

**Experimentelle und klinische Untersuchung zu antiviralen  
Effekten eines Spirulina Mikroalgen-Extrakts und dem  
daraus isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan**

-

**Eine mögliche neue prophylaktische Therapie  
bei Herpes labialis**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften,  
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Julia Heike Mader, geboren am 13.03.1980 in Detmold

Hamburg, Juli 2015

angefertigt am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für Experimentelle Virologie in  
Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Wolfram Brune und am Dermatologikum  
Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Kristian Reich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfram Brune
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Kristian Reich

Disputation am: 13. November 2015

*„Lerne als wenn Du für immer leben würdest.  
Lebe als wenn Du morgen sterben würdest.“  
(Mahatma Ghandi)*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN, ZEICHEN UND SYMBOLE</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. HERPESVIREN: CHARAKTERISIERUNG UND KLASSIFIZIERUNG	1
1.2. HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1 (HSV-1)	3
1.2.1. <i>Epidemiologie, Pathogenese und Klinik</i>	3
1.2.2. <i>Replikationszyklus</i>	6
1.3. KAPOSI-SARKOM-ASSOZIIERTES HERPESVIRUS	10
1.3.1. <i>Epidemiologie, Pathogenese und Klinik</i>	11
1.3.2. <i>Replikationszyklus</i>	12
1.4. ANTIVIRALE THERAPIEN UND INHIBITOREN VON HSV-1 UND KSHV/HHV-8	14
1.4.1. <i>Antivirale Therapie: topische und systemische Therapeutika bei HSV-1-Infektionen</i>	14
1.4.2. <i>Inhibition von HSV-1 durch Aciclovir</i>	16
1.4.3. <i>Inhibition von HSV-1 durch Heparin</i>	17
1.4.4. <i>Antivirale Therapie bei KSHV/HHV-8-Infektionen</i>	18
1.4.5. <i>Inhibition von KSHV/HHV-8 durch Foscarnet und Heparin</i>	18
1.5. RESISTENZEN GEGENÜBER ANTIVIRALEN THERAPEUTIKA: HERAUSFORDERUNGEN UND KONSEQUENZEN FÜR DIE ANTIVIRALE THERAPIE	19
1.5.1. <i>Spirulina platensis Mikroalgen: Algenspezies und Charakteristika</i>	20
1.5.2. <i>Spirulina platensis Mikroalgen-Extrakt</i>	21
1.5.3. <i>Calcium Spirulan</i>	22
1.5.4. <i>Bisherige Forschung - Wirkung von Spirulina platensis und Calcium Spirulan</i>	23
1.6. PERMANENT MAKE-UP (PMU)-BEHANDLUNGEN	26
1.6.1. <i>Risiko von Herpes labialis bei PMU-Behandlungen</i>	27
1.6.2. <i>Prophylaxe und Therapie bei PMU-Behandlungen</i>	28
1.7. ZIELSETZUNG DER FORSCHUNGSAUFGABE	29

## 2. MATERIAL – EINGESETZTES MATERIAL, GENUTZTE SUBSTANZEN UND WEITERE

<b>HILFSMITTEL</b>	<b>31</b>
2.1. MATERIAL – DIE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG BETREFFEND	31
2.1.1. Zelllinien	31
2.1.2. Zellkulturmedium und Puffer	31
2.1.3. Viren	32
2.1.4. Antibiotika	32
2.1.5. Oligonukleotide	32
2.1.6. Kit-System und Enzyme	33
2.1.7. Antikörper	33
2.1.8. Größenstandards	33
2.1.9. Chemikalien und Reagenzien	34
2.1.10. Inhibitorische Substanzen/ Virostatika	34
2.1.11. Puffer und Lösungen	35
2.1.12. Verbrauchsmaterialien	36
2.1.13. Geräte	36
2.1.14. Software	37
2.2. MATERIAL – DIE KLINISCHE UNTERSUCHUNG BETREFFEND	38
2.2.1. Testprodukt	38
2.2.2. Zur Gewinnung und Herstellung von <i>Spirulina platensis</i> Mikroalgen-Extrakt	38
2.2.3. Über die Isolierung von Calcium Spirulan aus dem <i>Spirulina platensis</i> Mikroalgen- Extrakt	39
2.2.4. Antivirale Therapeutika	39
2.2.5. Fragebögen	40
2.2.6. Informationsmaterial - Permanent Make-up Institute	40
2.2.7. Informationsmaterial und Einverständniserklärung – Probanden	41

