In vitro und *in vivo* Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität von synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptiden (SALP) gegen Influenza A Viren

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Hoffmann

geb. Richter

Hamburg 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. G. GABRIEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 25. April 2014

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2009 bis Februar 2014 in der Forschungsgruppe Virale Zoonosen und Adaptation im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (Direktor: Prof. Dr. T. Dobner), im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg unter Leitung von Prof. Dr. Gülşah Gabriel durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg als Dissertation am:

25.04.2014

Erstgutachter: Prof. Dr. Gülşah Gabriel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Tag der mündlichen Prüfung am: 25.04.2014

Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Michael Böttger

Prof. Dr. Gülşah Gabriel

Prof. Dr. Thomas Dobner

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Taxonomie 1

1.2 Virionstruktur und Morphologie 3

1.3 Genomaufbau 4

1.4 Replikationszyklus 6

1.4.1 Adsorption und rezeptorvermittelte Endozytose 7

1.4.2 Membranfusion und Freisetzung der vRNPs 8

1.4.3 Transkription und Replikation 9

1.4.4 Synthese neuer viraler Proteine 11

1.4.5 Zusammenlagerung und Freisetzung neuer Virionen 11

1.5 Wirtsspektrum und Evolution 12

1.6 Influenzavirusinfektionen im Vogel 14

1.7 Influenzavirusinfektionen im Menschen 14

1.7.1 Saisonale Influenza 15

1.7.2 Pandemische Influenza 16

1.7.3 Übertragung von aviären Influenzaviren auf den Menschen 18

1.8 Pathogenese 20

1.9 Prävention 21

1.10 Therapie 23

1.10.1 M2-Inhibitoren 24

1.10.2 NA-Inhibitoren 26

1.10.3 Neue therapeutische Ansätze 27

1.11 Synthetische Anti-Lipopolysacchaid Peptide (SALPs) 29

1.12 Zielsetzung 30

2 Material 32

2.1 Puffer, Lösungen und Chemikalien 32

2.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme (Kits) 35

2.3 Verbrauchsmaterial und Glaswaren 36

2.4 Zellkulturmedien & -zusatzstoffe 38

2.5 Eukaryotische Zelllinien 40

2.6 Virusstämme 40

2.7 Versuchstiere 40

2.8 DNA- und Protein-Größenstandards ... 41
2.9 Plasmide und Vektoren ... 41
2.10 Primer ... 41
2.11 Primäre Antikörper ... 43
2.12 Sekundäre Antikörper ... 43
2.13 Narkotika & Analgetika ... 44
2.14 Geräte und Werkzeuge ... 45
3 Methoden ... 49
3.1 Peptidsynthese ... 49
3.2 Zellkultur-Methoden ... 49
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien ... 50
3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien ... 50
3.3 Nukleinsäuretechniken ... 51
3.3.1 Isolierung viraler RNA ... 51
3.3.2 *One-Step* RT-PCR ... 51
3.3.3 DNA-Gelelektrophorese ... 52
3.3.4 Sequenzierung ... 52
3.4 Proteinbiochemische Methoden ... 52
3.4.1 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen ... 53
3.4.2 SDS-PAGE und Western Blot ... 53
3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie ... 53
3.6 Zytotoxizitätstest ... 54
3.7 Virologische Methoden ... 55
3.7.1 Reverse Genetik ... 56
3.7.2 Virusanzucht ... 57
3.7.3 Hämagglutinationstest (HA-Test) ... 59
3.7.4 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest ... 60
3.7.5 Test zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zelle ... 61
3.7.6 Test zur Bestimmung der Bindung von SALPs an die Viruspartikel ... 62
3.7.7 Test zur Bestimmung der von der Zelle internalisierten Viruspartikel ... 62
3.7.8 Test zur Bestimmung der viralen Replikation ... 63
3.7.9 Analyse des viralen Wachstumsverhaltens auf A549-Zellen ... 64
3.8 Fluoreszenz-Analysen ... 65
3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ... 67
3.10 Tierexperimentelle Methoden ... 67

3.10.1 Narkose und Tötungsmethoden ... 68
3.10.2 Toxizität der SALPs in der Maus ... 68
3.10.3 Lokalisation der SALPs in der Maus nach i.n. Applikation ... 69
3.10.4 Überlebensversuche ... 69
3.10.5 Organentnahmen ... 70
3.10.6 Präparation von murinen Organen für Folgeuntersuchungen ... 70
3.11 Histologische Methoden ... 71
3.11.1 Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten am Mikrotom ... 71
3.11.2 Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten ... 72
3.11.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ... 72
3.11.4 Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P) ... 73
3.12 Statistische Auswertungen ... 74
4 Ergebnisse ... 75
4.1 Bindungsaffinität der SALPs an *N*-Acetylneuraminsäuren ... 75
4.2 Virale Hämagglutination von Hühnererythrozyten während der SALP-Behandlung ... 76
4.3 Zytotoxizität der SALPs ... 78
4.4 Virale Bindung an die Zelloberfläche während der SALP-Behandlung ... 80
4.5 Bindung der SALPs an die Influenzaviruspartikel ... 82
4.6 Internalisierung von Viruspartikeln während der SALP-Behandlung ... 83
4.7 Virale Replikation während der SALP-Behandlung ... 85
4.8 Bestimmung der viralen Titer nach einer Ko-Behandlung mit SALPs ... 88
4.9 Bestimmung der viralen Titer nach therapeutischer SALP-Behandlung ... 90
4.10 Toxizität der SALPs nach intranasaler Applikation im Mausmodell ... 91
4.11 Verteilung der SALPs im Respirationstrakt nach intranasaler Applikation im Mausmodell ... 93
4.12 Einfluss der SALP Ko- und Nachbehandlung auf die H7N7 Influenzavirus Pathogenität in der Maus ... 94
5 Diskussion ... 99
5.1 SALPs inhibieren die virale Bindung an den zellulären Rezeptor durch kompetitive Hemmung ... 99
5.2 SALPs reduzieren die Internalisierung von Viruspartikeln sowie die Virusreplikation ... 103
5.3 SALPs bieten einen differenziellen Schutz vor einer letalen H7N7 Influenzavirusinfektion in der Maus ... 105
5.4 SALPs können zur Entwicklung zukünftiger antiviraler Strategien dienen ... 108
6 Zusammenfassung ... 113

7 Summary 114

8 Literaturverzeichnis 115

9 Anhang 123

9.1 Abkürzungsverzeichnis 123

9.2 Tabellenverzeichnis 126

9.3 Abbildungsverzeichnis 126

Publikationen, Vorträge, Posterpräsentationen 128

Wissenschaftlicher Werdegang 132

Danksagung 133

Eidesstattliche Versicherung 134

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde die antivirale Aktivität der synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptide (SALPs) gegen Influenza A Viren evaluiert. Die Einleitung soll einen Überblick über die Biologie der Influenza A Viren und deren Bedeutung als zoonotisches Virus für die menschliche Bevölkerung geben. Die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Antiviralia gegen Influenzaviren ist aufgrund der in den letzten Jahren entwickelten Resistenzen reduziert. Daher ist die Erforschung neuer antiviraler Strategien von besonderem Interesse. Die in dieser Arbeit untersuchte neue Klasse der SALPs bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Inhibition und Therapie von Influenza A Viren.

1.1 Taxonomie

Die Influenza A Viren gehören der Familie der *Orthomyxoviridae* an. Diese Familie umfasst umhüllte Viren, die ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung aufweisen (Modrow *et al.*, 2003; Palese und Shaw, 2007; Presti *et al.*, 2009). Der Familie der *Orthomyxoviridae* sind die Gattungen der Thogotoviren, Quarjaviren, Isaviren, Influenzaviren A, B und C zugeordnet (Modrow *et al.*, 2003; Presti *et al.*, 2009) (Tab. 1).

Tab. 1: Die Gattungen der Familie der *Orthomyxoviridae* und ihr Wirtsspektrum

Gattung	Mensch	Tier
Influenza A Virus[1, 2]	Influenza A Viren	Influenza A Viren (Wasservögel, Geflügel, Säugetiere wie z.B. Schweine, Pferde, Fledermäuse, Seehunde)
Influenza B Virus[1, 3]	Influenza B Viren	Influenza B Virus (Seehunde)
Influenza C Virus[1, 4]	Influenza C Viren	Influenza C Virus (Schweine)
Thogotovirus[1, 5]	Dhorivirus	Thogotovirus, Dhorivirus (Zecken, Nagetiere, Schafe, Ziegen, Rinder)
Isavirus[1]		Virus der infektiösen Anämie der Lachse (Infectious Salmon Anemia Virus)
bisher unbenannt[6]	Quaranfilvirus	Quaranfilvirus (QRFV; Zecken, Vögel) Lake Chad-Virus (LKCV; Vögel) Johnston-Atoll-Virus (JAV; Zecken, Vögel)

[1] (Modrow *et al.*, 2003), [2] (Tong *et al.*, 2012), [3] (Osterhaus *et al.*, 2000), [4] (Guo *et al.*, 1983), [5] (Haller und Kochs, 2001), [6] (Presti *et al.*, 2009)

Die Influenzaviren werden aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften und der serologischen Charakteristika in die Gattungen Influenza A, B und C Virus untergliedert (Modrow *et al.*, 2003; Palese und Shaw, 2007). Diese Gattungen unterscheiden sich zusätzlich durch die Anzahl ihrer Genomsegmente und ihres Wirtsspektrums. Influenza A und B Viren besitzen insgesamt acht Genomsegmente. Im Gegensatz dazu weisen Influenza C Viren nur sieben Genomsegmente auf. Diese reduzierte Anzahl von Genomsegmenten der Influenza C Viren ist auf das Genomsegment, welches für das Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF-Protein) kodiert, zurückzuführen. Das HEF-Protein übernimmt die Funktion des viralen Hämagglutinins (HA) und der Neuraminidase (NA), welche in Influenza A und B Viren auf zwei unterschiedlichen Genomsegmenten kodiert werden. Das Wirtsspektrum der Influenza A Viren umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies, wie beispielsweise Wasservögel, Geflügel, Schweine, Pferde, Seehunde, Fledermäuse und den Menschen (Modrow *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2012). Influenza B Viren konnten dagegen bisher ausschließlich aus dem Seehund und dem Menschen isoliert werden (Osterhaus *et al.*, 2000). Ebenfalls ein kleines Wirtspektrum besitzen Influenza C Viren, welche nur in Schweinen und im Menschen nachgewiesen werden konnten (Guo *et al.*, 1983)

Die Influenza A Viren werden aufgrund ihrer Oberflächenglykoproteine HA und NA in unterschiedliche Subtypen klassifiziert (Horimoto und Kawaoka, 2005). Bislang sind insgesamt 17 verschiedene HA- und 9 verschiedene NA-Subtypen bekannt (Tong *et al.*, 2012). Dabei wurde das H17 erst kürzlich aus guatemaltekischen Gelbschulterfledermäusen (*Sturnira lilium*) isoliert. Der Name eines isolierten Virus setzt sich aus dem Virustyp, der Spezies aus der das Virus isoliert wurde, dem Isolationsort, der Isolatnummer, dem Isolatjahr und dem HA- und NA-Subtyp zusammen (Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). Die einzige Ausnahme bei dieser Nomenklatur stellen humane Influenza A Virusisolate dar, bei denen auf die Auflistung der Spezies im Namen verzichtet wird. Die HA-Subtypen H1, H2 und H3 sowie die NA-Subtypen N1 und N2 konnten bisher den Menschen infizieren und sorgten in der Vergangenheit zum Ausbruch von Epidemien und Pandemien in der menschliche Bevölkerung (Horimoto und Kawaoka, 2005). Im Jahr 1933 wurde von Wilson Smith, Sir Christopher Andrewes und Sir Patrick Laidlaw erstmals ein Influenzavirus aus dem Menschen isoliert (A/Wilson-Smith/33 (H1N1)); (Smith *et al.*, 1933). Zusätzlich sind Interspeziestransmissionen von aviären H5-, H7-, H9- und H10- Subtypen auf den Menschen bekannt (Peiris *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2013; WHO, 2013a; To *et al.*, 2014). Diese zeigen jedoch bisher keine anhaltenden Mensch zu Mensch Transmissionen.

1.2 Virionstruktur und Morphologie

Influenza A Viren sind pleomorph und können in zwei unterschiedlichen Formen, der sphärischen oder der filamentösen Form, auftreten (Lamb und Choppin, 1983; Palese und Shaw, 2007). Die sphärische Form besitzt einen Durchmesser von 80-120 nm (Abb. 1). Im Vergleich dazu kann die filamentöse Form, die insbesondere in klinischen Isolaten nachgewiesen wurde, eine Länge von mehreren Mikrometern erreichen (Calder *et al.*, 2010; Rossman und Lamb, 2011). Es wird vermutet, dass virale und zelluläre Determinanten wesentlich zur Morphologie der Viren beitragen (Roberts und Compans, 1998; Roberts *et al.*, 1998). Die Funktion der unterschiedlichen Morphologie ist jedoch bislang ungeklärt (Rossman und Lamb, 2011).

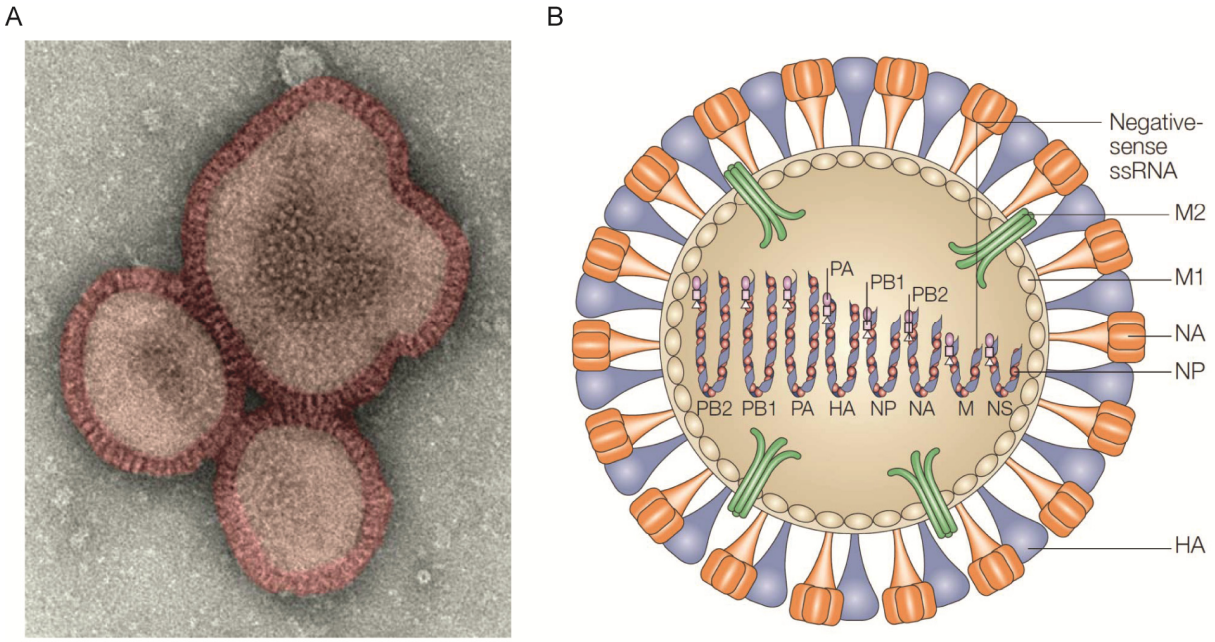


Abb. 1: Morphologie und Aufbau von Influenza A Viren

A) Kolorierte Negativfärbung einer transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme (TEM) von pandemischen H1N1 Viruspartikeln (pH1N1) (A/Hamburg/NY1580/09). Die sphärischen Virionen besitzen einen Durchmesser von 80-120 nm. Die Oberflächenglykoproteine HA und NA sind als Spikes der äußeren Virushülle erkennbar. B) Schematische Darstellung eines Influenza A Viruspartikels (Horimoto *et al.,* 2005). In die äußere Virushülle, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, sind die Oberflächenglykoproteine HA und NA sowie das M2-Protein eingebettet. Die M1-Proteine bilden eine Matrix und umschließen das Virusinnere. Im Inneren des Virus befinden sich die acht viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP). Diese bestehen aus der negativorientierten, einzelsträngigen viralen RNA, den Nukleoproteinen (NP) und den drei Polymeraseuntereinheiten, PB1, PB2 und PA.

Der Viruspartikel, gezeigt in der Abb. 1, besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche von der Zellmembran der Wirtszelle stammt (Kates *et al.*, 1962; Palese und Shaw, 2007). In diese Lipidhülle sind die Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in einem Verhältnis von circa 4:1 eingelagert (Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). Die Glykoproteinfortsätze der beiden Oberflächenmoleküle ragen als extramembraner Anteil, den sogenannten Spikes, aus der Lipidhülle heraus. Des Weiteren ist das

transmembrane Matrixprotein M2 in die Lipidhülle inseriert. Dieses Protein, welches in einem HA zu M2 Verhältnis von 1:10 bis 1:100 vorliegt, dient als Ionenkanalprotein (Zebedee und Lamb, 1988; Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). An die Virushülle ist eine Matrix, bestehend aus dem M1 Protein, die das Virusinnere umschließt, angelagert. Im Inneren des Viruspartikels ist das virale Genom in Form der acht viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP-Komplex) und das Kernexportprotein (NEP, bzw. auch NS2 genannt) lokalisiert. Der Komplex der vRNPs besteht aus der viralen RNA, welche von den Nukleoproteinmonomeren (NP) enkapsidiert ist und der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP), welche aus den basischen PB1- und PB2-Untereinheiten und der sauren PA-Untereinheit aufgebaut ist (Bouvier und Palese, 2008; Resa-Infante *et al.*, 2011). Die virale, heterotrimäre Polymerase ist mit den beiden Enden der vRNA assoziiert.

1.3 Genomaufbau

Das Genom der Influenza A Viren ist etwa 13,6 kb groß und besteht aus acht negativorientierten, einzelsträngigen RNA Genomsegmenten, (-)ssRNA (Modrow *et al.*, 2003). Die Genomsegmente sind, bezogen auf ihre Größe, nummeriert und kodieren nach aktuellem Wissensstand für insgesamt 13 verschiedene, virale Proteine (Tab. 2) (Modrow *et al.*, 2003; Jagger *et al.*, 2012). Die virale RNA liegt im vRNP Komplex in einer korkenzieher-ähnlichen Struktur vor und wird, wie bereits beschrieben, von den Nukleoproteinen enkapsidiert (Compans *et al.*, 1972; Jennings *et al.*, 1983; Hsu *et al.*, 1987; Baudin *et al.*, 1994; Resa-Infante *et al.*, 2011). Die in eine doppelhelikale Haarnadelstruktur gewundenen 5‘- und 3‘-Enden sind mit der viralen RNA-Polymerase assoziiert (Klumpp *et al.*, 1997; Flick und Hobom, 1999; Bouvier und Palese, 2008). Diese hochkonservierte, nichtkodierende Region enthält die Promotorbindestellen, das Polyadenylierungssignal und die Verpackungssignale, die für den Zusammenbau des Viruspartikels essentiell sind (Flick und Hobom, 1999; Bouvier und Palese, 2008; Naffakh *et al.*, 2008). Die vRNA Segmente von NP, HA und NA kodieren für jeweils ein Protein (Modrow *et al.*, 2003). Die PB1-, PB2-, PA-, M- und NS-Genomsegmente können aufgrund von alternativem Spleißen oder eines überlappenden Leserahmens für zwei oder drei Proteine kodieren (Modrow *et al.*, 2003; Palese und Shaw, 2007; Jagger *et al.*, 2012). Die Genomsegmente, die von ihnen kodierten viralen Proteine der Influenza A Viren und ihre Funktion sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Die Genomsegmente der Influenza A Viren und die Funktion ihrer kodierten viralen Proteine

	Größe [bp]	Protein	MW [kDa]	Proteinfunktion
1	2341	PB2	80	basisches Polymeraseprotein 2 Untereinheit des vRNP- und Polymerasekomplexes Erkennung und Bindung der 5'-Cap-Struktur der zellulären mRNA
2	2341	PB1	90	basisches Polymeraseprotein 1 Untereinheit des vRNP- und Polymerasekomplexes RNA-abhängige RNA-Polymerase, Elongation
		PB1-F2	10	reguliert Apoptose und virale Polymeraseaktivität (Knipe und Howley, 2006)
		PB1-N40	82	unbekannte Funktion (Wise *et al.*, 2009)
3	2233	PA	83	saures Polymeraseprotein Untereinheit des vRNP- und Polymerasekomplexes Proteaseaktivität
		PA-X	29	moduliert Immunantwort des Wirtes (Jagger *et al.*, 2012)
4	1778	HA	77	Hämagglutinin Oberflächenglykoprotein Rezeptorbindung, Fusion Antigen
5	1565	NP	55	Nukleoprotein Untereinheit des vRNP-Komplexes RNA-Bindung, RNA-Synthese, vermittelt vRNP Kernimport
6	1413	NA	56	Neuraminidase Oberflächenglykoprotein Sialidaseaktivität, Virusfreisetzung Antigen

7	1027	M1	28	Matrixprotein 1 vRNP-Interaktion, vRNP-Kernexport, Virusfreisetzung
		M2	15	Matrixprotein 2: Membranprotein Ionenkanal, vermittelt Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma, Viruszusammenbau
8	890	NS1	26	Nichtstrukturprotein 1 multifunktionelles Protein Interferonantagonist, Regulierung der zellulären Genexpression
		NS2/NEP	11	Nichtstrukturprotein 2/ Kernexportprotein regulatorisches Protein Funktion bei vRNP-Export

Die viralen Genomsegmente PB2, PA, HA, NP und NA kodieren für jeweils ein virales, gleichnamiges Protein (Palese und Shaw, 2007). Im Vergleich dazu kodieren die viralen Gensegmente 7 und 8 durch alternatives Spleißen für zwei Proteine, M1 und M2 bzw. NS1 und NS2 (Palese und Shaw, 2007). Durch einen alternativen, offenen Leserahmen (ORF) werden aus dem viralen PA-Gensegment die Proteine PA bzw. PA-X und aus dem viralen PB1-Gensegment, die Proteine PB1, PB1-F2 und PB1-N40 kodiert. Die Angaben in der Tabelle stammen von Modrow *et al.*, 2003, Palese *et al.*, 2007, Bouvier *et al.*, 2008 und wurden durch die entsprechend angegebene Literatur erweitert.

1.4 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Influenza A Viren, dargestellt in der Abb. 2, lässt sich in die unterschiedlichen Phasen Adsorption, rezeptorvermittelte Endozytose, Membranfusion und Freisetzung der vRNPs, Transkription und Replikation, Synthese neuer viraler Proteine sowie die Zusammenlagerung und Freisetzung neuer Virionen unterteilen (Wilschut *et al.*, 2006; Palese und Shaw, 2007; Neumann *et al.*, 2009). Im Menschen findet die Virusreplikation hauptsächlich in den Epithelzellen des Respirationstraktes statt.

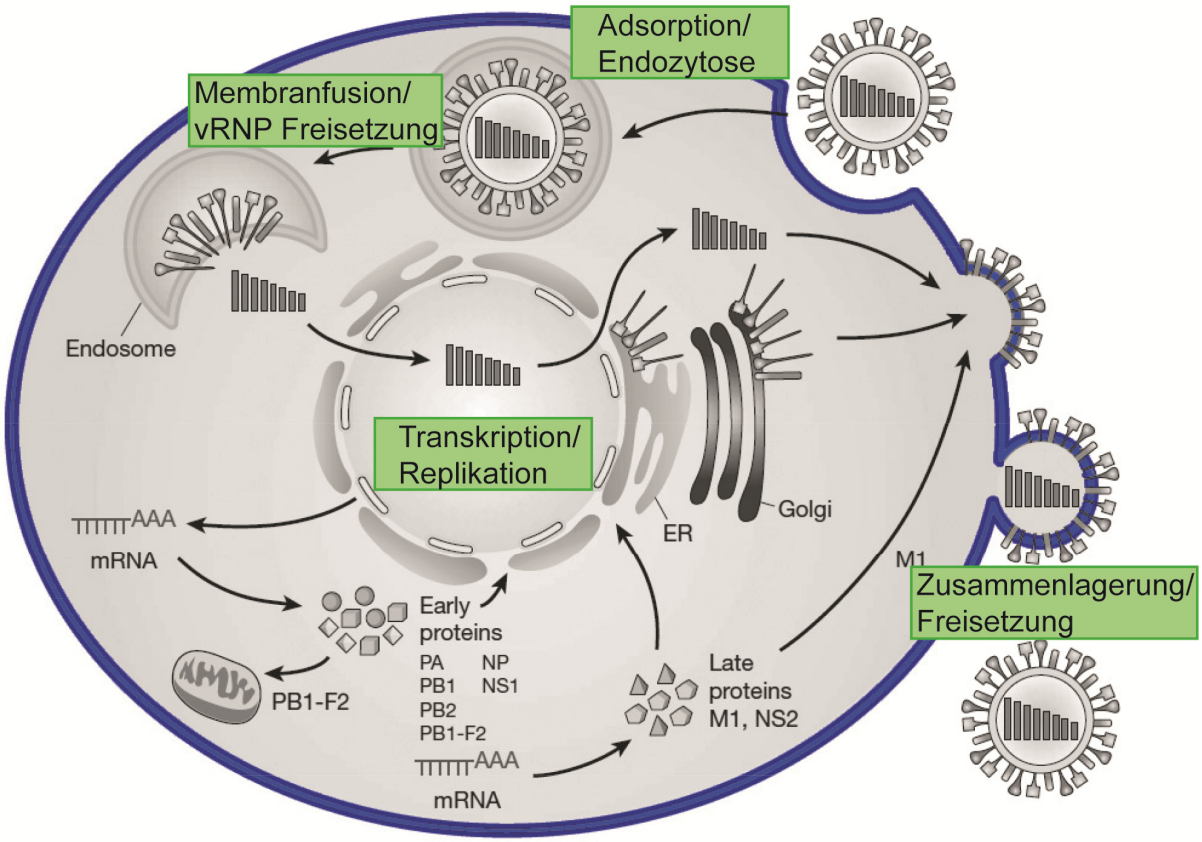


Abb. 2: Replikationszyklus der Influenza A Viren

Das virale HA-Protein erkennt und bindet *N*-Acetylneuraminsäuren auf der Zelloberfläche des Wirts (modifiziert nach Neumann *et al.,* 2009). Diese Bindung ermöglicht die rezeptorvermittelte Endozytose des Viruspartikels. Im Anschluss kommt es zur Membranfusion und zur Freisetzung der viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP) in das Zytoplasma der Wirtszelle. Mit Hilfe der zellulären Importmaschinerie gelangen die vRNPs in den Nukleus, in dem die Transkription und Replikation stattfinden. Die virale mRNA wird translatiert und die neu entstandenen, frühen viralen Proteine werden für die weitere Transkription und Replikation aus dem Zytoplasma wieder in den Nukleus transportiert. Synthetisierte Proteine der späten Phase der Transkription gelangen zur Zellmembran. Zusammen mit den neu synthetisierten und mittels M1 und NS2 exportierten vRNPs findet an der Zellmembran der Zusammenbau der neuen Virionen statt. Abschließend kommt es zur Abknospung und Freisetzung der neuen Virionen.

1.4.1 Adsorption und rezeptorvermittelte Endozytose

Die virale Rezeptorbindedomäne des Hämagglutinins ist im globulären Kopf des HA_1 lokalisiert (Skehel und Wiley, 2000; Modrow *et al.*, 2003; Palese und Shaw, 2007). Diese erkennt und bindet die endständigen, Galaktose-konjugierten *N*-Acetylneuraminsäuren zellulärer Glykoproteine oder Glykolipide der Zellmembran. Auf den Epithelzellen befinden sich hauptsächlich α2,3- oder α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren. Aviäre Influenzaviren binden präferentiell an die α2,3-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, welche in den Epithelzellen der Trachea und des Darms von Vögeln vorkommen (Connor *et al.*, 1994; Bouvier und Lowen, 2010). Das HA humaner Influenzaviren interagiert bevorzugt mit α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, die überwiegend auf der Zellmembran der Epithelzellen des humanen Respirationstrakts lokalisiert sind. Im menschlichen Wirt wurden

im Respirationstrakt jedoch auch α2,3-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren detektiert (Matrosovich *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006; Bouvier und Palese, 2008). Die Lokalisation dieser Rezeptoren unterscheidet sich jedoch von denen der α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren. Die α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren sind insbesondere im oberen Respirationstrakt zu finden, die α2,3-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren kommen im unteren Respirationstrakt vor. Damit besitzt das Hämagglutinin eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Erkennung der Wirtszelle und ist somit eine wichtige Determinante der Wirtsspezifität (Horimoto und Kawaoka, 2005; Matrosovich *et al.*, 2009). Die Adaptation der Viren an einen neuen Wirt wird durch den Erwerb wirtsadaptiver Signaturen, insbesondere im Bereich der HA-Rezeptorbindedomäne sowie der Polymerase, begünstigt (Klenk *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2013). Die Bindung der Viren an die Zelloberfläche kann jedoch auch von anderen Faktoren der Wirtszelle beeinflusst werden (de Vries *et al.*, 2012; Nicholls *et al.*, 2012). Nach der Rezeptorbindung erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose (Matlin *et al.*, 1981; Palese und Shaw, 2007). Dabei gelangen die Viruspartikel hauptsächlich durch Clathrin-umhüllte Vesikel in die Wirtszelle.

1.4.2 Membranfusion und Freisetzung der vRNPs

Eine Ansäuerung des Endosoms auf einen pH-Wert von fünf bis sechs wird durch Protonenpumpen erreicht (Skehel und Wiley, 2000; Stegmann, 2000; Cross *et al.*, 2001; Palese und Shaw, 2007). Durch den sauren pH-Wert wird eine Konformationsänderung des Hämagglutinins ausgelöst. Die Voraussetzung für die Konformationsänderung ist das Vorliegen einer funktionellen HA_2-Untereinheit. Dazu muss das Vorläuferprotein HA_0 zuvor durch zelluläre Proteasen in die Untereinheiten HA_1 und HA_2 gespalten und damit aktiviert worden sein (Klenk *et al.*, 1975; Steinhauer, 1999; Klenk *et al.*, 2008). Bei der Konformationsänderung kommt es zur Freilegung des Fusionspeptids, welches am Aminoterminus der HA_2-Untereinheit lokalisiert ist (Skehel und Wiley, 2000; Stegmann, 2000; Cross *et al.*, 2001; Palese und Shaw, 2007). Dieses Peptid interagiert anschließend mit der Endosomenmembran. Durch die Fusion des viralen Hämagglutinins mit der Endosomenmembran entsteht eine Pore. Zusätzlich zur Ansäuerung des Endosoms kommt es zu einem H^+-Einstrom durch den M2-Ionenkanal in das Innere des Virions (Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). Dadurch wird die Bindung zwischen den M1-Proteinen und den vRNP-Komplexen gelöst und es kommt zu einer Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma der Wirtszelle (Martin und Helenius, 1991; Helenius, 1992; Palese und Shaw, 2007). Dieser Prozess wird auch als *uncoating* bezeichnet (Palese und Shaw, 2007). Influenza A Viren transkribieren und replizieren, im Vergleich zu den meisten anderen RNA-Viren, ihr Genom im Zellkern der Wirtszelle. Für den Transport der vRNPs vom Zytoplasma

in den Zellkern wird die Kernimportmaschinerie der Wirtszelle genutzt (Cros und Palese, 2003; Resa-Infante und Gabriel, 2013).

1.4.3 Transkription und Replikation

Die in den Zellkern transportierten vRNP-Komplexe dienen zur Transkription und Replikation des viralen Genoms (Hay *et al.*, 1977; Hay und Skehel, 1979; Krug *et al.*, 1987; Palese und Shaw, 2007). Dabei stellt jeder der acht viralen RNPs, dargestellt in Abb. 3, eine eigene Replikations- und Transkriptionseinheit dar.

Der Prozess der Transkription zur Synthese der viralen mRNA beginnt mit dem sogenannten *Cap-Snatching* (Plotch *et al.*, 1981; Palese und Shaw, 2007; Guilligay *et al.*, 2008; Ruigrok *et al.*, 2010). In diesem Prozess wird die 5'-m7G-Cap-Struktur von der prä-mRNA des Wirts durch die virale Polymerase abgespalten und zur Generierung viraler mRNA verwendet. Dazu erkennt das PB2-Protein die Cap-Struktur der zellulären prä-mRNA und bindet diese. Anschließend kommt es zur Anlagerung der Cap-Struktur und der ersten Nukleotide der zellulären prä-mRNA an die 3'-Enden der viralen RNA. Das terminale Nukleotid Uridin der vRNA-Segmente hybridisiert mit einem Adeninrest in den ersten 10-13 Nukleotiden der prä-mRNA. Anschließend wird die prä-mRNA durch die Endonukleaseaktivität der PA-Untereinheit hinter dem Adenin abgespalten, wodurch ein freies 3'-OH-Ende entsteht, welches als Primer zur weiteren RNA-Synthese dient (Fodor *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2009). Die Initiierung der viralen mRNA-Synthese und die mRNA-Elongation werden durch die Nukleotidyltransferasedomäne der PB1-Untereinheit katalysiert (Ruigrok *et al.*, 2010). Dabei wird die vRNA als Matrize verwendet. Am Ende der viralen mRNA-Synthese findet eine Polyadenylierung statt, indem die fünf bis sieben Uracilresten am 5'-Ende der vRNA komplementär synthetisiert werden (Li und Palese, 1994). Dadurch entsteht das 3'-Poly(A)-Signal. Die Polyadenylierung der viralen mRNA unterscheidet sich somit von der Polyadenylierung der zellulären mRNA, die durch eine spezifische Poly(A)-Polymerase durchgeführt wird. Zusätzlich zur viralen mRNA-Synthese wird aufgrund des *Cap-Snatching* die zelluläre Replikation inhibiert, wodurch der Stoffwechsel der Wirtszelle stark beeinträchtigt wird (Palese und Shaw, 2007).

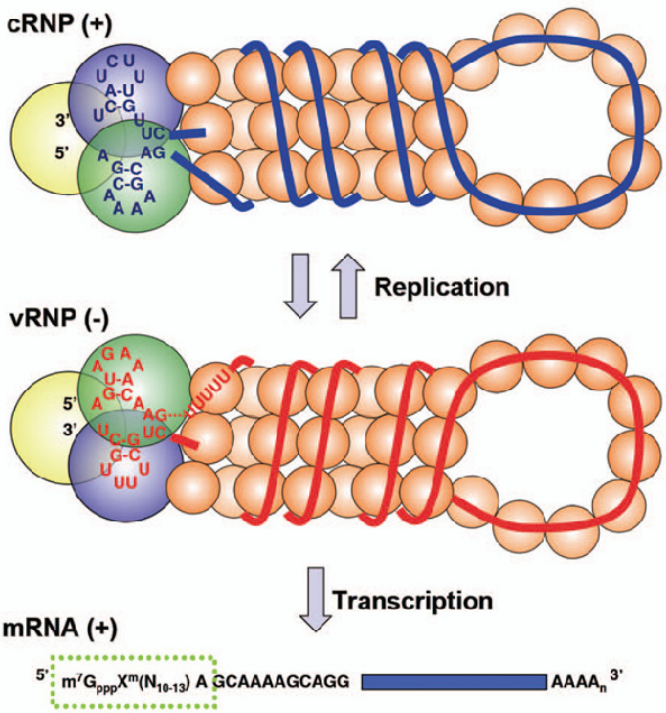


Abb. 3: Replikation und Transkription von Influenza A Viren

Die viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP) bestehen aus der negativorientierten, einzelsträngigen RNA ((-)ssRNA, rot), den Nukleoproteinen (orange) und dem Polymerasekomplex (PB1 in blau, PB2 in grün, PA in gelb) (Resa-Infante *et al.*, 2011). Der Promotor und das Polyadenylierungssignal (oligo U) sind in roter Schrift gekennzeichnet. Die vRNA des vRNP-Komplexes dient als Matrize zur Generierung der viralen mRNA während der Transkription und der cRNA während der Replikation. Die mRNA besitzt eine Cap-Struktur und einen Poly(A)-Schwanz. Die cRNPs enthalten eine positivorientierte, einzelsträngige RNA ((+)ssRNA, blau), Nukleoproteine und den Polymerasekomplex und gelten als Replikationsintermediate.

Die virale Transkription kann in eine frühe und eine späte Phase untergliedert werden (Lamb und Choppin, 1983; Neumann *et al.*, 2004; Palese und Shaw, 2007). In der frühen Transkriptionsphase wird insbesondere die mRNA von PB2, PB1, PA, NP, PB1-F2 und NS1 generiert. Die neu synthetisierten Proteine des RNP-Komplexes werden benötigt, um die durch die Virusreplikation entstehende cRNA und vRNA zu stabilisieren und somit die cRNP- und vRNP-Komplexe herzustellen (Resa-Infante *et al.*, 2011). Die Bestandteile der vRNPs dienen zur Interaktion mit zellulären Faktoren, wodurch eine effiziente Virusreplikation ermöglicht wird. Des Weiteren können auch die früh synthetisierten PB1-F2- und NS1-Proteine mit den zellulären Faktoren interagieren und dadurch die Immunantwort des Wirts herab regulieren (Kochs *et al.*, 2007; Marazzi *et al.*, 2012). In der späten Transkriptionsphase werden insbesondere die HA-, NA- und M1-Gensegmente für die anschließende Generierung neuer Viruspartikel transkribiert (Palese und Shaw, 2007).

Für die Virusreplikation wird zunächst eine einzelsträngige, positivorientierte cRNA generiert, welche anschließend als Matrize zur Generierung neuer vRNA dient (Lamb und Choppin, 1983; Palese und Shaw, 2007; Naffakh *et al.*, 2008). Sowohl die cRNA als auch die neu synthetisierte vRNA liegen durch das NP enkapsidiert vor und sind zusätzlich mit dem

Polymerasekomplex assoziiert (Resa-Infante *et al.*, 2011; Fodor, 2013; York *et al.*, 2013). Diese werden dann entsprechend cRNP- bzw. vRNP-Komplexe genannt. Zur Bildung dieser Komplexe müssen zuerst, wie bereits beschrieben, die neu synthetisierten viralen Proteine vorliegen. Die Virusreplikation findet primer-unabhängig statt und der Promotor liegt in den nicht-kodierenden Bereichen der viralen RNA-Segmente (Naffakh *et al.*, 2008). Die neu entstandenen vRNPs dienen anschließend zur Transkription, der nochmaligen viralen Replikation und als Gensegmente eines neuen Viruspartikels.

1.4.4 Synthese neuer viraler Proteine

Zur Synthese neuer viraler Proteine wird die Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle genutzt (Palese und Shaw, 2007; Zheng und Tao, 2013). Die virale mRNA, welche mit einer Cap-Struktur und polyadenyliert vorliegt, wird in das Zytoplasma exportiert und dort an den Ribosomen translatiert. Die exprimierten viralen Proteine werden entweder mit der zellulären Kernimportmaschinerie wieder zurück in den Nukleus transportiert oder sie dienen im späteren Replikationszyklus zum Zusammenbau neuer Virionen. Insbesondere die Untereinheiten des RNP-Komplexes, welche ein Kernlokalisationssignal (*nuclear localization signal,* NLS) besitzen, werden zur Generierung von cRNP oder vRNP-Komplexen während der Virusreplikation wieder in den Nukleus importiert. Die Translation der membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 findet am rauen endoplasmatischen Retikulum statt (Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). Anschließend werden die Proteine im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und zur Zellmembran transportiert. Für Hämagglutinine mit einer multibasischen Spaltstelle kann im Trans-Golgi-Netzwerk bereits die Aktivierung durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins HA_0 in HA_1 und HA_2 erfolgen (Steinhauer, 1999; Palese und Shaw, 2007; Klenk *et al.*, 2008).

1.4.5 Zusammenlagerung und Freisetzung neuer Virionen

Die membranassoziierten Proteine besitzen apikale Signale, wodurch sie zur Zellmembran an der die Viruszusammenlagerung stattfindet, transportiert werden (Modrow *et al.*, 2003; Palese und Shaw, 2007; Bouvier und Palese, 2008). Das Matrixprotein M1 assoziiert im Nukleus mit den neu synthetisierten vRNPs. Anschließend bindet dieser Komplex an das Kernexportprotein NEP/NS2 und leitet damit den Export ein. NEP/NS2 nutzt den zellulären Kernexportfaktor Crm1 zum Transport durch die Kernpore. Die Komplexe werden anschließend zu den Stellen der Zellmembran transportiert, in denen die viralen HA-, NA- und M2-Proteine bereits eingelagert sind. Die Zusammenlagerung der acht verschiedenen viralen Genomsegmente eines Viruspartikels ist ein höchst komplexer Prozess und noch nicht vollständig verstanden.

Die Freisetzung der neuen Virionen durch Abknospung wird wahrscheinlich durch die Anreicherung der M1-Proteine an der Innenseite der Zellmembran eingeleitet (Nayak *et al.*, 2004; Palese und Shaw, 2007; Rossman und Lamb, 2011). Dazu wird die Membran zuerst ausgestülpt und anschließend abgeschnürt (Nayak *et al.*, 2004; Rossman und Lamb, 2011). Durch die Bindung des HA-Proteins an die *N*-Acetylneuraminsäuren muss zur Freisetzung der neuen Virionen eine Spaltung dieser Verbindung stattfinden. Für diesen Prozess ist das virale NA-Protein verantwortlich, welches die *N*-Acetylneuraminsäure einerseits vom Viruspartikel und andererseits von der Zelloberfläche abspaltet (Palese *et al.*, 1974b; Colman *et al.*, 1983; Palese und Shaw, 2007). Dadurch wird die Voraussetzung gegeben, dass freigesetzte Virionen neue Zellen infizieren können und nicht erneut an bereits infizierte Zellen binden (Bouvier und Palese, 2008).

1.5 Wirtsspektrum und Evolution

Das natürliche Reservoir der Influenza A Viren sind wildlebende Wasservögel (Halvorson *et al.*, 1983; Webster *et al.*, 1992; Klenk *et al.*, 2008; Naffakh *et al.*, 2008). Insbesondere in den Ordnungen der *Anseriformes* und *Charadriiformes* zirkulieren 16 der 17 bekannten HA-Subtypen und alle 9 NA-Subtypen. Das Influenzavirus ist in seinem natürlichem Reservoir gut an den Wirt angepasst und es kommt in der Regel zu keiner symptomatischen Erkrankung des Wirts (Horimoto und Kawaoka, 2005). Das Virus wird über kontaminiertes Wasser und Futter von den Vögeln aufgenommen und repliziert insbesondere in den Epithelzellen des Intestinaltraktes (Webster *et al.*, 1992). Anschließend wird es über die Exkremente wieder ausgeschieden. Ohne einen Selektionsdruck können die Viren stabil in ihrem natürlichen Reservoir zirkulieren. Die Übertragung der Viren auf andere Spezies geht mit dem breiten Wirtsspektrum dieser Viren einher. Dabei umfasst das Wirtsspektrum der Influenza A Viren andere Vogelarten und Säugetiere, wie beispielsweise Schweine, Pferde, Fledermäuse, Seehunde, Delfine und Wale. (Shope, 1931; Webster *et al.*, 1981; Scholtissek *et al.*, 1983; Webster *et al.*, 1992; Naffakh *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2012). Influenza A Viren besitzen ein zoonotisches Potenzial und können vom Tier auf den Menschen übergehen (Webster *et al.*, 1992). Dabei werden die Viren entweder direkt vom Vogel auf den Menschen oder indirekt durch einen Zwischenwirt, meist Schweine, auf den Menschen übertragen (Scholtissek, 1990; Subbarao und Katz, 2000; Horimoto und Kawaoka, 2005; Taubenberger und Morens, 2006; Ma *et al.*, 2008).

Ist der neue Wirt immunologisch naiv gegenüber dem Virussubtyp kommt es zu Erkrankungen unterschiedlichen Ausmaßes (Webster *et al.*, 1992). Findet nach der Interspeziestransmission eine Adaptation des Virus an den neuen Wirt statt, so kann sich eine neue stabile Viruslinie etablieren. Bei dem Übergang von der einen auf eine andere

Spezies kommt es rasch zu einer Anhäufung von Mutationen, wobei sich Mutationen mit einem Selektionsvorteil durchsetzen. Dadurch kommt es zur Anpassung an den neuen Wirt, die mit der Ausbildung spezifischer Wirtssignaturen einhergehen (Klenk *et al.*, 2011).

Die Infektion von domestiziertem Geflügel mit hochpathogenen aviären Influenza A Viren (HPAIV) und deren effiziente Transmission in diesen Tieren führte in der Vergangenheit zu einer hohen Letalität und zum Keulen infizierter Tierbestände (Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Auch in anderen Nutztieren, wie dem Schwein und dem Pferd, führen Infektionen mit Influenzaviren zu Atemwegserkrankungen (Naffakh *et al.*, 2008). Durch den Ausbruch der Geflügelpest wird zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer Interspeziestransmission von diesen hochpathogenen aviären Influenzaviren auf den Menschen erhöht (Subbarao und Katz, 2000; Fouchier *et al.*, 2004; Beigel *et al.*, 2005). Damit kommt diesen Viren, auf die in den Abschnitten 1.6 und 1.7.3 dieser Arbeit noch einmal detailliert eingegangen wird, eine besondere medizinische, soziale und auch ökonomische Bedeutung zu (Wilschut *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008). Eine beträchtliche Bedrohung für die menschliche Bevölkerung geht jedoch auch von den humanen Influenzavirussubtypen H1, H2, H3, N1 und N2 aus, welche in den Abschnitten 1.7.1 und 1.7.2 näher beschrieben werden (Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007; WHO, 2013a). Diese führen jährlich zum Auftreten von lokal begrenzten Epidemien. Zusätzlich besitzen sie das Potenzial Pandemien zu verursachen, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen.

Die Evolution des Influenza A Virus wird im Wesentlichen durch das Auftreten von Punktmutationen und von der Reassortierung der einzelnen Genomsegmente vorangetrieben (Webster *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2007). Veränderungen der Oberflächenglykoproteine tragen dabei am stärksten zur Evolution dieser Viren bei. Die hohe Mutationsrate der Influenzaviren wird durch die virale Polymerase, welche keine Korrekturlesefunktion besitzt, verursacht. Die meisten dadurch entstehenden, genomisch veränderten Virusvarianten sind nicht replikationsfähig. Einige besitzen jedoch einen Selektionsvorteil und setzen sich durch. Dadurch ist eine schnelle Anpassung an den Wirt gegeben. Im Vergleich zur Punktmutation kommt es bei Influenzaviren auch zur sogenannten Reassortierung. Wird ein Wirt gleichzeitig von zwei unterschiedlichen Influenzaviren infiziert, so können aufgrund des segmentierten Genoms die acht Genomsegmente beider Viren in der infizierten Zelle reassortiert werden. Eine besondere Relevanz für diesen Reassortierungsprozess besitzt das Schwein, welches sowohl α2,3- als auch α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren im Respirationstrakt besitzt (Scholtissek, 1990; Ito *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2008). Durch das Vorhandensein von α2,3- und α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren können sie sowohl von aviären als auch von

humanen Influenzaviren infiziert werden kann. Aus diesem Grund wird das Schwein auch als Mischgefäß (*mixing vessel*) bezeichnet.

Aufgrund von Punktmutationen und Reassortierungen in den Oberflächenglykoproteine können antigenische Bereiche verändert werden (Webster *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2007). Durch Punktmutationen kann es zu einem Antigendrift kommen. Bei diesem Antigendrift handelt es sich um eine leichte Veränderung der Antigenität, durch die Epidemien ausgelöst werden können. Im Gegensatz dazu kann durch eine Reassortierung oder eine Punktmutation ein Antigenshift stattfinden. Ein Antigenshift ist eine starke Veränderung bzw. Verschiebung der Antigenität, welche zum Ausbruch einer Pandemie führen kann.

1.6 Influenzavirusinfektionen im Vogel

Bei den Influenzaviren des Vogels werden die niedrigpathogenen und die hochpathogenen aviären Influenza A Viren unterschieden (Horimoto und Kawaoka, 2005; Wright *et al.*, 2007; Klenk *et al.*, 2008). Die niedrigpathogenen, aviären Influenza A Viren (*low pathogenic avian influenza virus*, LPAIV) zeigen eine geringe Virulenz und einen milden, zumeist asymptomatischen Krankheitsverlauf. Unter den LPAIV sind die HA-Subtypen H1-H16 vertreten. Ein besonderes Kennzeichen dieser LPAIV ist die monobasische Spaltstelle des HA_0 Proteins, welche durch trypsinartige Proteasen der Epithelzellen des Intestinaltrakts gespalten wird (Webster und Rott, 1987; Klenk *et al.*, 2008). Im Vergleich dazu führen hochpathogene aviäre Influenza A Viren (*highly pathogenic avian influenza virus,* HPAIV) zu einer klassische Geflügelpest, die mit einer systemischen Infektion und einer hohen Letalität einhergeht (Horimoto und Kawaoka, 2005; Wright *et al.*, 2007; Klenk *et al.*, 2008). Typische Krankheitszeichen sind Symptome einer Atemwegserkrankung sowie Sinusitis, stark erhöhter Tränenfluss, Diarrhöe, verringerte Eiproduktion, Zyanose, Ödeme, gesträubtes Federkleid sowie neurologische Störungen (Schäfer, 1955; Webster *et al.*, 1992). Die H5- und H7-Subtypen mit einer multibasischen Spaltstelle in ihrem HA_0-Protein gehören meist zu den HPAIV (Webster und Rott, 1987; Stieneke-Grober *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1992; Klenk *et al.*, 2008). Zur Aktivierung des HA-Proteins wird das HA_0-Vorläuferprotein durch Furin oder Subtilisin-ähnliche Proteasen in HA_1 und HA_2 gespalten. Da diese Proteasen ubiquitär vorkommen, können HPAIV zu einer systemischen Infektion mit einer hohen Virulenz führen.

