute, kompetente und geduldige Betreuung, die wertvollen Denkanstöße, seine ständige Erreichbarkeit, sowie alle investierte Zeit.

Herzlichen Dank an Prof. U. Holzgrabe, Pharmazeutische Chemie, und Prof. Dr. G. Bringmann, Institut für Organische Chemie, Würzburg, sowie allen beteiligten Mitarbeitern für die Herstellung und das Zur-Verfügung-Stellen der in dieser Arbeit getesteten Substanzen und Naturstoffe.

Ein besonderes Dankeschön gilt Sabine Kendl, Dr. rer. nat. Markus Fehrholz und Dr. rer. nat. Dajana Reuter, die mich mit viel Geduld in die wissenschaftliche Forschung eingearbeitet haben, danke für eure vielseitige theoretische und praktische Unterstützung, für die gute Zusammenarbeit und das entspannte Arbeitsklima.

Danke auch an meine Laborkollegen Dr. rer. nat. Ibrahim Boussad und Dr. med. Valentin Vogt für die lockere Atmosphäre und das lustige Arbeitsklima.

Vielen Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe JSS, sowie der Nachbar-Arbeitsgruppe Sybille Schneider-Schaulies (SSS) welche während meiner Zeit im Labor kamen und gingen, für viele schöne Begegnungen und die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt meiner Familie. Danke für alles und noch viel mehr.

## **Lebenslauf**

### **Personalien**

Name Lieberherr geb. Helm  
Vorname Christina Irene

### **Ausbildung**

05/2012 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2007 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
10/2005-06/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
2004 **Allgemeine Hochschulreife**  
Martin Pollich Gymnasium Mellrichstadt

### **Ärztliche Tätigkeit**

Seit 06/2016 **Assistenzärztin Notaufnahme/Tagesklinik**  
Spital Wattwil  
10/2013-11/2015 **Assistenzärztin für Innere Medizin**  
Spital Wattwil  
02-09/2013 **Assistenzärztin für Psychiatrie**  
Clenia Littenheid

### **Publikationen**

**Lieberherr C., Zhang G., Grafen A., Singethan K., Kendl S., Vogt V., Maier J., Bringmann G. & Schneider-Schaulies J. (2017).** The Plant-Derived Naphthoquinone Droserone Inhibits In Vitro Measles Virus Infection. *Planta. Med.*, 83: 232-238.

Christina Lieberherr, August 2017