<b>3. ANGEWANDTE METHODEN</b>	<b>42</b>
3.1. ANGEWANDTE METHODEN – DIE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG BETREFFEND	42
3.1.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.1.1.1. Zellkultur: Pflege, Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
3.1.1.2. Viruspräparation	42
3.1.1.3. Methoden zur Bestimmung der Virustiter für HSV-1 und KSHV/HHV-8	43
3.1.1.4. MTS-Testung zur Bestimmung der Zellviabilität	44
3.1.1.5. Konzentrationen der verwendeten Testsubstanzen	45
3.1.2. METHODEN ZUR TESTUNG DER ANTIVIRALEN WIRKUNG VON SUBSTANZEN	46
3.1.2.1. Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1	46
3.1.2.2. Time-of-addition assays – HSV-1	47
3.1.2.3. Anheftungs – Experiment: Wirkweise von Ca-SP auf frühe Schritte der Virus-Zell Interaktion	48
3.1.2.4. TCID <sub>50</sub> -Reduktionsmethode – KSHV/HHV-8	49
3.1.2.5. Testung verschiedener Calcium Spirulan Chargen	50
3.1.2.6. Testung von Calcium Spirulan mittels Virus yield-Reduktionsmethode	51
3.1.2.7. Testung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME und Ca-SP	52
3.1.3. ANGEWANDTE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	52
3.1.3.1. Isolierung von DNA	52
3.1.3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	53
3.1.3.3. Agarose-Gelelektrophorese	53
3.1.3.4. Quantitative real-time PCR (qPCR)	54
3.1.4. EINGESETZTE PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	56
3.1.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	56
3.1.4.2. Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)	58
3.1.4.3. Durchflusszytometrie (FACS)	58
3.2. ANGEWANDTE METHODEN – DIE KLINISCHE UNTERSUCHUNG BETREFFEND	61

<b>4. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG</b>	<b>64</b>
4.1. ANTIVIRALE WIRKUNG VON CA-SP UND SPME GEGEN HSV-1-INFEKTIONEN IN HUMANEN	
KERATINOZYTEN	64
4.1.1. Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität	64
4.1.2. Inhibitorische Wirkung der antiviralen Substanzen getestet mittels Plaque-Reduktionstest (PRA)	65
4.1.3. Verifizierung der antiviralen Wirkweise von Ca-SP und SPME mittels quantitativer real-time PCR (qPCR)	68
4.2. WIRKMECHANISMUS VON CA-SP GEGEN HSV-1-INFEKTIONEN IN HUMANEN	
KERATINOZYTEN	71
4.2.1. Time-of-addition assay: Wirkung von Ca-SP auf frühe Schritte der HSV-1-Infektion	72
4.2.2. Inhibierung der HSV-1 Anheftung an humane Keratinozyten durch Ca-SP	73
4.2.3. VP16 Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF)	75
4.2.4. Quantifizierung von VP16 in HSV-1 infizierten HaCaT Zellen	76
4.3. S. PLATENSIS MIKROALGEN EXTRAKT UND CALCIUM SPIRULAN: EXPERIMENTE ZUM ERWEITERTEN WIRKUNGSVERSTÄNDNIS	78
4.3.1. Testung verschiedener Ca-SP Chargen auf ihre antivirale Wirkungsstabilität	78
4.3.2. Die Messung der antiviralen Wirkung von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen mit der Virus yield-Reduktionsmethode	80
4.3.3. Die antivirale Wirkung von Ca-SP unter Zugabe von SPME	81
4.4. PROPHYLAKTISCHE UND THERAPEUTISCHE EFFEKTE EINER SPME UND CA-SP ENTHALTENEN TOPISCHEN FORMULIERUNG GEGEN HERPES LABIALIS IM KLINISCHEN MODELL	83
4.4.1. Basis-Informationen zur klinischen Untersuchung und zum Probandenkollektiv	83
4.4.2. Klinische Evaluation der Herpes labialis-Reaktivierung bei Hochrisiko-Probanden nach der PMU-Behandlung	86
4.4.3. Die topischen Formulierung - Verträglichkeit und Probandenzufriedenheit	89