1.7 Influenzavirusinfektionen im Menschen

Das Influenzavirus ist ein humanpathogenes Virus, welches den Menschen infizieren und zu einer klassischen Grippeinfektion, einer Infektion des Respirationstrakts, führen kann (Wright

et al., 2007; WHO, 2013a). Je nach Virussubtyp und dem Gesundheitszustand des Infizierten verläuft die Virusinfektion unterschiedlich stark. Die in der Bevölkerung zirkulierenden Influenza A Viren lösen jährlich lokal begrenzte Epidemien aus, auf die im Abschnitt 1.7.1 eingegangen werden soll. Durch die fortwährende Evolution des Virus besitzt das Virus ebenfalls das Potenzial durch einen Antigenshift Pandemien zu verursachen. Die humanen Influenzaviren mit dem Subtyp H1, H2, H3, N1, und N2 waren in den letzten beiden Jahrhunderten für die Entstehung von Pandemien verantwortlich (1.7.2.). Anschließend zirkulierten diese Viren als saisonale Influenzaviren weiterhin in der humanen Bevölkerung. Besonderes Augenmerk gilt jedoch auch den aviären Influenzaviren die sporadisch zu einer Interspeziestransmission vom Vogel auf den Menschen führen (1.7.3). Im humanen Wirt weisen insbesondere HPAIV eine hohe Morbidität und Mortalität auf.

1.7.1 Saisonale Influenza

Die saisonalen Influenzaviren zirkulieren in der menschlichen Bevölkerung und verursachen in den Wintermonaten Epidemien (WHO, 2013a). Diese Viren lösen meist einen milden Krankheitsverlauf aus. Aber insbesondere Menschen die den Risikogruppen zugeordnet werden, können einen schweren Krankheitsverlauf aufweisen. Zu den Risikogruppen gehören Kinder unter zwei Jahren, Erwachsene ab dem 65. Lebensjahr, immunsupprimierte Menschen, schwangere Frauen und Menschen mit chronischen Vorerkrankungen, wie beispielsweise Asthma, chronische Herzerkrankungen oder Diabetes (CDC, abgerufen am 22.01.2014; WHO, abgerufen am 22.01.2014b). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden weltweit jährlich drei bis fünf Millionen Infizierte mit einem schweren Krankheitsverlauf gemeldet, wobei 250.000 bis 500.000 Menschen an den Folgen der Infektion versterben (WHO, abgerufen am 22.01.2014b). Aufgrund der hohen Mutationsrate der Influenzaviren kann sich die Antigenität verändern und einen Antigendrift zur Folge haben (Wright *et al.*, 2007). Dadurch werden vor allem Epidemien ausgelöst. Aufgrund dieser Variabilität müssen Vakzine zur Prävention einer Infektion jährlich an die zirkulierenden Viren angepasst werden. Aktuell zirkulieren die Subtypen H1N1 (pH1N1) und H3N2 in der Bevölkerung (WHO, 2013a). Das pH1N1 Virus hat das vor 2009 zirkulierende, alte saisonale H1N1 Influenzavirus ersetzt. Neben den Influenza A Viren zirkulieren die Victoria- und die Yamagata-Linie der Influenza B Viren. Das Phänomen, dass die Influenzavirusinfektionen insbesondere in den Wintermonaten auftreten, ist noch nicht vollständig geklärt (Dowell, 2001). Es wurde jedoch gezeigt, dass Influenzaviren bei niedrigen Temperaturen und trockener Luft stabiler sind (Shaman und Kohn, 2009). Zusätzlich wird vermutet, dass durch Menschenansammlungen in geschlossenen Räumlichkeiten die Übertragbarkeit der Viren erhöht wird (Cauchemez *et al.*, 2008). Eine

leichtere Anfälligkeit für Influenzavirusinfektionen in der kälteren Jahreszeit kann beispielsweise auch durch Heizungsluft gereizte Nasenschleimhäute bestehen (Salah *et al.*, 1988).

1.7.2 Pandemische Influenza

Durch eine antigenisch neue Viruslinie kann es zum Ausbruch einer Pandemie kommen (Wright *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2009). Aufgrund des Fehlens einer Immunität der immunologisch naiven Bevölkerung gegen das neue Virus kommt es zu einer globalen, sprich Länder- und Kontinente übergreifenden Ausbreitung des Virus, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen können (WHO, 2013a). Die Influenzavirus-pandemien des 20. und 21. Jh., dargestellt in der Abb. 4, wurden durch die HA-Subtypen H1, H2 bzw. H3 und die NA-Subtypen N1 bzw. N2 ausgelöst.

Durch die Spanische Grippe (H1N1) starben von 1918-1919 weltweit circa 50 Millionen Menschen (Johnson und Mueller, 2002). Sie ist somit bis heute die Pandemie mit der höchsten Mortalitätsrate. Dabei scheint das Influenzavirus direkt vom Vogel auf den Menschen übertragen worden zu sein (Reid *et al.*, 2004; Taubenberger und Morens, 2006). Den Ursprung hat diese Pandemie vermutlich in den USA (Wright *et al.*, 2007). Nach der ersten, relativ mild verlaufenden Pandemiewelle im Frühjahr 1918 folgten zwei weitere, schwer verlaufende Wellen im Herbst 1918 bzw. Frühjahr 1919 (Johnson und Mueller, 2002; Wright *et al.*, 2007). Ein besonderes Merkmal der Spanischen Grippe ist die hohe Mortalitätsrate bei jungen Erwachsenen. Der prozentuale Anteil der Todesfälle der 20 bis 40 Jährigen in der USA lag bei 50 % (Simonsen *et al.*, 1998), wobei der genaue Grund dafür noch nicht vollständig geklärt ist. Die meisten Patienten verstarben an einer schweren Pneumonie mit Atemversagen (Wright *et al.*, 2007). Die Ursachen der hohen Mortalität werden in den schlechten Lebensumständen in der Zeit des ersten Weltkriegs vermutet. Viele der fatalen Fälle wiesen eine sekundäre, bakterielle Pneumonie auf, die zu jener Zeit noch nicht mit Antibiotika therapiert werden konnte (Morens *et al.*, 2008).

Die zweite Pandemie des 20. Jh. war die Asiatische Grippe (H2N2), welcher 1 bis 1,5 Millionen Menschen von 1957 bis 1958 zum Opfer fielen (Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Der Ursprung dieser Pandemie lag in Südchina (Potter, 2001; Wilschut *et al.*, 2006). Von dort aus breitete sich das Influenzavirus wahrscheinlich über Singapur und Hongkong nach Europa, Afrika und Nord- sowie Südamerika aus. Insgesamt wurden in dieser Pandemie zwei Wellen beobachtet. Die meisten Todesfälle traten im Gegensatz zur Spanischen Grippe bei sehr jungen Infizierten oder Patienten im höheren Alter auf (Wright *et al.*, 2007). Das H2N2 Virus war eine Reassortante eines aviären und eines humanen Virus

(Scholtissek *et al.*, 1978; Kawaoka *et al.*, 1989). Die H2-, N2- und PB1-Gensegmente waren aviären Ursprungs und wurden in die Influenzaviren eingeführt, die in der damaligen Bevölkerung zirkulierten.

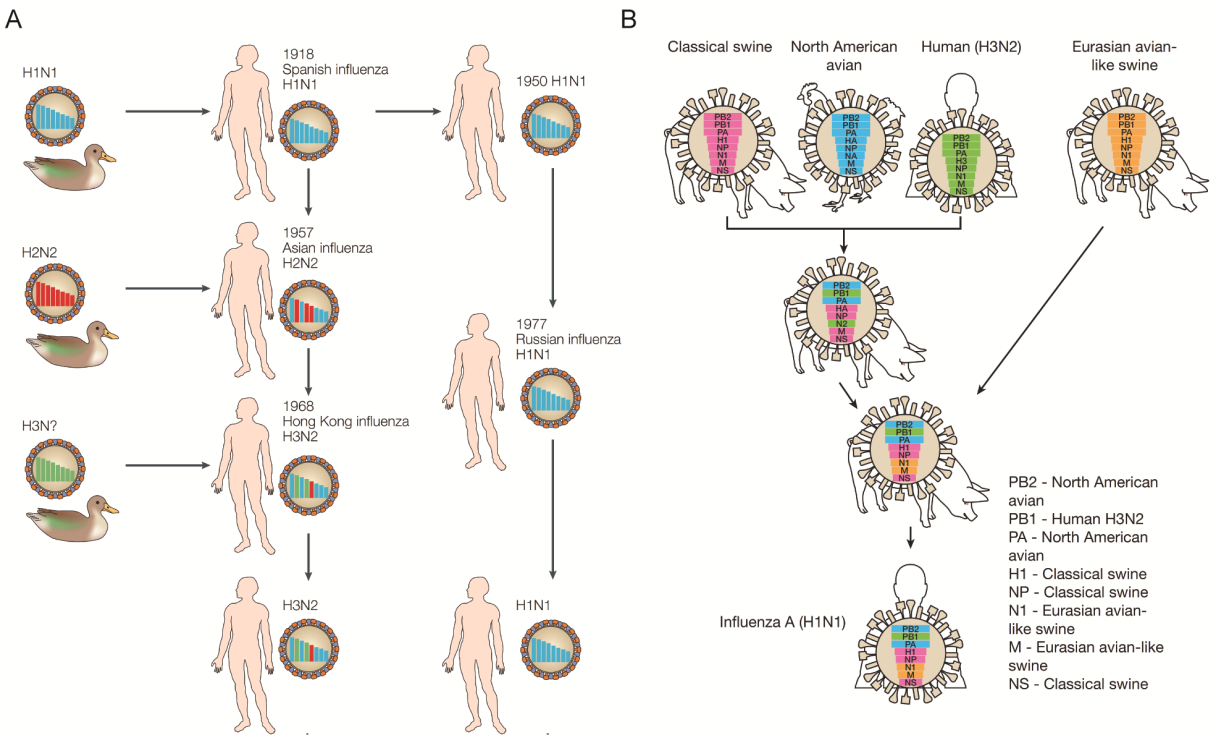


Abb. 4: Influenza-Pandemien

A) Die Spanische Grippe von 1918 wurde vermutlich durch eine Interspeziestransmission eines aviären H1N1 Influenza A Virus auf den Menschen ausgelöst (modifiziert nach Neumann *et al.,* 2009). Die Asiatische und die Hongkong Grippe entstanden durch die Reassortierung eines neuen aviären Influenzavirus mit dem damals in der Bevölkerung zirkulierenden Influenzavirus. An dem Ausbruch von Influenzavirusinfektionen in Russland 1977 scheint ein versehentlich freigesetztes Laborvirus verantwortlich gewesen zu sein, welches große Ähnlichkeit mit den im Jahr 1950 zirkulierenden Viren aufwies (modifiziert nach Horimoto *et al.* 2005) B) In den späten 1990er Jahren reassortierte ein humanes H3N2 Virus, ein nordamerikanisches Vogelvirus und ein klassisches Schweinevirus. Dieses Virus zirkulierte in der nordamerikanischen Schweinepopulation. Die Dreifachreassortante reassortierte mit einem eurasischen, aviär-ähnlichen Schweinvirus und wurde vermutlich direkt auf den Menschen übertragen. Dieses pH1N1 Virus löste die 2009 Pandemie aus.

Circa 500.000 bis 1 Million Todesfälle hatte die Hongkong Grippe (H3N2) in den Jahren von 1968-1970 zur Folge (Wilschut *et al.*, 2006). Das erste Isolat stammte aus Hongkong, wodurch die Pandemie ihren Namen erhielt. Die Pandemie ging wie die Asiatische Grippe mit zwei Infektionswellen einher (Wright *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2009). Bei diesem neuen Virus handelte es sich um eine human-aviäre Reassortante bei der in das damals zirkulierende Virus ein aviäres H3- und PB1-Gensegment integriert wurden (Scholtissek *et al.*, 1978; Kawaoka *et al.*, 1989; Horimoto und Kawaoka, 2005).

Das H1N1 Virus der Russischen Grippe von 1977-1978 wurde zuerst in China gemeldet und trat hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre auf (Neumann *et al.*, 2009). Das Virus wies große Ähnlichkeit zu einem H1N1 Virus auf, welches in den frühen 1950er Jahren zirkulierte (Nakajima *et al.*, 1978; Wright *et al.*, 2007). Aufgrund dieser hohen Ähnlichkeit wird davon

ausgegangen, dass es sich bei diesem Virus um ein unbeabsichtigt freigesetztes Laborvirus handelt (Kilbourne, 2006; Wright *et al.*, 2007). Die Russische Grippe verlief relativ mild da ein Großteil der Bevölkerung mit diesem Virus bereits Kontakt hatte und Antikörper aufwies (Horimoto und Kawaoka, 2005). Die schwersten Krankheitsfälle wurden bei den 7 bis 14 Jährigen festgestellt (Wilschut *et al.*, 2006). Im Vergleich zu den vorherigen Pandemien ersetzte das H1N1 Virus das zirkulierende H3N2 Virus nicht, sondern zirkulierte bis 2009 parallel in der Bevölkerung (Neumann *et al.*, 2009).

Die letzte Pandemie in 2009 wurde durch das pH1N1 Influenzavirus ausgelöst (Dawood *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Die ersten Fälle der 2009 H1N1 Influenza wurden im Februar 2009 gemeldet. Im März und April 2009 stieg die Anzahl der mit Influenzavirus infizierten Patienten weiterhin an. Erst Ende April 2009 wurde durch das Auftreten von pH1N1 Infektionen in den USA und durch die Bestätigung eines neu vorliegenden H1N1 Virus die Pandemie von der WHO ausgerufen. Weltweit zeigten sich abhängig von der Region unterschiedliche Infektionswellen (Dorigatti *et al.*, 2013; Mummert *et al.*, 2013). Das Ende der Pandemie wurde am 10.08.2010 deklariert (WHO, 2010). Die Pandemie verlief verglichen mit vorangegangenen Pandemien relativ mild und die Patienten zeigten insbesondere Symptome einer Atemwegsinfektion sowie gastrointestinale Beschwerden, die mit Erbrechen und Diarrhö einhergingen (Dawood *et al.*, 2009). Außerdem wies das pH1N1 Virus eine hohe Transmissibilität auf. Trotz der vielen milden Fälle zeigten einige Patienten einen sehr schweren Verlauf der Virusinfektion. Davon waren insbesondere junge Erwachsene betroffen. Die Anzahl der Todesfälle wird auf 150.000 - 500.000 geschätzt, darunter viele Jugendliche und junge Erwachsene ohne vorliegende Vorerkrankungen aber auch Menschen die den Risikogruppen zugeordnet werden (Vaillant *et al.*, 2009; Dawood *et al.*, 2012). Das Virus enthielt sechs Genomsegmente einer Dreifachreassortante die zuvor in der nordamerikanischen Schweinepopulation zirkulierte und zwei Gensegmente der eurasischen aviär-ähnlichen Schweineviruslinie (Abb. 4) (Dawood *et al.*, 2009; Garten *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Das 2009 pandemische H1N1 Virus verdrängte das alte saisonale H1N1 Virus und zirkuliert seitdem parallel zu H3N2 saisonalen Viren in der Bevölkerung (WHO, 2013a).

1.7.3 Übertragung von aviären Influenzaviren auf den Menschen

Neben den bekannten humanen Influenzavirussubtypen H1, H2, H3, N1 und N2 wurden in den vergangenen Jahrzehnten mit Besorgnis auch Interspeziestransmissionen des hochpathogenen aviären Subtyps H5 und H7 auf den Menschen beobachtet. Die Erforschung dieser Viren und deren Potenzial Pandemien zu verursachen, besitzt eine besondere gesellschaftliche Relevanz.

Die Infektionen des H5N1 Subtyps im Menschen führen zu einem schweren Krankheitsverlauf, der oft mit einem akuten Atemnotsyndrom einhergeht (akutes respiratorisches Distress-Syndrom, ARDS) (Beigel *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007; WHO, abgerufen am 22.01.2014a). In circa 60 % der Fälle endet der Verlauf tödlich. Das erste Mal wurden humane H5N1 Infektionen 1997 nach einem Ausbruch im Geflügel gemeldet (Claas *et al.*, 1998; Subbarao *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2009). Im Zeitraum von 2003 bis heute gab es insgesamt 648 Infektionen aus 15 verschiedenen Ländern von denen 384 tödlich verliefen (WHO, 2013b). Die Interspeziestransmissionen traten insbesondere in Asien und Nordostafrika auf, in denen die Menschen einen häufigen und engen Kontakt zu infizierten Geflügel besitzen. In Geflügelpopulationen in Teilen Asiens und Nordostafrikas sind diese Viren heutzutage endemisch (WHO, 2012a). Bis heute wurde noch keine anhaltende, direkte Übertragung von Mensch zu Mensch beobachtet (Neumann *et al.*, 2009). Zwei voneinander unabhängige Studien zur Übertragung der H5N1 Viren über Aerosole wurden in einem Frettchentransmissionsmodell durchgeführt (Herfst *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2012). Die Daten dieser Publikationen zeigen, dass bereits fünf bis neun Aminosäuresubstitutionen für eine effiziente Aerosoltransmission zwischen Frettchen ausreichen. Hauptsächlich liegen die Mutationen im HA-Protein, welches zur Bindung des Virus an die Wirtszelle dient. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die erhöhte Transmission mit einer verringerten Pathogenität dieser Viren einhergeht. Schlussendlich zeigen diese Studien, dass H5N1 Viren nur durch wenige adaptive Mutationen hypothetisch in der Lage wären Pandemien auszulösen.

Eine Übertragung des HPAIV Subtyps H7N7 auf den Menschen wurde ebenfalls mehrfach beobachtet (Kurtz *et al.*, 1996; Fouchier *et al.*, 2004; Horimoto und Kawaoka, 2005). Die meisten Fälle der Interspeziestransmission von H7N7 Viren wurden 2003 in den Niederlanden dokumentiert (Fouchier *et al.*, 2004; Koopmans *et al.*, 2004). Die H7N7 Geflügelpest infizierte 89 Menschen, wobei die Infektion relativ mild verlief und nur einen Todesfall hervorbrachte.

Im Frühjahr 2013 wurde erstmals die Übertragung eines aviären LPAIV des H7N9 Subtyps auf den Menschen gemeldet (Gao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Die ersten Fälle aus China zeigten einen schweren Infektionsverlauf mit ARDS, Fieber, Husten und Multiorganversagen. Bis heute sind bei der WHO insgesamt 207 H7N9 bestätigte Fälle, von denen 45 Fälle tödlich verliefen, dokumentiert (WHO, 2013c; WHO, 2014a). Vereinzelt kam es auch zu einer Interspeziestransmission von LPAIV, z.B. H6N1, H7N2, H7N7, H7N3, H9N2 auf den Menschen (Peiris *et al.*, 1999; Tweed *et al.*, 2004; Butt *et al.*, 2005; Horimoto und Kawaoka, 2005; Wright *et al.*, 2007; WHO, 2013d; Yuan *et al.*, 2013). Diese waren meist eng mit

Ausbrüchen im Geflügel verbunden. Der neuste Bericht der WHO vom 17.12.2013 zeigte die erste Interspeziestransmission eines H10N8 Subtyps auf den Menschen (To *et al.*, 2014).

1.8 Pathogenese

Die Infektion mit Influenzaviren führt im Menschen zur klassischen Virusgrippe (Modrow *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2007). Dabei werden die Viren über eine Aerosol-, Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. Über die Atemwege werden die Epithelzellen des oberen Respirationstrakts infiziert. Die Inkubationszeit des Influenzavirus beträgt 1 bis 5 Tage. Die ersten Symptome der Infektion sind das plötzliche Einsetzen von hohem Fieber, Schüttelfrost, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen. Diese Krankheitsanzeichen sind typische, systemische Symptome die durch die pro-inflammatorischen Zytokine ausgelöst werden (Wilschut *et al.*, 2006). Zusätzlich zu einem Schwächegefühl und einer Appetitlosigkeit können Erbrechen und Diarrhoe auftreten (Modrow *et al.*, 2003). Aufgrund der Inflammation und der Lyse infizierter Epithelzellen kommt es zur Schleimbildung und Flüssigkeitsansammlung im oberen Respirationstrakt, wodurch Halsschmerzen, Schnupfen und Husten hervorgerufen werden. Das Fieber und die Symptome der Infektion klingen nach circa drei bis sieben Tagen wieder ab. Der Husten kann jedoch über mehrere Wochen anhalten. Infizierte Patienten scheiden das Virus in der Regel bis circa eine Woche nach dem Auftreten der ersten Symptome aus. In Risikogruppen, während einer Pandemie oder durch die Infektion mit einem HPAIV kann es zu einem schweren Krankheitsverlauf kommen (Wilschut *et al.*, 2006; WHO, 2013a; CDC, abgerufen am 22.01.2014; WHO, abgerufen am 22.01.2014b). Gelegentlich zeigen jedoch auch Menschen die keiner Risikogruppe zugehörig sind einen schweren Verlauf einer saisonalen Influenzavirusinfektion. Dieser ist durch die Ausbildung einer primären viralen Pneumonie mit einer Infiltration mononuklearer Leukozyten oder einer ARDS gekennzeichnet (Modrow *et al.*, 2003; Wilschut *et al.*, 2006). Wenn das Virus die Zellen des Lungenparenchyms infiziert, bildet sich eine primäre, interstitielle Lungenentzündung aus. Das Epithel der Alveolarbereiche ist meist vollständig abgetragen und die Alveolarwände sind stark angeschwollen. Aufgrund der Nekrosen entstehen Blutungen im Alveolar- und Bonchialgewebe und es kommt zur Infiltration von mononuklearen Leukozyten. Die Patienten leiden in diesen Fällen an einer Hypoxie, welche mit Zyanose und Atemnot einhergeht und innerhalb weniger Tage durch Multiorganversagen zum Tod führen kann. In seltenen Fällen kann es auch zu extrapulmonalen Komplikationen kommen. Dazu gehören die Virämie, die Infektion des zentralen Nervensystems, das Reye-Syndrom, die Konjunktivitis, die Myositis und Myokarditis (Naficy, 1963; Hayase und Tobita, 1997; Fouchier *et al.*, 2004; Beigel *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007; Dawood *et al.*, 2009). Viele der fatalen, humanen Influenzavirusinfektionen sind mit einer bakteriellen Ko-Infektion

assoziiert (Wright *et al.*, 2007; Metersky *et al.*, 2012; Chertow und Memoli, 2013). Am häufigsten kommt es dabei zu bakteriellen Ko-Infektionen mit den Stämmen *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus*. Ein Großteil der Patienten, die an der Spanischen Grippe verstarben, wiesen eine sekundäre bakterielle Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* auf (Morens *et al.*, 2008). Aber auch in der Gegenwart spielen bakterielle Ko-Infektionen eine große Rolle. Eine Studie des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) untersuchte im Zeitraum von Mai bis August 2009 Patienten mit einem schweren Verlauf der pH1N1 Virusinfektion in den USA (CDC, 2009). Circa 30 % dieser Patienten wiesen eine bakterielle Co-Infektion auf.

Anhand der Symptome, der Kombination von Symptomen und der Berücksichtigung der aktuell gemeldeten Influenzafälle kann eine erste Diagnose des Arztes getroffen werden (Meerhoff *et al.*, 2004; Wilschut *et al.*, 2006). Die diagnostische Analyse erfolgt anschließend mit Hilfe der Detektion von viralem Antigen, viraler RNA oder in serologischen Tests. Das heute am häufigsten eingesetzte Antiviralia gegen Influenza A Viren ist Oseltamivir, ein Neuraminidaseinhibitor, welcher unter dem Handelsname Tamiflu bekannt ist (De Clercq, 2006; WHO, 2012b; WHO, 2013e). Die therapeutische Behandlung, näher beschrieben im Abschnitt 1.10, reduziert die Virusinfektion und trägt gleichzeitig zu einer verminderten Ausbreitung des Virus bei.

1.9 Prävention

Die wichtigste Maßnahme zur Prävention einer Influenzaviruserkrankung ist die Impfung (Wilschut *et al.*, 2006). Um einen optimalen Schutz zu gewährleisten, wird die Vakzine jährlich an die gegenwärtig zirkulierenden Viren angepasst. Der trivalente Impfstoff für die nördliche Hemisphäre in der Wintersaison 2013/2014 wurde von der WHO bestimmt und besteht aus den Influenza A Viren A/California/07/2009 (H1N1), A/Victoria/361/2011 (H3N2) und dem Influenza B Virus B/Massachusetts/2/2012 (RKI, abgerufen am 23.01.2014; WHO, abgerufen am 23.01.2014). Dabei sind die beiden Influenza A Viren unverändert zu dem Impfstoff des Vorjahres. Lediglich das Influenza B Virus wurde im Vergleich zum Vorjahr ausgetauscht. Ab 2013 wird ein quadrivalenter Impfstoff, der zusätzlich die Antigene des Influenza B Virus B/Brisbane/60/2008 enthält, in der EU angeboten. Von der Ständigen Impfkommission (STIKO) wird eine Impfempfehlung für die Risikogruppen und die Personen die einen häufigen und engen Kontakt zu Risikogruppen, Geflügel oder Wildvögeln besitzen, ausgesprochen. Bei den Impfstoffen wird zwischen den attenuierten Lebendimpfstoffen und den Totimpfstoffen unterschieden. Die Viren die im Lebendimpfstoff eingesetzt werden, sind Reassortanten. Das bedeutet, das HA- und NA-Genomsegment stammt von dem Wildtypvirus und die restlichen Genomsegmente sind von einem Kälte-adaptierten

Mastervirus. Damit besitzen die Viren die antigenischen Bereiche des Wildtypvirus, sind jedoch Kälte-adaptiert, Temperatur-sensitiv und attenuiert (Maassab *et al.*, 1990; Wareing und Tannock, 2001; Murphy und Coelingh, 2002; Kang *et al.*, 2011). In Deutschland ist seit der Wintersaison 2012/2013 erstmals ein Lebendimpfstoff (Fluenz®), der intranasal verabreicht wird, zugelassen (EMA, 2013; RKI, 2013; RKI, abgerufen am 23.01.2014). Dieser wird von der STIKO für zwei- bis sechsjährige Kinder empfohlen. In vorangegangenen Studien zeigte dieser Lebendimpfstoff für diese Altersklassen eine bessere Wirksamkeit gegenüber dem Totimpfstoff (Belshe *et al.*, 2007; Ambrose *et al.*, 2011). Für alle anderen Altersklassen wurde kein Unterschied zu der Impfung mit dem Totimpfstoff festgestellt. Der Totimpfstoff für Influenzaviren kann nochmals in den Spalt- und den Untereinheitenimpfstoff untergliedert werden (Stephenson und Nicholson, 2001; Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Bei den Spaltvakzinen handelt es sich um von Detergenzien zerstörte Viruspartikel. Die ersten Spaltvakzine gegen Influenza A Viren wurde 1968 in den USA lizenziert. Im Vergleich dazu enthalten Untereinheitenimpfstoffe nur die aufgereinigten HA und NA Untereinheiten des Influenzavirus. Diese Vakzine standen erstmals 1980 in Großbritannien zur Verfügung. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Herstellern die sowohl Spalt- als auch Untereinheitenvakzine vermarkten (PEI, abgerufen am 23.01.2014). Beide Impfstoffe werden in der Regel in Hühnereiern generiert und nach der jeweiligen Aufarbeitung intramuskulär verabreicht (Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Die Pharmaunternehmen besitzen jedoch ein großes Interesse an der zukünftigen Generierung von Viren für die Vakzinherstellung in der Zellkultur. Die Vorteile in der Herstellung der Vakzine in der Zellkultur liegen in der Nutzung standardisierter Zellen und einer kürzeren Planungs- und Produktionszeit für größere Impfstoffmengen, welche insbesondere im Fall einer Pandemie von Interesse sind (Tree *et al.*, 2001; Genzel *et al.*, 2014). Bei dem Ausbruch einer Pandemie mit einem HPAIV Subtyp H5 oder H7 besitzt die Produktion von Viren im Hühnerei zur Generierung eines neuen angepassten Impfstoffs wesentliche Nachteile (Bardiya und Bae, 2005). Vor allem virale Oberflächenproteine von aviären Influenzaviren können eine gewisse Pathogenität für Hühner sowie Hühnerembryonen aufzeigen und somit die Produktion der Vakzine gefährden.

Die Impfung von Geflügel gegen Influenza ist in Europa verboten (MSD-Tiergesundheit, abgerufen am 14.02.2014). Eine prophylaktische Impfung von Geflügel würde eine Kontrolle von infizierten Tieren erschweren und zusätzlich den Selektionsdruck, welcher zu einem Antigendrift führen kann, erhöhen. Nur während eines Ausbruchs im Geflügel kann die zuständige Behörde das Impfverbot aufheben. Im Gegensatz dazu werden Pferde und Schweine in Deutschland intensiv geimpft.

1.10 Therapie

Der Ausbruch einer Pandemie aufgrund eines Antigenshifts erfordert die Produktion einer neuen, angepassten Vakzine (Moscona, 2005; Wilschut *et al.*, 2006). Die Wirksamkeit der Vakzine kann auch aufgrund eines Antigendrifts während einer Epidemie reduziert werden. Die Produktion eines neuen Vakzins nimmt jedoch eine gewisse Zeit, mindestens zwanzig Wochen in Anspruch, wodurch der Einsatz von Antiviralia, die die Infektion und deren weitere Ausbreitung eingrenzen, erforderlich wird (PEI, 2010). Die häufigsten Antiviralia gegen Influenza A Viren sind die M2- und die NA-Inhibitoren (Abb. 5), wobei die M2-Inhibitoren aufgrund einer Resistenzentwicklung in den letzten Jahren eine stark reduzierte Wirksamkeit besitzen (De Clercq, 2006; Fiore *et al.*, 2011; WHO, 2012b; WHO, 2013e). Deshalb werden M2-Inhibitoren derzeit nicht mehr von der WHO empfohlen. Bei saisonalen Influenzavirusinfektionen empfiehlt das Robert Koch Instituts (RKI) die antivirale Therapie mit NA-Inhibitoren insbesondere, wenn die Patienten ein erhöhtes Risiko besitzen oder der Verdacht auf einen schweren Krankheitsverlauf besteht (RKI, abgerufen am 25.01.2014). Die beste Wirksamkeit besitzen diese Medikamente, wenn sie so früh wie möglich, d.h. innerhalb der ersten 24-48 Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome, verabreicht werden. Der Einsatz der Medikamente reduziert den Schweregrad und die Dauer der Erkrankung (Modrow *et al.*, 2003; Wilschut *et al.*, 2006; RKI, abgerufen am 25.01.2014).

Die Evolution und das Auftreten von Resistenzen der Viren wird durch die WHO sehr genau überwacht und Veränderungen werden sofort registriert (WHO, abgerufen am 22.01.2014b). Die Antiviralia können unter besonderen Umständen auch präventiv eingesetzt werden (RKI, abgerufen am 25.01.2014). Diese prophylaktische Behandlung wäre beispielsweise für medizinisches Personal beim Auftreten eines neuen pandemischen Virus von besonderem Interesse.

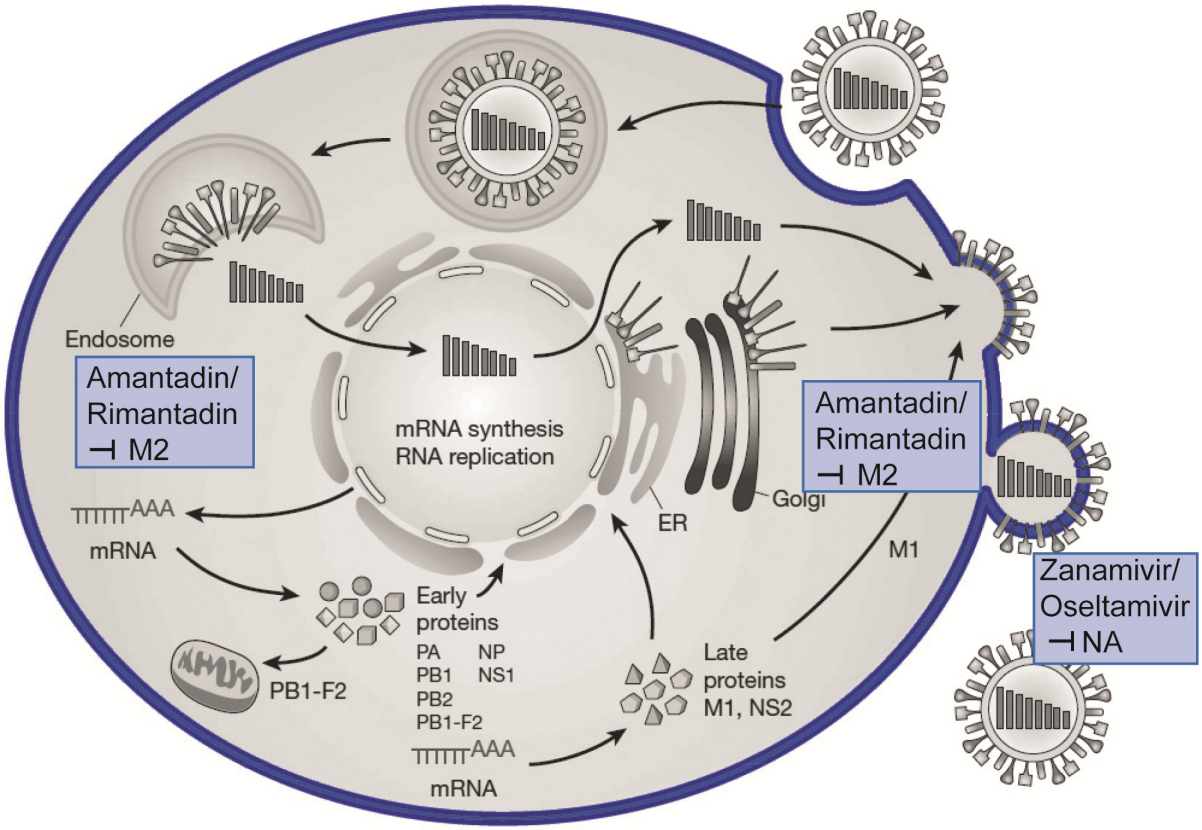


Abb. 5: Antiviralia gegen Influenza A Viren

Die Adamantanderivate Amantadin und Rimantadin blockieren den Ioneneinstrom durch das M2-Protein (modifiziert nach Neumann *et al.,* 2009). Dadurch inhibieren sie die Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma sowie die Reifung des HA-Proteins. Amantadin und Rimantadin sind unter dem Handelsnamen Symmetrel®, Lysovir® bzw. Flumadine® bekannt. Die Neuraminidaseinhibitoren, Zanamivir und Oseltamivir sind Analoga der *N*-Acetylneuraminsäure und inhibieren das NA-Protein durch eine kompetitive Hemmung. Dadurch wird die Virusfreisetzung blockiert. Zanamivir und Oseltamivir werden unter den Handelsnamen Relenza® bzw. Tamiflu® vermarktet.

1.10.1 M2-Inhibitoren

Die M2-Inhibitoren, gezeigt in Abb. 6, sind trizyklische primäre Amine (Modrow *et al.*, 2003; Wilschut *et al.*, 2006). Die Inhibitoren Amantadin (Symmetrel® bzw. Lysovir®) und Rimantadin (Flumadine®), ein Analog von Amantadin, gehören zu den Adamantanderivaten. Die antivirale Aktivität von Amantadin wurde erstmals 1964 von Davies beschrieben (Davies *et al.*, 1964). Beide Medikamente werden oral gut resorbiert und besitzen im Plasma eine Halbwertszeit von 15 bis 20 Stunden (Aktories *et al.*, 2009). Die therapeutische Wirkung der M2-Inhibitoren verkürzt die Symptome der Influenzavirusinfektion um circa einen Tag (Wingfield *et al.*, 1969; Govorkova und McCullers, 2013). Sie hemmen, wie der Name bereits sagt, die Virusreplikation durch die Inhibition des M2-Proteins (Oxford und Galbraith, 1980; Wang *et al.*, 1993; Wilschut *et al.*, 2006). Dadurch wird der Ioneneinstrom in das Innere des Viruspartikels blockiert, wodurch die Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma reduziert wird (Abb. 5). Des Weiteren wird die Reifung des HA-Proteins während des Transports vom

endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran gehemmt (Abb. 5). Bei diesem Prozess sorgt das M2 Protein für eine Neutralisierung des Golgi-Apparats und verhindert dadurch eine frühzeitige Konformationsänderung und somit die Inaktivierung des HA-Proteins. Mittels Nuklear Magnetischer Resonanz (NMR) Analyse wurde gezeigt, dass Rimantadin in der Nähe des Kanalschlosses Asp44 an der Lipid-zugewandten Seite lokalisiert ist und dadurch die geschlossene Konformation des Ionenkanals stabilisiert (Schnell und Chou, 2008). Zeitgleich wurde die Kristallstruktur von einem durch Amantadin blockierten M2-Ionenkanal veröffentlicht (Stouffer *et al.*, 2008). Diese Studie zeigt im Gegensatz zu der Studie von Schnell und Chou, dass Amantadin in der Pore des Ionenkanals lokalisiert ist.

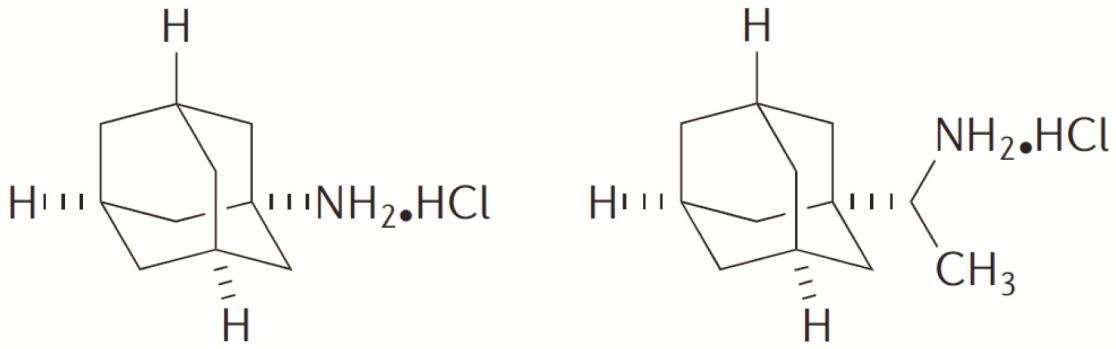


Abb. 6: Strukturen der M2-Inhibitoren
Die M2-Inhibitoren sind trizyklische primäre Amine (De Clercq, 2006). Zu den Derivaten von Adamantan gehören unter anderem Amantadin und Rimantadin.

Die Viren entwickelten in den letzten Jahren durch den Einsatz der Inhibitoren eine Resistenz (Wilschut *et al.*, 2006; Schnell und Chou, 2008; Hayden, 2009; Hayden und de Jong, 2011). Diese Resistenz wird durch einzelne Aminosäuresubstitutionen z.B. L26F, V27A, A30T, S31N, G34E und L38F im M2-Protein hervorgerufen, wobei S31N am häufigsten mit der Resistenzausbildung in Verbindung gebracht wird. In der Wintersaison 1994/1995 traten weltweit nur 0,4 % resistente H3N2 Viren auf, in der Saison 2003/2004 stieg der prozentuale Anteil bereits auf 12,3 % an (Bright 2005). Dabei wurden die meisten resistenten H3N2 Viren in China und Hongkong mit einem Anteil von circa 70 % registriert. Vergleichsweise war der Anteil der resistenten H3N2 Viren in Europa mit 4,7 % und in den USA mit 1,9 % noch relativ gering (Bright *et al.*, 2005). In der darauf folgenden Wintersaison 2005/2006 stiegen die Adamantan resistenten H3N2 Viren in der USA auf 92,3 % an (Bright *et al.*, 2006; CDC, 2006; Deyde *et al.*, 2007). Die Anzahl der H1N1 resistenten Viren stieg in diesem Zeitraum ebenfalls rasant. In der Wintersaison 2005/2006 wiesen weltweit 15,6 % der H1N1 Viren eine Resistenz gegen die M2-Inhibitoren auf. Auch für diesen Virussubtyp wurden regionale Unterschiede festgestellt, wobei die höchsten Resistenzraten in China und

Europa vorlagen. Auch das HPAIV H5N1 trägt das Resistenzgen für die M2-Inhibitoren (Li *et al.*, 2004). Heutzutage sind die beiden zirkulierenden Influenza A Viren H3N2 und pH1N1 resistent gegen die M2-Inhibitoren und deren Verwendung zur Indikation wird, wie bereits beschrieben, nicht mehr empfohlen (WHO, 2012b; WHO, 2013e). Die pH1N1 Viren zeigten bereits bei dem ersten Auftreten in der menschlichen Bevölkerung die S31N Signatur im M2 Protein, welche mit der Resistenz gegen Amantadin und Rimantadin verbunden ist (Dawood *et al.*, 2009).

1.10.2 NA-Inhibitoren

Die NA-Inhibitoren, gezeigt in der Abb. 7, sind Analoga der *N*-Acetylneuraminsäure (von Itzstein *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1997; Wilschut *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Der erste bekannte NA-Inhibitor war FANA (Palese *et al.*, 1974a; Palese und Compans, 1976; Moscona, 2005). Durch die Weiterentwicklung dieses Inhibitors entstanden die heutzutage eingesetzten Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivir mit dem Handelsnamen Relenza® bzw. Tamiflu® (Moscona, 2005; Wilschut *et al.*, 2006). Zanamivir wird intranasal verabreicht. Im Vergleich dazu wird Oseltamivir oral appliziert, wodurch das aktive Oseltamivir Carboxyl GS4071 in der Leber entstehen kann. Die NA-Inhibitoren sind im Gegensatz zu den M2-Inhibitoren in der Lage sowohl Influenza A als auch Influenza B Viren zu inhibieren. Zanamivir besitzt im Plasma eine Halbwertszeit von 2,5 bis 5 Stunden, wobei Oseltamivir eine Halbwertszeit von 6 bis 8 Stunden aufweist (Aktories *et al.*, 2009). Unterschiedliche Studien zeigen, dass der Einsatz der NA-Inhibitoren die Dauer der Influenzavirusinfektion von saisonaler Influenza um circa ein bis zwei Tage verkürzt und die Wahrscheinlichkeit einer sekundären Komplikation verringert wird (Hayden *et al.*, 1997; Treanor *et al.*, 2000; Modrow *et al.*, 2003). Die NA-Inhibitoren wurden auf der Grundlage der Lokalisation und der Struktur des aktives Zentrums des NA-Proteins designt (von Itzstein *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1997; Modrow *et al.*, 2003; Moscona, 2005; Amaro *et al.*, 2011). Die Interaktion der NA-Inhibitoren mit der funktionellen Einheit der Neuraminidase ist stärker als die Interaktion mit dem natürlichen Rezeptor der *N*-Acetylneuraminsäure. Durch die Interaktion wird die enzymatische Aktivität des NA-Proteins inhibiert, die *N*-Acetylneuraminsäure wird somit nicht von der Galaktose der Zellmembran und vom Viruspartikel gespalten. Dadurch wird die Virusfreisetzung und erneute Virusinfektion gehemmt (Abb. 5).

Eine Resistenz von H1N1 Viren gegen Oseltamivir trat erstmals 2008 in Norwegen auf (WHO, 2012b). Die Entwicklung von Resistenzen bei H1N1 Viren war oftmals mit den Signaturen Q136K, E119V, H274Y, R292K und N294S assoziiert, wobei die H274Y Signatur am häufigsten vorkommt (Moscona, 2009; Baranovich *et al.*, 2011; Govorkova und McCullers, 2013). Dabei unterscheiden sich z.T. die resistenzadaptiven Signaturen der N1

und N2 Subtypen der Influenza A Viren sowie der Influenza B Viren bezüglich ihrer Zanamivir oder Oseltamivir Resistenz. In den USA stieg der Anteil der Oseltamivir resistenten H1N1 Viren innerhalb von zwei Jahren rasant an. In der Wintersaison 2006/2007 traten 0,7 % resistente H1N1 Viren auf, im Jahr 2008/2009 erreichte der prozentuale Anteil bereits 98,5 % (Dharan *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Poland *et al.*, 2009). Neben den USA wurde auch in vielen anderen Ländern, wie beispielsweise in Japan, ein großer Anteil an resistenten H1N1 Viren detektiert (WHO, 2009; WHO, 2012b). Die Viren waren pathogen und gut von Mensch zu Mensch übertragbar (Gooskens *et al.*, 2009; RKI, abgerufen am 25.01.2014). Die Suszeptibilität gegenüber Zanamivir blieb jedoch bestehen. Seit dem Beginn der Pandemie 2009 bis heute weisen die neuen saisonalen pH1N1 nur vereinzelt Resistenzen auf (Hurt *et al.*, 2011; WHO, 2012b; CDC, abgerufen am 25.01.2014b; CDC, abgerufen am 25.01.2014a). Die Veröffentlichungen der WHO zeigen, dass die Mehrheit der pH1N1 und H3N2 Influenza A Viren sowie die Influenza B Viren sensitiv gegenüber Oseltamivir und Zanamivir sind (WHO, 2013e). Die Entwicklung der Viren ist jedoch ungewiss und wird permanent von den nationalen sowie internationalen Referenzzentren überwacht. Die ersten steigenden Tendenzen für eine Resistenz der pH1N1 Viren werden im aktuellen wöchentlichen epidemiologischen Report gezeigt (WHO, 2014b). Auch die H5N1 Viren zeigen vereinzelt die H274Y Signatur, welche mit einer Oseltamivirresistenz dieser Viren einhergeht (de Jong *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2005).

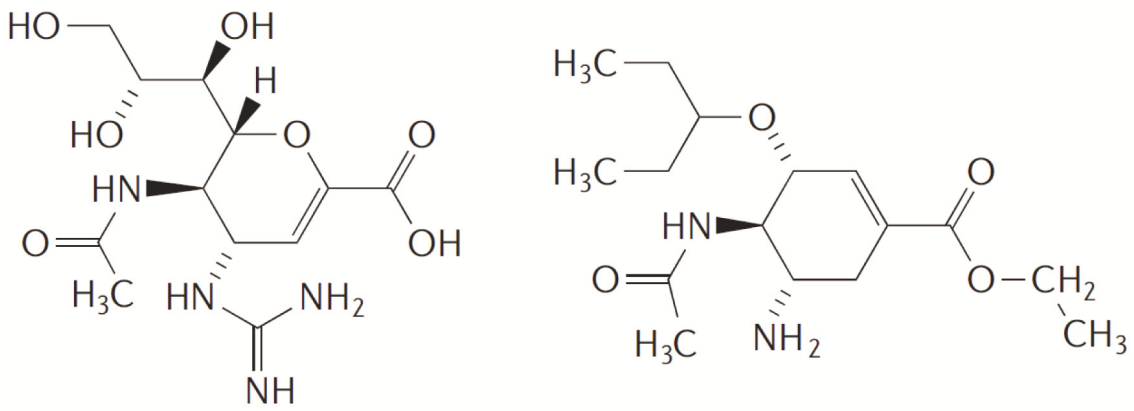


Abb. 7: Strukturen der NA-Inhibitoren
Die NA-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivir sind Analoga des zellulären Rezeptors der *N*-Acetylneuraminsäure (De Clercq, 2006).

1.10.3 Neue therapeutische Ansätze

Neue, effektive antivirale Substanzen werden aufgrund der potenziell möglichen Resistenzentwicklung der Viren gegen die derzeitigen Medikamente dringend benötigt

(Hayden, 2009; Clercq, 2012; Govorkova und McCullers, 2013). Außerdem wäre ein effizienterer Schutz gegen die Influenzavirusinfektion wünschenswert. Momentan sind bereits einige Inhibitoren, welche gegen virale oder zelluläre Faktoren gerichtet sind oder auch die Immunantwort des Wirts adressieren in der klinischen Entwicklungsphase. Diese antiviralen Substanzen sind in Tab. 3 aufgeführt. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren einige interessante Studien mit *small interfering RNAs* (siRNA), Antikörpern, systemischen Steroiden oder antiinflammatorischen Substanzen durchgeführt, welche die Influenzavirusreplikation inhibieren (Kong und Zhou, 2006; Luke *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Beigel und Bray, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Falagas *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Govorkova und McCullers, 2013).

Tab. 3: Neue Inhibitoren gegen Influenza A Viren in der klinischen Entwicklungsphase

Inhibitor	Angriffsziel	Applikations-route	klinische Phase	Literatur
Zanamivir (Relenza®)	NA	intravenös	2/3	(Harter *et al.*, 2010)
Oseltamivir (Tamiflu®)	NA	intravenös	3	(clinicaltrials, 2010)
Peramivir (Rapiacta®)	NA	intravenös, intramuskulär	2/3 (USA) abgeschlossen in Japan	(Birnkrant und Cox, 2009; Memoli *et al.*, 2010)
Laninamivir (CS-8958)	NA	inhalieren	abgeschlossen	(Honda *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2009; Yamashita *et al.*, 2009; Ishizuka *et al.*, 2010; Kiso *et al.*, 2010a; Kubo *et al.*, 2010; Sugaya und Ohashi, 2010)
Favipiravir (T705)	Polymerase	oral	2	(Furuta *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Furuta *et al.*, 2005; Sidwell *et al.*, 2007; Kiso *et al.*, 2010b; Sleeman *et al.*, 2010; Furuta *et al.*, 2013)
Hyperimmun-serum	HA	intravenös	1-2	(Kong und Zhou, 2006; Luke *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007)

DAS181 (Fludase®)	*N*-Acetyl-neuraminsäure	inhalieren	1	(Malakhov *et al.*, 2006; Belser *et al.*, 2007; Triana-Baltzer *et al.*, 2009a; Triana-Baltzer *et al.*, 2009b; Moss *et al.*, 2010; Nicholls *et al.*, 2013)
Rouvastatin	Cholesterol Biosynthese	oral	3	(Liu *et al.*, 2009)

(modifiziert nach Govorkova *et al.,* 2013)

1.11 Synthetische Anti-Lipopolysacchaid Peptide (SALPs)

Die Klasse der synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptide (SALPs) basiert auf der Lipopolysaccharid- (LPS) Bindedomäne des *Limulus* Anti-LPS Faktors (LALF) (Gutsmann *et al.*, 2010). Der amerikanische Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*, auch Hufeisenkrebs genannt) besitzt ein System zur Detektion von bakteriellen Endotoxinen (Bang, 1956; Levin, 1987; Hoess *et al.*, 1993; Brandenburg *et al.*, 2011). Die Blutzellen des Krebses, die sogenannten Amöbozyten, weisen Proteine auf, die eine Gerinnungskaskade auslösen, sobald LALF mit bakteriellen Endotoxinen interagiert. Diese Gerinnung dient zum Schutz gegen bakterielle Infektionen. Das gewonnene *Limulus* Amöbozyten Lysat (LAL) wird experimentell zur Detektion und Quantifizierung von bakteriellen Endotoxinen verwendet. Die Bindung des antimikrobiellen Peptids LALF an die Endotoxine und dessen inhibitorische Aktivität wurde in einigen Studien näher analysiert (Ried *et al.*, 1996; Dankesreiter *et al.*, 2000; Andra *et al.*, 2004a; Andra *et al.*, 2004b; Andra *et al.*, 2007). Für eine verbesserte antimikrobielle Aktivität und LPS-Neutralisierung wurden die Peptide anschließend bezüglich ihrer Länge und ihrer Primärsequenz modifiziert (Gutsmann *et al.*, 2010; Kowalski *et al.*, 2010). Die Peptide haben einen amphiphilen Charakter. Der Anteil der positiv geladenen Aminosäuren, bestehend aus sieben bis acht Argininen (R) und Lysinen (K), ist hauptsächlich am N-Terminus lokalisiert. Im Gegensatz dazu liegt der hydrophobe Anteil, bestehend aus Tryptophan (W) und Phenylalanin (F), am C-Terminus. Die aktuellen Studien zeigen, dass die SALPs mit einer hohen Affinität an das LPS der gramnegativen Bakterien binden (Gutsmann *et al.*, 2010). Außerdem sind diese Peptide auch in der Lage mit grampositiven Bakterien zu interagieren (Heinbockel *et al.*, 2013). Durch die Bindung der SALPs an das LPS der gramnegativen Bakterien sowie an Strukturen der grampositiven Bakterien sind humane Bindeproteine wie beispielsweise das Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP), CD14 oder TLR4 und TLR2 vermutlich nicht mehr in der Lage die Bakterien zu erkennen (Brandenburg *et al.*, 2011; Heinbockel *et al.*, 2013). Dadurch werden die angeborene Immunabwehr und die Immunzellrekrutierung während der Inflammation

verringert. Insbesondere die durch LPS- und Bakterien-induzierte Stimulation von Zytokinen, wie beispielsweise TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-10, wurde durch die Behandlung mit den SALPs *in vitro* und *in vivo* inhibiert (Gutsmann *et al.*, 2010; Martinez de Tejada *et al.*, 2012; Schuerholz *et al.*, 2012; Heinbockel *et al.*, 2013; Schuerholz *et al.*, 2013). Ein weiterer Mechanismus der für die antibakterielle Aktivität der SALPs vermutet wird, ist der durch die LPS-Bindung hervorgerufene Wechsel des LPS Aggregattyps vom aktiven kubischen zum inaktiven multilamellaren Typ (Kaconis *et al.*, 2011). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die SALPs vor einem septischen Schock durch gramnegative Bakterien, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella minnesota* oder *Salmonella enterica*, schützen (Gutsmann *et al.*, 2010; Martinez de Tejada *et al.*, 2012; Heinbockel *et al.*, 2013). Die publizierten Daten zeigen eine antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung der SALPs gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Außerdem waren die Peptide in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Krepstakies *et al.*, 2012).