4.5. CA-SP INHIBIERT DIE KSHV/HHV-8-INFEKTION IN HUMANEN RETINALEN PIGMENT- EPITHELZELLEN	92
4.5.1. <i>Einfluss der antiviralen Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität von RPE-1- Zellen</i>	92
4.5.2. <i>KSHV/HHV-8 - Inhibierung durch Ca-SP im Vergleich zu Foscarnet</i>	93
4.5.3. <i>Bestätigung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen</i>	95
4.5.4. <i>Quantifizierung von ORF45 in KSHV/HHV-8 infizierten RPE-1-Zellen</i>	96
4.6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	98
<b>5. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>99</b>
5.1. MARINE MIKROALGEN UND POLYSACCHARIDE – BISHERIGE FORSCHUNG UND WIRKUNG VON SPIRULINA PLATENSIS UND CALCIUM SPIRULAN	100
5.2. ANTIVIRALE EFFEKTE VON CA-SP BEI HSV-1-INFEKTIONEN IN HUMANEN KERATINOZYTEN	102
5.2.1. <i>Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME in HSV-1-infizierten humanen Keratinocyten</i>	102
5.2.2. <i>Inhibition der Virus-Anheftung durch Ca-SP an humane Keratinocyten</i>	105
5.3. PROPHYLAKTISCHE UND THERAPEUTISCHE EFFEKTE EINER SPME UND CA-SP ENTHALTENEN TOPISCHEN FORMULIERUNG GEGEN HERPES LABIALIS IM KLINISCHEN MODELL	108
5.4. ANTIVIRALE EFFEKTE VON CA-SP BEI KSHV/HHV-8-INFEKTIONEN IN HUMANEN RETINALEN PIGMENT-EPITHELZELLEN	113
5.5. SCHLUSSFOLGERUNGEN	116
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>118</b>

<b>7. ANLAGEN</b>	<b>135</b>
7.1. ANLAGE 1 – SCHRIFTSTÜCKE ZUR KLINISCHEN UNTERSUCHUNG	135
7.1.1. <i>Projektinformation Permanent Make-up Institute</i>	135
7.1.2. <i>Fragebogen 1</i>	141
7.1.3. <i>Fragebogen 2</i>	142
7.1.4. <i>Kundeninformation</i>	144
7.1.5. <i>Erklärung zum Datenschutz</i>	146
7.2. ANLAGE 2 – VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABBILDUNGEN	147
7.3. ANLAGE 3 – VERZEICHNIS DER EINGESETZTEN TABELLEN	149
7.4. ANLAGE 4 – ZUSAMMENSTELLUNG DER GENUTZTEN GEFAHRENSTOFFE	150
7.5. POSTER, VORTRÄGE UND PUBLIKATION	152
7.6. PERSÖNLICHE INFORMATIONEN	153
7.7. DANKSAGUNG	154
7.8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	155

**VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN, ZEICHEN UND SYMBOLE**

<b>Aciclo-GTP</b>	Aciclo-GuanosinTriphosphat
<b>ACV</b>	Aciclovir
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>BfR</b>	Bundesinstitut für Risikobewertung
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ca-SP</b>	Calcium Spirulan
<b>CHX</b>	Cycloheximid
<b>CLSM</b>	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
<b>CPE</b>	Zytopathischer Effekt
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagles Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>D-PBS</b>	Dulbeccos PBS
<b>ED<sub>50</sub></b>	mittlere Effektivdosis
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EphA2</b>	Ephrin receptor tyrosine kinase A2
<b>et al.</b>	und andere
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting; Durchflusszytometrie
<b>FCS</b>	Fötale Kälber Serum
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>gB</b>	Glykoprotein B
<b>gC</b>	Glykoprotein C
<b>gD</b>	Glykoprotein D
<b>gG</b>	Glykoprotein G
<b>gH</b>	Glykoprotein H
<b>gL</b>	Glykoprotein L
<b>gM</b>	Glykoprotein M
<b>gN</b>	Glykoprotein N
<b>h</b>	Stunden

---

<b>HaCaT</b>	Human adult low Calcium high Temperature; Humane Keratinozyten
<b>HCMV</b>	Humanes Cytomegalievirus
<b>HeLa</b>	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
<b>HHV-8</b>	Humanes Herpes Virus Typ 8
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienzvirus
<b>Hpi</b>	Hours post infection / Stunden nach der Infektion
<b>HS-GAG</b>	Heparansulfat - Glykosaminoglykan
<b>HSPGs</b>	Heparan Sulfat Proteoglykane
<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus
<b>HSV-1</b>	Herpes Simplex Virus Typ 1
<b>HSV-2</b>	Herpes Simplex Virus Typ 2
<b>HVEM</b>	Herpes virus entry mediator
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>IC<sub>50</sub></b>	Mittlere inhibitorische Konzentration
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses,
<b>IF</b>	Indirekte Immunfluoreszenz
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IGV</b>	Institut für Getreideverarbeitung GmbH
<b>INCI</b>	Internationale Nomenklatur für kosmetische Inhaltsstoffe
<b>kbp</b>	Kilo-Basenpaare
<b>KSHV</b>	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
<b>LANA</b>	Latency-associated nuclear antigen
<b>M</b>	Mittelwert
<b>μ</b>	Mikro
<b>MAG</b>	Myelin-associated glycoprotein; Zelloberflächen Rezeptor
<b>Min.</b>	Minute
<b>MRSA</b>	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>MTS</b>	[(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Salz
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Ammoniumchlorid
<b>NMHC-IIA</b>	Non-muscle myosin heavy; Zelloberflächen Rezeptor
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>PFA</b>	Phosphonoameisensäure; Foscarnet