Neben der inhibitorischen Aktivität der Peptide gegen Bakterien weisen die SALPs zusätzlich eine antivirale Aktivität gegen einige umhüllte Viren, wie beispielsweise Human Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis-B- und C-Viren (HBV, HCV), Herpes-simplex-Viren (HSV), auf (Krepstakies *et al.*, 2012). Die SALPs interagieren direkt mit dem zellulären Heparansulfat, einem Ko-Rezeptor dieser Viren. Dadurch wird die Bindung der Viren an die Zelloberfläche gehemmt und die Virusinfektion wird inhibiert.

1.12 Zielsetzung

Influenza A Viren stellen durch das Auslösen von sporadischen Pandemien, gelegentlichen Interspeziestransmissionen und lokal begrenzten Epidemien ein Risiko für die menschliche Bevölkerung dar. Die primäre Strategie Influenzavirusinfektionen zu vermeiden, ist die Vakzinierung. In manchen Situationen, zum Beispiel beim Ausbruch einer Pandemie, muss ein neuer angepasster Impfstoff hergestellt werden. Die Produktion eines neuen Impfstoffes benötigt einen Zeitraum von mindestens zwanzig Wochen, in denen keine Präventionsmöglichkeit durch die Vakzinierung besteht.

Bis eine Immunisierung durch Vakzinierung erfolgen kann, sind Antiviralia von besonderer Bedeutung. Die derzeit eingesetzten NA-Inhibitoren adressieren eine sehr späte Phase des Replikationszyklus und besitzen dadurch eine reduzierte Wirksamkeit. Influenza A Viren können, wie die Vergangenheit zeigte, innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums Resistenzen gegen zurzeit eingesetzte Inhibitoren ausbilden. Die Entwicklung neuer antiviraler Strategien ist daher von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit sollte die antivirale Aktivität der synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptide (SALP) gegen Influenza A Viren evaluiert werden. In vorangegangenen Studien wurde eine antivirale Aktivität dieser Peptide gegen umhüllte Viren, wie beispielsweise HIV, HBV, HCV und HSV nachgewiesen (Krepstakies *et al.*, 2012). Eine Inhibition der Viren wird durch eine Reduktion der Zellbindung dieser Viren, aufgrund der Interaktion der SALPs mit dem Ko-Rezeptor Heparansulfat, erreicht. Das bedeutet, dass SALPs ein frühes Stadium der Virusreplikation inhibieren.

Die folgenden zwei Fragestellungen sollten in dieser Arbeit untersucht werden:

- Können SALPs mit der *N*-Acetylneuraminsäure, dem Influenza A Virus Rezeptor interagieren und dadurch die Virusbindung an der Zelloberfläche sowie die Virusreplikation reduzieren?
- Schützt die SALP Behandlung vor einer im Mausmodell letal verlaufenden Influenza A Virusinfektion?

2 Material

2.1 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Die Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben in doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) angesetzt.

Bezeichnung	**Zusammensetzung/ Hersteller**
Agarose	Serva
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Avicel (mikrokristalline Cellulose)	FMC BioPolymer
Avicel-Lösung	2,5 % Avicel → autoklavieren
Bacto-Agar	BD Biosciences
Blocking-Puffer (Western Blot)	3 % BSA (Sigma-Aldrich) in 1x PBS-T
Blocking-Puffer (IHC)	10 % Eselserum (Abcam) in 1x PBS
Bromphenolblau	Carl Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka
Fluorescein *Sambucus nigra* (Elderberry) Bark Lectin	5 µg/ml Lektin (Vector Laboratories, FL-1301) in TBS Puffer
DAPI	Roche
Gallussäurelösung (TEM)	0,5 % Gallussäure (Sigma) 50 % 1x PBS ad ddH_2O
HEPES-Puffer	20 mM HEPES (Biomol)
Glutaraldehyd (Fixierlösung, TEM)	2,5 % Glutaraldehyd (Electron Microscopy Sciences, #16210) in 1x PBS
Iodlösung	volumetrisch, 0,5 M I_2 (1,0 N) (FLUKA)
Isopropanol (2-Propanol)	Fluka

Kontrast-Färbelösung (TEM)	2 % Uranylacetat (Merck) Bleicitrat (Fluka)
Kristallviolettlösung	270 ml 37 % Formaldehyd (Merck) 1 g Kristallviolett (Merck) ad 1 l ddH_2O
Laemmli-Proteinprobenpuffer (4x)	0,2 M Tris-HCl (Carl Roth) 8 % SDS (Sigma-Aldrich) 40 % Glycerol (Invitrogen) 0,25 % Bromphenolblau (Merck) 40 mM DTT (Serva) pH 6,8
Mowiol 4-88	Carl Roth
N-Acetylneuraminsäure	0,05 mM (Sigma, A0812) in HEPES-Puffer
Natriumchloridlösung	0,9 % NaCl (Merck)
Natriumsulfatlösung (Na_2SO_4)	1 % Natriumsulfat (Sigma) 50 % 1x PBS ad ddH_2O
Osmiumtetroxidlösung (OsO_4)	1 % OsO_4 (Plano) in 1x PBS
Paraffin (Low Melting Paraffine)	DCS Labline (#PL003S2K)
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (AppliChem) in 1x PBS
Peroxidase-Blocking-Puffer	3 % H_2O_2 (Merck) in Methanol (Merck)
PBS (10x)	26,8 mM KCl (Carl Roth) 17,6 mM KH_2PO_4 (Merck) 1,37 M NaCl (Merck) 51,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck) ad 1 l ddH_2O → pH 7,4
PBS-T (1x)	0,1 % Tween-20 (Serva) in 1x PBS
Salzsäure (HCl)	Merck

Sammelgelpuffer	1,5 M Tris (Carl Roth) pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris (Carl Roth) 1,92 M Glycin (Merck) 1 % SDS (Sigma-Aldrich)
SDS-PAGE-Sammelgel (pH 6,8; 5 %)	3,4 ml ddH_2O 630 µl Sammelgelpuffer (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS (Sigma-Aldrich) 830 µl 30 % Rotiphorese 5 µl TEMED (Carl Roth) 50 µl 10 % APS
SDS-PAGE-Trenngel (pH 8,8; 10 %)	4,0 ml ddH_2O 2,5 ml Trenngelpuffer (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS (Sigma-Aldrich) 3,3 ml 30 % Rotiphorese 4 µl TEMED (Carl Roth) 100 µl 10 % APS
TBS-Puffer	50 mM Tris (Carl Roth) 150 mM NaCl (Merck) pH 7,4
Transferpuffer (Western Blot, 10x)	250 mM Tris (Carl Roth) 1,92 M Glycin (Merck)
Transferpuffer (Western Blot, 1x)	10 % 10x Western Blot Puffer 20 % Methanol (Merck) ad ddH_2O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (Carl Roth) pH 8,8
Triton-X-100 Lösung	0,3 % Triton-X-100 (Merck)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris (Carl Roth) 1 M Essigsäure (Merck) 50 mM EDTA (Sigma-Aldrich) pH 8,0

Waschpuffer IHC-P	0,05 % Tween-20 (Serva) in 1x PBS
Xylol	Merck
Zelllyse-Puffer	50 mM HEPES (Biomol) (pH 8,0) 200 mM NaCl (Merck) 0,5 % Igepal (Sigma-Aldrich) 25 % Glycerol (Invitrogen) 10 µl/ml PMSF (1 mM, Sigma-Aldrich, 100x; 0,1 M-Stock) 0,07 µl/ml β-Mercaptoethanol (Fluka) 1x HALT™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x, Pierce/ Thermo Scientific) 1x EDTA Solution (0,5 M, 100x, Pierce/ Thermo Scientific)

2.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme (Kits)

Bezeichnung	**Hersteller**
Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001	Biozol
Citrat Plus Puffer (10x)	DCS
DNA-Ladepuffer (6X MassRuler DNA Loading Dye)	Fermentas/ Thermo Scientific
Decon (14 %)	GE Healthcare
Dithiothreitol (DTT; 0,1 M, in *SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Kit* enthalten)	Invitrogen/ Life Technologies
Eosin-Y-Lösung	Merck
Eponharz (Einbettharz)	Roth
Eukitt	Kindler
Hühnervollblut mit Citrat	Lohmann Tierzucht (#570001)
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Mayers Hämatoxylinlösung	Merck

MTT Cell Proliferation Assay Kit	American Type Culture Collection (ATCC; #30-1010K)
Tamiflu, 75 mg Hartkapseln	Roche
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN
Ottix Plus	DiaPath
Ottix Shaper	DiaPath
peqGOLD dNTP-Mix (10 mM)	Peqlab
Pursept-A Xpress	Merz Hygiene GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega (40 U/µl, #N251B)
SuperBlock T20 (TBS)	Pierce/ Thermo Scientific
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Pierce/ Thermo Scientific
TrueBlue™ Peroxidase Substrat	KPL
ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit	Zytomed

2.3 Verbrauchsmaterial und Glaswaren

Bezeichnung	**Hersteller**
Bastelkleber ohne Lösungsmittel	UHU
Chromatographiepapier 3MM Chr	Whatman
Whatman-Papier (GB 005 Whatman)	Whatman
Deckgläser (Ø 12 mm)	Carl Roth
Einmal-Injektionskanüle *Microlance™ 3* (26G x 3/8“, 0,45 x 10 mm)	BD

Einmal-Injektionskanüle *Microlance™ 3* (27G x ¾“, 0,4 x 19 mm)	BD
Einmal-Injektionskanüle *Microlance™ 3* (25G x 1“, 0,5 x 25 mm)	BD
Einmalskalpell (Surgical Disposable Scalpels)	B. Braun Melsungen AG (#5518083)
Einmalspritzen *Omnifix*® (3 ml/ Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen *Omnifix*® (5 ml/ Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen *Omnifix*® (10 ml/ Luer Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen *Omnifix*® (20 ml/ Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen *TERUMO*® *Syringe without needle*, U-100 Insulin (1 ml 6 % Luer)	TERUMO Corporation
Glasplatten (Mini Protean System)	Bio-Rad (#1653308)
Glasplatten	Biostep (20-30-114)
Mahlkugeln (Glasperlen: Ø 0,50-0,75 mm)	Retsch (#22.222.0003)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Nitrozellulosemembran *Hybond-C Extra*	Amersham Biosciences
Objektträger	Carl Roth (H868)
Parafilm M Verschlussfolie	Sigma-Aldrich
Präzisionswischtücher	Kimtech Science
Sterilfilter Millex HA 0,45 µm	Millipore
Sterilfilter Millex HA 0,22 µm	Millipore
SuperFrost/Plus Objektträger	Menzel-Gläser
Zellkulturschale (Ø 35 mm) µ-Dish $^{35\ mm,}$ high Grid-500	ibidi GmbH
96-Loch-Mikrotiterplatte mit v-förmigen Vertiefungen für den HA-Test	Nunc
96-Loch-Mikrotiterplatte F (flacher Boden)	Sarstedt

Alle weiteren, hier nicht angegebenen Einwegkunststoffartikel und Kulturgefäße wurden von den Firmen Falcon, Sarstedt, Biozym und Nunc bezogen.

2.4 Zellkulturmedien & -zusatzstoffe

Bezeichnung	**Zusammensetzung/ Hersteller**
Albumin Lösung (BSA, 35 % in DPBS)	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Infektionsmedium A549	DMEM 0,2 % BSA 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Infektionsmedium MDCK	MEM 0,2 % BSA 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
L-Glutamin (200 mM)	PAA
Minimal Essential Medium (MEM)	PAA
Modified Eagle Medium 2x (2x MEM)	PAA
MTT-Medium (MDCK)	MEM 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Overlay-Medium für Plaqueaufreinigung	50 % 1,8 % Agar in sterilem ddH_2O 50 % *Overlay*-Medium
Overlay für Plaquetest (*Low-viscosity Overlay* nach (Matrosovich *et al.*, 2006)	50 % *Overlay*-Medium 50 % Avicel-Lösung (2,5 % Avicel)

Overlay-Medium für Plaquetest	2x MEM 0,4 % BSA 2 % L-Glutamin 2 % Penicillin und Streptomycin
Penicillin und Streptomycin (P/S, 100x)	PAA
Reduced Serum Medium (OPTI-MEM I)	GIBCO
Transfektionsmedium HEK 293T	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin
Trypsin-EDTA (1x)	PAA
Trypsin-TPCK	Sigma
Wachstumsmedium A549	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Wachstumsmedium MDCK	MEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Zelleinfriermedium	Wachstumsmedium 10 % DMSO 10 % FCS oder: FCS inkl. 10 % DMSO

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
A549 (Human Lung Adenocarcinoma Cells)	humane Lungenepithelzelllinie
HEK293T (Human Embryonic Kidney Cells)	humane Nierenepithelzelllinie
MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells)	Cockerspaniel-Nierenzelllinie

2.6 Virusstämme

Bezeichnung	Beschreibung
SC35M (H7N7)	Rekombinantes, mausadaptiertes SC35M Influenza A Virus (H7N7) (Scheiblauer *et al.*, 1995)
A/Victoria/3/75 (H3N2)	(Hoke *et al.*, 1979)
A/Hamburg/NY1580/09 (pH1N1)	2009 pandemisches H1N1 (alias HH15) (Gabriel *et al.*, 2011; Otte und Gabriel, 2011)

2.7 Versuchstiere

Bezeichnung	Beschreibung
spezifiziert pathogenfreie (SPF) Hühnereier	Lohmann Tierzucht
BALB/c Mäuse	Charles River Laboratories oder SPF-Zucht, Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie

2.8 DNA- und Protein-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
MassRuler DNA Ladder Mix, Ready-to-Use 80-10 000 bp	Fermentas/ Thermo Scientific
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad

2.9 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Verwendung/ Hersteller
pHW2000	Reverse Genetik/ Leervektor (Hoffmann *et al.*, 2000)
pHW2000-SC35M-HA	Reverse Genetik/ Eukaryotische Proteinexpression (Gabriel *et al.*, 2005)
pHW2000-SC35M-M	
pHW2000-SC35M-NA	
pHW2000-SC35M-NP	
pHW2000-SC35M-NS	
pHW2000-SC35M-PA	
pHW2000-SC35M-PB1	
pHW2000-SC35M-PB2	

2.10 Primer

Die Primer wurden von dem externen Dienstleister Eurofins MWG Operon synthetisiert, mit ddH_2O auf eine Konzentration von 100 pmol/µl (100 µM) eingestellt und als PCR- bzw. Sequenzierungsprimer eingesetzt.

Bezeichnung	**Sequenz (5´→3´)**
SC35/M-PB2-828fw	GAGAAGGGCAACAGTATCAG
PB2-R1210	GGTTGCCTTTCTGAGGATAGC
PB2-1814	GAGGTCAATACAGCGGATTCG
M13-rev-Ouni-PB2#2	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGTCACAGTGG AAACAAGGTC
PB1-R550	CCTTCCTGATTCATTAGCC
PB1-2300 (rev)	CACTATTTCTGCCGTCTGAG
M13-21-Ouni-PB1#1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCGAA AGCAGGCA
M13-rev-Ouni-PB1#2	TGTAAAACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCGAA AGCAGGCA
PA-1554	GGAATGACACTGATGTGG
M13-rev-Ouni-PA#2	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGTCACAGTGG AAACAAGGTAC
H7-869	ACTCTAATTGTGGAGGGG
H7-R1330	GCTCAGCATTATACGACC
NP-737	AAACAGCAGCACAACGAG
NP-R1241	CTGCTGATTTGTGTTCCC
N7-832	AGCCAGGCACATAGAGG
N7-R1300	AATTCAACATAGAAACAGGG
M13-21	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGACC

2.11 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung/ Verwendung/ Hersteller
Anti-H7N1 Serum (alias Anti-FPV Serum)	Kaninchen, polyklonal 1:4000 (Western Blot) Prof. H.-D. Klenk (Institut für Virologie, Marburg, Deutschland)
Anti-GAPDH	Kaninchen, polyklonal 1:1000 (Western Blot) Cell Signaling (#2118)
Anti-PB2 #22A (in Kombination mit Anti-PB2 #20C)	Maus, polyklonal 1:200 (Western Blot) Prof. J. Ortin (CSIC, Madrid, Spanien)
Anti-PB2 #20C (in Kombination mit Anti-PB2 #22A)	Maus, polyklonal 1:200 (Western Blot) Prof. J. Ortin (CSIC, Madrid, Spanien)
Anti-NP	Maus, monoklonal 1:750 (IF) Abcam (ab43821)
Anti-pH1N1 Serum	Maus Serum gewonnen von pH1N1 infizierten Mäusen (21 Tage nach Infektion), positiv getestet für pH1N1 Antikörper

2.12 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung/ Verwendung/ Hersteller
Anti-Maus-HRP	Ziege, polyklonal 1:50000 (Western Blot) Sigma-Aldrich (#A4416)

Anti-Kaninchen-HRP	Ziege, polyklonal 1:50000 (Western Blot) Sigma-Aldrich (#A8275)
Anti-Maus-Alexa Fluor® 647	Ziege 1:500 (IF) Life Technologies (A21235)
Anti-Maus-Alexa Fluor® 488	Esel 1:1000 (IF) Life Technologies (A21202)
Anti-Kaninchen-Biotin	Esel, polyklonal 1:200 (IHC-P) Jackson ImmunoResearch (#711-066-152)

2.13 Narkotika & Analgetika

Bezeichnung	**Hersteller**
Forene (Isofluran 100 %)	Abbott
Ketamin Gräub (100 mg/ml)	Albrecht
Natriumchlorid (0,9 % Lösung)	B. Braun Melsungen AG
Sedaxylan (Xylazin-Hydrochlorid, 20 mg/ml)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (WDT)

2.14 Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
automatischer Peptid-Synthetisierer, Modell 433 A	Applied Biosystems
Badumwälz-Thermostat *Precitherm PFV*	Labora Mannheim
Bildbearbeitungsprogramm *Imaris 7.6.1*	Bitplane
Bildbearbeitungsprogramm Fiji (*ImageJ)*	Wayne Rasband (NIH)
Brutschrank B6120	Heraeus
Chirurgische Feinschere	Fine Science Tools (FST)
Chirurgische Standard-Pinzette	Fine Science Tools (FST)
CO_2-Inkubator *BBD6220*	Thermo Scientific
CO_2-Inkubator *HERACELL 150*	Thermo Scientific
CO_2-Inkubator *HERACELL 240*	Thermo Scientific
Dokumentationssystem ImageQuant LAS 4000 GE Healthcare mit Auswertungs-software ImageQuant Tools v.3.0	Amersham Biosciences
Durchlichtmikroskop Axioskop 2 mit *ImageAccess Software v.5.1*	Zeiss Imagic Bildverarbeitung AG
Durchlichtmikroskop IM	Zeiss
Eierprüflampe	Fritz Gössner
Elektrophoresesystem *Mini Trans-Blot Cell*	Bio-Rad
Gefriercontainer *Mr. Frosty*	Nalgene
Geldokumentationssystem *Gel Doc XR*	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem *Mini-PROTEAN Tetra Cell*	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem *Sub-Cell GT*	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem *Mode 96*	Bio-Rad
Handbohrer	Praktiker

Kamera, ProgRes C12 plus	Jenoptik
Kamera, Veleta CCD Camera	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
Kamera, DS-Fi2	Nikon
Kipp-/ Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument
Konfokalmikroskop C2+	Nikon
Kühlplatte CP60	Microm
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer MR80	Heidolph
Mikroskop ECLIPSE Ni-E	Nikon
Mikrotiterplatten Lesegerät Tristar LB 941 mit Mikrowin2000-Software v.4.41	Berthold Technologies, Software von Mikrotek Laborsysteme GmbH
Mikrotom HM325	Microm
Mikrotom (Ultracut Microtome)	Leica
Mikrowellenofen R-647	Sharp
Mikrowellenofen *Supratomic M754*	Miele
Minizentrifuge *Sprout*	Biozym
MSC Isothermes Titrationskalorimeter	MicroCal Inc
Paraffingießstation EG1160	Leica
PCR-Gerät GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
pH-Messgerät *766 Calimatic*	Knick
Pinzette (gebogen- IF)	Fine Science Tools (FST)
Pinzette	Fine Science Tools (FST)
Pipetten Eppendorf *Reference*	Eppendorf
Pipette Eppendorf *Xplorer (100)*	Eppendorf
Mehrkanalpipette (30-300 µl)	Eppendorf
Mehrkanalpipette (50-300 µl)	Labsystems
Pipettierhilfe *Pipetus*	Hirschmann Laborgeräte

Präzisionswaage KB-2000-2NM	KERN
Präzisionswaage ED224S	Sartorius
Präzisionswaage Kern KB 2000-2N	Kern & Sohn GmbH
Reinstwassersystem *Milli Q Aca*	Millipore
Rollenmischer RM5	NeoLab
Rollenmischer SRT9	Stuart
Scanner *perfection* V500 Photo	Epson
Schüttelwasserbad SW-22	Julabo
Schwingmühle MM400	Retsch
Spannungsquelle *Power Pac Basic*	Bio-Rad
Spannungsquelle *Power Pac 300*	Bio-Rad
Spektralphotometer *Nanodrop 1000*	Peqlab
Sterile Werkbank *Herasafe KS 12*	Thermo Scientific
Taumel-Wipptisch WT12	Biometra
Taumel-Wipptisch WT17	Biometra
Thermomixer *TMix-220V*	Analytik Jena
Thermomixer *comfort*	Eppendorf
Transmissionselektronenmikroskop *FEI Technai G 20 Twin*	FEI
Umluftwärmeschrank B15	Heraeus
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner	VWR
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat ASP 3000	Leica
Vakuumpumpe, *Laboport pumps*	KNF Neuberger
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab
Vortex-Mixer *Minishaker* MS2	IKA
Waage ED3202S-CW	Sartorius
Wasserbad HIS2	Kunz Instruments

Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus
Zentrifuge 5429	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge *Avanti J-E*	Beckham Coulter

3 Methoden

3.1 Peptidsynthese

Die Synthese der SALPs wurde von unseren Kooperationspartnern am Forschungszentrum Borstel, Borstel, Deutschland (Prof. Klaus Brandenburg, Arbeitsgruppe Biophysik und Rainer Bartels, Arbeitsgruppe Strukturbiochemie) durchgeführt und erfolgte mit Hilfe der Festphasensynthese-Technik in einem automatischen Peptid-Synthetisierer (Gutsmann *et al.*, 2010). Die Reinheit der Peptide wurde mittels Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie (HPLC) überprüft und lag bei über 95 %. Die Peptide wurden in ddH_2O aufgenommen und Aliquots mit Konzentrationen von 1 mg/ml oder 5 mg/ml wurden bei -80 °C gelagert. Die Aminosäuresequenz und das Molekulargewicht der in dieser Arbeit verwendeten Peptide, PEP 19-2.5, PEP 19-4 und PEP 19-8D sowie das nicht-positiv geladene Kontrollpeptid PEP 19-CP sind in der Tabelle (Tab. 4) dargestellt. Die Aminosäuresequenzen dieser Peptide wurden im Europäischen Patentamt unter EP2108372 im Oktober 2009 patentiert. Zur Visualisierung des Peptids, Peptid PEP 19-2.5 wurde dieses am N-Terminus mit einem Rhodmin (PEP 19-2.5-Rho) gekoppelt. Dieses fluoreszierende Peptid wurde anschließend zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zelle (3.7.5), zur Bestimmung der Bindung der SALPs an die Viruspartikel (3.7.6) sowie zur Detektion der SALPs nach i.n. Applikation in der Maus (3.10.3) eingesetzt.

Tab. 4: Die Aminosäuresequenz der SALPs, PEP 19-2.5, PEP 19-4, PEP 19-8D und PEP 19-CP

Peptid	Sequenz	MW [Da]
PEP 19-2.5	GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2711
PEP 19-4	GKKYRRFRWKFKGKWFWFG	2750
PEP 19-8D	GFWFKGKWRFKKYRGGRYKKFRWKGKFWFG	3964
PEP 19-CP	SSNKSTTGSGETTTA	1427

3.2 Zellkultur-Methoden

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden A549-, HEK293T- und MDCK-Zellen (2.5) verwendet. Auf die Kultivierung, das Einfrieren sowie das Auftauen dieser Zellen wird in den nächsten Abschnitten (3.2.1; 3.2.2) eingegangen.

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen fand in einem CO_2-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % statt. Zur Sicherung eines effizienten Wachstums der Zellen wurden A549- und HEK293T-Zellen in DMEM-Medium und MDCK-Zellen in MEM-Medium kultiviert. Beide Medien wurden mit 10 % FCS, 1 % Penicillin sowie Streptomycin und 1 % L-Glutamin versetzt. Bei dem Erreichen einer Zelldichte von 90-100 % wurden die eukaryotischen, immortalisierten Zelllinien in neue Zellkulturgefäße überführt und vereinzelt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit PBS oder Trypsin-EDTA gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA bei 37 °C, 5 % CO_2 und 96 % rH inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen durch das Trypsin-EDTA, wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen. Dabei wird das proteolytisch aktive Trypsin durch Komponenten des im Kulturmedium enthaltenen FCS inaktiviert. Abhängig vom Verwendungszweck wurden die Zellen verdünnt und in neue Kulturgefäße für das weitere Wachstum überführt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Zur Archivierung eukaryotischer, immortalisierter Zelllinien wurden Zellaliquots angefertigt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden die Zellen wie unter (3.2.1) gewaschen, trypsiniert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 4 °C kaltem Zelleinfriermedium resuspendiert und circa 5 x 10^6 Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 1 °C pro Minute in einem Gefriercontainer bis zum Erreichen von -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C archiviert. Das erneute Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad und anschließender, schneller, tropfenweiser Zugabe von Zellkulturmedium. Zum Entfernen des Einfriermediums fand eine 5-minütige Zentrifugation bei 1000 x g statt. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen (3.2.1) kultiviert. Um optimale Wachstumsbedingungen nach dem Auftauen zu schaffen, wurde das Zellkulturmedium nach 24 h gewechselt bzw. bei dem Erreichen einer zu hohen Zelldichte wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.3 Nukleinsäuretechniken

Zur Überprüfung des neu generierten, rekombinanten und Maus-adaptierten H7N7 Virus SC35M (3.7.1; 3.7.2) wurde die virale RNA des Virus isoliert (3.3.1), mittels spezifischer *One-Step* RT-PCR Reaktion in cDNA umgewandelt (3.3.2), amplifiziert (3.3.2) und anschließend sequenziert (3.3.4). Dabei wurde zur Verifizierung der spezifischen wirtsadaptiven Signaturen des SC35M Virus nicht das gesamte Virusgenom, sondern nur Teilabschnitte der viralen Gensegmente von HA, NA, NP und der viralen Polymerase sequenziert.

3.3.1 Isolierung viraler RNA

Die Isolierung viraler RNA (vRNA) wurde mit Hilfe des *QIAamp Viral RNA Mini Kit* nach den Angaben des Herstellers QIAGEN durchgeführt. Insgesamt wurde zur RNA-Isolierung ein Volumen von 300 µl des Virusstocks eingesetzt und die Elution erfolgte mit 60 µl AVE-Puffer. Nach der Bestimmung der vorliegenden RNA-Konzentration am Spektralphotometer *Nanodrop 1000* wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2 *One-Step* RT-PCR

In der *One-Step* RT-PCR findet zum einen die reverse Transkription zur Herstellung der *copy* DNA (cDNA) aus der vRNA und zum anderen die Amplifikation eines spezifischen Bereichs der generierten cDNA statt. Die *One-Step* RT-PCR wurde mit der isolierten vRNA des H7N7 Virus (3.3.1) und den spezifischen Primern (2.10) nach den Herstellerangaben von QIAGEN für das *OneStep RT-PCR Kit* durchgeführt.

***OneStep RT-PCR* Reaktionsansatz**

5x *OneStep RT-PCR* Puffer	10,0 µl
dNTP (10 mM)	2,0 µl
OneStep Enzym Mix	2,0 µl
Primer vorwärts (20 µM)	1,5 µl
Primer rückwärts (20 µM)	1,5 µl
Rnasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	1,0 µl
Template Gesamt-RNA (350 ng)	5,0 µl
RNAse- freies H_2O	ad 50,0 µl

***OneStep RT-PCR* Programm**

Reverse Transkription	50 °C	30 min
Initiale PCR-Aktivierung	95 °C	15 min
35 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	1 min
Primer-Hybridisierung (*annealing*)	52 °C	30 s
Elongation	72 °C	3 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

Im Anschluss an die *One-Step* RT-PCR wurden 40 µl der amplifizierten cDNA mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* nach den Angaben des Herstellers QIAGEN aufgereinigt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese analysiert (3.3.3) und anschließend sequenziert (3.3.4).

3.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und bezüglich ihrer Größe untersucht. Dazu wurde 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst, erhitzt und nach leichter Abkühlung mit Ethidiumbromid versetzt und anschließend in die Laufkammern gegossen. Die Proben wurden in 6x DNA-Ladepuffer aufgenommen und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 100-120 V durchgeführt und die anschließende Detektion erfolgte mit dem Geldokumentationssystem *Gel Doc XR*. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des Größenstandards *MassRuler DNA Ladder Mix* bestimmt (Sambrook und Russell, 2001).

3.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden vom Dienstleister Seqlab mit 20 pmol der spezifischen Sequenzierungsprimer (2.10) durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

Zur Auftrennung und anschließende Detektion viraler Proteine, die in den hergestellten Gesamtproteinextrakten eukaryotischer Zellen (3.4.1) vorlagen, wurden SDS-PAGE Gelelektrophoresen und Western Blot Analysen (3.4.2) durchgeführt.

3.4.1 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Aus den im Abschnitt, Bestimmung der viralen Replikation (3.7.8), gewonnen Proben wurde die Gesamtproteinmenge extrahiert. Dazu wurden die mittels TPCK-Trypsin von der Kulturschale gelösten Zellen für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zelllysat für 10 min bei 18000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4x Laemmli-Proteinprobenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C und 450 rpm im Thermomixer erhitzt und anschließend mittels SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.4.2).

3.4.2 SDS-PAGE und Western Blot

Zur elektrophoretischen Auftrennung des Gesamtproteinextrakts (3.4.1) im SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse zur Detektion spezifischer viraler Proteine wurden die Standardprotokolle von Sambrook und Russel verwendet (Sambrook, 2001). Die Gele, bestehend aus einem 10 %-igen Trenngel und einem 5 %-igen Sammelgel, wurden mit jeweils 10 µl der zu untersuchenden Probe beladen und anschließend in den SDS-PAGE Apparaturen elektrophoretisch bei 100-120 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* eingesetzt. Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine wurden diese bei 100 V mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die primären Antikörper Anti-H7N1 Serum, Anti-PB2 und Anti-GAPDH wurden in SuperBlock T20 (TBS) verdünnt (2.11) und für circa 16 h bei 4 °C mit der zuvor geblockten Membran auf dem Rollmischer inkubiert. Im Anschluss wurden die ungebundenen Antikörper in drei Waschschritten von jeweils 5 min mit PBS-T entfernt. Die mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörper wurden in der Western Blot Blockinglösung verdünnt. Danach wurde die Membran für circa 1 h bei Raumtemperatur auf einem Taumel-Wipptisch mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Anschließend wurde das Chemilumineszenzsubstrat *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* auf die zuvor gewaschene Membran gegeben. Die daraus resultierende Chemolumineszenz katalysiert durch das am Sekundärantikörper konjugierte HRP wurde im Dokumentationssystem *ImageQuant LAS 4000* detektiert. Die gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe der *ImageQuant Tools Ver. 3.0* Software ausgewertet und quantifiziert.

3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

Das Prinzip der isothermen Titrationskalorimetrie beruht auf der Änderung der Enthalpie die bei chemischen Reaktionen, wie der Interaktion zwischen zwei Molekülen, entsteht. Mit Hilfe

dieser Methode wurde die Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor der Influenzaviren, *N*-Acetylneuraminsäure, evaluiert. Die isotherme Titrationskalorimetrie wurde am Forschungszentrum Borstel, Borstel, Deutschland von Dr. Lena Heinbockel durchgeführt. Vor dem Experimentbeginn wurde die Apparatur gründlich mit ddH_2O und HEPES-Puffer gespült. Zusätzlich wurde vorab ein kurzer Testlauf mit HEPES-Puffer durchgeführt. Nach der vollständigen Reinigung, wurde 20 mM HEPES-Puffer mit einer Hamilton-Spritze in die Referenzzelle gegeben. Die *N*-Acetylneuraminsäure wurde auf eine Konzentration von 0,05 mM mit Hilfe von 20 mM HEPES-Puffer eingestellt, kurz im Ultraschallbad gelöst und mit der Vakuumpumpe für circa 30 min entgast. Bevor die *N*-Acetylneuraminsäure-Lösung in die Probenzelle der Apparatur gefüllt wurde, fand nochmals eine kurze Homogenisierung im Ultraschallbad statt. Die Spritze wurde mit 5 mM oder 10 mM des jeweilig gelösten und entgasten SALPs (gelöst in 20 mM HEPES-Puffer) aufgezogen. In der automatisch ablaufenden Titration wurden je 3 µl der SALPs aller 5 min zu der *N*-Acetylneuraminsäure gegeben und die Änderung der Enthalpie wurde mittels des isothermen Titrationskalorimeters *MSC isothermal titration calorimeter* bestimmt. Als Kontrolle diente die Titration mit dem Kontrollpeptid PEP 19-CP. Die Titration der Peptide wurde bei dem Erreichen einer Sättigung der *N*-Acetylneuraminsäure, bei der keine Änderung der Enthalpie detektierbar war, gestoppt. Die gewonnen Daten wurden mittels der vorliegenden Software *Origin 8* ausgewertet. Die Werte die nach einer Titration der SALPs zu HEPES-Puffer entstanden, wurden als Hintergrundsignal von den anderen Messwerten abgezogen. Zwischen den unterschiedlichen Titrationskalorimetrieläufen wurden Spülungen des Geräts mit 14 % Decon, ddH_2O und HEPES-Puffer durchgeführt sowie ein Testlauf mit HEPES-Puffer angeschlossen.

3.6 Zytotoxizitätstest

Zur Ermittlung der Zytotoxizität der SALPs wurde ein MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Experiment mit Hilfe des Kits, *MTT Cell Proliferation Assay*, durchgeführt. In diesem Test wird das MTT eingesetzt, welches durch die Dehydrogenasen der metabolisch, aktiven Zellen reduziert und in das violett farbene Formazan umgewandelt wird. Circa 24 h vor Experimentbeginn wurden 5 bis 8 x 10^5 MDCK-Zellen in eine 96-Loch-Zellkulturmikrotiterplatte ausgesät, um eine Konfluenz von 80-90 % zum Experimentbeginn zu erreichen. Die Zytotoxizität der SALPs wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen, die eine gewisse Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit eingesetzten Untersuchungen besitzen, ermittelt. Zum einen wurde die Zytotoxizität der SALPs in einem kurzen Untersuchungszeitraum von 1 h und zum anderen in einem langen Untersuchungszeitraum von 72 h bestimmt.

Für beide Ansätze wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen. Im ersten Ansatz wurde das Peptid in PBS verdünnt und anschließend wurden 20 µg/ml oder 50 µg/ml des jeweiligen Peptids in einem Volumen von 60 µl auf die Zellen gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Vergleich dazu wurden im zweiten Ansatz die beiden unterschiedlichen SALP-Konzentrationen mit 1x MEM-Medium, welches aus 2x MEM-Medium hergestellt wurde, eingestellt. Ein Volumen von 111 µl der verdünnten Peptide wurde auf die Zellen gegeben und für 72 h bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 inkubiert. Als Kontrollen für beide Ansätze dienten unbehandelte oder mit dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelte Zellen. Das MTT-Experiment wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zuerst wurde das ungebundene Peptid durch mehrmaliges waschen mit MTT-Medium entfernt. Anschließend wurde ein Gemisch aus 100 µl des MTT-Mediums und 10 µl MTT-Reagenz des Kits auf die Zellen gegeben und für 3 h bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 inkubiert. Danach folgten die Zugabe von 100 µl des MTT-Detergenz und eine circa dreistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät Tristar LB 941 mit Hilfe der Software *Mikrowin2000-Software v.4.41* durchgeführt. In diesen Messungen wurden relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) ausschließlich im Bereich zwischen 0,7 bis 1,4 berücksichtigt. Die Absorption der Vertiefungen in denen sich keine Zellen befanden, wurde als Hintergrundsignal von den anderen Messwerten abgezogen.

3.7 Virologische Methoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen, virologischen Arbeiten mit dem Maus-adaptierten H7N7, dem humanen H3N2 und dem pH1N1 Influenzavirus wurden in Laboren der biologischen Schutzstufe 2 (BSL-2) durchgeführt. Das Influenza A Virus A/Victoria/3/75 (H3N2) wurde im Jahr 1975 und das A/Hamburg/NY1580/09 (pH1N1) im Juni 2009 während der Pandemie aus dem Menschen isoliert (Hoke *et al.*, 1979; Otte und Gabriel, 2011). Für die Experimente dieser Arbeit wurden Virusstocks beider Viren generiert (3.7.2). Das Maus-adaptierte H7N7 Virus (SC35M) des SC35/SC35M-Adaptationsmodells wurde ursprünglich zur Identifikation säugeradaptierter Mutationen eines HPAIV generiert. Dazu wurde zunächst A/Seal/Massachussetts/1/80 (H7N7), isoliert aus einem Seehund (*Phoca vitulina*), 34-mal in Hühnerembryozellen passagiert (Webster *et al.*, 1981; Li *et al.*, 1990). Das so entstandene, für Hühner hochpathogene HPAIV SC35 wurde anschließend 11-mal in der Mauslunge passagiert. Dadurch entstand das für diese Arbeit eingesetzte SC35M Virus, welches aufgrund der erworbenen säugeradaptiver Mutationen eine hohe Pathogenität und Letalität in der Maus besitzt (Scheiblauer *et al.*, 1995; Gabriel *et al.*, 2005). Während des seriellen Passagierens in der Mauslunge fand ein Aminosäureaustausch von insgesamt neun

Aminosäuren statt, von denen sieben im viralen RNP-Komplex, eine im HA und eine im NA lokalisiert sind (Scheiblauer *et al.*, 1995; Gabriel *et al.*, 2005). Für die experimentellen Untersuchungen dieses bestimmten viralen Genotyps wurden rekombinante Viren mittels reverser Genetik generiert (Scheiblauer *et al.*, 1995; Gabriel *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde das Maus-adaptiertes SC35M Influenza A Virus (H7N7) rekombinant hergestellt (3.7.1) und anschließend auf dessen Richtigkeit mittels Genotypisierung kontrolliert (3.3). Mit diesen drei beschriebenen Viren wurde die antivirale Aktivität der SALPs mit den in den kommenden Abschnitten vorgestellten Methoden analysiert.

3.7.1 Reverse Genetik

Die Herstellung rekombinanter Influenzaviren kann mittels unterschiedlicher Methoden erfolgen. In dieser Arbeit wurde die reverse Genetik nach der Methode von Hoffmann *et al.* angewandt (Hoffmann *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001). Dabei werden die acht viralen Genomsegmente in den pHW2000 Expressionsvektor kloniert. In diesem Vektor wird das virale Genomsegment vom humanen Pol-I und vom Cytomegalievirus stammenden Pol-II Promotoren flankiert und ermöglicht dadurch die Synthese des viralen Proteins sowie der viralen RNA aus einem Konstrukt. Durch die gleichzeitige Transfektion der acht, in den pHW-2000-Vektoren vorliegenden Genomsegmenten in die Zellen werden neue infektiöse Viren, welche anschließend von den Zellen freigesetzt werden, generiert. Die reverse Genetik bietet außerdem die Möglichkeit mittels zielgerichteter Mutagenese künstliche Veränderungen in das virale Genom einzubringen und diese experimentell zu studieren. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften von Zelllinien wurden für die Herstellung rekombinanter SC35M Influenzaviren zwei Zelllinien eingesetzt. Dabei dienten HEK293T-Zellen einer effizienten Transfektion von pHW2000-Vektoren und MDCK-Zellen eigneten sich für die anschließende Virusamplifikation.

Transfektion von HEK293T-Zellen zur Virusgenerierung

Die acht pHW2000-Expressionsvektoren mit den jeweiligen Genomsegmenten von SC35M (2.9) wurden in vorherigen Arbeiten bereits generiert und für den folgenden Versuchsteil zur Verfügung gestellt (Gabriel *et al.*, 2005). Für die Transfektion wurde das Transfektionsagens Lipofectamine 2000 nach den Angaben des Herstellers Invitrogen eingesetzt. Dafür wurde zunächst ein Ansatz aus 8 µl Lipofectamine 2000 und 250 µl OptiMEM hergestellt. Dieser Ansatz wurde für die Bildung von Mizellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden zu den acht Vektorkonstrukten (je 1 µg) mit den jeweiligen SC35M Genomsegmenten je 250 µl Opti-MEM gegeben, so dass ein Verhältnis von Plasmid zu

Lipofectamine 2000 von 1:1 gegeben war. Anschließend wurden beide Ansätze miteinander vereint und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Transfektionslösung tropfenweise in eine Ø 6 cm Zellkulturschale mit circa 3×10^6 im Transfektionsmedium suspendierten HEK293T-Zellen pipettiert. Das Transfektionsmedium wurde nach circa 16 h durch frisches Medium ersetzt. Zur Generierung neuer infektiöser Viruspartikel wurden die Zellen für zwei Tage bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 inkubiert. Danach erfolgte die Überinfektion von MDCK-Zellen.

Überinfektion von MDCK-Zellen

Zur effizienten Amplifikation der Viruspartikel wurden MDCK-Zellen 24 h vor der Überinfektion in Ø 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät, um eine Zelldichte von 80-90 % zum Zeitpunkt der Überinfektion zu erreichen. Für die Überinfektion wurden 200 µl des infektiösen Zellkulturüberstands der transfizierten HEK293T-Zellen abgenommen und anschließend zusammen mit 2 ml Infektionsmedium als Inokulum auf die zuvor gewaschenen MDCK-Zellen gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 bis ein durch die Viren hervorgerufener zytopathischer Effekt (CPE) von 60-70 % sichtbar wurde. Der infektiöse Überstand wurde aliquotiert und bis die Plaqueaufreinigung angeschlossen wurde, bei -80 °C archiviert.

Plaqueaufreinigung

Die Plaqueaufreinigung diente der Generierung einer möglichst homogenen Viruspopulation und wurde zweimal durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein Plaquetest (3.7.4) mit den Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-6} des infektiösen MDCK-Überstands angefertigt. Im Vergleich zu dem beschriebenen Plaquetest (3.7.4) wurde bei der Plaqueaufreinigung das Inokulum entfernt und die MDCK-Zellen wurden mit einem Agar-haltigen *Overlay*-Medium überschichtet. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurden einzelne Plaques mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen und der infektiöse Agar wurde in eine Lösung, bestehend aus 200 µl 1x PBS und 0,2 % BSA, gegeben. Eine circa 16-stündige Inkubation bei 4 °C ermöglichte die Diffusion infektiöser Viruspartikel in die Lösung. Mit dieser Lösung wurde die zweite Plaqueaufreinigung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach erfolgreicher Plaqueaufreinigung wurde die Viruslösung bis zur Generierung eines neuen Virusstocks im embryonierten Hühnerei (3.7.2), bei -80 °C gelagert.

3.7.2 Virusanzucht

Der Influenza A Virussubtyp und die mit ihm verbundene Herkunft des Virusisolats entscheiden über die Art der Virusanzucht. Für Influenzaviren die aus einem Säugetier

stammen, wie die H1, H2 und H3-Virussubtypen, findet die Virusanzucht in Säugerzellen statt. Dabei können hohe Virustiter in MDCK-Zellen erreicht werden. Im Gegensatz dazu werden Influenzaviren aviären Ursprungs, wie beispielsweise H5 oder H7 im embryonierten Hühnerei vervielfältigt. Die Anzahl der Viruspassagen sollte so gering wie möglich gehalten werden, um eine Anhäufung von Mutationen zu vermeiden.

Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Die Generierung eines neuen Virusstocks des Maus-adaptierten H7N7 Virus SC35M fand in elf Tage bebrüteten, embryonierten Hühnereiern statt. Um die Qualität dieser Eier festzustellen und die Anwesenheit eines lebenden Hühnerembryos sicherzustellen, wurden die Eier mit einer Lampe durchleuchtet. Danach wurde die Eischale am stumpfen Ende, an dem sich die Luftblase befindet, mit Iod desinfiziert. An dieser Stelle wurde mit einem ebenfalls desinfizierten Handbohrer die Eischale eröffnet. Durch das so entstandene, kleine Loch wurden 200 µl einer Virusverdünnung (10^{-3} oder 10^{-4}) mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und einer Einmal-Injektionskanüle (25G x 1“, 0,5 x 25 mm) vorsichtig in die Allantoishöhle appliziert. Das mit Bastelkleber versiegelte Hühnerei wurde anschließend im CO_2-Inkubator bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Eier für circa 16 h im Kühlschrank gelagert, wodurch eine Kontraktion der Gefäße und ein Absterben des Embryos erreicht wurden. Zum Ernten der virushaltigen Allantoisflüssigkeit wurde die Eischale am stumpfen Ende mit Hilfe einer desinfizierten Pinzette geöffnet und entfernt. Anschließend wurde die klare Allantoisflüssigkeit mit einer 10 ml Plastikpipette abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Zell- oder Gewebetrümmern wurde die gewonnene Allantoisflüssigkeit für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Mit Hilfe des Hämagglutinationstests (3.7.3) wurde der virale Titer der Hämagglutinationseinheit (HAU-Titer, *hemagglutination unit*) bestimmt und Allantoisflüssigkeiten von Eiern mit ähnlichen HAU-Titern wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C archiviert. Für die sich anschließenden Experimente mit dem H7N7 Virus wurde die Anzahl der infektiösen Viruspartikel nach einem einmaligem Einfrier- und Auftauprozess durch einen Plaquetest ermittelt (3.7.4). Zur Kontrolle des Virusstocks wurde eine Virusgenotypisierung angeschlossen, indem spezifische Bereiche des viralen Genoms sequenziert wurden (3.3.4).

Virusanzucht in MDCK-Zellen

Die Virusanzucht von den in dieser Arbeit verwendeten humanen H3N2 und pH1N1Viren fand in MDCK-Zellen statt. Dafür wurden MDCK-Zellen 24 h vor der Infektion in 75 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät. Bei einer Zelldichte von 80-90 % wurden die Zellen mit 5 ml Infektionsmedium gewaschen und anschließend mit circa 10^4 p.f.u. (*plaque-forming units*) des jeweiligen Virusisolats inokuliert. Damit der gesamte Zellrasen von dem Inokulum

bedeckt wurde, wurde ein Inokulumvolumen von 1,5 ml eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C, 96 % rH und 5 % CO_2 wurde das Inokulum entfernt, durch 8 ml frisches Infektionsmedium ersetzt und erneut inkubiert. Für eine effiziente Virusvermehrung von beiden Viren, welche eine monobasische Spaltstelle besitzen, wurde das Infektionsmedium mit 1 µg/ml TPCK-Trypsin versetzt. Nach zwei bis drei Tagen lag ein durch die Viren hervorgerufener CPE von 60-70 % vor und das Virus wurde daraufhin geerntet. Dafür wurde der infektiöse Überstand abgenommen und für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die zelltrümmerfreie Viruslösung wurde aliquotiert und bei -80 °C archiviert. Wie bereits für die Anzucht im embryonierten Hühnerei beschrieben, fand auch hier eine Bestimmung der viralen Titer mittels HA-Test (3.7.3) und Plaquetest (3.7.4) statt.

3.7.3 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der Hämagglutinationstest basiert auf der Eigenschaft des viralen HA terminale *N*-Acetylneuraminsäuren auf Glykokonjugaten der Erythrozytenoberfläche zu erkennen und zu binden. Da Influenzaviren eine Vielzahl von HA-Oberflächenmolekülen besitzen, sind sie in der Lage Erythrozyten zu hämagglutinieren. Dadurch können Lösungen ohne hämagglutinierende Partikel, in denen die Erythrozyten sedimentieren von denen mit hämagglutinierenden Partikeln unterschieden werden und somit kann der HAU-Titer mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Virus bestimmt werden. Der Titer der Hämagglutinationseinheit (HAU-Titer, *hemagglutination unit*) ist der reziproke Wert der Verdünnungsstufe bei der gerade noch eine Hämagglutination der Erythrozyten erkennbar ist.

Für den Hämagglutinationstest wurden zunächst 5 ml Hühnervollblut mit 20 ml einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung versetzt und für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden das Serum und die Interphase verworfen, so dass ausschließlich Erythrozyten übrig blieben. Zur Sicherstellung einer hohen Erythrozytenqualität wurde der Waschschritt circa dreimal wiederholt. Für den anschließenden HA-Test wurde eine 1 %-ige Erythrozytenlösung mit einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung hergestellt. Dieser Test wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit v-förmigem Boden durchgeführt. Zuerst wurden 100 µl der unverdünnten Virussuspension oder 1x PBS in das erste Loch der 12er Reihe auf der Platte pipettiert. Anschließend wurde davon ausgehend eine zweifache Verdünnungsreihe mit jeweils 50 µl des Virus bzw. der jeweiligen Virusverdünnung und 50 µl PBS angefertigt. Zu dem finalen Volumen der Viruslösung von je 50 µl wurden je 50 µl der 1 %-igen Hühnererythrozytenlösung, beginnend bei der höchsten Verdünnungsstufe, gegeben. Die virale Hämagglutination wurde nach 45-minütiger Inkubation auf Eis ermittelt. Diese Inkubation auf Eis war essentiell, um die Aktivität des NA-Proteins, welches die Bindung zwischen HA und der *N*-Acetylneuraminsäuren löst, zu inhibieren. Der HA-Test lässt keine

Aussage über die Anzahl der infektiösen viralen Partikel zu, da nichtinfektiöse Partikel oder Membrantrümmer ebenfalls zu einer Hämagglutination der Erythrozyten führen.

Antivirale Aktivität der SALPs im HA-Test

Der HA-Test wurde ebenfalls verwendet, um die antivirale Aktivität der SALPs näher zu untersuchen. Dafür wurden die zwei zuvor im HA-Test ermittelten Virusverdünnungen eingesetzt, bei denen gerade noch eine virale Hämagglutination detektierbar war. Um die antivirale Breite der Peptide zu bestimmen, wurden 10^5-10^6 p.f.u. der Viren mit dem Subtyp H7N7, H3N2 oder pH1N1 im Test eingesetzt. Die jeweiligen Virusverdünnungen mit PBS wurden mit 5 µg/ml oder 10 µg/ml SALP versetzt und anschließend wurden 50 µl dieses Peptid-Virus Gemischs in die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach der Zugabe von 50 µl der 1 %-igen Erythrozytenlösung erfolgte, wie bereits im HA-Test erläutert, eine 45-minütige Inkubation auf Eis. Als Kontrollen dienten Erythrozyten die mit Viren und PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP inkubiert wurden. Zusätzlich wurden Erythrozyten ausschließlich mit SALPs, PBS oder PEP 19-CP inkubiert. Die virale Hämagglutination sowie die Hemmung der viralen Hämagglutination durch die Peptide wurden anschließend ermittelt.

3.7.4 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest

Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen HA-Test (3.7.3) kann mit dem Plaquetest die Anzahl der infektiösen Viruspartikel bestimmt werden. Diese Methode wurde eingesetzt um die Virustiter der neu generierten Virusstocks (3.7.2), der Überstände der Wachstumskurven (3.7.9) und der Organhomogenate aus den Tierversuchen zu ermitteln (3.10.6). (Matrosovich *et al.*, 2006). Für diesen Test wurden MDCK-Zellen 24 h vor der Infektion in 6-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, um eine 80-90 %-ige Konfluenz zum Zeitpunkt der Infektion zu erreichen. Zu Beginn des Plaquetests wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe der zu testenden Viruslösung mit 1x PBS hergestellt. Anschließend wurden die zuvor gewaschenen Zellen mit 333 µl der jeweiligen Virusverdünnung pro Plattenvertiefung inokuliert. Dabei wurden je nach Probe Verdünnungsreihen von 10^{-1} - 10^{-6}, 10^{-2} - 10^{-7} oder 10^{-3} - 10^{-8} verwendet. Zur Bindung der Viren an die Zelloberfläche und zur anschließenden Infektion wurden die Zellen 30 min bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 inkubiert, wobei nach 15 min ein kurzes Schwenken der Platte erfolgte. Danach wurden die inokulierten Zellen mit 3 ml Avicel-*Overlay*-Medium pro Plattenvertiefung überschichtet und für weitere 72 h im Inkubator gelagert. Das Avicel-*Overlay*-Medium zur Bestimmung des Virustiters von Viren mit einer monobasischen Spaltstelle im HA enthielt zusätzlich 1 µg/ml TPCK-Trypsin. Nach 72 h wurde das Agar-*Overlay*-Medium abgezogen, die Zellen gewaschen, mit 4 % PFA fixiert und abschließend für circa 5 min mit Kristallviolett gefärbt. Durch Virus lysierte bzw. abgelöste

Zellen erschienen dabei als farblose Plaques im Kristallviolett lila gefärbten Zellrasen. Die Bestimmung des Virustiters, angegeben in Plaque-bildenden Einheiten pro ml (p.f.u./ml; *plaque-forming units/ml*), erfolgt durch die Anzahl der Plaques in der jeweiligen Verdünnungsstufe.

Antivirale Aktivität der SALPs im Plaque-Reduktionstest

Auf dem Prinzip des Plaquetests aufbauend, wurde der Plaque-Reduktionstests in dieser Arbeit etabliert. Dieser diente zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der SALPs auf die viralen Titer verschiedener Influenza A Virussubtypen, wodurch eine Untersuchung der viralen Replikation möglich wurde. Dazu wurden die angefertigten Virusverdünnungen mit 20 µg/ml oder 50 µg/ml SALPs versetzt und anschließend, wie bereits beschrieben, zu den Zellen gegeben. Als Kontrollen dienten Zellen die mit Virus inokuliert und mit PBS oder dem Kontrollpeptide PEP 19-CP behandelt wurden. Der weitere Verlauf des Experiments wurde unter den gleichen Bedingungen wie im oben beschriebenen Plaquetest durchgeführt.

3.7.5 Test zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zelle

Mit Hilfe des hier beschriebenen Tests wurde der Effekt der SALPs auf den ersten Schritt des viralen Replikationszyklus, nämlich die Bindung von Influenzaviren an die Zelloberfläche, untersucht.

Für dieses Experiment wurden A549-Zellen 24 h vor Testbeginn in 24-Loch-Mikrotiterplatten auf sterile Ø 12 mm Deckgläser ausgesät, um eine 50-70 %-ige Konfluenz zum Zeitpunkt des Experimentbeginns zu erreichen. In diesem Test wurden drei unterschiedliche Applikationsansätze des Peptids untersucht. Entweder das Peptid wurde vor der Viruszugabe appliziert (Vorbehandlungsansatz) oder das Peptid wurde gleichzeitig mit den Viren zu den Zellen gegeben (Ko-Behandlungsansatz) oder das Peptid wurde nach der Virusinokulation appliziert (Nachbehandlungsansatz). Im Vorbehandlungsansatz wurden 20 µg/ml des Rhodamin-konjugierten SALPs PEP 19-2.5-Rho zu den zuvor gewaschenen Zellen gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichen Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe von 10^5 p.f.u. des pH1N1 Virus wurden ungebundene Peptide durch einen Waschschritt mit 1x PBS entfernt und die Zellen auf 4 °C vorgekühlt. Zur Bindung der Viren an die Zelle fand eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C statt. Anschließend wurden ungebundene Viren von den Zellen in einem Waschschritt mit 1x PBS entfernt und die Zellen mit den gebundenen Peptiden sowie Viren mit 4 % PFA oder 100 % Ethanol fixiert. Im Vergleich dazu wurde im Ko-Behandlungsansatz ein Gemisch aus 10^5 p.f.u. des pH1N1 Virus und 20 µg/ml PEP 19-2.5-Rho zu den gewaschenen und gekühlten Zellen gegeben und bei 4 °C für 30 min inkubiert. Die Fixierung mit PFA oder 100 % Ethanol erfolgte, wie im

Vorbehandlungsansatz nach einem Waschschritt mit 1x PBS. Alternativ wurde im Nachbehandlungsansatz das virale Inokulum für 30 min zu den gewaschenen und gekühlten Zellen gegeben. Die Peptidapplikation mit 20 µg/ml PEP 19-2.5-Rho erfolgte erst nachdem die Viren von den Zellen gewaschen wurden. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C mit den Peptiden wurden die Zellen ebenfalls mit 1x PBS gewaschen und mit 4 % PFA oder 100 % Ethanol fixiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 1x PBS oder PEP 19-2.5-Rho behandelt wurden. Eine zusätzliche Kontrolle stellten Zellen die mit Virus inokuliert wurden, dar. Die Visualisierung der viralen Bindung an die Zelloberfläche erfolgte mittels Fluoreszenz-Analysen, indem die fixierten Zellen mittels spezifisch bindender, fluoreszierender Substanzen oder Antikörpern gefärbt wurden (3.8).

3.7.6 Test zur Bestimmung der Bindung von SALPs an die Viruspartikel

Zur Bestimmung und Visualisierung der Bindung von SALPs an Viruspartikeln wurde mit der Methode der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (3.9) gearbeitet. Dazu wurden A549-Zellen in Ø 35 mm Zellkulturschalen (*µ-Dish* $^{35\,mm,\ high}$ *Grid-500*) ausgesät. Zum Experimentbeginn lag eine Zelldichte von circa 40 % vor. Das Rhodamin-konjugierten SALP PEP 19-2.5-Rho wurde mit Hilfe von PBS auf eine Konzentration von 20 µg/ml eingestellt und auf die zuvor gewaschenen Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation der Peptide mit gelegentlichen Schwenken bei Raumtemperatur und das Entfernen ungebundener Peptide durch einen Waschschritt mit 1x PBS. Vor der Zugabe von 10^9 p.f.u. des H7N7 Virus wurden die Zellen auf 4 °C vorgekühlt. Die Viren wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 1x PBS oder PEP 19-2.5-Rho behandelt wurden. Eine zusätzliche Kontrolle stellten Zellen die mit Virus inokuliert und mit PBS behandelt wurden, dar. Für die weitere Bearbeitung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie (3.9) wurden die Proben für 30 min mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert.

3.7.7 Test zur Bestimmung der von der Zelle internalisierten Viruspartikel

In diesem Test wurde die Menge an internalisierten, viralen NP zwei Stunden nach Infektion in den Zellen ermittelt. Da die Virusreplikation zu einem späteren Zeitpunkt des viralen Replikationszyklus stattfindet, war es möglich eine Aussage über die von den Zellen aufgenommenen Viruspartikel zu treffen. Dieser Test zur Bestimmung der von der Zelle aufgenommenen Viruspartikel wurde verwendet, um die antivirale Wirkung der SALPs auf den viralen Replikationszyklus näher zu untersuchen. Die Visualisierung der aufgenommenen Viruspartikel erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Analysen (3.8).

Für dieses Experiment wurden A549-Zellen 24 h vor Testbeginn in eine 24-Loch-Mikrotiterplatte auf sterile Ø 12 mm Deckgläser ausgesät, um zum Experimentbeginn eine Zellzahl von 2 x 10^5 Zellen mit einer 80 %-igen Konfluenz pro Vertiefung zu erreichen. Der Effekt der SALPs wurde wie unter (3.7.5) bereits beschrieben, im Vor-, Ko- und Nachbehandlungsansatz untersucht. Dabei wurden weitestgehend die Bedingungen analog zu denen des Test zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zellen (3.7.5) gewählt. Im Vergleich zu diesem Test wurden jedoch 20 µg/ml des unkonjugierten Peptids PEP 19-2.5 ohne Rhodamin verwendet. Um die Virusaufnahme in die Zellen zu studieren, wurde eine hohe Infektionsdosis von einer Multiplizität der Infektion (MOI, *multiplicity of infection*) von 25 gewählt. Infiziert wurde mit dem Maus-adaptierten H7N7 Virus SC35M. Im Vor- und Ko-Behandlungsansatz wurden die Zellen nach der Virusinokulation einmal mit 1x PBS gewaschen, für 10 min bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 inkubiert und anschließend nochmals mit 1x PBS gewaschen. Im Nachbehandlungsansatz erfolgte selbige Vorgehensweise nach der Peptidinkubation. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit Virus inokuliert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden. Zur Aufnahme der Viren in die Zellen wurden diese in 500 µl Infektionsmedium für weitere 2 h bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 inkubiert, bevor eine Fixierung der zuvor gewaschenen Zellen mit 4 % PFA erfolgte. Die Färbung des viralen Nukleoproteins erfolgte mittels Immunfluoreszenz (3.8).

3.7.8 Test zur Bestimmung der viralen Replikation

Im Vergleich zu dem Test zur Bestimmung der von der Zelle internalisierten Viruspartikel, (3.7.7) fand in diesem Versuch die Ermittlung der Menge an viralem NP und PB2 6 h nach Infektion statt. Mit dieser Methode wurde die virale Replikation in der Zelle untersucht. Sie diente gleichzeitigt zur Bestimmung der viralen Replikation unter SALP-Behandlung. Die Visualisierung der viralen Proteine erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Analyse (3.8) und Western Blot (3.4.2).

Untersuchung des Einflusses der SALP-Behandlung auf die virale Replikation mittels Immunfluoreszenz

Der Versuchsaufbau für die anschließenden Immunfluoreszenz-Analysen ähnelte dem des Tests zur Bestimmung der von der Zelle internalisierten Viruspartikel (3.7.7). Die einzigen Abänderungen, welche vorgenommen wurden, waren das Verwenden einer geringeren Infektionsdosis von einer MOI von 1 des Maus-adaptierten H7N7 Virus und einer längeren Inkubationszeit von 6 h. Zur Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz (3.8) wurden diese nach einem Waschschritt mit 1x PBS, mit 4 % PFA fixiert.

Untersuchung des Einflusses der SALP-Behandlung auf die virale Replikation mittels Western Blot

Für die Detektion der viralen Proteine mittels Western Blot wurden A549-Zellen 24 h vor Testbeginn in eine 6-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, um eine Zellzahl von 1 x 10^6 Zellen pro Vertiefung zum Zeitpunkt des Experimentbeginns zu erreichen. In diesem Versuch wurden ebenfalls die drei unterschiedlichen Applikationsansätze, Vor-, Ko- und Nachbehandlungsansatz, des Peptids untersucht. Im Vorbehandlungsansatz wurden 20 µg/ml SALP PEP 19-2.5 zu den zuvor gewaschenen Zellen gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichen Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe des Maus-adaptierten H7N7 Virus wurden die ungebundenen Peptide durch einen Waschschritt mit 1x PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 1 des H7N7 Virus für 30 min bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 inkubiert. Danach erfolgten ein Waschschritt mit 1x PBS und eine weitere Inkubation der Zellen in 500 µl Infektionsmedium für 6 h bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2. Im Ko-Behandlungsansatz wurde ein Gemisch aus dem H7N7 Virus (MOI 1) und 20 µg/ml PEP 19-2.5 angefertigt und auf die zuvor gewaschenen Zellen gegeben. Die nachfolgenden Inkubations- und Waschschritte waren identisch zu denen des Vorbehandlungsansatzes. Im Nachbehandlungsansatz wurden die gewaschenen Zellen zuerst mit dem H7N7 Virus (MOI 1) für 30 min bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 inkubiert. Danach erfolgte das Entfernen des Inokululms, das Waschen der inokulierten Zellen und die Peptidapplikation mit 20 µg/ml PEP 19-2.5 für 20 min bei Raumtemperatur. Der sechsstündige Inkubationsschritt bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2 wurde nach einem Waschen der Zellen mit PBS und der Zugabe von 500 µl Infektionsmedium angeschlossen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit Virus inokuliert und mit 1x PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit von 6 h wurden die Zellen je einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit TPCK-EDTA behandelt. Im Anschluss fand die Gesamtproteinextraktion (3.4.1) und die Western Blot Analyse zur Detektion der viralen Proteinmenge (3.4.2) statt.

3.7.9 Analyse des viralen Wachstumsverhaltens auf A549-Zellen

Um den therapeutischen Einfluss der SALPs auf das virale Wachstum des Maus-adaptierten H7N7 Virus zu untersuchen, wurden Wachstumskurven durchgeführt.

Für dieses Experiment wurden 1 x 10^6 A549-Zellen 24 h vor Versuchsbeginn pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät, um zum Experimentbeginn eine Zelldichte von 90 % zu erreichen. Die Zellen wurden vor dem Experimentbeginn einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit einer MOI von 10^{-4} des H7N7 Virus für 1 h bei

37 °C, 96 % rH, 5 % CO_2. Nicht gebundene Viren wurden anschließend durch einen Waschschritt mit 1x PBS entfernt. Nach der Virusinfektion der Zellen fand die Behandlung mit SALPs statt, indem 2 ml Infektionsmedium mit 20 µg/ml oder 50 µg/ml Peptid versetzt und auf die Zellen gegeben wurden. Dieses Infektionsmedium wurde 24 h nach der Infektion (*post infection*, p.i.) durch frisches, ebenfalls SALP-enthaltendes Infektionsmedium ausgetauscht. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Virus infiziert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden. Ein Volumen von 100 µl des Zellüberstandes wurde jeweils 1 h, 24 h und 48 h p.i. abgenommen, bei -20 °C archiviert und zu einem späteren Zeitpunkt hinsichtlich des viralen Titers mittels Plaquetest (3.7.4) untersucht.

3.8 Fluoreszenz-Analysen

Die Visualisierung bestimmter viraler oder zellulärer Strukturen erfolgte durch den Einsatz von Fluorophor-gekoppelten Substanzen die spezifisch an die Zielstruktur binden. Diese Methode kam im Test zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zelle (3.7.5), im Test zur Bestimmung der von der Zelle internalisierter Viruspartikel (3.7.7), im Test zur Bestimmung der viralen Replikation (3.7.8) sowie zur Detektion der SALPs nach i.n. Applikation in der Maus (3.10.3) zum Einsatz.

Im Test zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an die Zelle (3.7.5) wurden die *N*-Acetylneuraminsäuren auf der Oberfläche der Zellen und die an die Zellen gebundenen pH1N1-Viren visualisiert. Für die Färbung der zellulären *N*-Acetylneuraminsäuren wurde das Fluorescein *Sambucus nigra* Lektin verwendet, welches bevorzugt mit α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren interagiert. Die α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren sind die am meisten exprimierten zellulären Influenzavirusrezeptoren auf den A549-Zellen. Die Lektine wurden auf eine Konzentration von 5 µg/ml mit TBS-Puffer eingestellt und ein Tropfen dieser Lektin-Lösung (circa 15 µl) wurde auf Parafilm aufgebracht. Die Deckgläser mit den PFA-fixierten Zellen wurden mit TBS-Puffer gewaschen, aus der 24-Loch-Mikrotiterplatte entnommen und auf den aufgebrachten Tropfen gelegt. Nach einer circa 16-stündigen Inkubation bei 4 °C in einer dunklen, luftdicht verschlossen Box wurden ungebundene Lektine durch mehrmalige Waschschritte mit 1x PBS entfernt. Anschließend wurden die pH1N1 Viren mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Dazu wurde das Serum von pH1N1-infizierten Mäusen, welches 14 Tage p.i. entnommen und bei -80 °C archiviert wurde, zur Verfügung gestellt. Das Vorhandensein spezifischer pH1N1-Antikörper im Mausserum wurde mittels Western Blot bestätigt. Das Serum, zur Detektion des an die Zelle gebundenen Virus, wurde mit 1x PBS auf einen HAI-Titer (*hemagglutination inhibition*) von 1:80 eingestellt. Anschließend wurden 15 µl des Serums auf Parafilm aufgetragen und mit den an dem Deckglas fixierten Zellen bedeckt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C, 5 %

CO_2 und 96 % rH in einer dunklen, luftdicht verschlossenen Box. Danach wurde das Deckglas mit 1x PBS gewaschen und eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 und 96 % rH mit dem 1:500 in 1x PBS verdünnten Sekundärantikörper Anti-Maus-Alexa Fluor® 647 wurde angeschlossen. Die Eindeckelung der gefärbten und mit PBS gewaschenen Schnitte wurde mit Mowiol durchgeführt. Die Aufnahme von Z-Stapeln der Zellen erfolgte am Konfokalmikroskop C2+. Mit Hilfe des Programms *Imaris 7.6.1* wurden die Bilder anschließend bearbeitet und eine 3D-Rekonstruktion zur besseren Darstellung der Zelloberfläche, angefertigt.

Für den Test zur Bestimmung der von der Zelle internalisierten Viruspartikel (3.7.7) und für den Test zur Bestimmung der viralen Replikation (3.7.8) wurde das virale NP mittels Immunfluoreszenz detektiert. Dazu wurden das PFA auf den fixierten Zellen entfernt und die Zellen wurden mit 0,3 % Triton permeabilisiert. Der Primärantikörper Anti-NP wurde 1:750 in SuperBlock verdünnt, 500 µl dieser Antikörperlösung wurden auf die Zellen gegeben und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Taumel-Wipptisch inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde in drei Waschschritten von jeweils 5 min mit 1x PBS von den Zellen entfernt. Als Sekundärantikörper kam der 1:1000 in 1x PBS verdünnte Anti-Maus-Alexa Fluor® 488 zum Einsatz. Ein Volumen von 15 µl des verdünnten Antikörpers wurde auf Parafilm aufgebracht und anschließend mit dem von Zellen besetzten Deckglas bedeckt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 und 96 % rH in einer dunklen, luftdicht verschlossen Box. Die Deckgläser mit den gefärbten und anschließend mit 1x PBS gewaschenen Zellen wurden mit Mowiol eingedeckelt. Die Aufnahme der Zellen erfolgte am Konfokalmikroskop C2+. Mit Hilfe des Programms Image J wurden die Bilder anschließend bezüglich der Farbtabellenauswahl und -modifikation (*look up table*, LUT) bearbeitet und finalisiert.

In den angefertigten murinen Gewebeschnitten (3.10.6; 3.11.1; 3.11.2), des Tests zur Bestimmung der Lokalisation der SALPs nach i.n. Applikation (3.10.3) wurde die DNA zur besseren Visualisierung der Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Dazu wurde DAPI 1:5000 in 1x PBS verdünnt und für 5 min auf den Zellen inkubiert. Die Eindeckelung der entwässerten Schnitte erfolgte mit Mowiol. Die Detektion des fluoreszierenden Rhodamin-konjugierten PEP 19-2.5-Rho und der DNA erfolgte am Mikroskop ECLIPSE Ni-E und wurde von der DS-Fi2 Kamera aufgenommen. Zur Aufnahme und anschließenden Bearbeitung der Bilder wurde das Programm *Elements* AR 4_2000 verwendet.

3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um die Bindung der SALPs an die Viruspartikel zu untersuchen, wurde die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Die TEM-Aufnahmen wurden von unseren Kooperationspartnern Dr. Rudolph Reimer und Carola Schneider der Technologieplattform Mikroskopie und Bildanalyse am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie angefertigt. Dazu wurden die Glutaraldehyd-fixierten Proben (3.7.6) zunächst mit 1x PBS gewaschen. Für die Färbung der Zellen wurde diese für 30 min mit einer 1 %-igen Osmiumtetroxidlösung (OsO_4) inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung durch Waschschritte mit ddH_2O entfernt. Die Zellen wurden mit einer Gallussäurelösung behandelt, welche mit einer 1 %-igen Natriumsulfatlösung ebenfalls wieder entfernt, wurde. Zum Schneiden der Proben wurden die Proben zunächst in einer graduell aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert, in Eponharz eingebettet und einzelne Sektionen der Zellkulturschale wurden mit einem Hammer und einer Ø 4 mm Lochstanze erhalten. Mit Hilfe des Mikrotoms *Ultracut Micotome* wurden 50 nm ultradünne Schnitte quer zur Zellkulturschale angefertigt. Abschließend wurden die Schnitte mit einer Kontrast-Färbelösung behandelt. Die TEM-Aufnahmen entstanden durch die *Veleta CCD* Kamera, welche am Transmissionselektronenmikroskop *FEI Technai G 20 Twin* mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV angeschlossen war.

3.10 Tierexperimentelle Methoden

Das Tiermodell Maus wurde in dieser Arbeit genutzt, um die antivirale Aktivität der SALPs gegen Influenza A Viren *in vivo* zu evaluieren. Dabei stellt das Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenität, Letalität, des Gewichtsverlusts und des Organtropismus ein sehr gutes, in der Influenza-Forschung etabliertes Modell dar (Bouvier und Lowen, 2010). Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden circa 8 Wochen alte, weibliche sowie männliche BALB/c Mäuse verwendet. Diese wurden entweder von Charles River oder der hauseigenen SPF-Zucht des Heinrich-Pette-Instituts, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie bezogen. Die beschriebenen Experimente wurden unter Einhaltung der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetztes in den Tierversuchsbereichen des Heinrich-Pette-Instituts unter BSL-2 Bedingungen durchgeführt. Der Tierversuchsantrag zur Durchführung dieser Tierversuche mit der Genehmigungsnummer 29/09 wurde vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg genehmigt.

3.10.1 Narkose und Tötungsmethoden

Zum Narkotisieren der Tiere wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen wurde eine kurze Sedierung der Tiere mittels inhalativer Isofluran-Kurznarkose erreicht. Zum anderen wurden, für eine längere Narkose von etwa einer Stunde, 200 µl einer Ketamin-Xylazin-Narkose intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Das Narkosemittel, bestehend aus 100 mg/kg Ketamin, 10 mg/kg Xylazin und 0,9 %-iger NaCl-Lösung wurde mit einer Einmal-Injektionskanüle (26G x 3/8“, 0,45 x 10 mm) i.p. appliziert. Die Isofluran-Narkose wurde eingesetzt, wenn die Tiere mehrmals einmal täglich mit SALPs behandelt wurden (3.10.2; 3.10.4) und bevor eine Tötung der Tiere erfolgte. Im Vergleich dazu kam die Ketamin-Xylazin-Narkose bei der intranasalen (i.n.) Infektion mit Influenzaviren (3.10.4) oder der einmaligen i.n. Applikation der SALPs zum Einsatz (3.10.2). Die Tiere wurden zum Versuchsende, vor der Organentnahme oder beim Erreichen der Abbruchkriterien durch zervikale Dislokation mit vorangegangener Isofluran-Narkose getötet.

3.10.2 Toxizität der SALPs in der Maus

Zur Toxizitätsbestimmung der SALPs in der Maus wurden Ketamin-Xylazin-narkotisierten Mäusen 5 µg (*n*=10), 20 µg (*n*=5), 50 µg (*n*=9) oder 100 µg (*n*=10) SALP PEP 19-2.5 verabreicht. Für die Herstellung der jeweiligen Dosis wurden die SALPs in sterilem 1x PBS verdünnt und anschließend wurden 70 µl dieser SALP-Lösung den Mäusen intranasal verabreicht. Als Kontrollen dienten Mäuse, die mit 70 µl PBS (*n*=10) oder 70 µl 5 µg/ml des Kontrollpeptids PEP 19-CP (*n*=10) behandelt wurden. Die Tiere wurden täglich hinsichtlich des Aussehens sowie des Verhaltens kontrolliert und das Gewicht dieser Tiere wurde mindestens aller zwei Tage für einen Versuchszeitraum von 14 Tagen bestimmt. Jeweils zwei Mäuse der mit 5 µg PEP 19-2.5 behandelten Gruppe, sowie je zwei Mäuse der beiden Kontrollgruppen, wurden drei Tage nach der Behandlung für eine Organentnahme verwendet (3.10.5).

In einem zweiten Toxizitätsversuch wurde die mehrmalige Gabe von SALPs *in vivo* untersucht. Dafür wurden fünf Mäuse für sieben Tage einmal täglich mit 5 µg SALP PEP 19-2.5 i.n. behandelt. Die erste Applikation der Peptide in einem Volumen von 25 µl erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorherigen Untersuchungen unter Ketamin-Xylazin-Narkose, während die folgenden Behandlungen mit ebenfalls 25 µl unter einer kurzen Isofluran-Narkose stattfanden. Die Tiere wurden ebenfalls täglich, wie bereits oben beschrieben, für einen Versuchszeitraum von 14 Tagen kontrolliert und das Gewicht dieser Tiere wurde mindestens aller zwei Tage bestimmt.

3.10.3 Lokalisation der SALPs in der Maus nach i.n. Applikation

Zur Bestimmung der Lokalisation der SALPs im murinen Respirationstrakt nach intranasaler Applikation, wurden die Mäuse (*n*=3) mit 5 µg SALP PEP 19-2.5-Rho behandelt. Für die Herstellung der jeweiligen Dosis wurden SALPs in PBS verdünnt und anschließend wurden 70 µl dieser SALP-Lösung den Ketamin-Xylazin-narkotisierten Tieren i.n. verabreicht (3.10.1). Als Kontrolle diente eine Maus, welche mit PBS behandelt wurde. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 min, 30 min oder 45 min) nach der Behandlung wurden die Mäuse für eine anschließende Organentnahme euthanasiert (3.10.1).

3.10.4 Überlebensversuche

Die Infektionsversuche in der Maus wurden mit dem rekombinanten Maus-adaptierten H7N7 Virus durchgeführt (3.7.1; 3.7.2). Die mittlere Maus-letale Dosis 50 (MDL_{50}) dieses Virus wurde mit fünf Mäusen pro Gruppe nach der Methode von Reed und Muench überprüft (Reed und Muench, 1938). Dabei wurden Viruskonzentrationen von 10^2 p.f.u., 10^3 p.f.u., 10^4 p.f.u. und 10^5 p.f.u. des H7N7 Virus SC35M mit sterilem 1x PBS angefertigt. Ein Volumen von 50 µl dieser Virusverdünnungen wurde anschließend in die Nasenlöcher der Ketamin-Xylazin-narkotisierten Mäuse pipettiert. Als Kontrolle diente eine mit PBS behandelte Gruppe. Über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen wurden die Tiere täglich kontrolliert und das Gewicht dieser Tiere wurde dokumentiert. Die Tiere wurden vorzeitig aus dem Versuch genommen und euthanasiert, wenn eines der im Tierversuchsantrag beschriebenen Abbruchkriterien erfüllt wurde, beispielsweise wenn ein Gewichtsverlust von 25 % in Bezug auf das Ausgangsgewicht erreicht wurde. Aus der Anzahl der verstorbenen bzw. überlebenden Tiere der jeweiligen Gruppen wurde anschließend die MLD_{50} nach Reed und Muench (Reed und Muench, 1938) berechnet.

Antivirale Aktivität der SALPs im Ko-Behandlungsansatz

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der SALPs im Mausmodell wurden Überlebensversuche unter SALP-Behandlung durchgeführt. In diesem Experiment wurde ein Gemisch aus 5 µg SALP PEP 19-2.5 und 10^4 p.f.u. des H7N7 Virus (~15-fache MLD_{50}) hergestellt. Ein Volumen von 70 µl dieses Peptid-Virus Gemischs wurde anschließend den Ketamin-Xylazin-narkotisierten Mäuse (*n*=17) i.n. verabreicht. Als Kontrollen dienten infizierte und mit PBS (*n*=15) oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP (*n*=16) behandelte Mäuse. Der weitere Versuchsablauf wurde identisch zu den zuvor beschriebenen Überlebensversuchen durchgeführt. Jeweils 2-3 Tiere pro Gruppe wurden für die Organentnahmen am Tag 3 oder 6 p.i. (3.10.5) verwendet.

Antivirale Aktivität der SALPs im therapeutischen Behandlungsansatz

Die therapeutische Behandlung mit SALPs nach der Influenzavirusinfektion wurde ebenfalls im Mausmodell untersucht. Dabei wurden neun Mäuse pro Gruppe mit Ketamin-Xylazin narkotisiert und anschließend mit 50 µl $2{,}3x10^3$ p.f.u. des H7N7 Virus (5-fache MLD_{50}) i.n. infiziert. Etwa 30 min nach der Virusinfektion wurde eine i.n. Behandlung mit 5 µg PEP 19-2.5, angesetzt in 25 µl PBS, durchgeführt. Für sechs weitere Tage wurde die gleiche Menge der SALPs in einem Volumen von 25 µl i.n. appliziert. Dafür wurden die Tiere nur kurz mittels Isofluran narkotisiert. Als Kontrolle diente eine mit PBS behandelte H7N7-infizierte Kontrollgruppe (*n*=8). Zusätzlich wurde in einer weiteren Kontrollgruppe die antivirale Wirkung von Oseltamivir auf die H7N7 Virusinfektion in der Maus evaluiert. Dazu wurden die Tiere (*n*=11) wie bereits beschrieben mit H7N7 infiziert und 30 min nach der Infektion mit 100 mg/kg Oseltamivir oral behandelt. Die tägliche Oseltamivir-Behandlung wurde für weitere 6 Tage fortgesetzt. Für diese Studien wurde Oseltamivir in PBS verdünnt und ein Volumen von 33 µl dieser Oseltamivirlösung wurden in den Oesophagus, der fixierten und im Halsbereich überstreckten Mäuse mit der Pipette, appliziert. Die Tiere wurden für die Versuchsdauer von 14 Tagen täglich überprüft und das Gewicht wurde dokumentiert. Von drei Mäusen wurden die Organe zur immunhistochemischen Untersuchung am Tag 5 p.i. entnommen (3.10.5).

3.10.5 Organentnahmen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation mit vorangegangener Isofluran-Narkose getötet. Der Thorax und der Bauchraum wurden von ventral mit einer Schere eröffnet. Anschließend wurde die Lunge freipräpariert und entnommen. Die Mauslunge wurde für immunhistochemische Untersuchungen von Gewebedünnschnitten (3.11.4) und zur Bestimmung der viralen Lungentiter mittels Plaquetest (3.7.4) verwendet. Die Vorbereitung der Organe für beide Analysen ist unter Präparation von murinen Organen für Folgeuntersuchungen (3.10.6) näher erläutert.

3.10.6 Präparation von murinen Organen für Folgeuntersuchungen

Für immunhistochemische Analysen wurden die entnommenen Organe (3.10.5) für 24 h in 4 % PFA fixiert. Danach wurde das PFA durch 1x PBS ersetzt und bei 4 °C bis zur histologischen bzw. immunhistochemischen Färbung (3.11.4) gelagert. Für Virustiter-Bestimmungen wurden die isolierten Lungen in mit Glasperlen bestückte Reaktionsgefäße überführt und das Gewicht der Gewebe wurde ermittelt. Anschließend wurde das Organ in 1 ml sterilem 1x PBS aufgenommen und für 20 min bei 30 Hz und 4 °C in einer

Schwingmühle homogenisiert. Zum Entfernen größerer Gewebetrümmer wurde die Probe anschließend für 5 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene, virushaltige Überstand wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bis zur Durchführung des Plaquetests, zur Ermittlung des Virustiters (3.7.4), bei -80 °C archiviert.

3.11 Histologische Methoden

Aus den entnommenen Organen wurden Gewebeschnitte angefertigt (3.11.1) und Hämatoxylin-Eosin- (HE) oder immunhistochemische Färbungen (3.11.3; 3.11.4) durchgeführt. Dadurch war es möglich verschiedene Fragestellungen bezüglich der Toxizität der SALPs in der Maus (3.10.2), der Lokalisation der SALPs nach i.n. Applikation in der Maus (3.10.3) und der Pathogenität zu (3.10.4) untersuchen.

3.11.1 Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten am Mikrotom

Aus zuvor entnommenen und präparierten Organen (3.10.5; 3.10.6) wurden formalinfixierte, paraffineingebettete (FFPE)-Gewebeschnitte für histologische und immunhistologische Untersuchungen hergestellt. Dazu wurden die Gewebe in einem Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten ASP 300 sequenziell in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe inkubiert, mit Hilfe von Xylol entwässert und anschließend mit Paraffin infiltriert. Dabei wurde das folgende Programm angewandt:

Schritt	**Dauer**	**Temperatur**
Ethanol 70 %	1 h	RT
Ethanol 80 %	1 h	RT
Ethanol 90 %	1 h	RT
Ethanol 95 %	1 h	RT
Ethanol 100 %	1 h	RT
Ethanol 100 %	1,5 h	RT
Xylol I	1 h	RT
Xylol II	1 h	RT
Paraffin Typ 3	1 h	58 °C
Paraffin Typ 3	1 h	58 °C
Paraffin Typ 3	1 h	58 °C

Nach Abschluss des Programms wurden die Gewebe mittels einer Paraffingießstation in Paraffinblöcke eingebettet und zur Lagerung bei Raumtemperatur im Dunklen aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der Paraffinblöcke für das Schneiden, wurden diese auf einer Kühlplatte für circa 2 h bei -13 °C gekühlt. Mit Hilfe des Mikrotom HM325 wurden aus den Paraffinblöcken 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, welche anschließend im 37 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf einem SuperFrost/Plus-Objektträger aufgenommen wurden. Die Trocknung erfolgte für circa 16 h bei 37 °C in einem Umluftwärmeschrank. Die getrockneten Schnitte wurden bei Raumtemperatur im Dunklen gelagert, bevor sie immunhistochemisch gefärbt wurden.

3.11.2 Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten

Zur Färbung der FFPE-Gewebeschnitte müssen diese entparaffiniert und rehydriert vorliegen. Dieser Vorgang wurde manuell über sequentielle Inkubationsschritte in *Ottix Shaper* und *Ottix Plus,* welche als Alkohol- oder Xylol-Ersatz dienen, durchgeführt.

Schritt	**Dauer**
Ottix Plus (I)	5 min
Ottix Plus (II)	5 min
Ottix Plus (III)	5 min
Ottix Plus (IV)	5 min
Ottix Shaper (I)	2 min
Ottix Shaper (II)	2 min
Ottix Shaper (III)	2 min
Ottix Shaper (IV)	2 min
ddH_2O	2 min
ddH_2O	2 min

3.11.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur besseren lichtmikroskopischen Untersuchung der FFPE-Gewebeschnitte wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Dabei färbt der Farbstoff Hämatoxylin saure bzw. basophile Strukturen, wie beispielsweise den Zellkern oder das Endoplasmatische Retikulum blau an. Im Gegensatz dazu werden Zellplasmaproteine und Mitochondrien, welche einen basischen oder eosinophilen Charakter besitzen durch Eosin rot gefärbt. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für 4 min bei Raumtemperatur in Hämatoxylinlösung inkubiert und anschließend unter Leitungswasser geschwenkt. Danach wurden die Schnitte für ein paar Sekunden in einer Lösung, bestehend aus 97 % Ethanol und 3 % HCl, differenziert und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Eosin-Färbung wurde durch eine 25-sekündige

Inkubation mit dem Farbstoff Eosin durchgeführt. Nach der erfolgreichen HE-Färbung wurden die Schnitte wieder nach folgendem Protokoll entwässert:

Schritt	**Dauer**
Ottix Shaper (I)	10x eintauchen
Ottix Shaper (II)	10x eintauchen
Ottix Shaper (III)	10x eintauchen
Ottix Shaper (IV)	5 min
Ottix Plus (I)	10x eintauchen
Ottix Plus (II)	10x eintauchen
Ottix Plus (III)	10x eintauchen
Ottix Plus (IV)	10x eintauchen
Xylol	10x eintauchen
Xylol	10 min

Die Eindeckelung der entwässerten Schnitte erfolgte mit Eukitt. Die Aufnahmen der HE-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Durchlichtmikroskop Axioskop 2 mit der ProgRes C12 plus Kamera gemacht. Die Bearbeitung der Bilder fand mit der *ImageAccess Software v.5.1* sowie *Adobe® Photoshop® CS4 Extended v.11.0.2* Software statt.

3.11.4 Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P)

Die spezifische Detektion von viralem Antigen in Lungengewebedünnschnitten erfolgte in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Färbung. Diese Methode ermöglicht eine Aussage über den Grad der viralen Infektion und den viralen Tropismus im primären Zielorgan. Um eine qualitativ hochwertige Färbung der Schnitte mit den Antikörpern zu garantieren und die Hintergrundfärbungen zu reduzieren, wurde zunächst eine Reihe an Blockierungsschritten durchgeführt. Dazu wurden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte (3.11.2) für 16 min bei 850 W und anschließend für 5 min bei 450 W in einem *Citrat Plus Puffer* zur Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle aufgekocht. Nach einer Abkühlung der Proben für circa 20 min erfolgte ein 5-minütiger Waschschritt mit 1x PBS. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase, welche zu einer starken DAB-Hintergrundfärbung bei einer Detektion mittels HRP-Konjugat führen kann, wurden die Schnitte für 15 min in einem Peroxidase-Blocking-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS für 5 min wieder entfernt. Danach erfolgte die 15-minütige Avidin/Biotin-Blockierung mit Hilfe des *Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001* und die anschließende 30-minütige Blockierung unspezifischer Bindungen mittels 10 %-igem in PBS verdünnten Eselserum. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Primärantikörper, Anti-H7N1

Serum, welcher 1:2000 in 1x PBS verdünnt wurde, für 75 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, Anti-Kaninchen-Biotin für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde dabei 1:200 in 1x PBS, welches 2 % Eselserum enthielt, verdünnt. Die Bindung des Streptavidin-HRP-Konjugats an den biotinylierten Sekundärantikörper wurde mit Hilfe des *ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit* durch eine 15-minütige Inkubation gewährleistet. Zum Entfernen der ungebundener Antikörper und des ungebundenen Streptavidin-HRP-Konjugats wurden die Schnitte zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten mehrmals mit 0,05 % Tween-PBS oder 1x PBS gewaschen. Die indirekte, immunhistochemische Färbung des viralen Antigens erfolgte durch die Zugabe des HRP-Substrats, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion nach circa 3-5 min mit ddH_2O gestoppt. Zur besseren lichtmikroskopischen Untersuchung wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (3.11.3) angeschlossen. Die Eindeckelung der Schnitte erfolgte mit Eukitt. Die Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Durchlichtmikroskops Axioskop 2 mit der ProgRes C12 plus Kamera oder dem Mikroskop ECLIPSE Ni-E mit der DS-Fi2 Kamera gemacht. Die Bearbeitung der Bilder fand mit den Programmen *Elements* AR 4_2000 und *Adobe® Photoshop® CS4 Extended v.11.0.2* statt.

3.12 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten erfolgte mittels der Statistiksoftware *GraphPad Prism 5 v.5.03* für Windows (Graphpad Software, Inc.) und *GraphPad Prism (Graphpad, abgerufen am 10.12.2013)*. Die statistische Signifikanz lag bei einem P-Wert von <0,01 vor und wurde in den Abbildungen durch *p<0,01 oder **p<0,001 gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz der Überlebensraten der infizierten und PBS-behandelten Tiere im Vergleich zu den infizierten und SALP-behandelten Tieren wurde mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Tests im *GraphPad Prism 5* Programm berechnet. Der Student‘s-*t*-Tests wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz aller anderen Daten eingesetzt.

4 Ergebnisse

Die neue Gruppe synthetischer Peptide, die sogenannten SALPs, wurden gegen das LPS von gramnegativen Bakterien designt. Die Peptide weisen jedoch nicht nur gegen gramnegative sondern ebenfalls gegen grampositive Bakterien eine antimikrobielle Wirkung auf (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Schuerholz *et al.*, 2012; Heinbockel *et al.*, 2013). Des Weiteren besitzen sie eine antivirale Aktivität gegen ein breites Spektrum an Viren, wie beispielsweise HIV, HBV, HCV und HSV (Krepstakies *et al.*, 2012). Diese antivirale Aktivität wird durch die spezifische Bindung der SALPs an Heparansulfat vermittelt, welches als zellulärer Ko-Rezeptor dieser Viren zur Bindung an die Zelle genutzt wird (Krepstakies *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob diese Peptide ein breites Spektrum von Viren inhibieren können, wurde in dieser Arbeit die antivirale Aktivität der SALPs gegen Influenza A Viren evaluiert. Da die bereits publizierte antivirale Aktivität auf eine verminderte Bindung der Viren an die Zelloberfläche durch die von SALPs gebundenen Ko-Rezeptoren zurück zu führen ist, wurde zunächst eine mögliche Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor der Influenza A Viren getestet.

4.1 Bindungsaffinität der SALPs an *N*-Acetylneuraminsäuren

Die Analyse der Bindungsaffinität von SALPs an den Rezeptor der Influenza A Viren, der *N*-Acetylneuraminsäure, fand mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie statt. Diese Methode wurde bereits zur Ermittlung der spezifischen Bindung von SALPs an Heparansulfat in den vorherigen Studien angewandt (Krepstakies *et al.*, 2012). Die SALPs wurden zu der *N*-Acetylneuraminsäure titriert und die Änderung der Enthalpie, die bei einer direkten Interaktion dieser Moleküle entsteht, wurde mit Hilfe des isothermen Titrationskalorimeters gemessen. Als Kontrolle diente das nicht-positiv geladene Kontrollpeptid PEP 19-CP.

Die in diesem Versuch eingesetzten Peptide PEP 19-2.5, PEP 19-4 und PEP 19-8D zeigten eine starke Interaktion mit der *N*-Acetylneuraminsäure, welche sich durch eine exotherme Reaktion auszeichnete (Abb. 8). Im Vergleich dazu wurde während der Titration des Kontrollpeptids PEP 19-CP zu der *N*-Acetylneuraminsäure keine Änderung der Enthalpie gemessen (Abb. 8A). Das bedeutet, das Kontrollpeptid PEP 19-CP zeigte keine Bindung an die *N*-Acetylneuraminsäure. Die stärkste exotherme Reaktion wurde mit dem Peptid PEP 19-2.5 detektiert (Abb. 8B). Eine Sättigung der *N*-Acetylneuraminsäure wurde bei einem molaren Verhältnis von PEP 19-2.5 zu *N*-Acetylneuraminsäure von 5 bis 6 erhalten (Abb. 8B). Eine schwächere Reaktion fand mit den Peptiden PEP 19-8D, gefolgt von PEP 19-4 statt (Abb. 8C, D). Die Sättigung der *N*-Acetylneuraminsäure lag für das PEP 19-8D und PEP 19-4 bei einem molaren Verhältnis von 6 bis 8 bzw. 11 bis 12 vor (Abb. 8C, D).

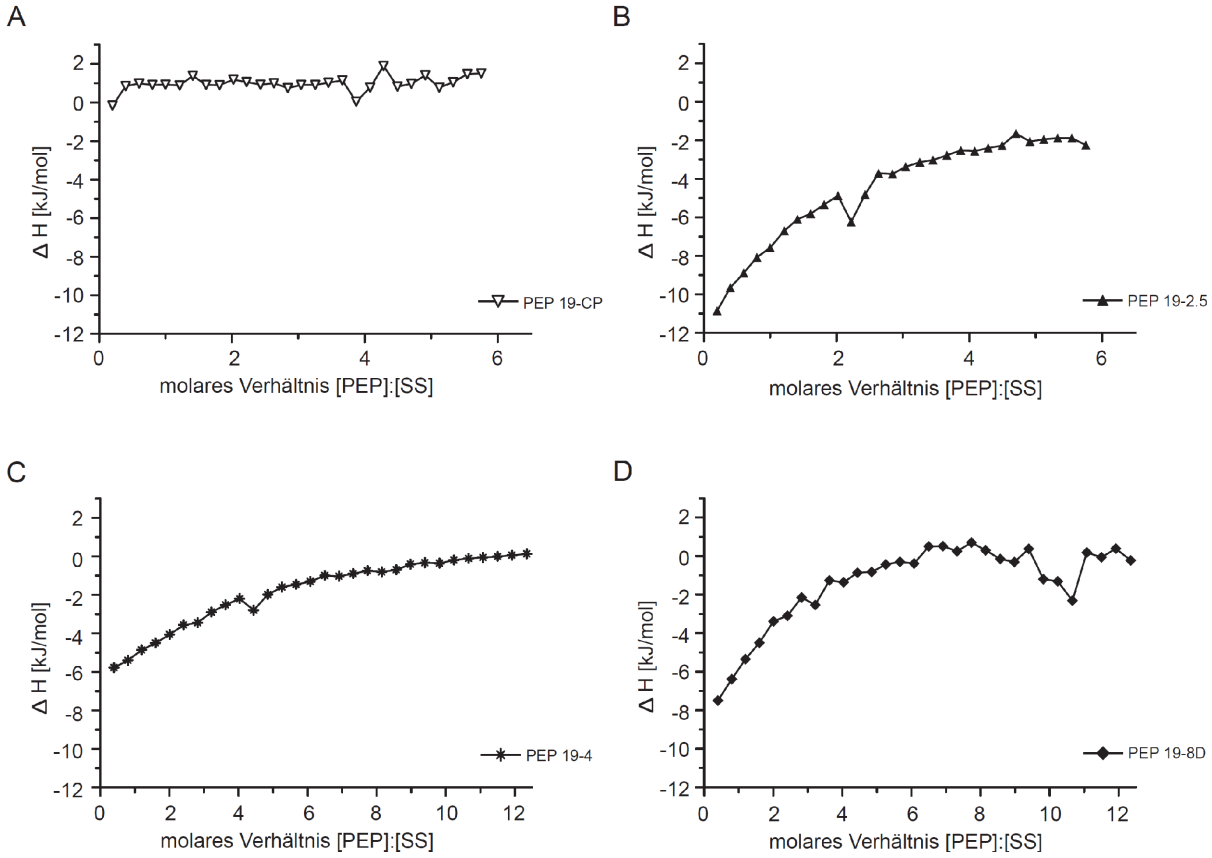


Abb. 8: Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor der *N*-Acetylneuraminsäure

Für die isotherme Titrationskalorimetrie wurde das Peptid PEP 19-2.5 (5 mM, in 20 mM HEPES-Puffer) (B), PEP 19-4 (10 mM, in 20 mM HEPES-Puffer) (C) oder PEP 19-8D (10mM, in 20 mM HEPES-Puffer) (D) zu der *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure, SS) (0,05 mM, in 20 mM HEPES-Puffer) titriert. Als Kontrolle diente das Peptid PEP 19-CP (5 mM, in 20 mM HEPES_Puffer) (A). Die Änderung der Enthalpie wurde mit Hilfe des isothermen Titrationskalorimeters *MSC isothermal titration calorimeter* bestimmt. Die Titration der Peptide wurde nach der Sättigung der *N*-Acetylneuraminsäure bei einem molaren Verhältnis von Peptid (PEP) zu *N*-Acetylneuraminsäure (SS) von 6 für PEP 19-2.5 und PEP 19-CP und von 12 für PEP 19-4 und PEP 19-8D gestoppt. Die Werte, die nach einer Titration der SALPs zu HEPES-Puffer entstanden, wurden als Hintergrundsignal von den restlichen Messwerten abgezogen. Dargestellt ist die repräsentative Änderung der Enthalpie aus einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche.

Die Daten zeigen eine spezifische und direkte Bindung der SALPs an die *N*-Acetylneuraminsäure, wobei das Peptid PEP 19-2.5 die stärkste Interaktion aufweist. Aufgrund der Erkenntnis, dass die Peptide spezifisch an den zellulären Rezeptor von Influenza A Viren binden, wurde in den nächsten Versuchen der Einfluss der SALPs auf die Bindung der Viren an die *N*-Acetylneuraminsäure auf der Zelloberfläche ermittelt.

4.2 Virale Hämagglutination von Hühnererythrozyten während der SALP-Behandlung

Zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der SALPs auf die virale Bindung an Erythrozyten, welche reichlich *N*-Acetylneuraminsäure auf der Zelloberfläche exprimieren, wurde ein Hämagglutinationstest durchgeführt.

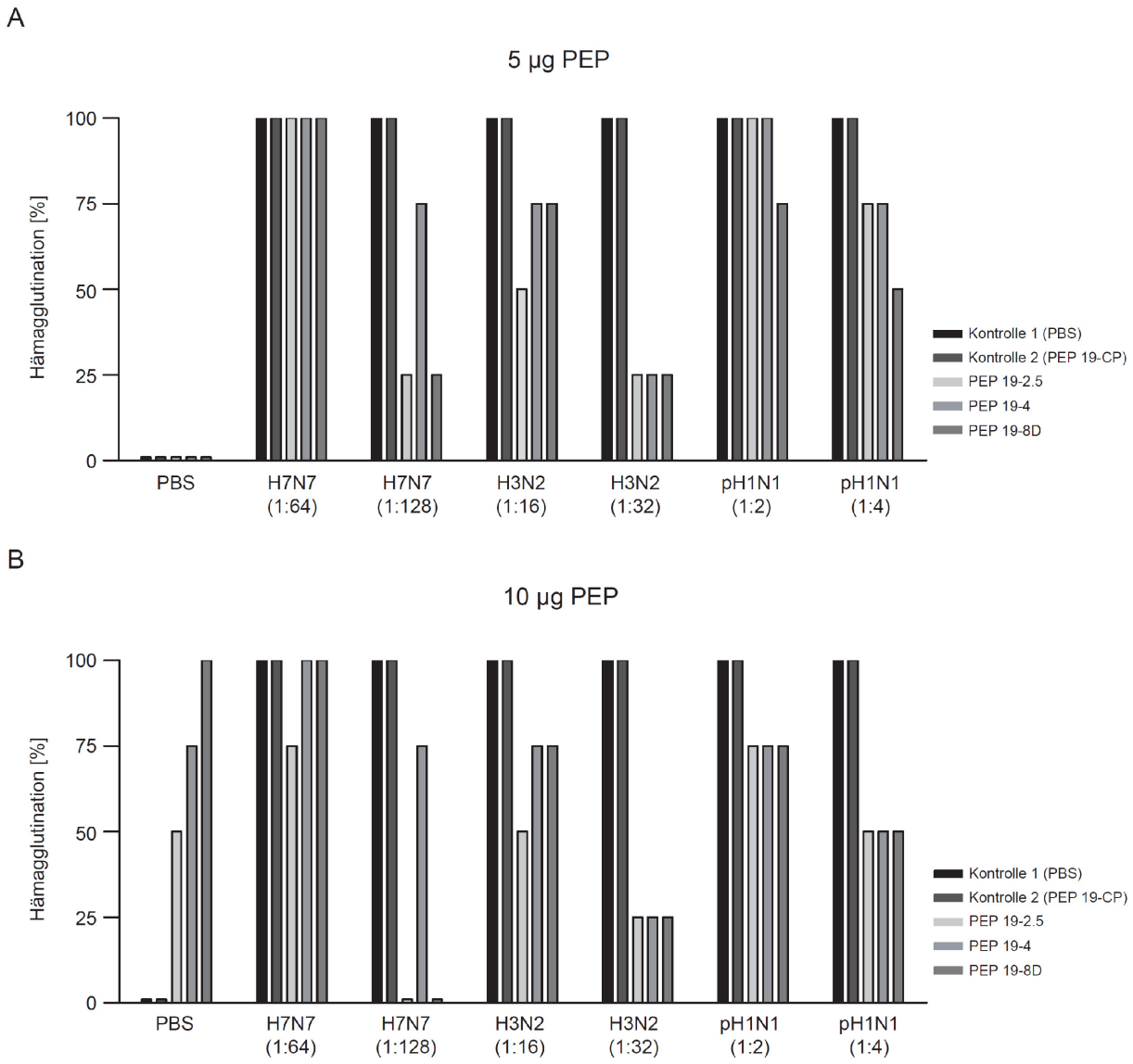


Abb. 9: H7N7-, H3N2- und pH1N1-Hämagglutination von Hühnererythrozyten während der gleichzeitigen SALP-Behandlung

Hühnererythrozyten wurden mit einem Gemisch bestehend aus H7N7 (1:64 oder 1:128 verdünnt in 1x PBS), H3N2, (1:16 oder 1:32 verdünnt in 1x PBS) oder pH1N1 Viren (1:2 oder 1:4 verdünnt in 1x PBS) und 5 µg (A) oder 10 µg (B) des jeweiligen SALPs (PEP 19-2.5, PEP 19-4, PEP 19-8D) inkubiert. Als Kontrolle diente eine Behandlung der Erythrozyten mit Viren und mit PBS (Kontrolle 1) oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP (Kontrolle 2). Zusätzlich wurden Erythrozyten mit den SALPs, PBS oder PEP 19-CP inkubiert. Die virale Hämagglutination wurde nach einer 45-minütigen Inkubation auf Eis ermittelt. Der Grad der Hämagglutination wurde in einen prozentualen Wert umgewandelt. Eine vollständige Hämagglutination der Hühnererythrozyten entsprach dabei einem prozentualen Wert von 100 % und das Ausbleiben der Hämagglutination und die Sedimentation der Erythrozyten wurde 0 % gesetzt. Dargestellt ist die repräsentative prozentuale Hämagglutination aus einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche.

Dazu wurde ein Gemisch von Virus und Peptid zu Hühnererythrozyten gegeben und die virale Hämagglutinationseigenschaft wurde gemessen. Die Inkubation erfolgte auf Eis um die Neuraminidase zu inhibieren, welche sonst die Virusbindung an die Erythrozyten wieder entfernen würde. Um das antivirale Spektrum von SALPs zu untersuchen, wurden verschiedene Influenza A Virussubtypen, wie z.B. das Maus-adaptierte H7N7, das humane H3N2 und das 2009 pandemische H1N1 Virus (pH1N1) verwendet. Als Kontrolle diente die

Behandlung mit PBS oder dem ungeladenen Kontrollpeptid PEP 19-CP. Zur weiteren Kontrolle wurden die Erythrozyten mit den jeweiligen SALPs, PBS oder dem Kontrollpeptid, ohne die Zugabe von Viren inkubiert.

Die SALPs zeigten eine Inhibierung der viralen Hämagglutination von allen drei Influenzavirussubtypen (Abb. 9). Im Vergleich dazu wiesen PBS- oder Kontrollpeptid PEP 19-CP-behandelte Proben eine durch die Bindung des Virus an die Erythrozyten hervorgerufene Hämagglutination der Hühnererythrozyten von 100 % auf (Abb. 9). In der Abwesenheit des Virus bei einer Inkubation der Erythrozyten mit PBS oder dem Kontrollpeptid allein, sedimentierten die Erythrozyten und die virale Hämagglutination entsprach 0 % (Abb. 9). Die antivirale Wirkung der SALPs auf die virale Hämagglutination variierte abhängig vom Virussubtyp, von der Virusverdünnung, vom jeweils eingesetzten Peptid sowie der Menge des Peptids (Abb. 9). Dabei inhibierten die SALPs die virale Hämagglutination von Hühnererythrozyten effizienter bei einer höheren als bei einer niedrigeren Virusverdünnung (Abb. 9). Die Peptide PEP 19-2.5 und PEP 19-8D reduzierten die virale Hämagglutination bis zu 100 % und zeigten damit die stärksten Effekte, verglichen mit PEP 19-4 (Abb. 9). Ebenfalls eine stärkere Inhibition der viralen Hämagglutination wurde bei einer größeren Peptidmenge von 10 µg detektiert (Abb. 9B). Der Einsatz von 10 µg SALPs führte jedoch gleichzeitig zu einem unerwünschten Nebeneffekt. Die SALPs hämagglutinierten die Hühnererythrozyten in der Abwesenheit von Virus, wobei PEP 19-8D die stärkste Hämagglutination hervorrief (Abb. 9B). Geringer fielen diese Nebeneffekte für PEP 19-4 und PEP 19-2.5 aus (Abb. 9B).

Die Ergebnisse des Hämagglutinationstests zeigen, dass SALPs, speziell PEP 19-2.5 und PEP 19-8D die virale Hämagglutination von H7, H3 und H1 Subtypen inhibieren. Diese Wirkung der SALPs auf die virale Hämagglutination gibt ein erstes Indiz darauf, dass die Peptide die Bindung der Viren an die Zelloberfläche beeinflussen. Dieser Effekt wird nachfolgend detaillierter untersucht.

4.3 Zytotoxizität der SALPs

Die nachfolgenden Experimente zur Untersuchung der antiviralen Aktivität der SALPs fanden in der Zellkultur mit den eukaryotischen, immortalisierten Zelllinien statt. Zur Bestimmung der nicht-toxisch wirkenden Dosis der SALPs, bei der die Zellviabilität nicht beeinträchtigt wird, wurde zunächst ein MTT Zellproliferationstest (MTT *Cell Proliferation Assay Kit)* auf MDCK-Zellen durchgeführt. Die Bedingungen des Zytotoxizitätstests wurden den nachfolgenden Experimenten für eine bessere Vergleichbarkeit angepasst. Dabei wurde die Zytotoxizität der SALPs nach einem kurzen Behandlungszeitraum, einer SALP-Inkubation von 1 h und einem

längeren Behandlungszeitraum, einer SALP-Inkubation von 72 h, analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit PBS- oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP-behandelt wurden.

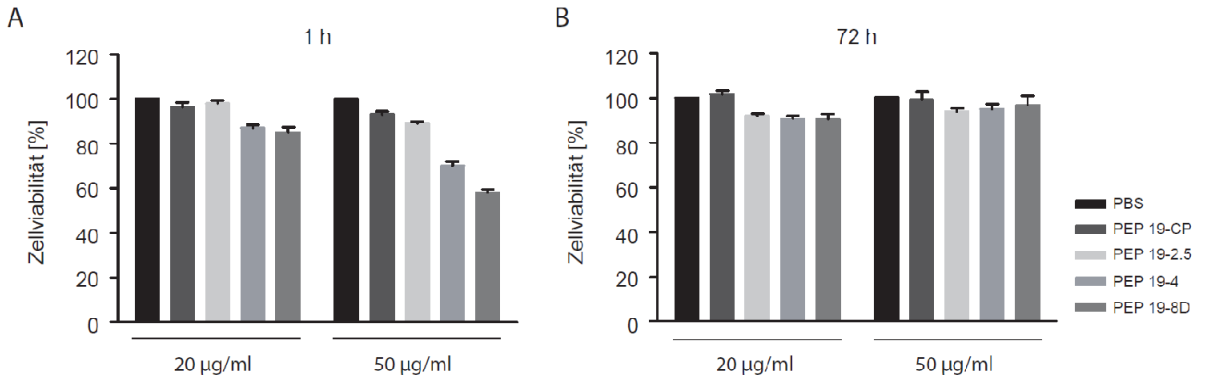


Abb. 10: Zytotoxizität der SALPs auf MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden mit 20 µg/ml oder 50 µg/ml PEP 19-2.5, PEP 19-4 oder PEP 19-8D für einen Behandlungszeitraum von 1 h (A) oder von 72 h (B) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 96 % rH inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden. Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT *Cell Proliferation Assay Kit* nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät und die Absorption der PBS-behandelten Zellen wurde als Referenz gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte der Zellviabilität und deren Standardabweichungen von mindestens vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die kurze SALP-Behandlung der Zellen zeigte abhängig vom jeweiligen Peptid und der eingesetzten Peptidkonzentration unterschiedliche Effekte auf die Zellviabilität (Abb. 10). Das Peptid PEP 19-2.5 verursachte bei einer Konzentration von 20 µg/ml, verglichen mit PBS- oder Pep 19-CP-behandelten Zellen, keine Veränderung der Zellviabilität (Abb. 10A). Nur eine geringe Reduktion der Zellviabilität von circa 10 % wurden für die Peptide PEP 19-4 und PEP 19-8D bei der niedrigen Peptidkonzentration detektiert (Abb. 10A). Dieser leichte zytotoxische Effekt wurde jedoch bei dem Einsatz einer höheren Peptiddosis von 50 µg/ml, mit einer Reduktion der Zellviabilität von 30-40 %, verstärkt (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu zeigte die 72-stündige Inkubation der Zellen mit SALPs keine oder nur eine minimale Veränderung der Zellviabilität (Abb. 10B).

Mit Hilfe der in diesem Test gewonnen Daten wurde die Dosis der jeweiligen Peptide für die nachfolgenden Experimente in der Zellkultur bestimmt. Für die Untersuchungen bei denen ein kurzer Behandlungszeitraum der SALPs von einer Stunde oder kürzer gewählt wurde, wurden 20 µg/ml des nicht-toxischen und in den vorherigen Versuchen effizientesten Peptids PEP 19-2.5 eingesetzt (4.1; 4.2). Für Experimente bei denen die Peptide für einen längeren Zeitraum von 72 h auf den Zellen inkubiert wurden, konnten 20 µg/ml sowie 50 µg/ml der unterschiedlichen SALPs eingesetzt werden.

4.4 Virale Bindung an die Zelloberfläche während der SALP-Behandlung

Um die zuvor mit Hilfe des Hämagglutinationstests beobachtete Inhibition der viralen Bindung an die Erythrozyten durch SALPs (4.2) zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzanalysen (3.8) durchgeführt.

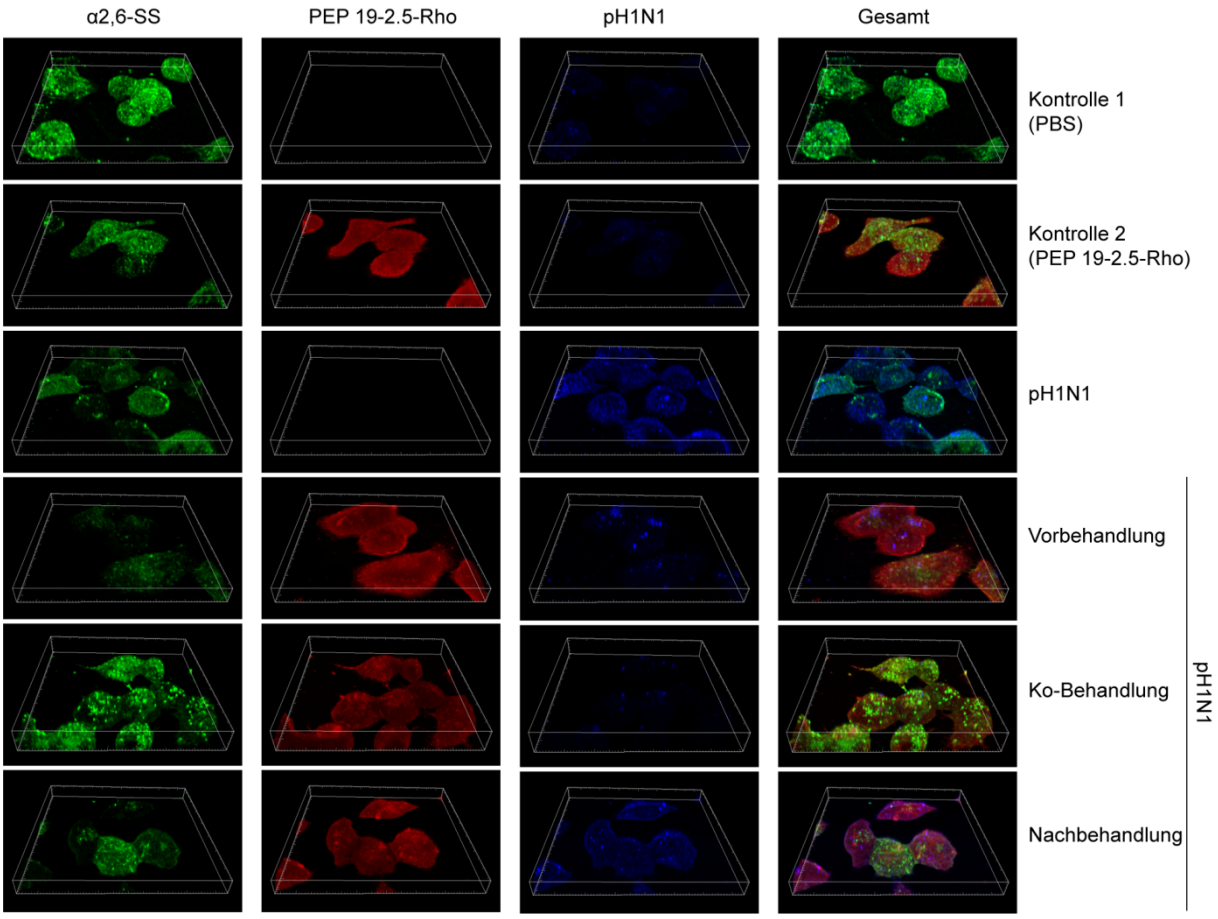


Abb. 11: Bindung von pH1N1 Viren an die Zelloberfläche von A549-Zellen während der PEP 19-2.5-Behandlung

A549-Zellen wurden mit 10^5 p.f.u. des pH1N1 Virus (blau) für 30 min bei 4 °C inokuliert. Die Behandlung mit 20 µg/ml PEP 19-2.5-Rho (rot) fand entweder vor der pH1N1 Virusinokulation (Vorbehandlung), zeitgleich mit der Virusinokulation (Ko-Behandlung) oder nach der Virusinokulation (Nachbehandlung) statt. Als Kontrolle dienten PBS- (Kontrolle 1) oder PEP 19-2.5-Rho- (Kontrolle 2) behandelte Zellen oder pH1N1 inokulierte Zellen (pH1N1). Die α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure, SS) der Zellen wurden mit dem FITC gekoppelten *Sambucus nigra* Lektin (grün) gefärbt. Die an der Zelloberfläche gebundenen pH1N1 Viren wurden mit Hilfe eines Anti-pH1N1 Mausserums und dem Alexa Fluor 647 gekoppelten Anti-Maus-Antikörper detektiert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops C2+ gemacht. Dargestellt sind die mit dem Programm Imaris 7.6.1 erstellten repräsentativen 3D-rekonstruierten Z-Stapel aus einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche.

Für die detailliertere Untersuchung der SALPs auf die Bindung der Viren an die Zelloberfläche wurden pH1N1 Viren mit A549-Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Visualisierung der SALPs wurde das Rhodamin-gekoppelte PEP 19-2.5-Rho eingesetzt. Die Wirkungsweise der SALPs wurde in drei unterschiedlichen Behandlungsansätzen untersucht. Entweder wurde das Peptid vor der Viruszugabe appliziert (Vorbehandlungsansatz) oder das Peptid wurde gleichzeitig mit den Viren zu den Zellen

gegeben (Ko-Behandlungsansatz) oder aber das Peptid wurde nach der Virusinokulation appliziert (Nachbehandlungsansatz). Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit PBS (Kontrolle 1) oder PEP 19-2.5-Rho (Kontrolle 2) behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen, die mit Virus inokuliert und nicht mit SALP-behandelt wurden, eingesetzt. Nach der Virusinkubation wurden die α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren und die Oberflächenantigene von pH1N1 Viren mittels Immunfluoreszenzanalyse detektiert (3.8).

Die Kontrolle 1, der PBS-behandelten Zellen, zeigte eine gleichmäßige Verteilung der α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren (grün) über die gesamte Zelloberfläche (Abb. 11). Eine gleichmäßige Bindung über die gesamte Zelloberfläche wurde ebenfalls für das PEP 19-2.5-Rho (rot) detektiert (Kontrolle 2) (Abb. 11). Die pH1N1 Viren (blau) wiesen eine starke Bindung an die Zelloberfläche auf, die durch die starken Signale der viralen Oberflächenantigene in den pH1N1 inokulierten und PBS-behandelten Zellen, nachweisbar sind (Abb. 11). Die SALPs inhibierten, abhängig vom Behandlungsansatz, differenziell die virale Bindung der pH1N1 Viren an die Zelloberfläche (Abb. 11). Im Vorbehandlungsansatz, in dem die Zellen mit dem Peptid PEP 19-2.5-Rho vor der Virusinokulation behandelt wurden und im Ko-Behandlungsansatz, in dem Virus und Peptid gleichzeitig auf die Zellen gegeben wurde, wurde nur sehr wenig virales Antigen, verglichen mit der Kontrolle detektiert (Abb. 11). Das bedeutete, dass die Virusbindung an die Zelloberfläche im Vor- und Ko-Behandlungsansatz durch die SALPs stark inhibiert wurde (Abb. 11). Im Vergleich dazu war die detektierte Menge von Virusantigen nur leicht reduziert, wenn das Peptid nach der Virusinokulation appliziert wurde (Abb. 11). Somit war die Virusbindung an die Zellen im Nachbehandlungsansatz im Vergleich zur Kontrolle kaum beeinträchtigt. Interessanterweise wurden weniger *N*-Acetylneuraminsäuren in dem Vorbehandlungsansatz sowie in den uninfizierten- und PEP 19-2.5-Rho-behandelten Zellen detektiert (Abb. 11). Diese Reduktion lässt eine Konkurrenz zwischen den SALPs und den Lektinen um die freien Bindungsstellen der *N*-Acetylneuraminsäure vermuten. Im Gegensatz dazu zeigte der Ko-Behandlungsansatz eine reduzierte Bindung von PEP 19-2.5-Rho an die Zelloberfläche, welche mit einer intensiveren Färbung der *N*-Acetylneuraminsäuren, aber einer ebenfalls reduzierten Detektion von Virusantigen einherging (Abb. 11). Eine mögliche Hypothese die sich aus diesem Ergebnis aufstellen lässt, ist eine zusätzliche Bindung von SALPs an die Viruspartikel, welche ebenfalls zur Reduktion der Virusbindung an die Zelloberfläche beitragen kann.

Die Aufnahmen des Vor- und Ko-Behandlungsansatzes zeigen eine starke Reduktion von detektiertem Virusantigen. Diese Reduktion lässt auf eine starke Inhibition der viralen Bindung an die Zelloberfläche schließen. Sie ist durch die Bindung der SALPs an die

Rezeptoren der Zelloberfläche und der dadurch resultierenden Unzugänglichkeit der *N*-Acetylneuraminsäuren für die Influenzaviren bedingt. Zusätzlich wird eine Interaktion der Peptide mit den Viruspartikeln vermutet, welche ebenfalls zu einer reduzierten viralen Bindung beitragen kann. Diese Interaktion soll im Anschluss näher untersucht werden.

4.5 Bindung der SALPs an die Influenzaviruspartikel

Zur Untersuchung der aufgestellten Hypothese, dass SALPs das Potenzial besitzen an Influenzaviren zu binden und somit zusätzlich zur Reduktion der viralen Bindung an die Zelloberfläche beitragen, wurden Bindungsstudien mit anschließender TEM-Analyse (3.9) durchgeführt.

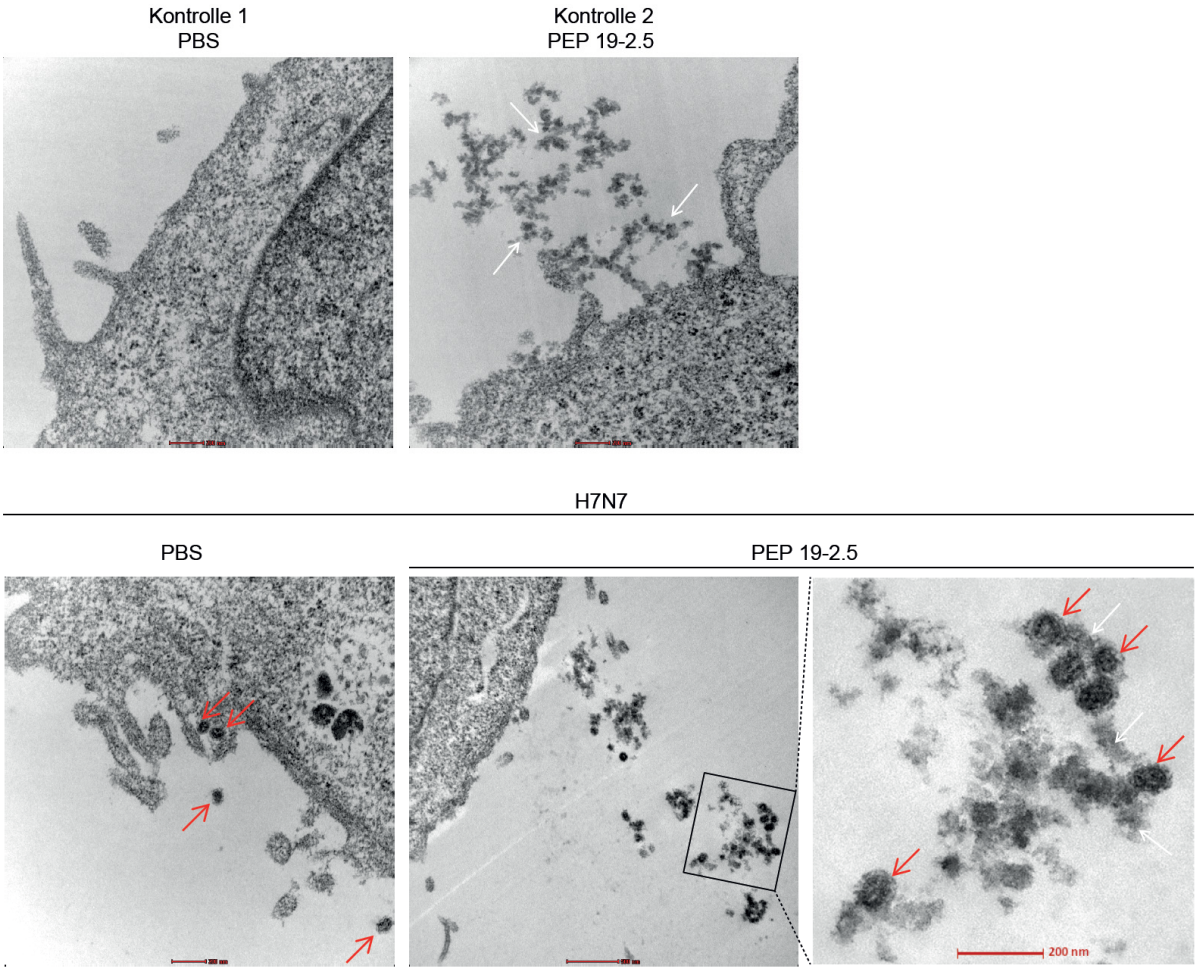


Abb. 12: Bindung von PEP 19-2.5 an H7N7 Viruspartikel

A549-Zellen wurden für 20 min mit 20 µg/ml PEP 19-2.5-Rho inkubiert. Anschließend erfolgte die Inokulation mit circa 10^9 p.f.u. des H7N7 Virus für 30 min bei 4 °C. Als Kontrolle dienten PBS- (Kontrolle 1) oder PEP 19-2.5-Rho- (Kontrolle 2) behandelte Zellen oder H7N7 inokulierte und PBS-behandelte Zellen. Die Zellen wurden fixiert, mit 1 % OsO_4 und 0,5 % Gallussäure behandelt und dehydriert. Anschließend wurden ultradünne Schnitte angefertigt. Die dargestellten Aufnahmen wurden mittels TEM, *FEI Technai G 20 Twin* und der Kamera, *Veleta CCD*, gemacht. Die weißen Pfeile markieren Aggregate des PEP 19-2.5-Rho und die roten Pfeile markieren H7N7 Viruspartikel.

Die Zellen wurden mit PEP 19-2.5-Rho behandelt und anschließend mit dem Maus-adaptierten H7N7 Virus für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Analyse der Zellen mittels TEM (3.9). Als Kontrollen dienten ausschließlich mit PBS bzw. PEP 19-2.5-Rho behandelte Zellen sowie Zellen, die mit Virus inokuliert und mit PBS behandelt wurden.

Auf der Zelloberfläche der PEP 19-2.5-Rho behandelten, uninfizierten Zellen wurden gebundene Aggregate des PEP 19-2.5-Rho detektiert (Kontrolle 2) (Abb. 12, obere Reihe, rechte Aufnahme). Die Detektion einzelner Peptide war allerdings mit dieser Technik nicht möglich. Die mit Virus inokulierten Zellen dagegen, zeigten an die Zelloberfläche gebundene Viren (H7N7) (Abb. 12, untere Reihe). Zusätzlich wurde mittels TEM die direkte Interaktion zwischen Viruspartikeln und Peptid-Aggregaten sichtbar (Abb. 12, untere Reihe, rechte Aufnahme).

Die Aufnahmen zeigen die Interaktion der Peptide mit Viruspartikeln, welche möglicherweise zusätzlich zu einer reduzierten viralen Bindung an die Zelloberfläche beitragen. Im Anschluss wurden die Auswirkungen der beschriebenen inhibierten viralen Bindung an die Zelloberfläche auf die nachfolgenden Schritte des viralen Replikationszyklus untersucht.

4.6 Internalisierung von Viruspartikeln während der SALP-Behandlung

Zur Analyse der Konsequenz einer verminderten viralen Bindung an die Zelloberfläche während der SALP-Behandlung, wurde die Internalisierung von Viruspartikeln in die Zelle bestimmt. In diesem Versuch wurden A549-Zellen mit einer hohen MOI von 25 des H7N7 Virus inkubiert. Die SALP-Behandlung fand wie in den vorangegangenen Experimenten im Vor-, Ko- und Nachbehandlungsansatz statt. Die Detektion des viralen Nukleoproteins (NP) als Marker für die internalisierten Viruspartikel erfolgte zwei Stunden nach Infektion. Dazu wurden die permeabilisierten Zellen mit einem Anti-NP-Antikörper und einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper behandelt (3.8). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen die mit Virus inokuliert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden.

Die mit PEP 19-2.5-behandelten H7N7-infizierten Zellen wiesen im Vergleich zu den PBS- bzw. dem Kontrollpeptid PEP 19-CP-behandelten, infizierten Zellen abhängig vom Behandlungsansatz keine oder nur eine verminderte NP-Expression auf (Abb. 13). Die geringsten NP-Signale im Inneren der Zellen wurden detektiert, wenn das Peptid PEP 19-2.5 vor der Virusinkubation auf die Zellen gegeben wurde (Abb. 13). Ebenfalls geringe NP-Mengen wurden im Ko-Behandlungsansatz, bei dem das Peptid zusammen mit dem Virus zu den Zellen gegeben wurde, ermittelt (Abb. 13). Nur leicht reduzierte Mengen von NP, im

Vergleich zu den Kontrollen, wurden detektiert wenn das Peptid nach erfolgter Virusinfektion appliziert wurde (Abb. 13).

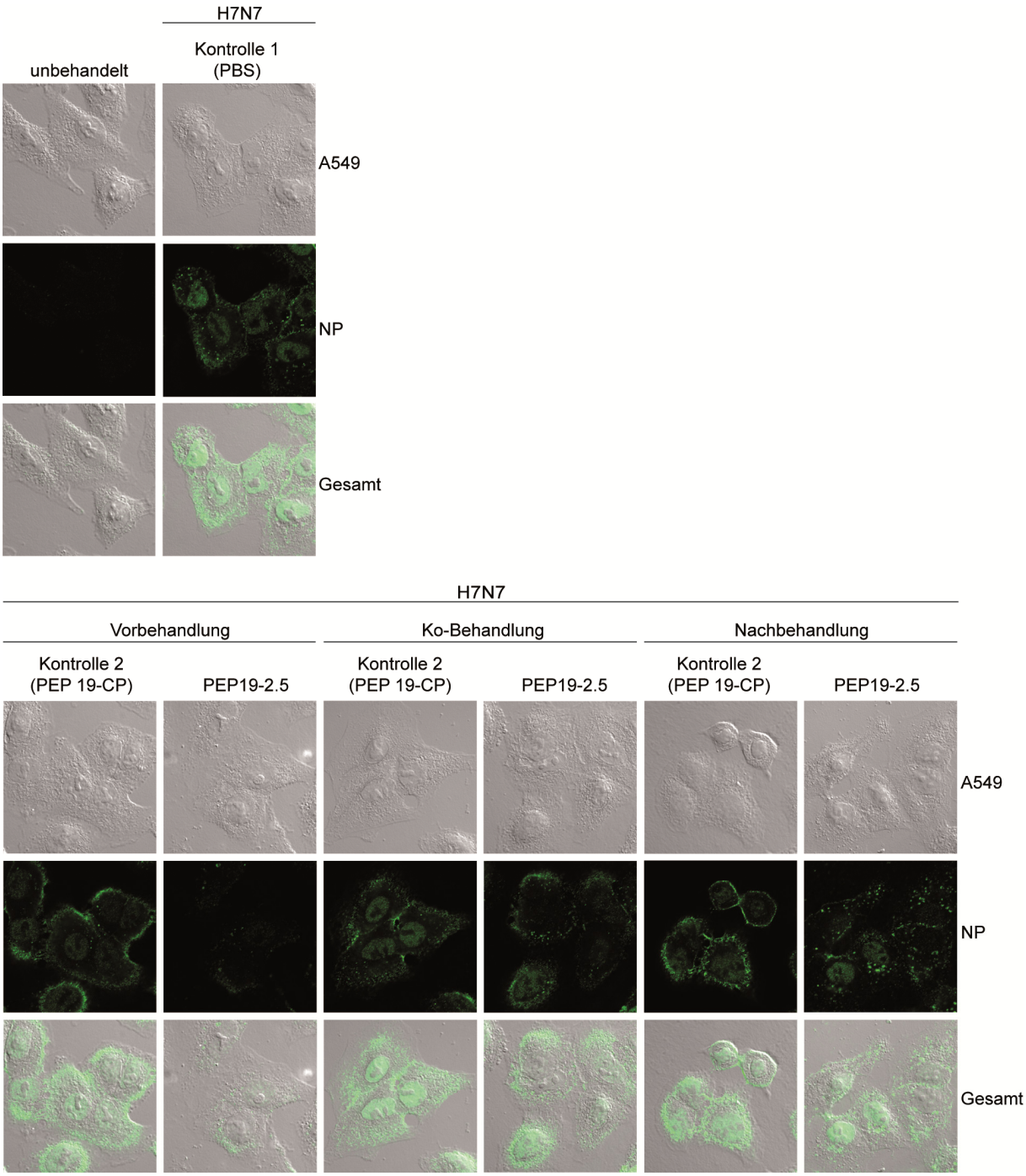


Abb. 13: Aufnahme von H7N7 Viren in die Zelle während der PEP 19-2.5-Behandlung

A549-Zellen wurden mit einer MOI von 25 des H7N7 Virus für 30 min bei 4 °C inokuliert. Die Behandlung mit 20 µg/ml PEP 19-2.5 fand entweder vor der H7N7 Virusinokulation (Vorbehandlung), zeitgleich mit der Virusinokulation (Ko-Behandlung) oder nach der Virusinokulation (Nachbehandlung) statt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. H7N7 inokulierte und mit PBS- (Kontrolle 1) oder PEP 19-CP- (Kontrolle 2) behandelte Zellen. Die von den Zellen internalisierten H7N7 Viren wurden 2 h p.i. analysiert. Dazu wurden die PFA-fixierten und permeabilisierten Zellen mittels des Anti-NP- und des sekundären Anti-Maus-Alexa Fluor® 488 Antikörpers gefärbt. Dargestellt sind die Durchlichtaufnahmen (obere Reihe), die Fluoreszenzaufnahmen (mittlere Reihe) sowie die übereinandergelegten Aufnahmen (untere Reihe) des Konfokalmikroskops C2+. Dabei sind repräsentative Aufnahmen von einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche dargestellt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die SALP-Behandlung die Bindung des Virus an die Zelloberfläche gehemmt wird, welche wiederum die Infektiösität des Virus reduziert.

4.7 Virale Replikation während der SALP-Behandlung

Des Weiteren wurde der Einfluss der durch SALP verminderten viralen Bindung an die Zelloberfläche auf die Virusreplikation untersucht. Dazu wurden A549-Zellen mit einer MOI von 1 des H7N7 Virus inkubiert. Die SALP-Behandlung fand wie in den vorangegangenen Experimenten im Vor-, Ko- und Nachbehandlungsansatz statt. Die Detektion der viralen Polymeraseuntereinheiten NP und PB2 erfolgte sechs Stunden nach Infektion mittels spezifischer Antikörper in einer Immunfluoreszenz- (3.8) bzw. einer Western Blot Analyse (3.4.2). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, die mit Virus inokuliert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden.

Die mit PBS- oder dem Kontrollpeptid (PEP 19-CP)-behandelten H7N7-infizierten Zellen zeigten starke NP-Signale in der Immunfluoreszenz, d.h. große Mengen neu synthetisierter viraler NP-Proteine waren sowohl im Zellkern als auch im Zytoplamsa der Zellen sichtbar (Abb. 14). Im Vergleich dazu war in PEP 19-2.5-behandelten und infizierten Zellen die Anzahl der NP-positiven Zellen stark reduziert (Abb. 14). Die stärkste Reduktion der Virusreplikation wurde im Vorbehandlungsansatz, bei dem die Zellen vor der Virusinokulation mit Peptid behandelt wurden sowie im Ko-Behandlungsansatz, bei dem Zellen gleichzeitig mit Peptid und Virus inokuliert wurden, detektiert (Abb. 14). In diesen beiden Ansätzen lagen nur vereinzelte Zellen mit neu synthetisiertem viralen NP vor (Abb. 14). Des Weiteren waren die Nukleoproteine im Zellkern akkumuliert (Abb. 14). Dies deutete auf eine leicht verzögerte Virusreplikation hin. Im Vergleich zu den Kontrollen wurde in Zellen, die zuerst mit Virus inokuliert und anschließend mit PEP 19-2.5 behandelt wurden (Nachbehandlungsansatz), nur eine geringfügig reduzierte Anzahl an NP-positiven Zellen mit einem leicht reduzierten NP-Signal ermittelt (Abb. 14).

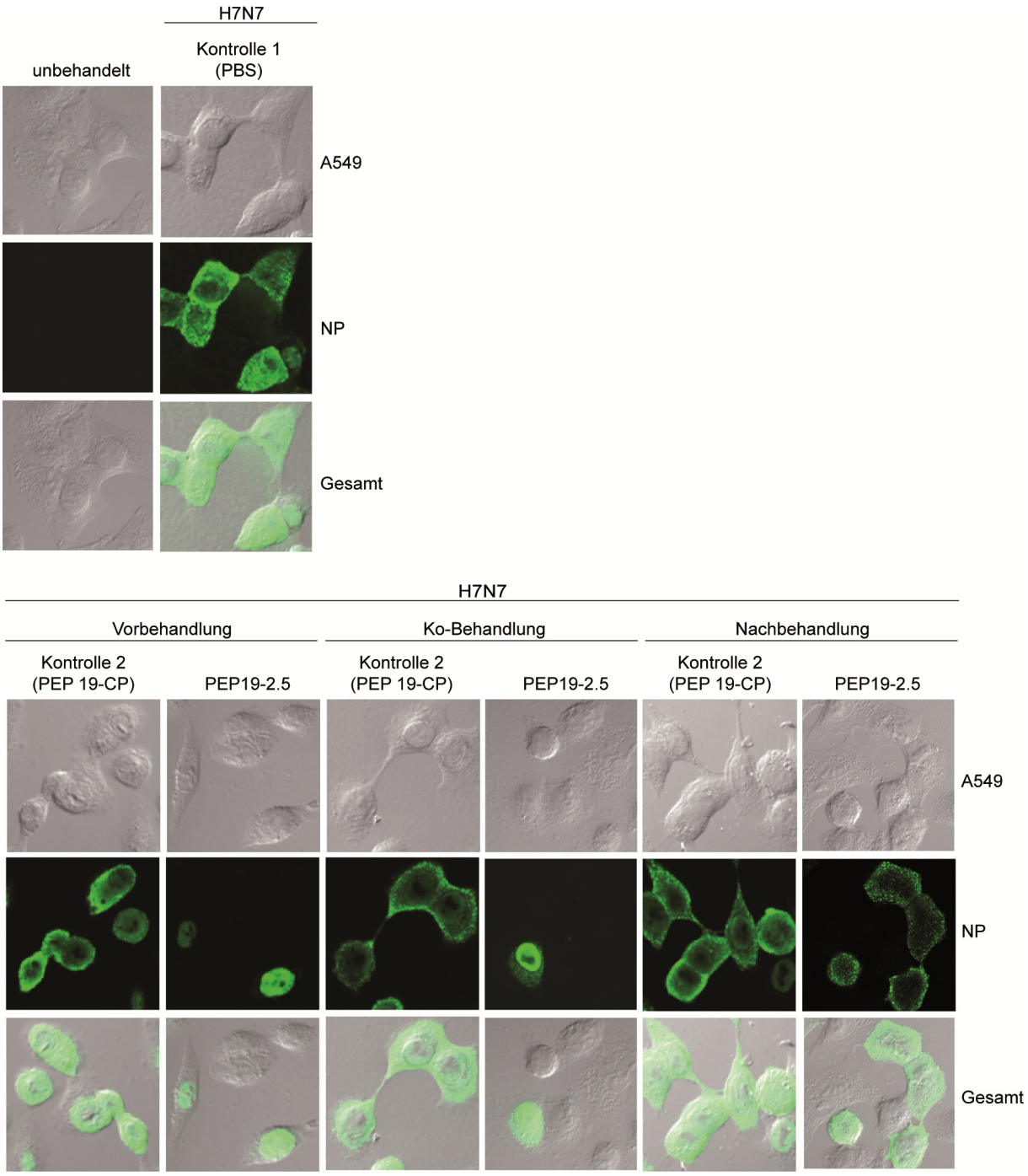
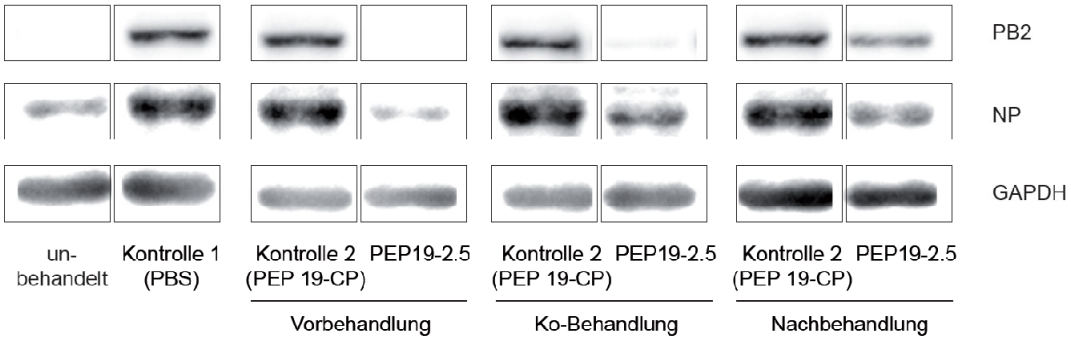


Abb. 14: Detektion der Virusreplikation von H7N7 Viren während der PEP 19-2.5-Behandlung mittels Immunfluoreszenz

A549-Zellen wurden mit einer MOI von 1 des H7N7 Virus für 30 min bei 4 °C inokuliert. Die Behandlung mit 20 µg/ml PEP 19-2.5 fand entweder vor der H7N7 Virusinokulation (Vorbehandlung), zeitgleich mit der Virusinokulation (Ko-Behandlung) oder nach der Virusinokulation (Nachbehandlung) statt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. H7N7 inokulierte und mit PBS- (Kontrolle 1) oder PEP 19-CP- (Kontrolle 2) behandelte Zellen. Die virale Replikation wurde 6 h p.i. analysiert. Dazu wurden die PFA-fixierten und permeabilisierten Zellen mittels des Anti-NP- und des sekundären Anti-Maus-Alexa Fluor® 488 Antikörpers gefärbt. Dargestellt sind die Durchlichtaufnahmen (obere Reihe), die Fluoreszenzaufnahmen (mittlere Reihe) sowie die übereinandergelegten Aufnahmen (untere Reihe) des Konfokalmikroskops C2+. Dabei sind repräsentative Aufnahmen von einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche dargestellt.

A



B

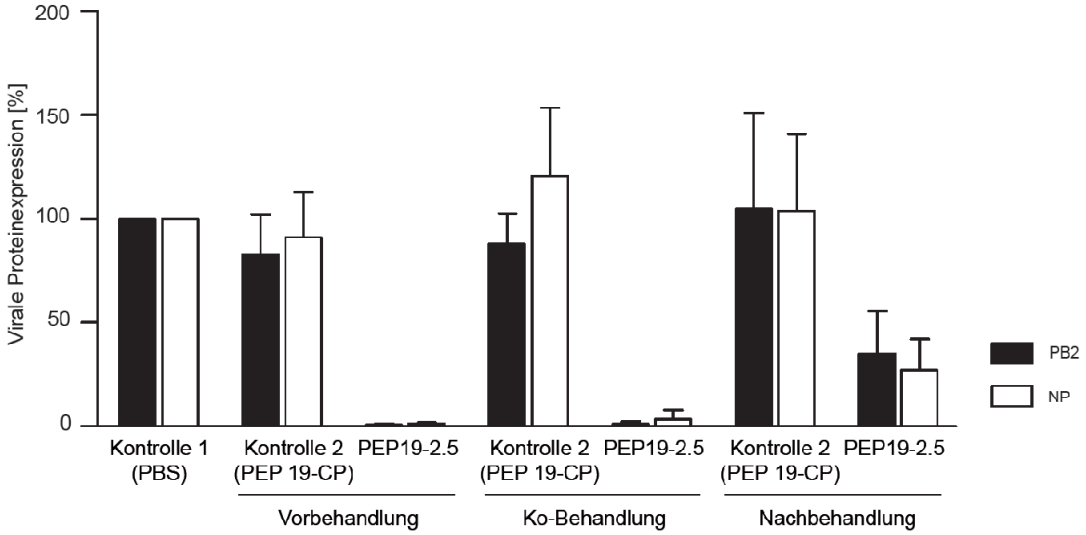


Abb. 15: Detektion der Virusreplikation von H7N7 Viren während der PEP 19-2.5-Behandlung mittels Western Blot

A549-Zellen wurden mit einer MOI von 1 des H7N7 Virus für 30 min bei 4 °C inokuliert. Die Behandlung mit 20 µg/ml PEP 19-2.5 fand entweder vor der H7N7 Virusinokulation (Vorbehandlung), zeitgleich mit der Virusinokulation (Ko-Behandlung) oder nach der Virusinokulation (Nachbehandlung) statt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen bzw. H7N7 inokulierte und mit PBS (Kontrolle 1) oder PEP 19-CP (Kontrolle 2) behandelte Zellen. Die Zellen wurden nach 6 h p.i. geerntet und lysiert. Die Proteine des Zelllysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Membran transferiert. Die viralen Proteine PB2 und NP wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert (A). Die Quantifizierung der viralen Proteinlevel erfolgte mit Hilfe des Dokumentationssystems *ImageQuant LAS 4000* und der Auswertungssoftware *ImageQuant Tools*. Die Hintergrundsignale der uninfizierten Zellen wurden von den übrigen Signalen abgezogen und die virale Proteinmenge wurde gegen das interne Standardprotein GAPDH normalisiert. Die Signale der viralen Proteine der infizierten und mit PBS-behandelten Zellen (Kontrolle 1) wurden 100 % gesetzt (B). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen viralen Proteinmengen und deren Standardabweichungen (SD) von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Des Weiteren wurden die Proteinmengen der neu synthetisierten Polymeraseuntereinheit PB2 sowie NP von H7N7-infizierten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Die Zellen, welche infiziert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden, zeigten eine starke Virusreplikation mit intensiven PB2- und NP-Signalen im Western Blot (Abb. 15). Im Vergleich dazu wiesen mit PEP 19-2.5-behandelte und H7N7-infizierte Zellen abhängig vom Behandlungsansatz unterschiedliche Mengen an viralem NP bzw. PB2 auf

(Abb. 15). Im Vorbehandlungsansatz, in dem die Zellen mit PEP 19-2.5 vor der Virusinfektion behandelt wurden, war die Virusreplikation am stärksten beeinträchtigt (Abb. 15). Es wurde keine Bande für das virale PB2 im Western Blot detektiert (Abb. 15A). Auch die NP-Bande dieser Probe war vergleichbar mit der Hintergrundbande der unbehandelten und uninfizierten Zellen (Abb. 15). Zellen, bei denen das Virus und das Peptid gleichzeitig appliziert wurden (Ko-Behandlungsansatz), wiesen ebenfalls eine starke Reduktion der viralen Replikation auf, mit Banden, die am Detektionslimit der Western Blot Analysen lagen (Abb. 15). Die geringste antivirale Aktivität besaß das PEP 19-2.5 wie bereits in den vorangegangenen Studien im Nachbehandlungsansatz, bei dem Zellen zuerst inokuliert und anschließend mit PEP 19-2.5 behandelt wurden (Abb. 15). In diesem Behandlungsansatz waren die Mengen von PB2 und NP, im Vergleich zu infizierten und mit PBS-behandelten Zellen um 60-70 % reduziert (Abb. 15).

Diese Daten zeigen, dass eine verringerte virale Bindung an die Zelloberfläche zu einer reduzierten Virusreplikation führt. Diese Virusreplikation ist besonders reduziert, wenn das Peptid vor oder während der Virusinokulation appliziert wird.

4.8 Bestimmung der viralen Titer nach einer Ko-Behandlung mit SALPs

Zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der SALPs auf die Virusreplikation wurden zusätzlich die viralen Titer verschiedener Influenzavirussubtypen nach der SALP-Behandlung ermittelt, um den Einfluss der SALP Behandlung auf das Entstehen von infektiösen Viruspartikeln zu bestimmen. Für dieses Experiment wurden MDCK-Zellen gleichzeitig mit H7N7, H3N2 oder pH1N1 und den unterschiedlichen SALPs im Ko-Behandlungsansatz infiziert und der virale Titer wurde mittels Plaquetest ermittelt (3.7.4). Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Virus infiziert und mit PBS oder dem Kontrollpeptide PEP 19-CP behandelt wurden.

Die Virusreplikation von H7N7, H3N2 und pH1N1 wurde, verglichen mit den eingesetzten Kontrollen, aufgrund der SALP-Behandlung stark beeinträchtigt (Abb. 16). Die Peptide PEP 19-2.5 und PEP 19-8D reduzierten bei einer Konzentration von 20 µg/ml die viralen Titer um 1 bis 4 Logstufen (Abb. 16A, C, E). Die Behandlung mit PEP 19-4 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der viralen Titer der unterschiedlichen Subtypen, jedoch in einem geringeren Maße als die Behandlung mit den beiden anderen SALPs (Abb. 16A, C, E). Die inhibitorische Wirkung der SALPs wurde bei dem Einsatz einer höheren Peptidkonzentration von 50 µg/ml leicht verstärkt (Abb. 16B, D, F). Die SALPs wiesen eine unterschiedliche Inhibition der Virussubtypen auf, wobei die stärksten inhibitorischen Effekte der SALPs gegen das H7N7 Virus vorlagen (Abb. 16A, B). Etwas geringere Inhibitionen wurden mit den SALPs gegen das pH1N1 Virus (Abb. 16E, F), gefolgt vom H3N2 Virus (Abb.

16C, D), erzielt. Die Virustiter von infizierten und mit Kontrollpeptid PEP 19-CP-beandelten Zellen waren vergleichbar mit denen der infizierten und PBS-behandelten Zellen (Abb. 16).

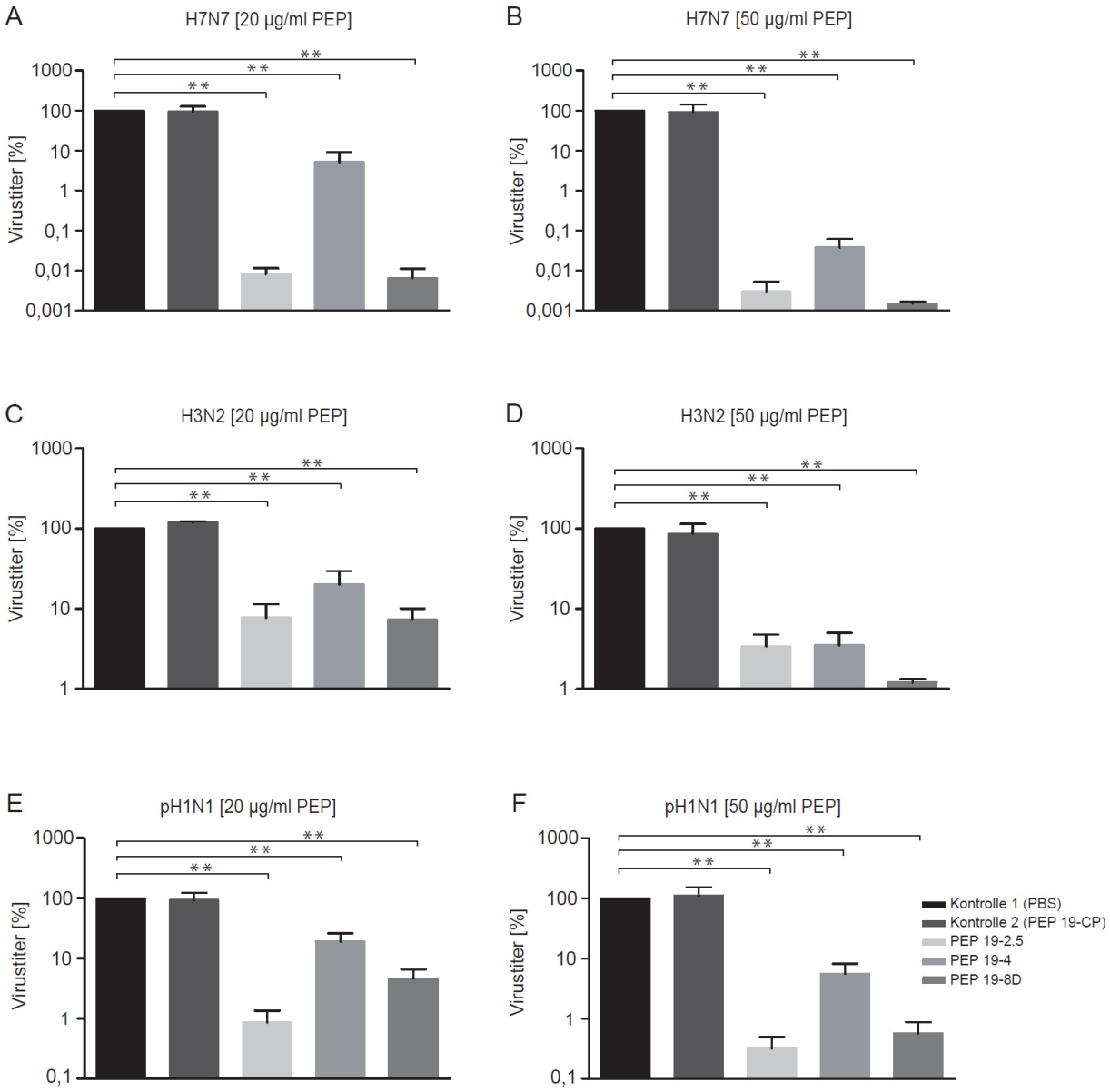


Abb. 16: Bestimmung der Virustiter von H7N7, H3N2 und pH1N1 Viren während der SALP-Behandlung

MDCK-Zellen wurden mit einer 1:10 Verdünnungsreihe der H7N7 (A und B), H3N2 (C und D) oder pH1N1 Viren (E und F) infiziert. Die Behandlung mit 20 µg/ml (A, C und E) oder 50 µg/ml SALPs (B, D und F) erfolgte zeitglich mit der Virusinfektion (Ko-Behandlungsansatz). Als Kontrollen dienten Zellen die mit Virus infiziert und mit PBS (Kontrolle 1) oder dem Kontrollpeptide PEP 19-CP (Kontrolle 2) behandelt wurden. Die Virustiter wurden im Plaquetest bestimmt und der Virustiter der infizierten und PBS-behandelten Zellen (Kontrolle 1) wurden 100 % gesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte der Virustiter und deren Standardabweichungen aus mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-*t*-Test ermittelt (*p<0,01, **p>0,001).

Diese Daten zeigen, dass die Gruppe der SALPs die Influenzavirusreplikation von unterschiedlichen Subtypen, H7, H3 und H1, dosisabhängig inhibieren. Dabei erzielen die Peptide PEP 19-2.5 und PEP 19-8D die stärksten antiviralen Effekte.

4.9 Bestimmung der viralen Titer nach therapeutischer SALP-Behandlung

Zusätzlich wurde der Einfluss der SALP Nachbehandlung auf die Virusreplikation von H7N7 Viren in A549-Zellen ermittelt. Dafür wurden die Zellen mit einer MOI von 10^{-4} des H7N7 Virus infiziert und anschließend mit 20 µg/ml PEP 19-2.5 therapeutisch behandelt. Das virale Wachstum der Viren wurde über einen Zeitraum von 48 h mittels der im Plaquetest gewonnen Virustiter bestimmt (3.7.4). Dadurch wurde die antivirale Aktivität der SALPs in mehreren Virusreplikationszyklen evaluiert. Als Kontrollen dienten Zellen die mit Virus infiziert und mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden.

Die therapeutische Behandlung mit dem Peptid PEP 19-2.5 führte, verglichen mit den Kontrollen, zu einer signifikant geringeren H7N7 Virusreplikation (Abb. 17). Das virale Wachstum wurde durch die SALP-Behandlung bei einer Konzentration von 20 µg/ml bis zu 80 % (Abb. 17A) und bei einer Konzentration von 50 µg/ml bis zu 95 % (Abb. 17B) reduziert. Dabei wurde eine stärkere Inhibition nach einem längeren Untersuchungszeitraum von 48 h detektiert. Der Einsatz einer höheren PEP 19-2.5 Konzentration von 50 µg/ml führte ebenfalls zu einer stärkeren Reduktion des viralen Wachstums (Abb. 17B). Durch die Behandlung mit dem Kontrollpeptid PEP 19-CP wurden keine Veränderungen im viralen Titer im Vergleich zu den H7N7-infizierten und mit PBS-behandelten Zellen detektiert (Abb. 17). Der Überstand der infizierten Zellen enthielt nach einer Stunde (1 h p.i.) wie erwartet keine Virustiter (Abb. 17).

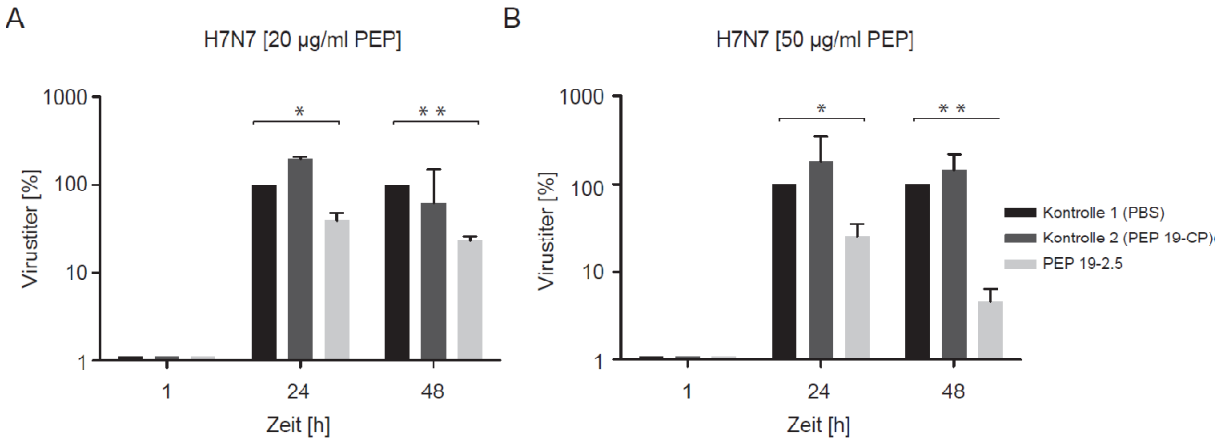


Abb. 17: Wachstumsverhalten von H7N7 Viren in A549-Zellen während der therapeutischen PEP 19-2.5 Behandlung

A549-Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-4} des H7N7 Virus für 1 h inokuliert und anschließend gewaschen. Die therapeutische Behandlung mit 20 µg/ml (A) oder 50 µg/ml (B) PEP 19-2.5 fand 1 h bzw. 24 h p.i. statt. Als Kontrollen dienten H7N7 infizierte und mit PBS- (Kontrolle 1) oder PEP 19-CP- (Kontrolle 2) behandelte Zellen. Die viralen Titer wurden 1 h, 24 h oder 48 h p.i. mittels Plaquetest bestimmt. Die Virustiter der H7N7 infizierten und mit PBS behandelten Zellen wurde 100 % gesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte der Virustiter und deren Standardabweichungen (SD) von einem der zwei voneinander unabhängig durchgeführten Duplikate. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-*t*-Test ermittelt (*p<0,01, **p>0,001).

Die Ergebnisse zeigen, dass PEP 19-2.5 die Virusreplikation und das Entstehen von infektiösen Viruspartikeln in A549-Zellen signifikant reduziert.

4.10 Toxizität der SALPs nach intranasaler Applikation im Mausmodell

Zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der SALPs im Mausmodell wurde das Peptid PEP 19-2.5, welches die stärkste inhibitorische Wirkung gegen Influenzaviren und die geringste Zytotoxizität in den vorangegangenen Experimenten *in vitro* aufwies, eingesetzt (4.1 - 4.9). Um die nicht-toxisch wirkende Dosis des Peptids *in vivo* zu ermitteln, wurden zuerst Toxizitätstests in der Maus durchgeführt. Dabei wurde, für die anschließenden Infektionsversuche, die Toxizität des PEP 19-2.5 nach einmaliger Gabe sowie mehrmaliger, einmal täglicher Gabe untersucht. Zur Gewährleistung einer schnellen und effizienten Bereitstellung der Peptide im Zielorgan der Influenzaviren, der Lunge, wurden die Peptide i.n. appliziert.

Zur Ermittlung der Toxizität nach der einmaligen Gabe der SALPs in BALB/c-Mäusen, wurden diese mit 5 µg, 20 µg, 50 µg oder 100 µg PEP 19-2.5 intranasal behandelt und der Gewichtsverlust wurde als Indikator für die Toxizität über einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen bestimmt. Des Weiteren wurden Veränderungen im Aussehen sowie im Verhalten der Tiere dokumentiert. Als Kontrolle dienten BALB/c-Mäuse die ausschließlich eine intranasale PBS-Applikation erhielten.

Die einmalige, intranasale Applikation der unterschiedlichen Mengen an PEP 19-2.5 führte zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Toxizität der Mäuse (Abb. 18A). Die Mäuse, welche mit 5 µg bzw. 20 µg PEP 19-2.5 behandelt wurden, wiesen den gleichen Gewichtsverlauf wie PBS-behandelte Mäuse auf (Abb. 18A). Außerdem wurden keine Veränderungen des Verhaltens oder des Aussehens, z.B. der Fellbeschaffenheit, festgestellt. Im Gegensatz dazu führte die i.n. Applikation mit 50 µg PEP 19-2.5 am ersten Tag nach der Behandlung zu einem Gewichtsverlust von circa 5 %, welcher sich erst zwei Tage später wieder normalisierte (Abb. 18A). Wenn eine höhere Dosis von 100 µg PEP 19-2.5 verabreicht wurde, wurde dieser Effekt mit einem Gewichtsverlust von circa 10 % und einer Erholungsphase von circa 6 Tagen, zusätzlich verstärkt (Abb. 18A). Die Fellbeschaffenheit der Mäuse, die mit einer höheren Dosis von 50 oder 100 µg behandelt wurden, war ebenfalls verändert und deutete auf eine schlechtere Verträglichkeit des Peptids hin.

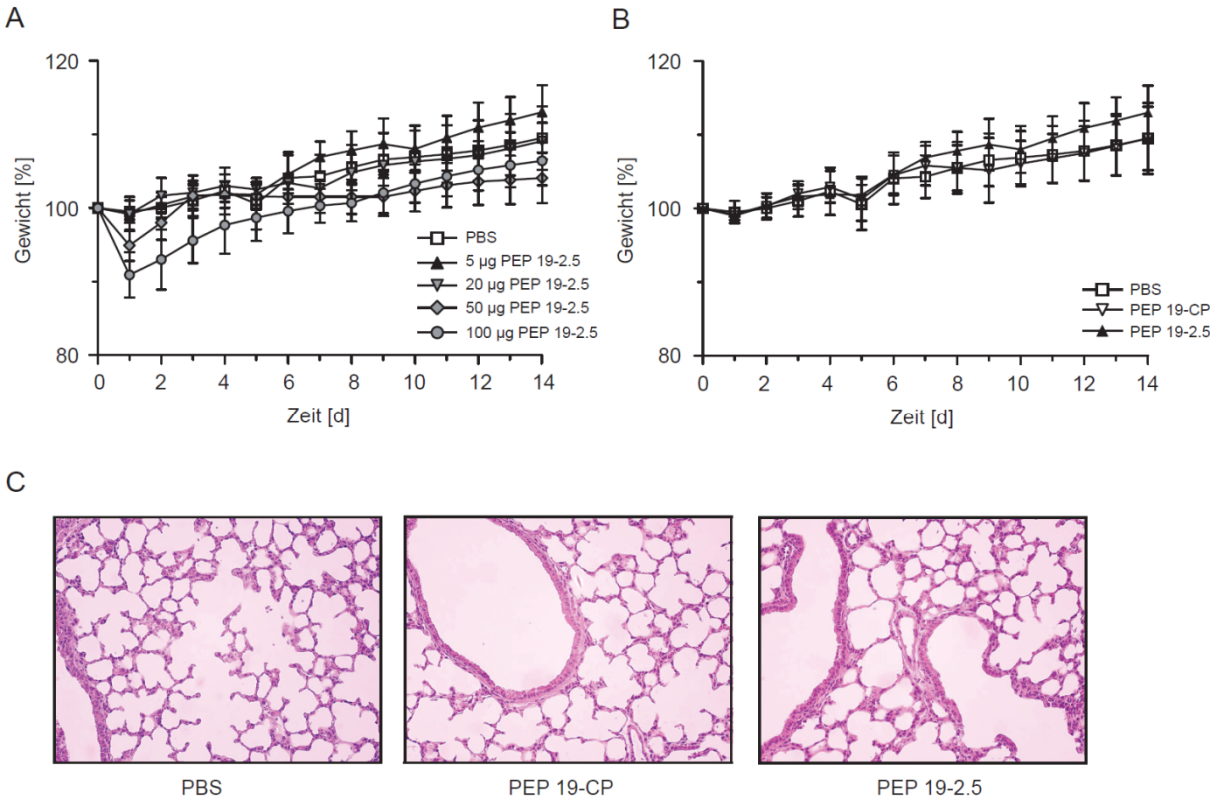


Abb. 18: Toxizität der SALPs nach einmaliger intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell

BALB/c-Mäuse wurden einmalig mit 5 µg (*n*=8; A, B), 20 µg (*n*=5; A), 50 µg (*n*=9; A) oder 100 µg (*n*=8; A) PEP 19-2.5 nach einer Ketamin-Xylazin-Narkose intranasal behandelt. Als Kontrollen dienten Mäuse, die mit PBS (*n*=8) oder 5 µg PEP 19-CP (*n*=8) behandelt wurden (A, B). Das Gewicht der Mäuse wurde mindestens jeden zweiten Tag für einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte des Gewichts und deren Standardabweichungen (SD; A, B). Am Tag 3 nach Behandlung wurden zwei zusätzliche Mäuse pro Gruppe euthanasiert und die Lungen wurden zur Anfertigung von HE-gefärbten histologischen Schnitten entnommen (C). Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axioplan 2 mit der ProgRes C12 Kamera gemacht.

Für die im Gewichtsverlauf nicht-toxisch wirkende Dosis von 5 µg wurden detaillierte Studien hinsichtlich der Toxizität durchgeführt (Abb. 18A). Als Kontrolle dienten wieder Mäuse, die mit PBS behandelt wurden. Zusätzlich wurde die Behandlung mit dem Kontrollpeptid PEP 19-CP hinsichtlich der Toxizität, im Gewichtsverlauf untersucht. Außerdem wurden die Lungen von zwei Tieren pro Gruppe drei Tage nach der Behandlung entnommen, um FFPE-Gewebedünnschnitte anzufertigen (3.11.1), mit HE zu färben (3.11.3) und anschließend bezüglich pathologischer Veränderungen im Lungengewebe zu untersuchen.

Der Gewichtsverlauf der Mäuse, die intranasal mit 5 µg Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden, verlief unauffällig und zeigte keine Anzeichen einer Toxizität (Abb. 18B). Die drei Tage nach der Behandlung gewonnen HE-gefärbten histologischen Lungenschnitte der PEP 19-2.5-behandelten Mäuse wiesen ebenfalls keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den Lungenschnitten der Kontrollmäuse auf (Abb. 18C). Das Alveolar- und Bronchialgewebe war intakt und es waren keine Anzeichen von Infiltrationen von Immunzellen erkennbar (Abb. 18C).

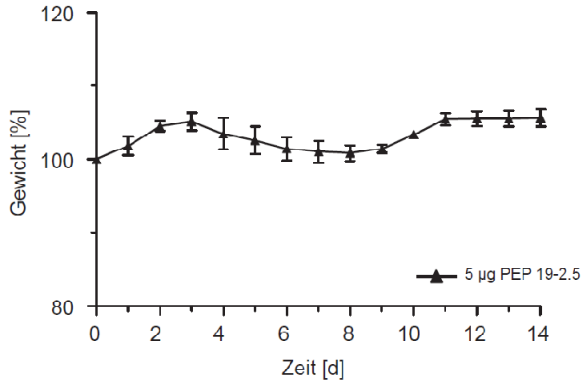


Abb. 19: Toxizität der SALPs nach mehrmaliger intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell
BALB/c- Mäuse wurden einmal täglich für 7 Tage mit 5 µg (*n*=5) PEP 19-2.5 intranasal behandelt. Das Gewicht der Mäuse wurde mindestens jeden zweiten Tag für einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte des Gewichts und deren Standardabweichungen (SD).

Im Anschluss wurde die mehrmalige intranasale Gabe des PEP 19-2.5 hinsichtlich der Toxizität untersucht. Dazu wurden 5 µg des PEP 19-2.5 einmal täglich für einen Zeitraum von sieben Tagen intranasal verabreicht und das Gewicht wurde für einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Auch in diesem Experiment konnte keine Toxizität des Peptids PEP 19-2.5 festgestellt werden (Abb. 19).

Die aus den Toxizitätsstudien gewonnen Daten zeigen, dass eine Dosis von 20 µg PEP 19-2.5 oder niedriger für die einmalige, intranasale Applikation geeignet ist. Dadurch wurde in den im Anschluss durchgeführten Infektionsversuchen mit einmaliger SALP-Behandlung eine Dosis von 5 µg PEP 19-2.5 eingesetzt. Das Kontrollpeptid PEP 19-CP, welches bei einer Dosis von 5 µg keine Anzeichen einer Toxizität aufweist, diente in den Mausstudien weiterhin als Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist die intranasale Behandlung mit einer Peptiddosis von 50 µg oder höher, aufgrund einer im Gewichtsverlauf deutlich erkennbaren Toxizität, ungeeignet. Das Verabreichen von 5 µg PEP 19-2.5 einmal täglich für sieben Tage ist ebenfalls nicht toxisch für die Mäuse und kann somit in den nachfolgenden Infektionsstudien Anwendung finden.

4.11 Verteilung der SALPs im Respirationstrakt nach intranasaler Applikation im Mausmodell

Nachdem die nicht-toxisch wirkende Dosis des Peptids PEP 19-2.5 ermittelt wurde, wurde im Anschluss die Verteilung der SALPs im Respirationstrakt nach intranasaler Applikation im Mausmodell analysiert. Die Mäuse wurden dafür mit 5 µg des Rhodamin-gekoppelten PEP 19-2.5-Rho intranasal behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die Lunge und die Trachea der Mäuse zur Anfertigung von DAPI gefärbten histologischen Schnitten entnommen (3.10.5; 3.11.1; 3.8). Diese dienten zur

Analyse der Verteilung der fluoreszierenden Peptide in der Trachea und in der Lunge, dem primären Zielorgan der Influenzaviren. Als Kontrolle dienten BALB/c-Mäuse, die ausschließlich eine i.n. PBS-Applikation erhielten.

Das Peptid PEP 19-2.5-Rho war nach der intranasalen Applikation auf den murinen Epithelzellen der Lunge und der Trachea detektierbar (Abb. 20). Die Peptide befanden sich bereits nach einem kurzen Zeitraum von 15 min in der Trachea sowie im Bronchialgewebe der Lunge (Abb. 20). Zu späteren Zeitpunkten, 30 min oder 45 min, nach der Behandlung breitete sich das Peptid auch in das umliegende Alveolargewebe der Lunge aus (Abb. 20).

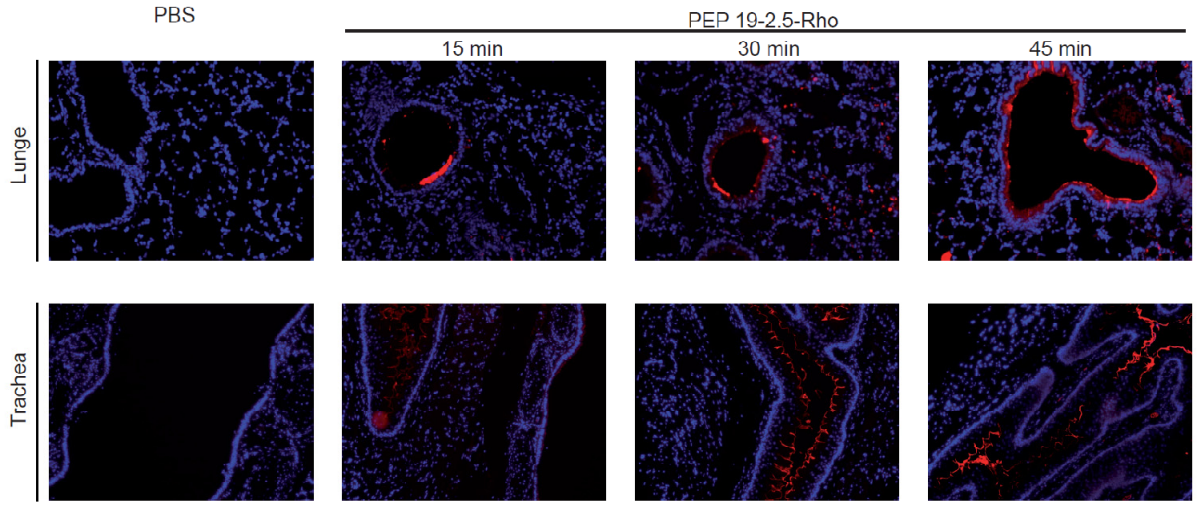


Abb. 20: Verteilung der SALPs im Respirationstrakt nach intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell
BALB/c-Mäuse wurden einmalig mit 5 µg (*n*=3) 19-2.5-Rho nach einer Ketamin-Xylazin-Narkose intranasal behandelt. Als Kontrolle diente eine Maus, die mit PBS (*n*=1) behandelt wurde. Die Mäuse wurden 15, 30 oder 45 min nach der Behandlung euthanasiert. Die Lunge und die Trachea der Mäuse wurden zur Anfertigung von DAPI gefärbten, histologischen Schnitten entnommen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ECLIPSE Ni-E mit der DS-Fi2 Kamera gemacht.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Verteilung des Peptids PEP 19-2.5 im gesamten Respirationstrakt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Peptide die Zielzellen der Influenzaviren erreichen und bieten die Voraussetzung, zu einer in der Zellkultur zuvor evaluierten Inhibition der Virusadsorption und Virusaufnahme in der Maus.

4.12 Einfluss der SALP Ko- und Nachbehandlung auf die H7N7 Influenzavirus Pathogenität in der Maus

Zur Ermittlung der antiviralen Aktivität der SALPs während der Influenza A Virusinfektion im Mausmodell wurde mit der geringsten zuvor ermittelten, nicht toxisch wirkenden Dosis von 5 µg PEP 19-2.5 gearbeitet. Hierfür wurde das an die Maus-adaptierte und letal verlaufende H7N7 Virus eingesetzt. Die mittlere letale Dosis 50 (MLD_{50}) der neu generierten rekombinanten H7N7 Viren (SC35M) wurde dafür zunächst im BALB/c-Mausmodell

bestimmt. Zur Untersuchung der antiviralen Aktivität der SALPs wurden zwei unterschiedliche Behandlungsansätze, der Ko- und der Nachbehandlungsansatz untersucht. Im Ko-Behandlungsansatz wurde das H7N7 Virus mit einer circa 15-fachen MLD_{50} und 5 µg PEP 19-2.5 gleichzeitig i.n. appliziert. Als Kontrollen dienten infizierte Mäuse, die mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden. Die Pathogenität wurde durch die Bestimmung des Gewichts und der Überlebensrate der Mäuse über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Zusätzlich wurden die Mauslungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion entnommen und hinsichtlich der viralen Titer mittels Plaquetest (3.7.4) untersucht.

Die Behandlung mit dem Peptid PEP 19-2.5 im Ko-Behandlungsansatz schützte vor einer letal verlaufenden Influenzavirusinfektion in BALB/c-Mäusen (Abb. 21). Die Mäuse, die mit dem H7N7 Virus infiziert und gleichzeitig mit PBS oder dem Kontrollpeptid PEP 19-CP behandelt wurden, zeigten innerhalb weniger Tage einen starken Gewichtsverlust und unterlagen der Influenzaviruserkrankung innerhalb der ersten 7 bzw. 8 Tage p.i. (Abb. 21A, B). Im Vergleich dazu zeigten Mäuse, die mit PEP 19-2.5 behandelt wurden keine Reduktion ihres Gewichts und alle Mäuse überlebten die Influenzavirusinfektion (Abb. 21A, B). Diese Daten wurden zusätzlich durch die Analyse der Virustiter der Lungen am Tag 3 und 6 p.i. verifiziert (Abb. 21C). Die Kontrolltiere wiesen hohe H7N7 Virustiter in der Lunge an beiden Untersuchungstagen auf (Abb. 21C). Im Vergleich dazu wurden keine viralen Titer des H7N7 Virus am Tag 3 p.i. in der Lunge der infizierten und PEP 19-2.5 behandelten Mäuse detektiert (Abb. 21C). Am Tag 6 p.i. wurde nur in einer der drei Mäuse ein Virustiter gemessen, dieser war jedoch verglichen mit den Kontrollgruppen um drei Logstufen reduziert (Abb. 21C).

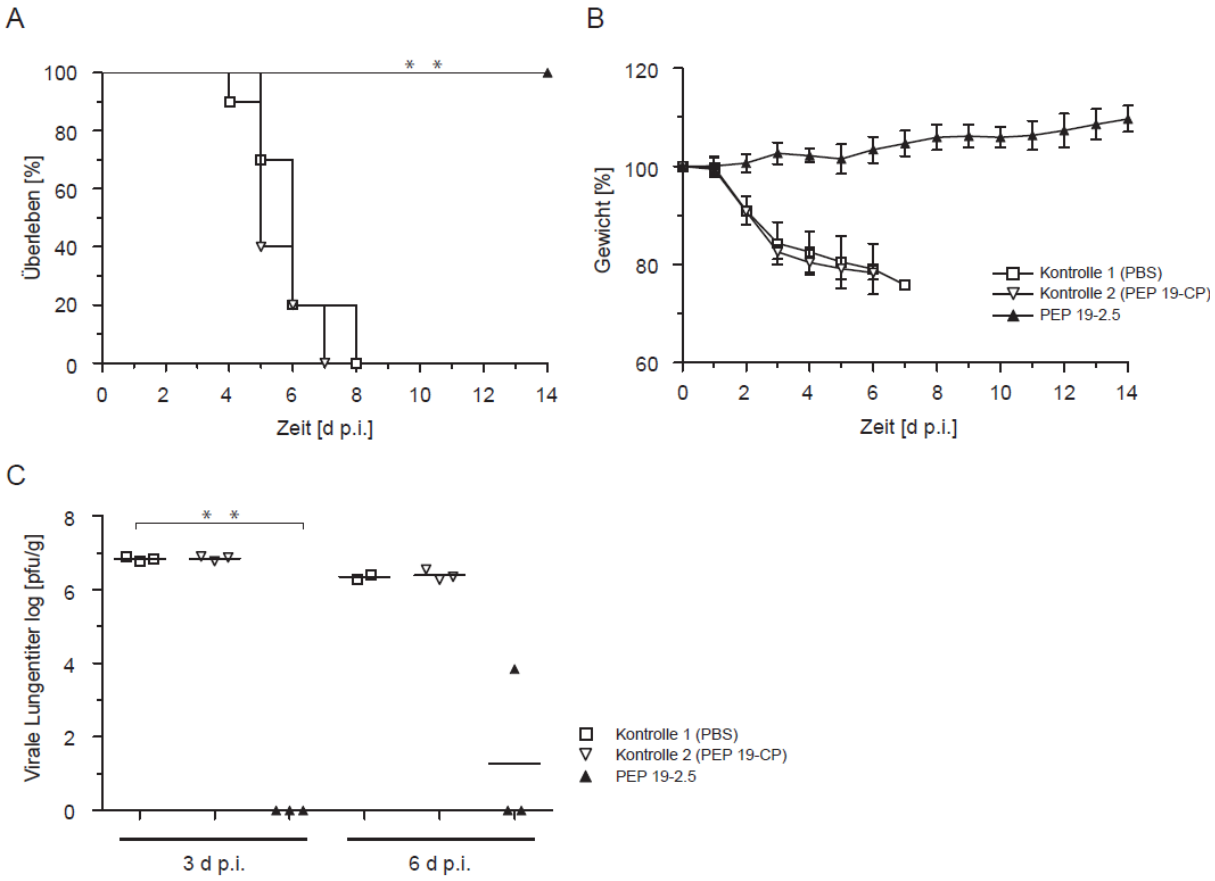


Abb. 21: Überlebensrate, Gewichtsverlust und virale Lungentiter von H7N7-infizierten BALB/c-Mäusen während der PEP 19-2.5 Ko-Behandlung

BALB/c-Mäuse wurden zeitgleich mit 10^4 p.f.u. des H7N7 Virus (circa 15-fache MLD_{50}) und 5 µg PEP 19-2.5 (*n*=17) nach einer Ketamin-Xylazin-Narkose intranasal inokuliert (Ko-Behandlungsansatz). Als Kontrollen dienten infizierte Mäuse, die mit PBS (Kontrolle 1, *n*=15) oder 5 µg PEP 19-CP (Kontrolle 2, *n*=16) behandelt wurden. Das Überleben (A) und das Gewicht (B) der Mäuse wurden über einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Am Tag 3 und 6 p.i. wurden jeweils 2-3 Mäuse pro Gruppe euthanasiert und die Lungen wurden zur Bestimmung der Virustiter mittels Plaquetest entnommen. Gezeigt sind die logarithmisch dargestellten viralen Lungentiter der einzelnen Mäuse (C). Die statistische Signifikanz der Überlebensraten wurde mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und die viralen Lungentiter mit dem Student's-*t*-Test ermittelt (*p<0,01, **p>0,001).

Im Nachbehandlungsansatz wurde die therapeutische i.n. Behandlung mit 5 µg PEP 19-2.5 30 min nach der H7N7 Virusinokulation (5-fache MLD_{50}) durchgeführt. Diese Behandlung wurde einmal täglich für sechs weitere Tage fortgesetzt. Zusätzlich wurde die Wirkung von oral verabreichtem Oseltamivir im Nachbehandlungsansatz als weitere Kontrolle evaluiert. Dabei fand die erste Behandlung 30 min p.i. statt und wurde einmal täglich für sechs Tage weitergeführt. Die Pathogenität wurde durch die Bestimmung des Gewichts und der Überlebensrate der Mäuse über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Zusätzlich wurden die Mauslungen am Tag 5 p.i. entnommen und bezüglich der Anwesenheit viraler Antigene und möglicher Immunzellinfiltrationen immunhistochemisch untersucht (3.11.4).

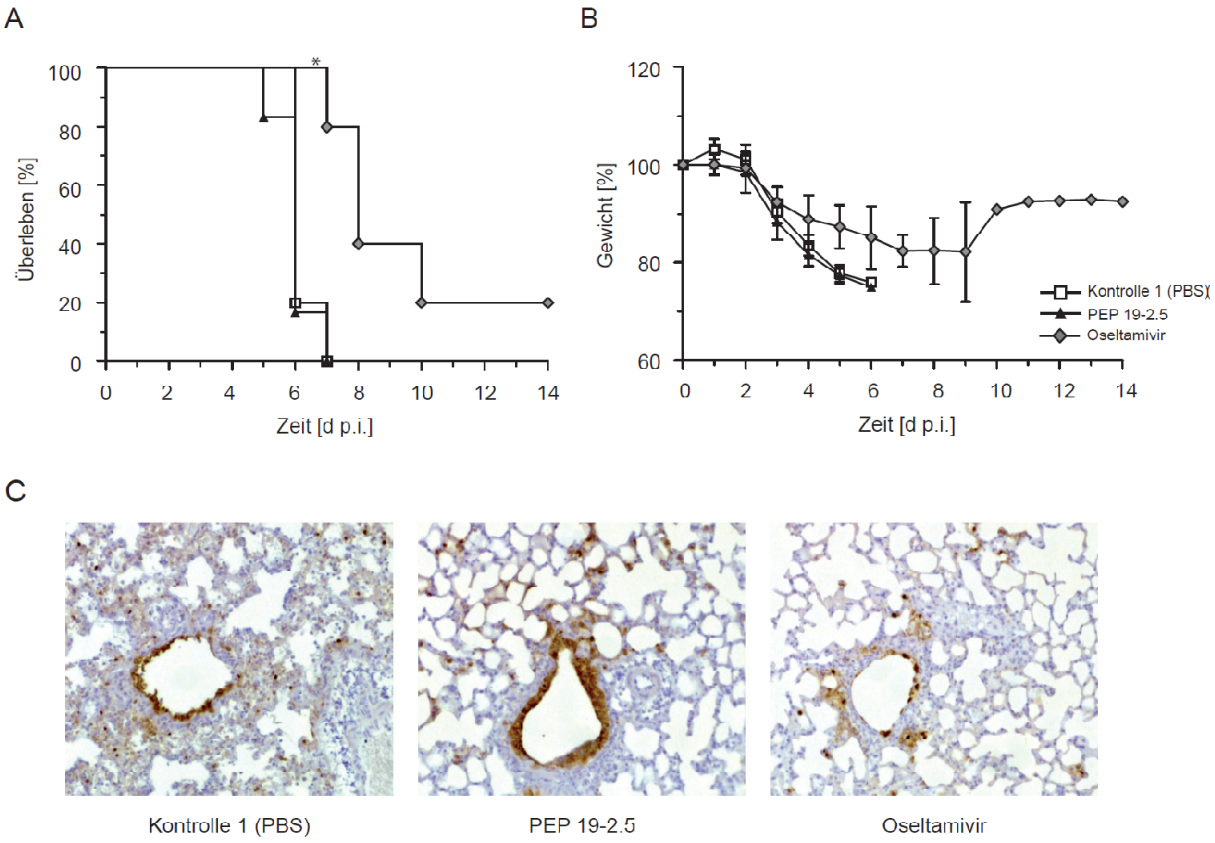


Abb. 22: Überlebensrate, Gewichtsverlust und immunhistochemische Färbung der Lunge von H7N7-infizierten BALB/c-Mäusen während der therapeutischen PEP 19-2.5 Behandlung

BALB/c-Mäuse (*n*=9) wurden mit 2,3 p.f.u. des H7N7 Virus (5-fachen MLD_{50}) intranasal inokuliert. Die therapeutische Behandlung mit 5 µg PEP 19-2.5 fand 30 min nach der Virusinokulation statt und wurde für 6 Tage einmal täglich weitergeführt. Als Kontrollen dienten infizierte Mäuse, die i.n. mit PBS (Kontrolle 1, *n*=8) oder oral mit 100 µg/kg Oseltamivir (*n*=11) behandelt wurden. Das Überleben (A) und das Gewicht (B) der Mäuse wurden über einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen ermittelt. Am Tag 5 p.i. wurden jeweils 3 Tiere pro Gruppe euthanasiert und die Lungen wurden entnommen. In immunhistochemischen Lungenschnitten wurde das virale Antigen (NP) detektiert und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angeschlossen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Durchlichtmikroskops ECLIPSE Ni-E mit der DS-Fi2 Kamera gemacht. Die statistische Signifikanz der Überlebensraten wurde mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test ermittelt (*p<0,01, **p>0,001).

Die therapeutische Behandlung mit dem Peptid PEP 19-2.5 hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsabnahme oder das Überleben der Tiere (Abb. 22). Die PEP 19-2.5- als auch die PBS-behandelten H7N7-infizierten Mäuse, zeigten die gleiche starke Gewichtsabnahme und das Versterben der Tiere bis Tag 7 p.i. (Abb. 22A, B). Im Vergleich dazu wiesen die immunhistochemischen Schnitte eine verminderte Anzahl an infizierten Zellen und eine geringere Infiltration von Immunzellen in PEP 19-2.5-behandelten Lungen auf (Abb. 22C). Die orale Einnahme von Oseltamivir rief eine leichte Reduktion der Virulenz, die mit einer verzögerten und reduzierten Gewichtsabnahme und einem Überleben der Tiere von 20 % einherging, hervor (Abb. 22A, B). Diese Ergebnisse wurden durch die Lungenschnitte, in denen die geringste Anzahl an infizierten, Virusantigen-positiven Zellen und infiltrierten Immunzellen im Vergleich zu den anderen Gruppen vorlag, verifiziert (Abb. 22C).

Diese gewonnen Ergebnisse zeigen, dass insbesondere bei der gleichzeitigen Applikation von Virus und Peptid ein Schutz vor der Influenzavirusinfektion besteht. Dieser Schutz ist bei der Peptid-Behandlung nach erfolgter Virusinfektion nicht gegeben. Diese Daten bestätigen die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse. Auch hier zeigt die Peptidbehandlung vor der Virusinokulation sowie die gleichzeige Applikation von Peptid und Virus einen staken antiviralen Effekt der SALPs. Diese antivirale Wirkung ist dagegen stark reduziert, wenn das Peptid nach der Virusinfektion appliziert wird.

5 Diskussion

5.1 SALPs inhibieren die virale Bindung an den zellulären Rezeptor durch kompetitive Hemmung

Die Entwicklung neuer antiviraler Strategien ist von besonderer medizinischer, sozialer und ökonomischer Bedeutung. In den Fällen, bei denen keine Immunisierung durch Vakzine stattfinden kann, beispielsweise beim Ausbruch einer neuen Pandemie, ist der Einsatz effizienter Medikamente von großem Interesse. Dieser trägt zur Minderung der Infektion und zur Eingrenzung der Virusausbreitung bei. Die verordneten Medikamente sollten dabei eine gute Verträglichkeit und eine hohe Wirksamkeit besitzen. Des Weiteren sollten sie nicht zur Ausbildung von Resistenzen führen. Die heute hauptsächlich eingesetzten NA-Inhibitoren weisen eine mäßige Wirksamkeit auf und verursachten in der Vergangenheit durch Mutationen im NA-Genomsegment bei manchen Influenzavirussubtypen eine Resistenz.

Die SALPs sind multifunktionelle Peptide für die bereits antimikrobielle, antiinflammatorische und antivirale Aktivitäten beschrieben wurden (Gutsmann *et al.*, 2010; Krepstakies *et al.*, 2012; Heinbockel *et al.*, 2013). In vorherigen Studien wurde die Bindung der SALPs an den Ko-Rezeptor Heparansulfat, welcher von einer Vielzahl von Viren genutzt wird, gezeigt. Aufgrund dieser Bindung waren umhüllte Viren wie HIV, HBV, HCV und HSV nicht mehr in der Lage an die Zelloberfläche zu binden. Diese Inhibition der ersten Phase des viralen Replikationszyklus, welche bereits die Infektion der Zellen verhindert, ist ebenfalls für Influenzaviren interessant. Der zelluläre Rezeptor der Influenza A Viren ist jedoch nicht das Heparansulfat, sondern die *N*-Acetylneuraminsäure (Palese und Shaw, 2007).

Zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der SALPs gegen Influenza A Viren wurde zuerst die Interaktion der SALPs mit der *N*-Acetylneuraminsäure mittels isothermer Titrationskalorimetrie untersucht. Die eingesetzten SALPs PEP 19-2.5, PEP 19-4 und PEP 19-8D zeigten eine spezifische Bindung an die *N*-Acetylneuraminsäure, wodurch die Voraussetzung einer kompetitiven Hemmung gegeben war. Dabei interagierte das PEP 19-2.5 am stärksten mit dem zellulären Rezeptor.

Die Interaktion von SALPs mit Heparansulfat wurde ebenfalls mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie ermittelt (Krepstakies *et al.*, 2012). Bei der stark exotherm verlaufenden Reaktion wurde eine Änderung der Enthalpie von 40 kJ/mol detektiert. Bereits bei einem molaren Verhältnis von Peptid zu Heparansulfat von 1 wurde eine Sättigung des Heparansulfats erzielt. Im direkten Vergleich zu den Daten dieser Arbeit wird Heparansulfat somit schneller als die *N*-Acetylneuraminsäure gesättigt. Die Bindung der Peptide an

Heparansulfat wird aufgrund der unterschiedlichen Ladungen vermutet. Die SALPs sind positiv geladen und könnten dadurch eine Interaktion mit dem negativ geladenen Heparansulfat eingehen und dieses dadurch neutralisieren. Die *N*-Acetylneuraminsäure besitzt ebenfalls eine negative Ladung, wodurch der gleiche Mechanismus der Bindung vermutet werden kann. Dabei scheint die allgemeine positive Ladung und die gleichmäßige Verteilung der positiv geladenen Aminosäuren mehr Einfluss auf den antiviralen Effekt zu besitzen, als die eigentliche Aminosäuresequenz und der amphiphile Charakter der Peptide (Krepstakies *et al.*, 2012). Diese Hypothese wird durch die Daten dieser Arbeit unterstützt, da das nicht-positiv geladene Kontrollpeptid PEP 19-CP keine Bindung mit der *N*-Acetylneuraminsäure eingeht. Die Daten dieser und der vorangegangenen Arbeit zeigen somit, dass die positive Ladung der SALPs wahrscheinlich entscheidend für die Bindung und Neutralisierung zellulärer Rezeptoren ist. Weshalb das PEP 19-2.5 die stärkste Interaktion zur *N*-Acetylneuraminsäure aufweist, ist bislang noch ungeklärt. Das SALPs das Potenzial besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenstrukturen, wie beispielsweise LPS, die Zellmembrankomponenten Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin sowie die negativ geladene Oberfläche der grampositiven und gramnegativen Bakterien zu binden, wurde in unterschiedlichen Publikationen gezeigt (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Heinbockel *et al.*, 2013). Aufgrund einer Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor *N*-Acetylneuraminsäure ist hypothetisch die Bindung des viralen Hämagglutinins nicht mehr möglich, wodurch die Anzahl der an der Zelloberfläche gebundenen Viruspartikel reduziert sein müsste. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Experimente zur Bindung der Viruspartikel an die Zelloberfläche während der SALP-Behandlung durchgeführt.

Vor diesen Experimenten wurde zunächst die Zytotoxizität der SALPs mittels MTT-Test analysiert. Die Behandlung der Zellen mit 20 µg/ml SALP zeigte keine Veränderung der Zellviabilität und somit keine Toxizität. Eine höhere Konzentration von 50 µg/ml beeinflusste die Zellviabilität je nach Behandlungsdauer unterschiedlich. Mit Hilfe dieser Daten konnten die nachfolgenden Untersuchungen mit nicht-toxisch wirkenden SALP-Dosen in der Zellkultur stattfinden. Für zukünftige Versuche wären detailliertere Toxizitätsbestimmungen mit mehreren Zelllinien, primären Zellen und unterschiedlichen Applikationsschemata wichtig. Außerdem sollten unterschiedliche Zytotoxizitätstests eingesetzt werden. Dabei sollten jedoch die Daten der bereits durchgeführten Toxizitätstests, die die Daten des MTT-Experiments dieser Arbeit unterstützen mit in Betracht gezogen werden (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Krepstakies *et al.*, 2012). Die Zytotoxizität der SALPs wurde unter anderem auf HeLa Zellen (humane Zervixepithelzelllinie), Vero Zellen (grüne Meerkatze-Nierenzelllinie), Jurkat T Zellen (human T-Zelllinie), HepG2 Zellen (humane Leberepithelzelllinie), hPBMCs (human periphere mononukleäre Zellen) und humanen Makrophagen mit dem *AlamarBlue* Viabilitätsassay, dem MTT Viabilitätstest und

toxikologischen Untersuchungen mittels des Bionas Systems bestimmt (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Krepstakies *et al.*, 2012). Für immortalisierte Zellen zeigten die SALPs bis zu einer Konzentration von 20 µg/ml keine Toxizität. Höhere Konzentrationen führten je nach Zelllinie und Zytotoxizitätstest zu unterschiedlichen Effekten. Für primäre Zellen war bereits der Einsatz niedrigerer Dosen toxisch. Weshalb eine stärkere Toxizität der SALPs nach einem kürzeren Behandlungszeitraum von einer Stunde sichtbar wurde, wurde nicht weiter evaluiert. Eine mögliche Erklärung wäre jedoch eine bis jetzt unzureichend untersuchte geringe Stabilität der Peptide. Aufgrund einer verminderten Halbwertszeit der Peptide wäre bei einem längeren Behandlungszeitraum eine Regeneration der Zellen denkbar. Da die Toxizität und die Stabilität von Inhibitoren bei der Entwicklung eines Medikaments eine entscheidende Rolle besitzt, soll im Abschnitt 5.4 noch einmal gesondert darauf eingegangen werden.

Der Einfluss der SALPs auf die Bindung der Viruspartikel an die Zelloberfläche wurde mit drei unterschiedlichen Influenza A Virussubtypen in zwei methodisch unterschiedlichen Experimenten untersucht. Dabei kamen der HA-Test mit Hühnererythrozyten und die Fluoreszenzanalyse zur Bestimmung der Bindung von Viruspartikeln an A549-Zellen zum Einsatz. Beide Zelltypen exprimieren den Rezeptor *N*-Acetylneuraminsäure auf der Oberfläche. Die SALP-Behandlung reduzierte in beiden Untersuchungen die Bindung der Viruspartikel an die Zelloberfläche. Diese Inhibition wurde vermutlich durch eine kompetitive Hemmung ausgelöst. Aufgrund der beschriebenen Bindung der SALPs an die *N*-Acetylneuraminsäure ist wahrscheinlich keine Bindung des viralen HA-Proteins mehr möglich. Die Reduktion der viralen Hämagglutination, welche mit den drei unterschiedlichen Influenzavirussubtypen dem Maus-adaptierten H7N7 Virus, dem humanen H3N2 Virus und dem pH1N1 Virus detektiert wurde, zeigte, dass die SALPs ein breites Spektrum der Influenzaviren inhibieren. Die stärksten inhibitorischen Effekte wurden mit PEP 19-2.5 und PEP 19-8D detektiert. Bereits der Einsatz einer niedrigen SALP-Konzentration verringerte die virale Hämagglutination. Eine höhere SALP-Konzentration verstärkte nur leicht den inhibitorischen Effekt, was auf eine ausreichende Blockierung des zellulären Rezeptors bereits bei niedrigen Konzentrationen deutet. Bei der höheren Peptidkonzentration wurde zusätzlich eine Hämagglutination der Hühnererythrozyten detektiert. Diese Hämagglutination lässt das Vorhandensein mehrerer Bindungsstellen der SALPs vermuten, welche anschließend mit Hilfe der TEM-Analyse untersucht wurden. Eine Lyse der Erythrozyten kann aufgrund der durchgeführten Hämolysetests vorangegangenen Studien ausgeschlossen werden (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011). Im HA-Test wurde lediglich der Ko-Behandlungsansatz, bei dem die Peptide und das Virus zusammen zu den Erythrozyten gegeben wurden, untersucht. Zur Analyse der antiviralen Funktion der SALPs wurden im Bindungsversuch auf A549-Zellen drei unterschiedliche SALP-

Applikationsansätze betrachtet. Dabei zeigten der Vorbehandlungsansatz, bei dem die Zellen vor der Virusinokulation mit PEP 19-2.5 behandelt wurden, und der Ko-Behandlungsansatz, bei dem das Virus und das Peptid gleichzeitig zu den Zellen gegeben wurden, die stärkste Inhibition der viralen Zellbindung. Im Gegensatz dazu wurden nur leichte inhibitorische Effekte im Nachbehandlungsansatz, in dem die Zellen zuerst mit Virus inokuliert und anschließend mit Peptid behandelt wurden, erzielt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass sobald das Virus erfolgreich an den Rezeptor der Wirtszelle gebunden hat, die SALPs keine inhibitorische Wirkung mehr besitzen. Die Ergebnisse der untersuchten Applikationsansätze verifizieren die Hypothese der kompetitiven Hemmung. Somit werden mit Influenza A Viren ähnliche inhibitorische Effekte wie mit anderen umhüllten Viren erzielt (Krepstakies *et al.*, 2012). Die spezifischen Bindungsversuche zeigten im Vorbehandlungsansatz eine Reduktion der HIV-Bindung an die Zelloberfläche von 80-90 %. Ebenfalls inhibierten die SALPs effizient die virale Zellbindung von HSV. Mittels der Heparin-Affinitätschromatographie wurde gezeigt, dass die SALP-Behandlung zu einer deutlich reduzierten Bindung von HBV an Heparin führt. Dabei wurde eine gleich starke Inhibition im Vor- und Ko-Behandlungsansatz gezeigt. Für die antiviralen Studien wurden ebenfalls die SALPs PEP 19-2.5 und PEP 19-4 verwendet, wobei PEP 19-2.5 minimal besser die Bindung der Viren an die Zellen inhibierte.

Zusätzlich zur Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor wurde die Interaktion der SALPs mit den Viruspartikeln selbst untersucht. Diese Interaktion kann ebenfalls zur verminderten viralen Bindung an die Wirtszelle beitragen. Die TEM-Aufnahmen zeigten die Interaktion zwischen SALPs, welche Aggregate bildeten, und den Viruspartikeln. Die Bildung von SALP-Aggregaten lässt mehr als eine Bindungsstelle der SALPs, welche die Interaktion zwischen SALPs ermöglicht, vermuten. Diese Hypothese könnte eine mögliche Erklärung für die bei der höheren SALP-Konzentration detektierte Hämagglutination der Hühnererythrozyten geben. Damit wurde die bereits in einer Studie gezeigte Bindung der SALPs an die Zelloberfläche sowie die Bildung von Peptidaggregaten, welche mit Fluoreszenz- und TEM-Analysen untersucht wurden, bestätigt (Krepstakies *et al.*, 2012). Die gewonnenen Daten der isothermen Titrationskalorimetrie, des HA-Tests, der Fluoreszenz- und der TEM-Analyse deuten auf die Reduktion der viralen Bindung an die Zelloberfläche aufgrund zwei unterschiedlicher Mechanismen hin. Zum einen interagieren SALPs mit dem zellulären Rezeptor der *N*-Acetylneuraminsäure und scheinen dadurch eine effiziente Bindung des viralen Hämagglutinins an diesen zellulären Rezeptor zu blockieren. Zum anderen binden SALPs an die Viruspartikel, wodurch ebenfalls die virale Bindung an die Zelloberfläche gehemmt werden könnte. Welcher der beiden Mechanismen stärker zur Inhibition beiträgt, muss in zukünftigen Experimenten noch detailierter analysiert werden. Unklar ist auch, ob die SALPs mit den viralen Oberflächenmolekülen HA oder NA

interagieren oder eine direkte Interaktion mit der viralen Lipidhülle, welche von der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle stammt, besteht. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen sind weitere Studien notwendig. Mit dem jetzigen Wissensstand können nur Spekulationen über die SALP-Virus-Interaktion stattfinden. Dabei ist eine Bindung der SALPs an die negativ geladenen Komponenten der viralen Lipidhülle, wie beispielsweise Heparansulfat, *N*-Acetylneuraminsäure und Phosphatidylcholin wahrscheinlicher, als eine Bindung an positiv geladene, komplex glykosylierte virale Oberflächenproteine (Kaconis *et al.*, 2011; Krepstakies *et al.*, 2012). Des Weiteren ist aufgrund der Bindung der SALPs an die Viruspartikel eine unterschiedliche inhibitorische Wirkung für die Influenzavirussubtypen denkbar. Eine Bindung der SALPs an andere umhüllten Viren, wie z.B. die bereits untersuchten Viren HIV, HSV, HBV und HCV wäre ebenfalls hypothetisch möglich, wurde bis jetzt jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

5.2 SALPs reduzieren die Internalisierung von Viruspartikeln sowie die Virusreplikation

Zur Untersuchung der Konsequenzen einer verminderten Bindung der Viren an die Zelloberfläche wurden die von der Zelle internalisierten Viruspartikel detektiert. Außerdem wurde die virale Replikation mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen, Western Blot Analysen, Plaque-Reduktionstests und Wachstumskurven bestimmt. Dabei wurden ebenfalls die unterschiedlichen SALP-Applikationsansätze des Vor-, Ko- und Nachbehandlungsansatzes analysiert.

Aufgrund der SALP-Behandlung wurde eine verringerte virale Zellbindung hervorgerufen, wodurch weniger Zellen infiziert wurden. Dadurch war die zelluläre Internalisierung der Viruspartikel stark reduziert. Dabei war die Virusaufnahme besonders im Vor- und Ko-Behandlungsansatz beeinträchtigt, bei denen die Zellen entweder vor oder während der Virusinokulation mit den SALPs behandelt wurden. Nur geringfügige Effekte wurden im Nachbehandlungsansatz erzielt, bei dem die Zellen zuerst mit Virus inokuliert und anschließend mit Peptid behandelt wurden. Bei dieser Analyse der internalisierten Viruspartikel war der Einsatz einer sehr hohen, in der Natur ausgeschlossenen Infektionsdosis erforderlich. Diese war jedoch für die gewählte Methode notwendig um oberhalb des Detektionslimits des Fluoreszenzsignals zu liegen und die aufgenommenen Viruspartikeln detektieren zu können. Vergleichbare Tests zur Internalisierung von Viruspartikeln wurden auch mit HSV und HBV Viren durchgeführt (Krepstakies *et al.*, 2012). Die Vorbehandlung der Zellen mit SALPs für eine bzw. 24 Stunden führte zu einer starken Reduktion der von der Zelle internalisierten HSV bzw. HBV Viren.

Die Analyse der Virusreplikation der Influenzaviren während der SALP-Behandlung zeigte, dass die SALPs die Virusreplikation aufgrund einer verminderten viralen Zellbindung reduzierten. Dies wurde mit einer Vielzahl unterschiedlicher Methoden nachgewiesen. Die Inhibition war besonders ausgeprägt, wenn das Peptid vor oder während der Virusinokulation appliziert wurde. Nur minimale Effekte wurden erneut im Nachbehandlungsansatz erzielt. Diese verminderte Wirksamkeit der SALPs im Nachbehandlungsansatz könnte, wie bereits beschrieben, durch eine sehr stark eingeschränkte Funktionsfähigkeit der SALPs bei bereits an die Wirtzelle gebundenen Viruspartikeln erklärt werden. Da initial weniger Zellen im Vor- und Ko-Behandlungsansatz infiziert wurden, wurden ebenfalls weniger exprimierte virale Proteine in der Immunfluoreszenz- und Western Blot Analyse detektiert. Aufgrund der unterschiedlichen, zellulären Verteilung der neu synthetisierten Nukleoproteine zwischen SALP-behandelten und nicht-behandelten Zellen, scheint die Virusreplikation zusätzlich leicht verzögert zu sein. Des Weiteren wurde im Ko-Behandlungsansatz der Virustiter von allen drei eingesetzten Subtypen H7, H3 und H1 signifikant bis zu vier Logstufen inhibiert. Dabei sind die inhibitorischen Effekte, die mit dem H7N7 Virus erzielt wurden, von besonderem Interesse, da diese Viren hohe Replikationsraten und eine hohe Virulenz in der Maus besitzen. Die therapeutische Applikation von PEP 19-2.5 reduzierte ebenfalls signifikant das Wachstum der H7N7 Viren. Eine gesteigerte therapeutische Aktivität der SALPs in diesem Versuch könnte durch eine Verbesserung der Halbwertszeit dieser Peptide, auf die im Abschnitt 5.4 detaillierter eingegangen wird, geschaffen werden.

Die SALPs zeigten eine unterschiedlich starke antivirale Aktivität gegen humane Influenzavirussubtypen H3N2 und pH1N1 und den aviären Influenzavirussubtyp H7N7. Zur Untersuchung dieses Effekts wurde der Zusammenhang zwischen der Inhibition humaner und aviärer Influenzaviren und der α2,3- und α2,6-Spezifität genauer betrachtet. Das Hämagglutinin aviärer Influenzaviren interagiert präferentiell mit α2,3-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, welche auf den Epithelzellen der Trachea und des Darms von Vögeln exprimiert werden (Connor *et al.*, 1994; Bouvier und Palese, 2008). Humane Influenzaviren bevorzugen die Bindung an α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren, welche hauptsächlich auf Epithelzellen des humanen Respirationstrakts lokalisiert sind. Im HA-Test zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der SALPs wurden Hühnererythrozyten eingesetzt. Die Mehrheit der Rezeptoren auf der Oberfläche von Hühnererythrozyten sind die α2,3-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, welche wie beschrieben, von aviären Influenzaviren gebunden werden (Medeiros *et al.*, 2001). Die SALPs inhibierten die aviäre H7N7 Hämagglutination genauso stark, wie die durch die humanen H3N2 Viren hervorgerufene Hämagglutination. Geringere inhibitorische Effekte wurden in diesem Test gegen das humane pH1N1 Virus erzielt. Ebenfalls starke inhibitorische Effekte der SALPs wurden gegen das aviäre H7N7 Virus und das pH1N1 Virus in den Studien zur Bindung der

Viruspartikel an die Zelloberfläche, zur Bestimmung internalisierter Viruspartikel und zur Bestimmung der Virusreplikation festgestellt. Diese Experimente wurden mit humanen Lungenepithelzelllinien, welche vorrangig α2,6-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren exprimieren, durchgeführt (Kumari *et al.*, 2007; Sieben *et al.*, 2012). Es scheint daher keinen Zusammenhang zwischen der SALP-Bindung zu α2,3- oder α2,6-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren und der Inhibition aviärer oder humaner Influenza A Viren zu geben. Die virale Rezeptorbindung ist sehr komplex und die alleinige Betrachtung der α2,3- oder α2,6-Spezifität ist wahrscheinlich nicht ausreichend. Zusätzliche Studien sind notwendig, um die SALP-Bindung an den zellulären Rezeptor zu charakterisieren. Dabei können z.B. Polysaccharidarrays, welche eine Vielzahl modifizierter *N*-Acetylneuraminsäuren besitzen, eingesetzt werden (Stevens *et al.*, 2006). Die unterschiedliche Aktivität der SALPs gegen humane und aviäre Influenzaviren wäre auch aufgrund des zweiten Mechanismus, der Bindung der SALPs an die Viruspartikel, möglich. Ob und wie die Inhibition aufgrund der Interaktion der SALPs mit Viruspartikeln unterschiedlicher Subtypen beeinflusst wird, ist wie bereits beschrieben, Inhalt weiterführender Arbeiten.

Die Untersuchung der Auswirkungen der reduzierten Virusbindung an die Zelloberfläche auf die weiteren Phasen des viralen Replikationszyklus war auch Bestandteil der Arbeit von Krepstakies *et al.* (Krepstakies *et al.*, 2012). Die erfolgreiche Integration des HIV Genoms mit anschließender Expression der viralen Proteine, die Env-vermittelte Zell-Zellfusion sowie die HIV Virusreplikation, gemessen an den p24 Antigenleveln wurden durch die SALP-Behandlung inhibiert. SALPs reduzierten im Vorbehandlungsansatz die Virusreplikation von HSV, HCV und HBV, gemessen an der ICP0- bzw. VP5-Proteinmenge im Fall von HSV-1 bzw. HSV-2. Bei HCV wurde die Inhibition mit Hilfe eines Luciferase Reporter Assay und bei HBV durch die Ermittlung der Menge des extrazellulären HBV Kernantigens (HBeAG) oder des HBV Oberflächenantigens (HBsAG) bestimmt. In den Analysen mit den HBV Viren wurde parallel zum Vorbehandlungsansatz auch der Nachbehandlungsansatz untersucht, bei dem keine Virusinhibition gezeigt werden konnte. Das bedeutet, die Daten dieser Publikation bestätigen diejenigen in dieser Arbeit. Die Vor- und Ko-Behandlung mit SALPs inhibierte die virale Bindung an die Zelloberfläche, worauf die Infektion der Zellen und alle weiteren Phasen des viralen Replikationszyklus inhibiert wurden.

5.3 SALPs bieten einen differenziellen Schutz vor einer letalen H7N7 Influenzavirusinfektion in der Maus

Für die Infektionsversuche im Mausmodell wurde zunächst *in vivo* die nicht-toxisch wirkende Dosis ermittelt und die Applikationsroute für die Zustellung der Peptide im Zielorgan wurde bestimmt. Die Versuche im Mausmodell wurden mit dem Peptid PEP 19-2.5 durchgeführt,

welches die stärksten inhibitorischen Effekte und die geringsten zytotoxischen Effekte in den vorangegangenen Experimenten zeigte. Die intranasale Applikation von 5 µg führte auch bei der mehrfachen Gabe zu keinem Gewichtsverlust oder anderen toxischen Anzeichen, wie beispielsweise Veränderungen im Lungengewebe. Höhere Dosen ab 50 µg waren ungeeignet für die intranasale Applikationsroute, da sie toxische Nebeneffekte hervorriefen. Neben der Toxizität wurde untersucht, ob die SALPs die Lunge erreichen. Dies wurde mit Hilfe des Rhodamin-gekoppelten PEP 19 2.5-Rho analysiert. Die Peptide wurden bereits nach einem kurzen Behandlungszeitraum auf der Oberfläche der Epithelzellen des Respirationstrakts nachgewiesen und das Erreichen der Zielzellen war somit gegeben. Aufgrund der Verknüpfung von Peptiden mit einem Farbstoff kann es zu Veränderungen der Peptide kommen, welche Auswirkung auf die Lokalisierung dieser haben könnte. Durch die Bestimmung der nicht-toxisch wirkenden Dosis und der Zustellung des Inhibitors zu den Zielzellen waren die Voraussetzungen für die anschließenden Mausversuche in BALB/c-Mäusen gegeben.

Es wurden jedoch auch schon andere Applikationsrouten der SALPs im Mausmodell getestet. Zur Bestimmung der schützenden Funktion der SALPs gegen eine letale Endotoxämie in BALB/c und C57BL/6 Mäusen, wurden die SALPs intraperitoneal (i.p.) verabreicht (Gutsmann *et al.*, 2010; Kaconis *et al.*, 2011; Martinez de Tejada *et al.*, 2012; Heinbockel *et al.*, 2013). Dabei wurden je nach Fragestellung Dosen bis zu 400 µg verabreicht. Eine mehrfache Applikation der Peptide wurde nur in einer Versuchsgruppe durch das Verabreichen von 150 µg PEP 19-2.5 zu Beginn des Experiments und von 400 µg sechs Stunden nach der ersten Gabe, durchgeführt. Diese Dosen scheinen keine Toxizität im Tier verursacht zu haben. In Vorversuchen dieser Arbeit wurde die intraperitoneale Applikation der Peptide ebenfalls getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde bei der Gabe von 250 µg kein Gewichtsverlust der Mäuse gemessen. Jedoch führte die i.p. Applikation von 500 µg pro Maus zu einer leichten Toxizität, detektiert an einer minimalen Gewichtsabnahme. Die intravenöse Behandlung mit SALP PEP 19-2.5 wurde ebenfalls in vorangegangenen Studien durchgeführt (Schuerholz *et al.*, 2013). Dabei wurde ein intravenöser (i.v.) Katheter mit einer Pumpleistung von 100 µl/h gelegt, bei denen die Tiere 2 µg/h des Peptids verabreicht bekamen. Über die Toxizität der SALPs mit dieser Applikationsroute kann mit den veröffentlichten Daten keine Aussage getroffen werden, da die alleinige i.v. Behandlung nicht untersucht wurde. Jedoch zeigten die behandelten Tiere in einem polymikrobiellen Sepsismodell eine signifikante Reduktion der induzierten Zytokine. Je nach Fragestellung besitzen die jeweiligen Applikationsrouten Vor- und Nachteile. Für die Influenzavirusinfektion ist die intranasale Applikationsroute vorteilhaft, da die Peptide theoretisch schnell zu den jeweiligen Zielzellen gelangen. Eine systemische Applikation der Peptide wäre ebenfalls denkbar und insbesondere bei einer schwer verlaufenden,

systemischen Infektion von Interesse. Jedoch müssten dazu erst umfangreiche Studien bezüglich der maximal einsetzbaren, nicht-toxischen Menge und der Zustellung der Peptide in der Lunge durchgeführt werden. In dem bereits erwähnten Vorversuch konnte nach der i.p. Applikation von PEP 19-2.5-Rho kein Fluoreszenzsignal in der Lunge detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die intravenöse Applikation ist kritisch zu betrachten, da die Versuche dieser Arbeit eine Hämagglutination von Erythrozyten bei einer höheren SALP-Konzentration zeigten. In der Publikation von Krepstakies *et al.* wurde die antivirale Aktivität der SALPs gegen HIV, HSV, HCV und HBV ausschließlich im Zellkultursystem evaluiert (Krepstakies *et al.*, 2012). Bei der Entwicklung von neuen Medikamenten spielt neben der Toxizität und der Zustellung auch die Stabilität der Inhibitoren eine entscheidende Rolle, weshalb im Abschnitt 5.4 nochmals gesondert auf diese Punkte eingegangen wird.

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der SALPs gegen Influenza A Viren im Mausmodell wurden zwei unterschiedliche Behandlungsstrategien verfolgt. Zum einen wurde den Mäusen ein Peptid-Virus Mix im Ko-Behandlungsansatz verabreicht. Zum anderen wurde die therapeutische Anwendung durch die mehrmalige Gabe der Peptide, beginnend ab 30 min p.i., analysiert. Die gleichzeitige Applikation von Virus und Peptid schützte die Mäuse vor einer letal verlaufenden H7N7 Virusinfektion. Es wurde kein Gewichtsverlust beobachtet und die meisten PEP 19-2.5-behandelten Mäuse wiesen keine viralen Lungentiter auf. Der vollständige Schutz im Vorbehandlungsansatz unterstützt die gewonnenen Daten über die Verteilung der SALPs nach der i.n. Applikation. Die Detektion der SALPs auf den Epithelzellen des murinen Respirationstrakts steht in direktem Zusammenhang mit dem Schutz vor einer Influenzavirusinfektion. Die effiziente Zustellung der SALPs in der Lunge scheint damit notwendig, um die Virusreplikation in der Lunge zu inhibieren. Der Schutz war bei der therapeutischen Behandlung nicht gegeben. Lediglich die Infiltration von Immunzellen und die Zerstörung der Lunge waren in Peptid-behandelten Mäusen weniger stark ausgeprägt. Die *in vivo* Daten spiegelten damit die *in vitro* Daten wider. Generell lag ein antiviraler Effekt im Vor- und Ko-Behandlungsansatz vor. Ein stark reduzierter Effekt war im therapeutischen Nachbehandlungsansatz erkennbar. Die SALPs besaßen keinen Einfluss auf die Virusreplikation, wenn Viruspartikel bereits an der Wirtszelle gebunden waren. SALPs können theoretisch nach der Freilassung neuer Virionen durch eine kompetitive Hemmung des zellulären Rezeptors oder aufgrund der direkten SALP-Virus-Bindung die erneute Infektion inhibieren. Eine reduzierte Inhibition mehrerer Replikationszyklen wäre aufgrund einer verminderten Halbwertszeit der Peptide, näher beschrieben im Abschnitt 5.4, denkbar.

Wie bereits beschrieben, wurde die antivirale Aktivität der SALPs gegenüber anderen umhüllten Viren in den Zellkulturexperimenten ebenfalls hauptsächlich im Vor- und Ko-Behandlungsansatz detektiert (Krepstakies *et al.*, 2012). Die SALP-Behandlung zu

unterschiedlichen Zeitpunkten einer LPS-induzierten Sepsis im Mausmodell zeigte die stärksten inhibitorischen Effekte der SALPs bei der gleichzeitigen Gabe von LPS und SALPs, gefolgt von der SALP-Applikation 30 Minuten nach der LPS Gabe (Heinbockel *et al.*, 2013). Minimale bzw. keine Effekte riefen die Vorbehandlung und die nach 60 Minuten stattfindende therapeutische Behandlung hervor. Eine zusätzliche inhibitorische Steigerung gegen eine LPS induzierte Sepsis wurde erzielt, wenn eine Kombinationstherapie aus SALP und Antibiotika verabreicht wurde. Die Kombination der SALPs mit anderen antiviralen Inhibitoren könnte ebenfalls zur Reduktion der Influenzavirusinfektion beitragen.

Die therapeutische Oseltamivir-Behandlung erhöhte die Überlebensrate der Mäuse auf 20 %. Die unterschiedliche antivirale Wirksamkeit von Oseltamivir gegenüber den Influenzavirussubtypen wurde bereits im Mausmodell untersucht. Dabei ist Oseltamivir gegenüber HPAIV weniger effizient als gegen niedrig pathogene humane Influenzavirussubtypen (Smee *et al.*, 2010; Takano *et al.*, 2013). Das in den Mausversuchen dieser Arbeit verwendete H7N7 Virus weist keine der in der Literatur beschriebenen resistenzvermittelten Mutationen, H274Y, R292K oder N294S im NA-Genomsegment auf (Moscona, 2009; Baranovich *et al.*, 2011). Die reduzierte Wirksamkeit des NA-Inhibitors, könnte auch auf einer geringeren Funktionalität gegenüber dem N7-Subtyp im Vergleich zu den N1- oder N2-Subtypen beruhen.

5.4 SALPs können zur Entwicklung zukünftiger antiviraler Strategien dienen

Die SALPs sind kleine Peptide und stellen exzellente Kandidaten zur Entwicklung zukünftiger antiviraler Strategien dar. Die Vorteile von Peptiden in der antiviralen Verwendung liegen bei der kleinen Größe, der hohen Spezifität, der Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen, einer geringeren Akkumulation im Gewebe und einer geringeren Zytotoxizität (Huther und Dietrich, 2007; Tan *et al.*, 2012; Galdiero *et al.*, 2013). Des Weiteren können Peptide schnell und in großen Mengen synthetisiert werden. Peptide besitzen jedoch auch einige Nachteile, wie z.B. die meist reduzierte Möglichkeit Membranen zu passieren, eine kurze Halbwertszeit, eine potenziell immunogene Aktivität, eine geringere orale Adsorption, hohen Produktionskosten und eine limitierte Stabilität bei der Lagerung (Edwards *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2012; Galdiero *et al.*, 2013). An der Optimierung von Peptiden wurde in den letzten Jahren gearbeitet und durch den Einsatz neuer Technologien konnten Peptide insbesondere bezüglich ihrer Stabilität und ihrer Zustellung verbessert werden. Der erste Peptid-basierte Inhibitor Enfuvirtide wurde 2003 von der *Food and Drug Administration* (FDA) genehmigt (Kilby *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2012). Enfuvirtide besteht aus 36 Aminosäuren und basiert auf der HR2 Sequenz des Transmembranproteins gp41 von HIV-1. Dieser Inhibitor blockiert die Aufnahme von HIV in die Zelle. Weitere auf Peptiden

basierende Inhibitoren wurden zur Inhibition der Virusreplikation von Enteroviren, HCV, HBV, HSV und Influenzaviren designt (Fox, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Rajik *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011; Wunderlich *et al.*, 2011; ElSawy *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012; Galdiero *et al.*, 2013). Der Angriffspunkt für viele Peptide scheint die virale Adsorption und die Endozytose sowie die Virushülle selbst zu sein, wobei ein amphiphiler Charakter der Peptide vermutlich entscheidend zu der Inhibition beiträgt (Robinson *et al.*, 1998; Belaid *et al.*, 2002; Galdiero *et al.*, 2013). Außerdem wurden Peptide für die Entwicklung von Vakzinen verwendet (Bianchi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009a; Wu *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2010a; Wang *et al.*, 2010b; Kang *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011). Der Vorteil von Peptid-basierten Vakzinen ist, verglichen zur konventionellen Produktion von Vakzinen, die günstige und schnelle Herstellung. Die Peptide basieren auf der hochkonservierten, extramembranen Domäne des HA- oder M2-Proteins und rufen eine Immunantwort gegen unterschiedliche Influenzavirussubtypen hervor. Die Vakzinierung mit diesen Peptiden zeigt bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur eine bedingte Wirksamkeit. Der Einsatz dieser Peptide könnte jedoch auch eine Möglichkeit zur Verbesserung der aktuellen Vakzine bieten.

Die antivirale Aktivität der SALPs zielt ebenfalls, wie bereits für einige antiviral wirkende Peptide beschrieben, auf die effiziente Inhibition der Virusbindung an die Zelloberfläche ab. Betrachtet man die einzelnen Aspekte der Medikamentenentwicklung so besitzen die SALPs bereits die ersten Voraussetzungen für ein Antiviralia. Dabei gelten die Patentierung der Peptide und die hohe Reinheit der synthetisierten SALPs bereits zur präklinischen Entwicklungsphase. Um eine verbesserte antivirale Wirksamkeit der Peptide in der therapeutischen Anwendung zu erzielen, müssen diese jedoch in Zukunft noch weiter optimiert werden. Im Mittelpunkt der Optimierung antiviraler Substanzen in der Forschungs- und präklinischen Phase stehen unter anderem die Verbesserung der Spezifität, die Zustellung der Inhibitoren zu den Zielzellen, die Stabilität sowie die Reduktion der Toxizität. Dabei beeinflussen sich die vier Faktoren gegenseitig. Eine Verbesserung der Spezifität und der Bindungsaffinität zum zellulären Rezeptor der *N*-Acetylneuraminsäure könnte die Wirksamkeit der Peptide weiter steigern und die einzusetzende Dosis senken. Die Stabilität könnte beispielsweise durch die Einführung von D-Aminosäuren erhöht werden (Galdiero *et al.*, 2013). Da Proteasen hauptsächlich L-konfigurierte Peptide abbauen, besitzen die D-Aminosäuren eine längere Halbwertszeit. Eine modifizierte Variante von PEP 19-2.5 enthält Aminosäuren in einer D-Konfiguration (Schuerholz *et al.*, 2012). Dieses Peptid zeigte bereits eine gute inhibitorische Aktivität gegen die LPS-induzierte TNF-α Induktion in mononukleären Zellen. Der Einsatz dieses Peptids könnte zu einer Steigerung der *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit führen und insbesondere die therapeutische Inhibition verbessern. Zur Steigerung der Zustellung der Inhibitoren und einer damit verbundenen Senkung der SALP-Dosis könnte die Verabreichung von SALP-Aerosolen darstellen. Zur Verabreichung

dieser Aerosole werden besondere Inhalatoren mit Feintröpfchenverneblern verwendet (Droebner *et al.*). Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Influenzaviren ist die Resistenzentwicklung der Viren bezüglich des eingesetzten Inhibitors. Experimente, die zur Adressierung dieser Fragestellung geeignet wären, sind beispielsweise Versuche bei denen die Viren in der Zellkultur oder im Mausmodell während der SALP-Behandlung passagiert werden (Furuta *et al.*, 2002; Ives *et al.*, 2002). Die resistenzspezifischen Signaturen, die beim Eintreten der Resistenz auftreten, könnten im Anschluss mittels Sequenzierungstechniken spezifiziert werden. Inhibitoren können bezogen auf ihr Angriffsziel in zwei Kategorien aufgeteilt werden (Govorkova und McCullers, 2013). Es werden Inhibitoren, die die viralen Proteine hemmen von denen, die die Interaktionen zwischen viralen und zellulären Faktoren blockieren, unterschieden. Aufgrund der Antiviralia die gegen virale Proteine gerichtet sind, entsteht ein großer Selektionsdruck für die Viren der zur schnellen Anpassung und somit einer Resistenzausbildung führt kann. Im Gegensatz dazu ist die Anpassung der Viren gegen Inhibitoren, die zelluläre Zielstrukturen adressieren schwieriger und die Chance einer Resistenzentwicklung geringer. Dadurch sind Inhibitoren die virale Faktoren adressieren resistenzanfälliger als Inhibitoren, die zelluläre Faktoren als Angriffsziel besitzen. Inhibitoren, die zelluläre Faktoren adressieren, weisen jedoch auch Nachteile insbesondere bezüglich ihrer Toxizität, auf.

Die breite Wirksamkeit der SALPs gegen gramnegative und grampositive Bakterien sowie eine Vielzahl umhüllter Viren machen die SALPs zu einem interessanten, breit einsetzbaren Inhibitor. Da sehr viele der schwer verlaufenden Influenza A Virusinfektionen mit einer bakteriellen Ko-Infektion assoziiert sind, könnte der Einsatz der SALPs allein ausreichen, um die virale als auch die bakterielle Infektion zu hemmen. Die Bakterienstämme *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* führen am häufigsten zu einer bakteriellen Ko-Infektion (Wright *et al.*, 2007; Chertow und Memoli, 2013). Dabei wurde die antimikrobielle und antiinflammatorische Aktivität der SALPs gegen *Staphylococcus aureus* bereits gezeigt (Gutsmann *et al.*, 2010; Heinbockel *et al.*, 2013). Diese Daten stellen die erste Voraussetzung zur Inhibition einer Influenzavirus und *Staphylococcus aureus* Ko-Infektion dar.

Da Influenza B Viren genauso wie Influenza A Viren an die *N*-Acetylneuraminsäure binden, liegt die Vermutung nahe, dass SALPs ebenfalls ein antivirales Potenzial gegen Influenza B Viren besitzen können (Palese und Shaw, 2007). Diese Hypothese müsste in zukünftigen Studien untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre die Nutzung einer Peptid-Virus-Vermengung als potenzielle Vakzine. Im Ko-Behandlungsansatz zeigten die Mäuse keinen Gewichtsverlust und die SALPs schützen vor einer letal verlaufenden Virusinfektion. Aufgrund dessen

könnten theoretisch bei der gleichzeitigen Applikation von Virus und Peptid im Wirt Antikörper gegen die antigenischen Bereiche der viralen Oberflächenglykoproteinen gebildet werden. Dadurch wäre, wie bei einem attenuierten Lebendimpfstoff ein Schutz gegen eine erneute Infektion gegeben. Um diese Hypothese experimentell zu prüfen, muss die Ausbildung von spezifischen Antikörpern in den Mäusen untersucht werden.

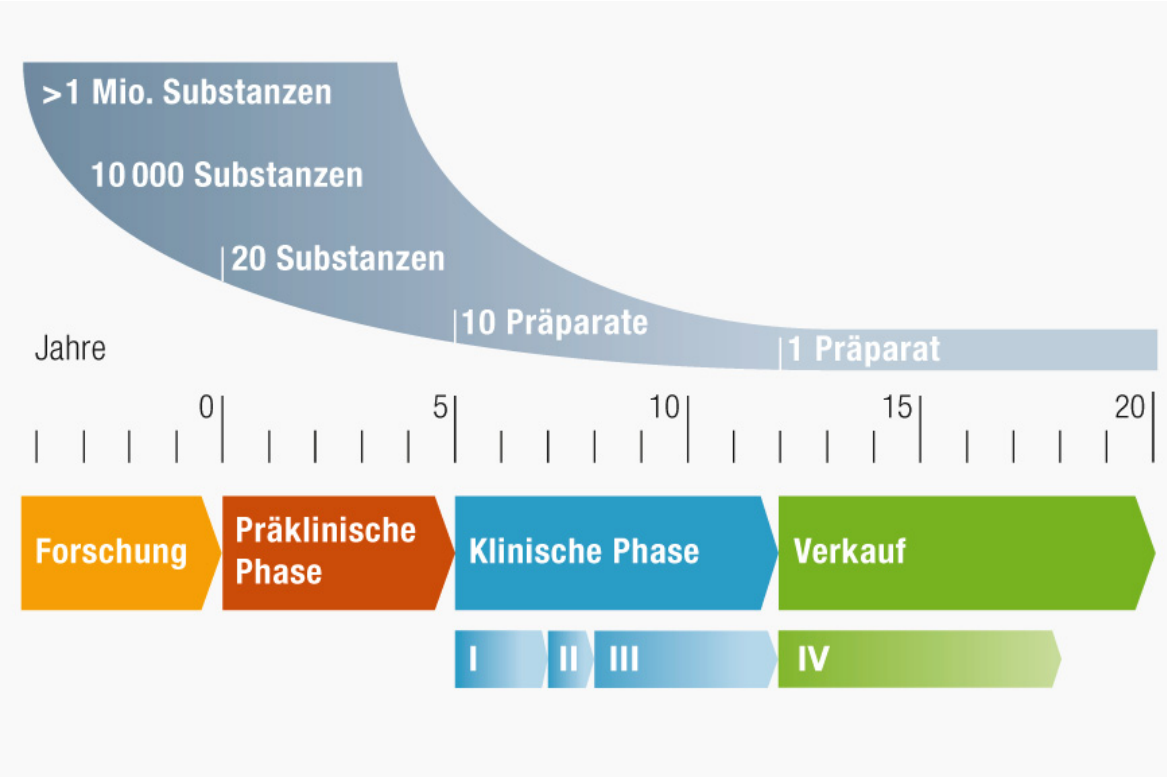


Abb. 23: Der Werdegang eines Medikaments
In der Forschungs- und präklinischen Phase wird die Wirksamkeit des Inhibitors in der Zellkultur sowie im Mausmodell untersucht (Interpharma, abgerufen am 06.02.2014). Des Weiteren werden in diesen Systemen toxikologische Untersuchen durchgeführt. Die klinische Phase wird nochmal in mehrere Phasen untergliedert. Nach dem erfolgreichen Durchlaufen dieser Phasen kann das Präparat auf dem Markt zugelassen und verkauft werden.

In dieser Arbeit wurde die inhibitorische Aktivität von antimikrobiell, antiinflammatorisch und antiviral wirkenden SALPs gegen Influenza A Viren analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass SALPs in der Lage sind mit dem zellulären Rezeptor der Influenzaviren der *N*-Acetylneuraminsäure zu interagieren und somit die Bindung der Viren an die Zelloberfläche zu inhibieren. Zusätzlich wurde die Interaktion der SALPs mit den Viruspartikeln gezeigt, wodurch ebenfalls die Bindung an die Wirtszelle reduziert werden kann. Aufgrund der verringerten viralen Zellbindung waren die Infektion der Zellen und alle nachfolgenden viralen Replikationsschritte reduziert. Die stärksten Effekte wurden im Vor- und im Ko-Behandlungsansatz erzielt. Die antivirale Aktivität der SALPs wurde neben den Zellkulturexperimenten auch im Mausmodell untersucht. Insbesondere im Ko-Behandlungsansatz wurde ein Schutz gegen eine in der Maus letal verlaufende Influenza A

Virusinfektion erhalten. Um diese SALPs zukünftig als Inhibitoren gegen Influenzaviren einsetzen zu können, müssen noch weitere Optimierungen, welche im Diskussionsabschnitt dargestellt wurden, stattfinden. Von der hier gezeigten antiviralen Aktivität der SALPs gegen Influenzaviren bis zur Genehmigung eines Medikaments durch die FDA ist es ein langer und aufwendiger Prozess (Abb. 23).

Der Vorteil der in dieser Studie untersuchten SALPs liegt in der inhibitorischen Aktivität die sie gegen eine Vielzahl humanpathogener Viren besitzen. Des Weiteren weisen SALPs, die insbesondere zelluläre Angriffsziele besitzen, vermutlich eine geringere Resistenzanfälligkeit auf. Sie stellen aufgrund ihrer Fähigkeit neben Viren auch Bakterien zu inhibieren eine vielversprechende zukünftige Strategie dar, um bakterielle Ko-Infektionen zu adressieren.

6 Zusammenfassung

Influenza A Viren stellen durch ihre Fähigkeit Pandemien, Epidemien sowie Interspeziestransmissionen auszulösen ein stetiges Risiko für die menschliche Gesundheit dar. Die primäre Strategie zur Prävention von Influenzavirusinfektionen ist die Vakzinierung. Im Falle einer Pandemie wird ein Zeitraum von mindestens zwanzig Wochen benötigt, um einen neuen angepassten Impfstoff zu produzieren. In diesem Zeitraum vom Ausbruch der Pandemie bis zur Verfügbarkeit des neuen Impfstoffs werden Antiviralia zur Minderung der Infektion und Eingrenzung der Virusausbreitung dringend benötigt. Die heute eingesetzten Medikamente besitzen nur eine mäßige Wirksamkeit, welche durch das stetige Auftreten resistenter Viren maßgeblich reduziert wird. Die Entwicklung neuer antiviraler Strategien ist dadurch von besonderem Interesse.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptide (SALP) gegen Influenza A Viren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SALPs, insbesondere PEP 19-2.5 eine starke Bindungsaffinität zur *N*-Acetylneuraminsäure, dem zellulären Rezeptor der Influenzaviren, besitzen. Zusätzlich können SALPs direkt mit Influenzaviruspartikeln interagieren. Bedingt durch diese Interaktionen kommt es zu einer reduzierten Virusbindung an die Zielzelle und damit zur Reduktion der internalisierten Viruspartikel. Als Konsequenz der initialen Inhibition der Virusadsorption wird die Replikation von unterschiedlichen Influenzavirussubtypen (H7N7, H3N2 und pH1N1) signifikant inhibiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass SALP PEP 19-2.5 im Ko-Behandlungsansatz gegen eine sonst zu 100 % letal verlaufende H7N7 Influenza A Virusinfektion in der Maus vollständig schützt.

Damit bieten die SALPs eine gute Basis für die Entwicklung zukünftiger antiviraler Strategien gegen Influenzaviren. Insbesondere stellt das breite Spektrum der SALPs sowohl Bakterien als auch Viren zu inhibieren eine besonders vielversprechende zukünftige Therapiemöglichkeit dar, um Ko-Infektionen zu adressieren.

7 Summary

Influenza A viruses are a continuous threat to human health as illustrated by pandemics, epidemics as well as interspecies transmissions. The primary strategy to prevent influenza virus infection is vaccination. In case of a pandemic the production of new adjusted vaccines requires a certain time period of at least twenty weeks. Consequently, especially in the beginning of an influenza pandemic antiviral drugs are essential to control illness and transmission until an adequate vaccine becomes available. However, the emergence of resistant strains has limited the clinical use of many currently available antivirals. Therefore, the development of novel antiviral strategies is urgently needed.

The aim of this study was to investigate the inhibitory activity of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides (SALPs) against influenza A viruses.

In this study, SALPs, particularly PEP 19-2.5 show high binding affinities for the cellular influenza virus receptor molecule, *N*-Acetylneuraminic acid. Furthermore, SALPs interact with the influenza virus particles. These interactions lead to impaired viral attachment and cellular entry. As a result of impaired viral attachment, replication of several influenza virus subtypes (H7N7, H3N2 and pH1N1) is significantly reduced. Additionally, SALP PEP 19-2.5 is able to fully protect against an otherwise 100 % lethal H7N7 influenza virus infection in mice in a co-treatment approach.

Thus, SALPs provide an excellent basis for future drug development against lethal influenza virus infections. Especially, the broad-spectrum of SALPs to inhibit bacteria as well as viruses might provide a promising future strategy to combat viral and bacterial co-infections.

8 Literaturverzeichnis

Aktories, K., Förstermann, U., F.B., H. and K., S. (2009). Repetitorium allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier.

Amaro, R. E., Swift, R. V., Votapka, L., Li, W. W., Walker, R. C. and Bush, R. M. (2011). "Mechanism of 150-cavity formation in influenza neuraminidase." Nat Commun **2**: 388.

Ambrose, C. S., Levin, M. J. and Belshe, R. B. (2011). "The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults." Influenza Other Respir Viruses **5**(2): 67-75.

Andra, J., Garidel, P., Majerle, A., Jerala, R., Ridge, R., Paus, E., Novitsky, T., Koch, M. H. and Brandenburg, K. (2004a). "Biophysical characterization of the interaction of Limulus polyphemus endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide." Eur J Biochem **271**(10): 2037-46.

Andra, J., Howe, J., Garidel, P., Rossle, M., Richter, W., Leiva-Leon, J., Moriyon, I., Bartels, R., Gutsmann, T. and Brandenburg, K. (2007). "Mechanism of interaction of optimized Limulus-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis." Biochem J **406**(2): 297-307.

Andra, J., Koch, M. H., Bartels, R. and Brandenburg, K. (2004b). "Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1593-9.

Bang, F. B. (1956). "A bacterial disease of Limulus polyphemus." Bull Johns Hopkins Hosp **98**(5): 325-51.

Baranovich, T., Webster, R. G. and Govorkova, E. A. (2011). "Fitness of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses." Curr Opin Virol **1**(6): 574-81.

Bardiya, N. and Bae, J. H. (2005). "Influenza vaccines: recent advances in production technologies." Appl Microbiol Biotechnol **67**(3): 299-305.

Baudin, F., Bach, C., Cusack, S. and Ruigrok, R. W. (1994). "Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent." EMBO J **13**(13): 3158-65.

Beigel, J. and Bray, M. (2008). "Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza." Antiviral Res **78**(1): 91-102.

Beigel, J. H., Farrar, J., Han, A. M., Hayden, F. G., Hyer, R., de Jong, M. D., Lochindarat, S., Nguyen, T. K., Nguyen, T. H., Tran, T. H., Nicoll, A., Touch, S., Yuen, K. Y. and Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Human Influenza, A. H. (2005). "Avian influenza A (H5N1) infection in humans." N Engl J Med **353**(13): 1374-85.

Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M. and Hani, K. (2002). "In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1." J Med Virol **66**(2): 229-34.

Belser, J. A., Lu, X., Szretter, K. J., Jin, X., Aschenbrenner, L. M., Lee, A., Hawley, S., Kim do, H., Malakhov, M. P., Yu, M., Fang, F. and Katz, J. M. (2007). "DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection." J Infect Dis **196**(10): 1493-9.

Belshe, R. B., Edwards, K. M., Vesikari, T., Black, S. V., Walker, R. E., Hultquist, M., Kemble, G., Connor, E. M. and Group, C.-T. C. E. S. (2007). "Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children." N Engl J Med **356**(7): 685-96.

Bianchi, E., Liang, X., Ingallinella, P., Finotto, M., Chastain, M. A., Fan, J., Fu, T. M., Song, H. C., Horton, M. S., Freed, D. C., Manger, W., Wen, E., Shi, L., Ionescu, R., Price, C., Wenger, M., Emini, E. A., Cortese, R., Ciliberto, G., Shiver, J. W. and Pessi, A. (2005). "Universal influenza B vaccine based on the maturational cleavage site of the hemagglutinin precursor." J Virol **79**(12): 7380-8.

Birnkrant, D. and Cox, E. (2009). "The Emergency Use Authorization of peramivir for treatment of 2009 H1N1 influenza." N Engl J Med **361**(23): 2204-7.

Bouvier, N. M. and Lowen, A. C. (2010). "Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission." Viruses **2**: 1530-1563.

Bouvier, N. M. and Palese, P. (2008). "The biology of influenza viruses." Vaccine **26**: D49-D53.

Brandenburg, K., Andra, J., Garidel, P. and Gutsmann, T. (2011). "Peptide-based treatment of sepsis." Appl Microbiol Biotechnol **90**(3): 799-808.

Bright, R. A., Medina, M. J., Xu, X., Perez-Oronoz, G., Wallis, T. R., Davis, X. M., Povinelli, L., Cox, N. J. and Klimov, A. I. (2005). "Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern." Lancet **366**(9492): 1175-81.

Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. and Klimov, A. I. (2006). "Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States." JAMA **295**(8): 891-4.

Butt, K. M., Smith, G. J., Chen, H., Zhang, L. J., Leung, Y. H., Xu, K. M., Lim, W., Webster, R. G., Yuen, K. Y., Peiris, J. S. and Guan, Y. (2005). "Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003." J Clin Microbiol **43**(11): 5760-7.

Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A. and Rosenthal, P. B. (2010). "Structural organization of a filamentous influenza A virus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10685-90.

Cauchemez, S., Valleron, A. J., Boelle, P. Y., Flahault, A. and Ferguson, N. M. (2008). "Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data." Nature **452**(7188): 750-4.

CDC (2006). "http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5502a7.htm ".

CDC (2009). "http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5838a4.htm ".

CDC (abgerufen am 22.01.2014). "http://www.cdc.gov/flu/about/disease/high_risk.htm."

CDC (abgerufen am 25.01.2014a). "http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0814a1.htm."

CDC (abgerufen am 25.01.2014b). "http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5835a1.htm."

Cheng, G., Montero, A., Gastaminza, P., Whitten-Bauer, C., Wieland, S. F., Isogawa, M., Fredericksen, B., Selvarajah, S., Gallay, P. A., Ghadiri, M. R. and Chisari, F. V. (2008). "A virocidal amphipathic {alpha}-helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3088-93.

Chertow, D. S. and Memoli, M. J. (2013). "Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review." JAMA **309**(3): 275-82.

Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F. and Webster, R. G. (1998). "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." Lancet **351**(9101): 472-7.

Clercq, E. D. (2012). "Highlights in Antiviral Drug Research: Antivirals at the Horizon." Med Res Rev.

clinicaltrials (2010). "http://clinicaltrials.gov/."

Colman, P. M., Varghese, J. N. and Laver, W. G. (1983). "Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase." Nature **303**(5912): 41-4.

Compans, R. W., Content, J. and Duesberg, P. H. (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." J Virol **10**(4): 795-800.

Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G. and Paulson, J. C. (1994). "Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates." Virology **205**(1): 17-23.

Cros, J. F. and Palese, P. (2003). "Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses." Virus Res **95**(1-2): 3-12.

Cross, K. J., Burleigh, L. M. and Steinhauer, D. A. (2001). "Mechanisms of cell entry by influenza virus." Expert Rev Mol Med **3**(21): 1-18.

Dankesreiter, S., Hoess, A., Schneider-Mergener, J., Wagner, H. and Miethke, T. (2000). "Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock." J Immunol **164**(9): 4804-11.

Davies, W. L., Grunert, R. R., Haff, R. F., McGahen, J. W., Neumayer, E. M., Paulshock, M., Watts, J. C., Wood, T. R., Hermann, E. C. and Hoffmann, C. E. (1964). "Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine)." Science **144**(3620): 862-3.

Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., Cheng, P.-y., Bandaranayake, D., Breiman, R. F., Brooks, W. A., Buchy, P., Feikin, D. R., Fowler, K. B., Gordon, A., Hien, N. T., Horby, P., Huang, Q. S. and Katz, M. A. (2012). "Articles Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation : a modelling study." **3099**: 1-11.

Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., Xu, X., Bridges, C. B. and Uyeki, T. M. (2009). "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans." N Engl J Med **360**(25): 2605-15.

De Clercq, E. (2006). "Antiviral agents active against influenza A viruses." Nat Rev Drug Discov **5**(12): 1015-25.

de Jong, M. D., Tran, T. T., Truong, H. K., Vo, M. H., Smith, G. J., Nguyen, V. C., Bach, V. C., Phan, T. Q., Do, Q. H., Guan, Y., Peiris, J. S., Tran, T. H. and Farrar, J. (2005). "Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection." N Engl J Med **353**(25): 2667-72.

de Vries, E., de Vries, R. P., Wienholts, M. J., Floris, C. E., Jacobs, M. S., van den Heuvel, A., Rottier, P. J. and de Haan, C. A. (2012). "Influenza A virus entry into cells lacking sialylated N-glycans." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(19): 7457-62.

Deyde, V. M., Xu, X., Bright, R. A., Shaw, M., Smith, C. B., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva, L. V., Cox, N. J. and Klimov, A. I. (2007). "Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide." J Infect Dis **196**(2): 249-57.

Dharan, N. J., Gubareva, L. V., Meyer, J. J., Okomo-Adhiambo, M., McClinton, R. C., Marshall, S. A., St George, K., Epperson, S., Brammer, L., Klimov, A. I., Bresee, J. S. and Fry, A. M. (2009). "Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States." JAMA **301**(10): 1034-41.

Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. and Ruigrok, R. W. (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." Nature **458**(7240): 914-8.

Dorigatti, I., Cauchemez, S. and Ferguson, N. M. (2013). "Increased transmissibility explains the third wave of infection by the 2009 H1N1 pandemic virus in England." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(33): 13422-7.

Dowell, S. F. (2001). "Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases." Emerg Infect Dis **7**(3): 369-74.

Droebner, K., Pleschka, S., Ludwig, S. and Planz, O. "Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus in vitro and in vivo." Antiviral Res **92**(2): 195-203.

Edwards, C. M., Cohen, M. A. and Bloom, S. R. (1999). "Peptides as drugs." QJM **92**(1): 1-4.

ElSawy, K. M., Twarock, R., Verma, C. S. and Caves, L. S. (2012). "Peptide inhibitors of viral assembly: a novel route to broad-spectrum antivirals." J Chem Inf Model **52**(3): 770-6.

EMA (2013). "http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001101/WC500103709.pdf."

Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Baskouta, E., Rafailidis, P. I., Polyzos, K. and Rello, J. (2010). "Treatment options for 2009 H1N1 influenza: evaluation of the published evidence." Int J Antimicrob Agents **35**(5): 421-30.

Fiore, A. E., Fry, A., Shay, D., Gubareva, L., Bresee, J. S., Uyeki, T. M., Centers for Disease, C. and Prevention (2011). "Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)." MMWR Recomm Rep **60**(1): 1-24.

Flick, R. and Hobom, G. (1999). "Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation." J Gen Virol **80 (Pt 10)**: 2565-72.

Fodor, E. (2013). "The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication." Acta Virol **57**(2): 113-22.

Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P. and Brownlee, G. G. (2002). "A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs." J Virol **76**(18): 8989-9001.

Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., Van Doornum, G. J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M. and Osterhaus, A. D. (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1356-61.

Fox, J. L. (2007). "Antivirals become a broader enterprise." Nat Biotechnol **25**(12): 1395-402.

Fraser, C., Donnelly, C. A., Cauchemez, S., Hanage, W. P., Van Kerkhove, M. D., Hollingsworth, T. D., Griffin, J., Baggaley, R. F., Jenkins, H. E., Lyons, E. J., Jombart, T., Hinsley, W. R., Grassly, N. C., Balloux, F., Ghani, A. C., Ferguson, N. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C. M., Chapela, I. B., Zavala, E. P., Guevara, D. M., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S., Roth, C. and Collaboration, W. H. O. R. P. A. (2009). "Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings." Science **324**(5934): 1557-61.

Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D. F. and Barnard, D. L. (2013). "Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor." Antiviral Res **100**(2): 446-54.

Furuta, Y., Takahashi, K., Fukuda, Y., Kuno, M., Kamiyama, T., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., Minami, S., Watanabe, Y., Narita, H. and Shiraki, K. (2002). "In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 977-81.

Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-Maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H. and Shiraki, K. (2005). "Mechanism of action of T-705 against influenza virus." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 981-6.

Gabriel, G., Czudai-Matwich, V. and Klenk, H. D. (2013). "Adaptive mutations in the H5N1 polymerase complex." Virus Res **178**(1): 53-62.

Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H. D. and Stech, J. (2005). "The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18590-5.

Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Shmidt, T., Rother, F., Baumgarte, S., Keiner, B., Hartmann, E., Bader, M., Brownlee, G. G., Fodor, E. and Klenk, H.-D. (2011). "Differential use of importin-α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus." Nature communications **2**: 156.

Galdiero, S., Falanga, A., Tarallo, R., Russo, L., Galdiero, E., Cantisani, M., Morelli, G. and Galdiero, M. (2013). "Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections." J Pept Sci **19**(3): 148-58.

Gao, R., Cao, B., Hu, Y., Feng, Z., Wang, D., Hu, W., Chen, J., Jie, Z., Qiu, H., Xu, K., Xu, X., Lu, H., Zhu, W., Gao, Z., Xiang, N., Shen, Y., He, Z., Gu, Y., Zhang, Z., Yang, Y., Zhao, X., Zhou, L., Li, X., Zou, S., Zhang, Y., Yang, L., Guo, J., Dong, J., Li, Q., Dong, L., Zhu, Y., Bai, T., Wang, S., Hao, P., Yang, W., Han, J., Yu, H., Li, D., Gao, G. F., Wu, G., Wang, Y., Yuan, Z. and Shu, Y. (2013). "Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus." N Engl J Med **368**(20): 1888-97.

Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. a., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivailler, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. a. M., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., López-Gatell, H., Olivera, H., López, I., Myers, C. a., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. a., Clark, P. a., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I. and Cox, N. J. (2009). "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans." Science (New York, N.Y.) **325**: 197-201.

Genzel, Y., Rodig, J., Rapp, E. and Reichl, U. (2014). "Vaccine production: upstream processing with adherent or suspension cell lines." Methods Mol Biol **1104**: 371-93.

Gooskens, J., Jonges, M., Claas, E. C., Meijer, A., van den Broek, P. J. and Kroes, A. M. (2009). "Morbidity and mortality associated with nosocomial transmission of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus." JAMA **301**(10): 1042-6.

Govorkova, E. A. and McCullers, J. A. (2013). "Therapeutics against influenza." Curr Top Microbiol Immunol **370**: 273-300.

Graphpad (abgerufen am 10.12.2013). "http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD."

Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W., Ortin, J., Hart, D. J. and Cusack, S. (2008). "The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2." Nat Struct Mol Biol **15**(5): 500-6.

Guo, Y. J., Jin, F. G., Wang, P., Wang, M. and Zhu, J. M. (1983). "Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus." J Gen Virol **64 (Pt 1)**: 177-82.

Gutsmann, T., Razquin-Olazaran, I., Kowalski, I., Kaconis, Y., Howe, J., Bartels, R., Hornef, M., Schurholz, T., Rossle, M., Sanchez-Gomez, S., Moriyon, I., Martinez de Tejada, G. and Brandenburg, K. (2010). "New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3817-24.

Haller, O. and Kochs, G., Eds. (2001). Thogotovirus, Springer Verlag.

Halvorson, D., Karunakaran, D., Senne, D., Kelleher, C., Bailey, C., Abraham, A., Hinshaw, V. and Newman, J. (1983). "Epizootiology of avian influenza--simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota." Avian Dis **27**(1): 77-85.

Harter, G., Zimmermann, O., Maier, L., Schubert, A., Mertens, T., Kern, P. and Wohrle, J. (2010). "Intravenous zanamivir for patients with pneumonitis due to pandemic (H1N1) 2009 influenza virus." Clin Infect Dis **50**(9): 1249-51.

Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R. and Skehel, J. J. (1977). "Transcription of the influenza virus genome." Virology **83**(2): 337-55.

Hay, A. J. and Skehel, J. J. (1979). "Characterization of influenza virus RNA transcripts synthesized in vitro." J Gen Virol **44**(3): 599-608.

Hayase, Y. and Tobita, K. (1997). "Influenza virus and neurological diseases." Psychiatry Clin Neurosci **51**(4): 181-4.

Hayden, F. (2009). "Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold?" Clin Infect Dis **48 Suppl 1**: S3-13.

Hayden, F. G. and de Jong, M. D. (2011). "Emerging influenza antiviral resistance threats." J Infect Dis **203**(1): 6-10.

Hayden, F. G., Osterhaus, A. D., Treanor, J. J., Fleming, D. M., Aoki, F. Y., Nicholson, K. G., Bohnen, A. M., Hirst, H. M., Keene, O. and Wightman, K. (1997). "Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. GG167 Influenza Study Group." N Engl J Med **337**(13): 874-80.

Heinbockel, L., Sanchez-Gomez, S., Martinez de Tejada, G., Domming, S., Brandenburg, J., Kaconis, Y., Hornef, M., Dupont, A., Marwitz, S., Goldmann, T., Ernst, M., Gutsmann, T., Schurholz, T. and Brandenburg, K. (2013). "Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors." Antimicrob Agents Chemother **57**(3): 1480-7.

Helenius, A. (1992). "Unpacking the incoming influenza virus." Cell **69**(4): 577-8.

Herfst, S., Schrauwen, E. J., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V. J., Sorrell, E. M., Bestebroer, T. M., Burke, D. F., Smith, D. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. and Fouchier, R. A. (2012). "Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets." Science **336**(6088): 1534-41.

Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R. and Liddington, R. (1993). "Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5 A resolution." EMBO J **12**(9): 3351-6.

Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. and Webster, R. G. (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6108-13.

Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. and Perez, D. R. (2001). "Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses." Arch Virol **146**(12): 2275-89.

Hoke, C. H., Jr., Hopkins, J. A., Meiklejohn, G. and Mostow, S. R. (1979). "Comparison of sevral wild-type influenza viruses in the ferret tracheal organ culture system." Rev Infect Dis **1**(6): 946-54.

Honda, T., Kubo, S., Masuda, T., Arai, M., Kobayashi, Y. and Yamashita, M. (2009). "Synthesis and in vivo influenza virus-inhibitory effect of ester prodrug of 4-guanidino-7-O-methyl-Neu5Ac2en." Bioorg Med Chem Lett **19**(11): 2938-40.

Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2005). "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents." Nat Rev Microbiol **3**(8): 591-600.

Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. and Palese, P. (1987). "Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(22): 8140-4.

Hurt, A. C., Hardie, K., Wilson, N. J., Deng, Y. M., Osbourn, M., Gehrig, N. and Kelso, A. (2011). "Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza." N Engl J Med **365**(26): 2541-2.

Huther, A. and Dietrich, U. (2007). "The emergence of peptides as therapeutic drugs for the inhibition of HIV-1." AIDS Rev **9**(4): 208-17.

Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E. A., Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2012). "Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets." Nature **486**(7403): 420-8.

Interpharma. (abgerufen am 06.02.2014). from http://www.interpharma.ch/sites/default/files/images/articles/300dpi/61_interpharma _pms_d_13.png.

Ishizuka, H., Yoshiba, S., Okabe, H. and Yoshihara, K. (2010). "Clinical pharmacokinetics of laninamivir, a novel long-acting neuraminidase inhibitor, after single and multiple inhaled doses of its prodrug, CS-8958, in healthy male volunteers." J Clin Pharmacol **50**(11): 1319-29.

Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. and Kawaoka, Y. (1998). "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential." J Virol **72**(9): 7367-73.

Ives, J. A., Carr, J. A., Mendel, D. B., Tai, C. Y., Lambkin, R., Kelly, L., Oxford, J. S., Hayden, F. G. and Roberts, N. A. (2002). "The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo." Antiviral Res **55**(2): 307-17.

Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A., Bell, G. L., Dalton, R. M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J. F., Firth, A. E., Taubenberger, J. K. and Digard, P. (2012). "An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response." Science **337**(6091): 199-204.

Jennings, P. A., Finch, J. T., Winter, G. and Robertson, J. S. (1983). "Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA?" Cell **34**(2): 619-27.

Johnson, N. P. and Mueller, J. (2002). "Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic." Bull Hist Med **76**(1): 105-15.

Jones, J. C., Settles, E. W., Brandt, C. R. and Schultz-Cherry, S. (2011). "Identification of the minimal active sequence of an anti-influenza virus peptide." Antimicrob Agents Chemother **55**(4): 1810-3.

Kaconis, Y., Kowalski, I., Howe, J., Brauser, A., Richter, W., Razquin-Olazaran, I., Inigo-Pestana, M., Garidel, P., Rossle, M., Martinez de Tejada, G., Gutsmann, T. and Brandenburg, K. (2011). "Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides." Biophys J **100**(11): 2652-61.

Kang, S. M., Song, J. M. and Compans, R. W. (2011). "Novel vaccines against influenza viruses." Virus Res **162**(1-2): 31-8.

Kates, M., Allison, A. C., Tyrell, D. A. and James, A. T. (1962). "Origin of lipids in influenza virus." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **27**: 293-301.

Kawaoka, Y., Krauss, S. and Webster, R. G. (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." J Virol **63**(11): 4603-8.

Kilbourne, E. D. (2006). "Influenza pandemics of the 20th century." Emerg Infect Dis **12**(1): 9-14.

Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Mathews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M. and Saag, M. S. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nature Medicine **4**(11): 1302-1307.

Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M. S., Mendel, D. B., Tai, C. Y., Laver, W. G. and Stevens, R. C. (1997). "Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity." J Am Chem Soc **119**(4): 681-90.

Kim, D. H., Ni, Y., Lee, S. H., Urban, S. and Han, K. H. (2008). "An anti-viral peptide derived from the preS1 surface protein of hepatitis B virus." BMB Rep **41**(9): 640-4.

Kiso, M., Kubo, S., Ozawa, M., Le, Q. M., Nidom, C. A., Yamashita, M. and Kawaoka, Y. (2010a). "Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses." PLoS Pathog **6**(2): e1000786.

Kiso, M., Takahashi, K., Sakai-Tagawa, Y., Shinya, K., Sakabe, S., Le, Q. M., Ozawa, M., Furuta, Y. and Kawaoka, Y. (2010b). "T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 882-7.

Klenk, H. D., Garten, W. and Matrosovich, M. (2011). "Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic." Bioessays.

Klenk, H. D., Matrosovich, M. N. and Stech, J., Eds. (2008). Avian Influenza, S. Karger AG.

Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. and Blodorn, J. (1975). "Activation of influenza A viruses by trypsin treatment." Virology **68**(2): 426-39.

Klumpp, K., Ruigrok, R. W. and Baudin, F. (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." EMBO J **16**(6): 1248-57.

Knipe, D. M. and Howley, P. M., Eds. (2006). Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Kochs, G., Koerner, I., Thiel, L., Kothlow, S., Kaspers, B., Ruggli, N., Summerfield, A., Pavlovic, J., Stech, J. and Staeheli, P. (2007). "Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens." J Gen Virol **88**(Pt 5): 1403-9.

Kong, L. K. and Zhou, B. P. (2006). "Successful treatment of avian influenza with convalescent plasma." Hong Kong Med J **12**(6): 489.

Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A. and Bosman, A. (2004). "Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands." Lancet **363**(9409): 587-93.

Kowalski, I., Kaconis, Y., Andra, J., Razquin-Olazaran, I., Gutsmann, T., Martinez de Tejada, G. and Brandenburg, K. (2010). "Physicochemical and biological characterization of anti-endotoxin peptides and their influence on lipid properties." Protein Pept Lett **17**(11): 1328-33.

Koyama, K., Takahashi, M., Oitate, M., Nakai, N., Takakusa, H., Miura, S. and Okazaki, O. (2009). "CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a favorable long-retention profile in the mouse respiratory tract." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4845-51.

Krepstakies, M., Lucifora, J., Nagel, C. H., Zeisel, M. B., Holstermann, B., Hohenberg, H., Kowalski, I., Gutsmann, T., Baumert, T. F., Brandenburg, K., Hauber, J. and Protzer, U. (2012). "A new class of synthetic peptide inhibitors blocks attachment and entry of human pathogenic viruses." J Infect Dis **205**(11): 1654-64.

Krug, R. M., St Angelo, C., Broni, B. and Shapiro, G. (1987). "Transcription and replication of influenza virion RNA in the nucleus of infected cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **52**: 353-8.

Kubo, S., Kakuta, M. and Yamashita, M. (2010). "[In vitro and in vivo effects of a long-acting anti-influenza agent CS-8958 (laninamivir octanoate, Inavir) against pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses]." Jpn J Antibiot **63**(5): 337-46.

Kumar, A., Zarychanski, R., Pinto, R., Cook, D. J., Marshall, J., Lacroix, J., Stelfox, T., Bagshaw, S., Choong, K., Lamontagne, F., Turgeon, A. F., Lapinsky, S., Ahern, S. P., Smith, O., Siddiqui, F., Jouvet, P., Khwaja, K., McIntyre, L., Menon, K., Hutchison, J., Hornstein, D., Joffe, A., Lauzier, F., Singh, J., Karachi, T., Wiebe, K., Olafson, K., Ramsey, C., Sharma, S., Dodek, P., Meade, M., Hall, R., Fowler, R. A. and Canadian Critical Care Trials Group, H. N. C. (2009). "Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada." JAMA **302**(17): 1872-9.

Kumar, P., Sood, V., Vyas, R., Gupta, N., Banerjea, A. C. and Khanna, M. (2010). "Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozyme constructs." Antiviral Res **87**(2): 204-12.

Kumari, K., Gulati, S., Smith, D. F., Gulati, U., Cummings, R. D. and Air, G. M. (2007). "Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses." Virol J **4**: 42.

Kurtz, J., Manvell, R. J. and Banks, J. (1996). "Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis." Lancet **348**(9031): 901-2.

Lamb, R. A. and Choppin, P. W. (1983). "The gene structure and replication of influenza virus." Annu Rev Biochem **52**: 467-506.

Le, Q. M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y. T., Nguyen, T. H., Nguyen, K. H., Pham, N. D., Ngyen, H. H., Yamada, S., Muramoto, Y., Horimoto, T., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Kawaoka, Y. (2005). "Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus." Nature **437**(7062): 1108.

Levin, J. (1987). "The Limulus amebocyte lysate test: perspectives and problems." Prog Clin Biol Res **231**: 1-23.

Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Estoepangestie, A. T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N. T., Webby, R. J., Poon, L. L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G. and Peiris, J. S. (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." Nature **430**(6996): 209-13.

Li, Q., Zhou, L., Zhou, M., Chen, Z., Li, F., Wu, H., Xiang, N., Chen, E., Tang, F., Wang, D., Meng, L., Hong, Z., Tu, W., Cao, Y., Li, L., Ding, F., Liu, B., Wang, M., Xie, R., Gao, R., Li, X., Bai, T., Zou, S., He, J., Hu, J., Xu, Y., Chai, C., Wang, S., Gao, Y., Jin, L., Zhang, Y., Luo, H., Yu, H., Gao, L., Pang, X., Liu, G., Shu, Y., Yang, W., Uyeki, T. M., Wang, Y., Wu, F. and Feng, Z. (2013). "Preliminary Report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) Outbreak in China." N Engl J Med.

Li, S. Q., Orlich, M. and Rott, R. (1990). "Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes." J Virol **64**(7): 3297-303.

Li, X. and Palese, P. (1994). "Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA." J Virol **68**(2): 1245-9.

Liu, Z., Guo, Z., Wang, G., Zhang, D., He, H., Li, G., Liu, Y., Higgins, D., Walsh, A., Shanahan-Prendergast, L. and Lu, J. (2009). "Evaluation of the efficacy and safety of a statin/caffeine combination against H5N1, H3N2 and H1N1 virus infection in BALB/c mice." Eur J Pharm Sci **38**(3): 215-23.

Luke, T. C., Kilbane, E. M., Jackson, J. L. and Hoffman, S. L. (2006). "Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment?" Ann Intern Med **145**(8): 599-609.

Ma, W., Kahn, R. E. and Richt, J. A. (2008). "The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications." J Mol Genet Med **3**(1): 158-66.

Maassab, H. F., Heilman, C. A. and Herlocher, M. L. (1990). "Cold-adapted influenza viruses for use as live vaccines for man." Adv Biotechnol Processes **14**: 203-42.

Malakhov, M. P., Aschenbrenner, L. M., Smee, D. F., Wandersee, M. K., Sidwell, R. W., Gubareva, L. V., Mishin, V. P., Hayden, F. G., Kim, D. H., Ing, A., Campbell, E. R., Yu, M. and Fang, F. (2006). "Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1470-9.

Marazzi, I., Ho, J. S., Kim, J., Manicassamy, B., Dewell, S., Albrecht, R. A., Seibert, C. W., Schaefer, U., Jeffrey, K. L., Prinjha, R. K., Lee, K., Garcia-Sastre, A., Roeder, R. G. and Tarakhovsky, A. (2012). "Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic." Nature **483**(7390): 428-33.

Martin, K. and Helenius, A. (1991). "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus." J Virol **65**(1): 232-44.

Martinez de Tejada, G., Sanchez-Gomez, S., Razquin-Olazaran, I., Kowalski, I., Kaconis, Y., Heinbockel, L., Andra, J., Schurholz, T., Hornef, M., Dupont, A., Garidel, P., Lohner, K., Gutsmann, T., David, S. A. and Brandenburg, K. (2012). "Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines." Curr Drug Targets **13**(9): 1121-30.

Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K. (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." J Cell Biol **91**(3 Pt 1): 601-13.

Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W. and Klenk, H. D. (2006). "New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays." Virol J **3**: 63.

Matrosovich, M., Stech, J. and Klenk, H. D. (2009). "Influenza receptors, polymerase and host range." Rev Sci Tech **28**(1): 203-17.

Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. and Klenk, H. D. (2004). "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4620-4.

Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. and Bolognesi, D. (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 215-25.

Medeiros, R., Escriou, N., Naffakh, N., Manuguerra, J. C. and van der Werf, S. (2001). "Hemagglutinin residues of recent human A(H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes." Virology **289**(1): 74-85.

Meerhoff, T. J., Meijer, A., Paget, W. J. and Eiss (2004). "Methods for sentinel virological surveillance of influenza in Europe - an 18-country survey." Euro Surveill **9**(1): 34-8.

Memoli, M. J., Hrabal, R. J., Hassantoufighi, A., Eichelberger, M. C. and Taubenberger, J. K. (2010). "Rapid selection of oseltamivir- and peramivir-resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts." Clin Infect Dis **50**(9): 1252-5.

Metersky, M. L., Masterton, R. G., Lode, H., File, T. M., Jr. and Babinchak, T. (2012). "Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza." Int J Infect Dis **16**(5): e321-31.

Miller, D. S., Finnie, J., Bowden, T. R., Scholz, A. C., Oh, S., Kok, T., Burrell, C. J., Trinidad, L., Boyle, D. B. and Li, P. (2011). "Preclinical efficacy studies of influenza A haemagglutinin precursor cleavage loop peptides as a potential vaccine." J Gen Virol **92**(Pt 5): 1152-61.

Modrow, S., Falke, D. and Truyen, U., Eds. (2003). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag.

Morens, D. M., Taubenberger, J. K. and Fauci, A. S. (2008). "Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness." J Infect Dis **198**(7): 962-70.

Moscona, A. (2005). "Neuraminidase inhibitors for influenza." N Engl J Med **353**(13): 1363-73.

Moscona, A. (2009). "Global transmission of oseltamivir-resistant influenza." N Engl J Med **360**(10): 953-6.
Moss, R. B., Davey, R. T., Steigbigel, R. T. and Fang, F. (2010). "Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance." J Antimicrob Chemother **65**(6): 1086-93.
MSD-Tiergesundheit (abgerufen am 14.02.2014). "http://www.msd-tiergesundheit.de/."
Mummert, A., Weiss, H., Long, L. P., Amigo, J. M. and Wan, X. F. (2013). "A perspective on multiple waves of influenza pandemics." PLoS One **8**(4): e60343.
Murphy, B. R. and Coelingh, K. (2002). "Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines." Viral Immunol **15**(2): 295-323.
Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M. A. and van der Werf, S. (2008). "Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins." Annu Rev Microbiol **62**: 403-24.
Naficy, K. (1963). "Human Influenza Infection with Proved Viremia. Report of a Case." N Engl J Med **269**: 964-6.
Nakajima, K., Desselberger, U. and Palese, P. (1978). "Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950." Nature **274**(5669): 334-9.
Nayak, D. P., Hui, E. K. and Barman, S. (2004). "Assembly and budding of influenza virus." Virus Res **106**(2): 147-65.
Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. and Kawaoka, Y. (2004). "Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation." Curr Top Microbiol Immunol **283**: 121-43.
Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." Nature **459**(7249): 931-9.
Nicholls, J. M., Lai, J. and Garcia, J. M. (2012). Investigating the Interaction Between Influenza and Sialic Acid: Making and Breaking the Link. Influenza Virus Sialidase - A Drug Discovery Target. M. von Itzstein**:** 31 - 45.
Nicholls, J. M., Moss, R. B. and Haslam, S. M. (2013). "The use of sialidase therapy for respiratory viral infections." Antiviral Research **98**(3): 401-409.
Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M. and Fouchier, R. A. (2000). "Influenza B virus in seals." Science **288**(5468): 1051-3.
Otte, A. and Gabriel, G. (2011). "2009 pandemic H1N1 influenza A virus strains display differential pathogenicity in C57BL/6J but not BALB/c mice." Virulence **2**: 563-6.
Oxford, J. S. and Galbraith, A. (1980). "Antiviral activity of amantadine: a review of laboratory and clinical data." Pharmacol Ther **11**(1): 181-262.
Palese, P. and Compans, R. W. (1976). "Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action." J Gen Virol **33**(1): 159-63.
Palese, P., Schulman, J. L., Bodo, G. and Meindl, P. (1974a). "Inhibition of influenza and parainfluenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA)." Virology **59**(2): 490-8.
Palese, P. and Shaw, M. L. (2007). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology Fifth Edition**:** 1647 - 1689.
Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. and Compans, R. W. (1974b). "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase." Virology **61**(2): 397-410.
PEI (2010). "http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/bundesgesundheitsblatt/2010/2010-pandemieimpfstoffe.pdf?__blob=publicationFile&v=1."
PEI (abgerufen am 23.01.2014). "http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/influenza-grippe-node.html."
Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L., Lai, R. W., Orr, W. K. and Shortridge, K. F. (1999). "Human infection with influenza H9N2." Lancet **354**(9182): 916-7.
Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. and Krug, R. M. (1981). "A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." Cell **23**(3): 847-58.
Poland, G. A., Jacobson, R. M. and Ovsyannikova, I. G. (2009). "Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use." Clin Infect Dis **48**(9): 1254-6.
Potter, C. W. (2001). "A history of influenza." J Appl Microbiol **91**(4): 572-9.
Presti, R. M., Zhao, G., Beatty, W. L., Mihindukulasuriya, K. A., da Rosa, A. P., Popov, V. L., Tesh, R. B., Virgin, H. W. and Wang, D. (2009). "Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae." J Virol **83**(22): 11599-606.
Rajik, M., Jahanshiri, F., Omar, A. R., Ideris, A., Hassan, S. S. and Yusoff, K. (2009). "Identification and characterisation of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2." Virol J **6**: 74.
Reed, L. H. and Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints." American Journal of Hygiene **27**: 493-97.
Reid, A. H., Taubenberger, J. K. and Fanning, T. G. (2004). "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus." Nat Rev Microbiol **2**(11): 909-14.
Resa-Infante, P. and Gabriel, G. (2013). "The nuclear import machinery is a determinant of influenza virus host adaptation." Bioessays **35**(1): 23-7.
Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R. and Ortín, J. (2011). "The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function." RNA Biol **8**(2): 207-15.
Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellnhofer, G., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J. and Hoess, A. (1996). "High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor." J Biol Chem **271**(45): 28120-7.
RKI (2013). "http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/36_37_13.pdf?__blob=publicationFile."
RKI (abgerufen am 23.01.2014). "http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Influenza/faq_ges.html?nn=2370434."
RKI (abgerufen am 25.01.2014). "http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html#doc2382022bodyText2."
Roberts, P. C. and Compans, R. W. (1998). "Host cell dependence of viral morphology." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5746-51.
Roberts, P. C., Lamb, R. A. and Compans, R. W. (1998). "The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation." Virology **240**(1): 127-37.
Robinson, W. E., Jr., McDougall, B., Tran, D. and Selsted, M. E. (1998). "Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils." J Leukoc Biol **63**(1): 94-100.
Rossman, J. S. and Lamb, R. A. (2011). "Influenza virus assembly and budding." Virology **411**(2): 229-36.
Ruigrok, R. W., Crepin, T., Hart, D. J. and Cusack, S. (2010). "Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery." Curr Opin Struct Biol **20**(1): 104-13.

Salah, B., Dinh Xuan, A. T., Fouilladieu, J. L., Lockhart, A. and Regnard, J. (1988). "Nasal mucociliary transport in healthy subjects is slower when breathing dry air." Eur Respir J **1**(9): 852-5.
Sambrook, J. a. D. R., Eds. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Schäfer, W. (1955). "Sero-immunologic studies on incomplete forms of the virus of classical fowl plague. (In German.)." Arch. Exp. Vet. Med. **9**: 218-230.
Scheiblauer, H., Kendal, A. P. and Rott, R. (1995). "Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species." Arch Virol **140**(2): 341-8.
Schnell, J. R. and Chou, J. J. (2008). "Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus." Nature **451**(7178): 591-5.
Scholtissek, C. (1990). "Pigs as mixing-vessels for the creation of new pandemic influenza A viruses." Medical Principles and Practice **2**: 65 - 71.
Scholtissek, C., Burger, H., Bachmann, P. A. and Hannoun, C. (1983). "Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds." Virology **129**(2): 521-3.
Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. and Rott, R. (1978). "On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2." Virology **87**(1): 13-20.
Schuerholz, T., Brandenburg, K. and Marx, G. (2012). "Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis." Crit Care **16**(2): 207.
Schuerholz, T., Doemming, S., Hornef, M., Martin, L., Simon, T. P., Heinbockel, L., Brandenburg, K. and Marx, G. (2013). "The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study." Crit Care **17**(1): R3.
Shaman, J. and Kohn, M. (2009). "Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3243-8.
Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. and Kawaoka, Y. (2006). "Avian flu: influenza virus receptors in the human airway." Nature **440**: 435-6.
Shope, R. E. (1931). "The Etiology of Swine Influenza." Science **73**(1886): 214-5.
Sidwell, R. W., Barnard, D. L., Day, C. W., Smee, D. F., Bailey, K. W., Wong, M. H., Morrey, J. D. and Furuta, Y. (2007). "Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 845-51.
Sieben, C., Kappel, C., Zhu, R., Wozniak, A., Rankl, C., Hinterdorfer, P., Grubmuller, H. and Herrmann, A. (2012). "Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(34): 13626-31.
Simonsen, L., Clarke, M. J., Schonberger, L. B., Arden, N. H., Cox, N. J. and Fukuda, K. (1998). "Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution." J Infect Dis **178**(1): 53-60.
Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (2000). "R ECEPTOR B INDING AND M EMBRANE F USION IN V IRUS E NTRY : The Influenza Hemagglutinin." Structure.
Sleeman, K., Mishin, V. P., Deyde, V. M., Furuta, Y., Klimov, A. I. and Gubareva, L. V. (2010). "In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses." Antimicrob Agents Chemother **54**(6): 2517-24.
Smee, D. F., Hurst, B. L., Wong, M. H., Bailey, K. W., Tarbet, E. B., Morrey, J. D. and Furuta, Y. (2010). "Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 126-33.
Smith, W., Andrewes, C. and Laidlaw, P. (1933). "A virus obtained from influenza patients." Lancet **222**(5732): 66 - 68.
Stegmann, T. (2000). "Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion." Traffic **1**(8): 598-604.
Steinhauer, D. A. (1999). "Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus." Virology **258**(1): 1-20.
Stephenson, I. and Nicholson, K. G. (2001). "Influenza: vaccination and treatment." Eur Respir J **17**(6): 1282-93.
Stevens, J., Blixt, O., Paulson, J. C. and Wilson, I. A. (2006). "Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses." Nat Rev Microbiol **4**(11): 857-64.
Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. and Garten, W. (1992). "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." EMBO J **11**(7): 2407-14.
Stouffer, A. L., Acharya, R., Salom, D., Levine, A. S., Di Costanzo, L., Soto, C. S., Tereshko, V., Nanda, V., Stayrook, S. and DeGrado, W. F. (2008). "Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel." Nature **451**(7178): 596-9.
Subbarao, K. and Katz, J. (2000). "Avian influenza viruses infecting humans." Cell Mol Life Sci **57**(12): 1770-84.
Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." Science **279**(5349): 393-6.
Sugaya, N. and Ohashi, Y. (2010). "Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate (CS-8958) versus oseltamivir as treatment for children with influenza virus infection." Antimicrob Agents Chemother **54**(6): 2575-82.
Takahashi, K., Furuta, Y., Fukuda, Y., Kuno, M., Kamiyama, T., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., Minami, S. and Shiraki, K. (2003). "In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus." Antivir Chem Chemother **14**(5): 235-41.
Takano, R., Kiso, M., Igarashi, M., Le, Q. M., Sekijima, M., Ito, K., Takada, A. and Kawaoka, Y. (2013). "Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses." J Infect Dis **207**(1): 89-97.
Tan, C. W., Chan, Y. F., Sim, K. M., Tan, E. L. and Poh, C. L. (2012). "Inhibition of enterovirus 71 (EV-71) infections by a novel antiviral peptide derived from EV-71 capsid protein VP1." PLoS One **7**(5): e34589.
Taubenberger, J. K. and Morens, D. M. (2006). "1918 Influenza: the mother of all pandemics." Emerg Infect Dis **12**(1): 15-22.
To, K. K., Tsang, A. K., Chan, J. F., Cheng, V. C., Chen, H. and Yuen, K. Y. (2014). "Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8) - Cause for concern?" J Infect.
Tong, S., Li, Y., Rivailler, P., Conrardy, C., Castillo, D. A., Chen, L. M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K. A., Cox, N. J., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E. and Donis, R. O. (2012). "A distinct lineage of influenza A virus from bats." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(11): 4269-74.
Treanor, J. J., Hayden, F. G., Vrooman, P. S., Barbarash, R., Bettis, R., Riff, D., Singh, S., Kinnersley, N., Ward, P. and Mills, R. G. (2000). "Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group." JAMA **283**(8): 1016-24.

Tree, J. A., Richardson, C., Fooks, A. R., Clegg, J. C. and Looby, D. (2001). "Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains." Vaccine **19**(25-26): 3444-50.

Triana-Baltzer, G. B., Gubareva, L. V., Klimov, A. I., Wurtman, D. F., Moss, R. B., Hedlund, M., Larson, J. L., Belshe, R. B. and Fang, F. (2009a). "Inhibition of neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus by DAS181, a novel sialidase fusion protein." PLoS One **4**(11): e7838.

Triana-Baltzer, G. B., Gubareva, L. V., Nicholls, J. M., Pearce, M. B., Mishin, V. P., Belser, J. A., Chen, L. M., Chan, R. W., Chan, M. C., Hedlund, M., Larson, J. L., Moss, R. B., Katz, J. M., Tumpey, T. M. and Fang, F. (2009b). "Novel pandemic influenza A(H1N1) viruses are potently inhibited by DAS181, a sialidase fusion protein." PLoS One **4**(11): e7788.

Tweed, S. A., Skowronski, D. M., David, S. T., Larder, A., Petric, M., Lees, W., Li, Y., Katz, J., Krajden, M., Tellier, R., Halpert, C., Hirst, M., Astell, C., Lawrence, D. and Mak, A. (2004). "Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia." Emerg Infect Dis **10**(12): 2196-9.

Vaillant, L., La Ruche, G., Tarantola, A., Barboza, P. and epidemic intelligence team at In, V. S. (2009). "Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009." Euro Surveill **14**(33).

von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W. and et al. (1993). "Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication." Nature **363**(6428): 418-23.

Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. H. and Lamb, R. A. (1993). "Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block." J Virol **67**(9): 5585-94.

Wang, T. T., Tan, G. S., Hai, R., Pica, N., Ngai, L., Ekiert, D. C., Wilson, I. A., Garcia-Sastre, A., Moran, T. M. and Palese, P. (2010a). "Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(44): 18979-84.

Wang, T. T., Tan, G. S., Hai, R., Pica, N., Petersen, E., Moran, T. M. and Palese, P. (2010b). "Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins." PLoS Pathog **6**(2): e1000796.

Wareing, M. D. and Tannock, G. A. (2001). "Live attenuated vaccines against influenza; an historical review." Vaccine **19**(25-26): 3320-30.

Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. and Kawaoka, Y. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." Microbiol Rev **56**(1): 152-79.

Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Van Wyke, K. L., Geraci, J. R., St Aubin, D. J. and Petursson, G. (1981). "Characterization of an influenza A virus from seals." Virology **113**(2): 712-24.

Webster, R. G. and Rott, R. (1987). "Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin." Cell **50**(5): 665-6.

WHO (2009). "http://www.who.int/influenza/resources/documents/H1N1webupdate20090318_ed_ns.pdf?ua=1."

WHO (2010). "http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html."

WHO (2012a). "http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_avian_influenza_update200412.pdf?ua=1."

WHO (2012b). http://www.who.int/wer/2012/wer8739.pdf?ua=1.

WHO (2013a). "http://www.who.int/influenza/GIP_InfluenzaVirusInfectionsHumans_Jul13.pdf."

WHO (2013b). "http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20131210CumulativeNumberH5N1cases.pdf."

WHO (2013c). "http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/10u_ReportWebH7N9Number.pdf."

WHO (2013d). "http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201302_h5h7h9_vaccinevirusupdate.pdf."

WHO (2013e). http://www.who.int/wer/2013/wer8841.pdf?ua=1.

WHO (2014a). "http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/RiskAssessment_H7N9_21Jan14.pdf?ua=1."

WHO (2014b). "http://www.who.int/wer/2014/wer8904_05.pdf?ua=1."

WHO (abgerufen am 22.01.2014a). "http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1_research/en/index.html."

WHO (abgerufen am 22.01.2014b). "http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/."

WHO (abgerufen am 23.01.2014). "http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/index.html."

Wilschut, J. C., Elhaney, J. R. and Palache, A. M. (2006). Influenza, Elsevier.

Wingfield, W. L., Pollack, D. and Grunert, R. R. (1969). "Therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 respiratory illness in man." N Engl J Med **281**(11): 579-84.

Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. and Digard, P. (2009). "A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA." J Virol **83**(16): 8021-31.

Wright, P. F., Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2007). Orthomyxoviruses. Fields Virology Fifth Edition**:** 1691 - 1740.

Wu, F., Yuan, X. Y., Huang, W. S. and Chen, Y. H. (2009a). "Heterosubtypic protection conferred by combined vaccination with M2e peptide and split influenza vaccine." Vaccine **27**(43): 6095-101.

Wu, F., Yuan, X. Y., Li, J. and Chen, Y. H. (2009b). "The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine." Vaccine **27**(32): 4320-4.

Wunderlich, K., Juozapaitis, M., Ranadheera, C., Kessler, U., Martin, A., Eisel, J., Beutling, U., Frank, R. and Schwemmle, M. (2011). "Identification of High-Affinity PB1-Derived Peptides with Enhanced Affinity to the PA Protein of Influenza A Virus Polymerase." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**(2): 696-702.

Yamashita, M., Tomozawa, T., Kakuta, M., Tokumitsu, A., Nasu, H. and Kubo, S. (2009). "CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity." Antimicrob Agents Chemother **53**(1): 186-92.

York, A., Hengrung, N., Vreede, F. T., Huiskonen, J. T. and Fodor, E. (2013). "Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(45): E4238-45.

Yuan, J., Zhang, L., Kan, X., Jiang, L., Yang, J., Guo, Z. and Ren, Q. (2013). "Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A(H6N1) virus causing human infection in Taiwan." Clin Infect Dis **57**(9): 1367-8.

Zebedee, S. L. and Lamb, R. A. (1988). "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions." J Virol **62**(8): 2762-72.

Zheng, W. and Tao, Y. J. (2013). "Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex." FEBS Lett **587**(8): 1206-14.

Zhou, B., Zhong, N. and Guan, Y. (2007). "Treatment with convalescent plasma for influenza A (H5N1) infection." N Engl J Med **357**(14): 1450-1.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den IUPAC-Regeln und international verbindlichen Normen.

Abb.	Abbildung
Ad	an/zu
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	akutes respiratorisches Distress-Syndrom
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
BSL	Biologische Schutzstufe (*biosafety level*)
C-	Carboxyterminal/Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*copy* DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cRNA	*copy* RNA/ *complementary* RNA
cRNP	*complementary* Ribonukleoprotein
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/dsDNA	Desoxyribonukleinsäure/doppelsträngige DNA
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
d	Tag (*day*)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
F	Phenylalanin
FCS	Fötales Kälberserum
FFPE	formalinfixiert & paraffineingebettet
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
x g	Erdbeschleunigung (Angabe zur Zentrifugationsstärke)
h	Stunde
H_2O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HAU	Hamagglutinationseinheit (*hemagglutination unit*)

HA-Test	Hämagglutinationstest
HBV	Hepatitis-B Virus
HCV	Hepatitis-C Virus
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein
HIV	Human Immundefizienz-Virus
HPAIV	hochpathogenes aviäres Influenza A Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*)
HSV	Herpes-simplex-Virus
Hz	Hertz
IFN	Interferone
IL	Interleukine
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
K	Lysinen
kb	Kilobasenpaar (1000 Basenpaare)
kDA	Kilodalton
l	Liter
LAL	*Limulus* Amöbozyten Lysat
LALF	*Limulus* Anti-LPS Faktor
LF-2000	Lipofectamine 2000
log	Logarithmus
LPAIV	niedrig pathogenes aviäres Influenza A Virus
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M1/2	Matrixprotein 1/2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MLD_{50}	Maus-letale Dosis 50
mRNA	*messenger* RNA
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*)
N-	Aminoterminal/Amino-Terminus
NA	Neuraminidase
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na_2SO_4	Natriumsulfatlösung
NEP	Nuklear Export Protein
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein

OD_{λ}	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
ORF	offener Leserahmen (*open reading frame*)
PA	polymerase acidic protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Rho	Rhodamin
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pH1N1	pandemisches H1N1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pfu/ml	plaquebildende Einheiten pro ml (*plaque-forming units/ml*),
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
p.i.	nach Infektion (*post infection*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Argininen
RdRP	RNA-abhängigen RNA-Polymerase (*RNA dependent RNA polymerase*)
Rh	relativen Luftfeuchtigkeit (*relative humidity*)
RLU	Relative Lichteinheiten (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SALP	synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptiden
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
siRNA	*small-interfering* RNA
SPF	spezifiziert pathogenfrei (*specific pathogen-free*)
ssRNA	einzelsträngigen RNA (*single stranded RNA*)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transfektion
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (*toll-like receptor*)
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
W	Tryptophan

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die Gattungen der Familie der *Orthomyxoviridae* und ihr Wirtsspektrum 1

Tab. 2: Die Genomsegmente der Influenza A Viren und die Funktion ihrer kodierten viralen Proteine 5

Tab. 3: Neue Inhibitoren gegen Influenza A Viren in der klinischen Entwicklungsphase 28

Tab. 4: Die Aminosäuresequenz der SALPs, PEP 19-2.5, PEP 19-4, PEP 19-8D und PEP 19-CP 49

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie und Aufbau von Influenza A Viren 3

Abb. 2: Replikationszyklus der Influenza A Viren 7

Abb. 3: Replikation und Transkription von Influenza A Viren..... 10

Abb. 4: Influenza-Pandemien 17

Abb. 5: Antiviralia gegen Influenza A Viren 24

Abb. 6: Strukturen der M2-Inhibitoren..... 25

Abb. 7: Strukturen der NA-Inhibitoren..... 27

Abb. 8: Bindung der SALPs an den zellulären Rezeptor der *N*-Acetylneuraminsäure 76

Abb. 9: H7N7-, H3N2- und pH1N1-Hämagglutination von Hühnererythrozyten während der gleichzeitigen SALP-Behandlung 77

Abb. 10: Zytotoxizität der SALPs auf MDCK-Zellen 79

Abb. 11: Bindung von pH1N1 Viren an die Zelloberfläche von A549-Zellen während der PEP 19-2.5-Behandlung..... 80

Abb. 12: Bindung von PEP 19-2.5 an H7N7 Viruspartikel..... 82

Abb. 13: Aufnahme von H7N7 Viren in die Zelle während der PEP 19-2.5-Behandlung 84

Abb. 14: Detektion der Virusreplikation von H7N7 Viren während der PEP 19-2.5-Behandlung mittels Immunfluoreszenz..... 86

Abb. 15: Detektion der Virusreplikation von H7N7 Viren während der PEP 19-2.5-Behandlung mittels Western Blot 87

Abb. 16: Bestimmung der Virustiter von H7N7, H3N2 und pH1N1 Viren während der SALP-Behandlung 89

Abb. 17: Wachstumsverhalten von H7N7 Viren in A549-Zellen während der therapeutischen PEP 19-2.5 Behandlung 90

Abb. 18: Toxizität der SALPs nach einmaliger intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell .. 92

Abb. 19: Toxizität der SALPs nach mehrmaliger intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell 93

Abb. 20: Verteilung der SALPs im Respirationstrakt nach intranasaler Gabe im BALB/c-Mausmodell 94

Abb. 21: Überlebensrate, Gewichtsverlust und virale Lungentiter von H7N7-infizierten BALB/c-Mäusen während der PEP 19-2.5 Ko-Behandlung 96

Abb. 22: Überlebensrate, Gewichtsverlust und immunhistochemische Färbung der Lunge von H7N7-infizierten BALB/c-Mäusen während der therapeutischen PEP 19-2.5 Behandlung 97

Abb. 23: Der Werdegang eines Medikaments 111

Publikationen, Vorträge, Posterpräsentationen

Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hoffmann J., Schneider C., Heinbockel L., Brandenburg K., Reimer R. und Gabriel G. (2014)
A new class of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides inhibits influenza A virus replication by blocking cellular attachment
Antiviral Research, 104C: 23-33.

Weitere Veröffentlichungen, die während der Doktorarbeit entstanden sind:

Hoffmann J.[#], Thieme R.[#], Engels G.[#], Mittrücker H.-W., Karimi K, Arck P.C.[#] und Gabriel G.[#] (2014)
Influenza A virus infection during pregnancy – course and impact
Manuskript in Vorbereitung, [#] gleichwertiger Beitrag

Hoffmann J., Buck F. und Gabriel G. (2014)
Identification and characterization of human importin-α interaction partners
Manuskript in Vorbereitung

Weitere Veröffentlichungen, die vor der Doktorarbeit entstanden sind:

Neschen S., Katterle Y., **Richter J.**, Augustin R., Scherneck S., Mirhashemi F., Schürmann A., Joost H.G. und Klaus S. (2008)
Uncoupling protein 1 expression in murine skeletal muscle increases AMPK activation, glucose turnover, and insulin sensitivity *in vivo*
Physiological Genomics, 33(3): 333-340.

Haupt K., Reuter M., Elsen J., Burman J., Hälbich S., **Richter J.**, Skerka C. und Zipfel P.F. (2008)
The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement factor H and C3b
PLoS Pathogens, 4(12):e1000250.

Vorträge auf Fachtagungen

* *präsentierender Autor*
[#] *gleichwertiger Beitrag*

***Richter J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2010)
Evaluation of antimicrobial peptides against influenza virus infection
2010 Workshop on (Glyco)lipids, structures, functions and interactions

***Richter J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2010)
Evaluation of antimicrobial peptides against influenza virus infection
1st HPI Young Scientists Retreat, Seevetal, Deutschland

***Richter J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2011)
Evaluation of antiviral activity of novel antiseptic peptides against influenza viruses
National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, Deutschland

***Hoffmann J**., Brandenburg K., Gabriel G. (2012)
Evaluation of antiviral activity of SALPs against influenza viruses
2nd Antivirals Congress, Cambridge, MA, USA

*****Thieme R.[#], **Hoffmann J.[#]**, Engels G.[#], Mittrücker H.W., Karimi K., Gabriel G.[#], Arck P.C.[#] (2013)
Influenza A Infektion während der Schwangerschaft – Ein Mausmodell zur Untersuchung einer erhöhten Morbidität und Mortalität.
13. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF), Düsseldorf, Deutschland

Posterpräsentation auf Fachtagungen

* *präsentierender Autor*
[#] *gleichwertiger Beitrag*

***Richter J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2011)
Evaluation of antiviral activity of novel antiseptic peptides against influenza viruses
21st Annual Meeting of the Society for Virology, Freiburg (Breisgau), Deutschland

***Richter J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2011)
Evaluation of antiviral activity of novel antiseptic peptides against influenza viruses
HPI Joint Scientific Retreat, Hamburg, Deutschland

***Hoffmann J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2012)
Evaluation of antiviral activity of novel antiseptic peptides against influenza viruses
3nd International Influenza Meeting, Münster, Deutschland

***Hoffmann J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2012)
Novel synthetic anti-lipopolysaccharide peptides inhibit influenza A virus attachment and entry into target cells and prevent lethal infection in mice
HPI Joint Scientific Retreat, Hamburg, Deutschland

***Hoffmann J.**[#], Engels G.[#], Thieme R.[#], Hecher K., Mittrücker H.-W., Arck P.C.[#], Gabriel G[#]. (2012)
Influenza A virus infection during pregnancy – course and impact
HPI Joint Scientific Retreat, Hamburg, Deutschland

***Hoffmann J.**[#], Engels G.[#], Thieme R.[#], Hecher K., Mittrücker H.-W., Arck P.C.[#], Gabriel G[#]. (2013)
Influenza A virus infection during pregnancy – course and impact
23st Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Kiel, Deutschland

***Hoffmann J.**, Brandenburg K., Gabriel G. (2013)
A new class of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides protect against lethal influenza A virus infection in mice by inhibition of cell attachment and entry
Junior Scientist Zoonoses Meeting 2013, Leipzig, Deutschland

*Engels G.[#], **Hoffmann J.**[#], Thieme R.[#], Hecher K., Mittrücker H.-W., Arck P.C.[#], Gabriel G.[#] (2013)
Influenza A virus infection during pregnancy – course and impact
4nd International Influenza Meeting, Münster, Deutschland

Teilnahme an Fachtagungen

Richter J. (2010)
2nd International Influenza Meeting, Münster, Deutschland

Richter J. (2011)
LCI-Symposium Co-Infection 2011, Hamburg, Deutschland

Richter J. (2012)
LCI-Symposium Imaging Infection 2012, Hamburg, Deutschland

Hoffmann J. (2012)
Symposium, From Genomes to Epigenomes: Viral Playgrounds and Therapeutic Targets, Hamburg, Germany

Hoffmann J. (2013)
Second annual Flupharm meeting 2013, Wien, Östereich

Wissenschaftlicher Werdegang

Schulausbildung

08/1990 – 07/1994	Außenstelle der Schlossgrundschule, Chemnitz
08/1994 – 07/2002	Dr.-Wilhelm-André-Gymnasium, Chemnitz
	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2002 – 07/2008	Magisterstudium, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
	Magistra Scientiarum (M.Sc.)
	Hauptfach: Biologie
	1. Nebenfach: Biologische Anthropologie
	2. Nebenfach: Sportwissenschaft
	Thema der Magisterarbeit:
	„Charakterisierung von Komplement Inhibitoren von pathogenen Organismen“
	Abteilung Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena

Promotion

09/2009 – 04/2014	Thema der Promotion:
	„*In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität von synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptiden (SALP) gegen Influenza A Viren“
	Forschungsgruppe Virale Zoonosen und Adaptation, Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (HPI), Hamburg

Danksagung

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Gülşah Gabriel möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in einem sehr guten wissenschaftlichen Umfeld über ein so gesellschaftlich-relevantes Thema, der Evaluierung neuer Inhibitoren gegen Influenza A Viren, anfertigen zu können. Ihre Betreuung, Unterstützung und Motivation während der gesamten Promotionszeit hat mich in meiner wissenschaftlichen Karriere vorangetrieben und mir sehr dabei geholfen meine Fähigkeiten und Kenntnisse zu erweitern.

Des Weiteren möchte ich Frau Prof. Dr. Gülşah Gabriel und Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Böttger danke ich für die Bereitschaft den Vorsitz der Prüfungskommission in meiner Disputation zu übernehmen.

Unseren Kooperationspartner Prof. Klaus Brandenburg und Dr. Lena Heinbockel von der Arbeitsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel bin ich für die Bereitstellung der SALPs sowie der Einweisung und Durchführung der isothermen Titrationskalorimetrie dankbar. Dr. Rudolph Reimer und Carola Schneider von der Technologieplattform Mikroskopie und Bildanalyse des Heinrich-Pette-Instituts, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie danke ich für die Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie. Ich möchte mich ebenfalls bei Gundula Pilnitz-Stolze für die Anfertigung der Gewebeschnitte bedanken.

Ich danke meinen Arbeitskollegen für die stets konstruktive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Sie haben mir geholfen manche Rückschläge wegzustecken und weiterzumachen. Ganz besonderer Dank gilt meinen Arbeitskolleginnen Swantje Thiele und Anna Otte, die mich von Beginn meiner Doktorarbeit an begleitet und unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich bei Patricia Resa Infante für die wissenschaftlichen Gespräche bedanken. Ich bin sehr froh und dankbar diese Menschen kenngelernt zu haben und hoffe, dass sie auch in Zukunft mein Leben bereichern werden.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen lieben Freunden bedanken, die mir in der Freizeit Kraft für meine Promotion gaben.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Eric Hoffmann, meinen Eltern und meinem Bruder, die mir immer viel Liebe gaben und mich bei der Verwirklichung meiner Träume stets unterstützen.

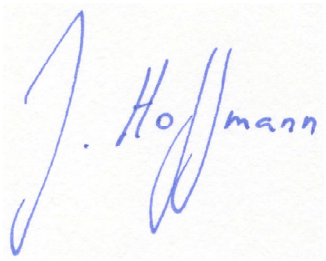
Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel:

„*In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität von synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptiden (SALP) gegen Influenza A Viren“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 20.02.2014



Julia Hoffmann