---

<b>PFU</b>	Plaque-Forming Units
<b>PILR<math>\alpha</math></b>	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor
<b>PMS</b>	Phenazin-methosulfat
<b>PMU</b>	Permanent Make-up
<b>PRA</b>	Plaque - Reduktionstest / Plaque reduction assay
<b>PS</b>	Penicillin / Streptomycin
<b>qPCR</b>	quantitativen real-time PCR
<b>RPE-1</b>	Humane retinale Pigment-Epithelzellen
<b>RPMI</b>	RosKavität Park Memorial Institute 1640 Medium
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RTA</b>	Replication and transcription activator
<b>S. platensis</b>	Spirulina platensis
<b>s.</b>	siehe
<b>SC</b>	Standard care
<b>SD</b>	Standardabweichung (standard deviation)
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SPME</b>	Spirulina platensis Mikroalgen Extrakt
<b>SPME</b>	Spirularin <sup>®</sup> HS Creme
<b>+ Ca-SP</b>	
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>STS</b>	Staurosporin
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Tissue culture infective dose pro ml
<b>Tk</b>	Thymidinkinase
<b>Tm</b>	Hybridisierungstemperatur (von Primern)
<b>TNF Rezeptor</b>	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
<b>Tris</b>	Trizma
<b>Triton-X 100</b>	T-Octylphenoxyethoxyethanol
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>Vero</b>	African Green Monkey Kidney Cells; Nierenzellen der grünen Meerkatze
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Forschungsergebnisse mit einem Heißwasser-Extrakt aus *S. platensis* deuten auf eine antivirale Wirkung gegenüber Herpes Simplex Viren (HSV) sowie einigen anderen Herpesviren hin [183; 205]. Diese Daten wurden mit empfänglichen Zelllinien, allerdings nicht den natürlichen Wirtszellen, erhoben und sind methodisch kritisiert worden [185]. Aus diesen frühen Arbeiten ergab sich der Verdacht, dass das aus der Mikroalge *S. platensis* isolierte Polysaccharid Calcium Spirulan eine Hemmung früher Schritte der Virus-Zell-Interaktion bewirken und für die antivirale Wirkung verantwortlich sein könnte [184; 186].

In der hier vorgelegten Arbeit wurden zunächst antivirale Effekte eines definierten Extrakts aus *S. platensis* sowie hochgereinigtem Calcium Spirulan gegenüber Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) in einer typischen empfänglichen Zelllinie mit verschiedenen Methoden zur Virusquantifizierung eindeutig belegt. Neben der Untersuchung zytopathologischer Effekte wurde eine quantitative PCR zur Analyse HSV-1 spezifischer DNA etabliert. Mit beiden Methoden konnte eine potente Inhibition der HSV-1-Infektion in Vero-Zellen durch Calcium Spirulan nachgewiesen werden. Der potente antivirale Effekt von Calcium Spirulan war vergleichbar mit der Wirkung von Aciclovir. Diese Experimente wurden mit einer humanen Keratinozytenzelllinie wiederholt, um die antiviralen Effekte an einer natürlichen HSV-1 Wirtszelle zu dokumentieren. Auch hier gelang es, eine eindeutige Hemmung von HSV-1 durch Calcium Spirulan sowie den *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt nachzuweisen.

Des Weiteren wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen der antivirale Wirkmechanismus des *S. platensis* Extrakts sowie von Calcium Spirulan bei humanen Keratinozyten im Vergleich zu Modellsubstanzen wie Heparin (hemmt die Anheftung von HSV an die Wirtszelle) und Aciclovir (hemmt die virale DNA-Replikation) untersucht (‘*time-of-addition*’ und ‘*adherence*’ Experimente). Hieraus ergaben sich deutliche Hinweise für eine Inhibition des Eintritts von HSV in die Keratinozyten als Grundlage des antiviralen Effekts von Calcium Spirulan. Um diesen Mechanismus weiter experimentell zu belegen, wurde die Detektion des viralen Hüllproteins VP16 in Keratinozyten mittels Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie als Technik etabliert. Durch beide Verfahren konnte eindeutig gezeigt werden, dass Calcium Spirulan dosisabhängig den viralen Eintritt von HSV-1 in Keratinozyten hemmt.

Nachdem sich in der vorliegenden Arbeit *in vitro* eine Hemmung des Eintritts von HSV-1 in Keratinozyten durch Calcium Spirulan nachweisen ließ, wurde das mögliche therapeutische Potenzial dieser Beobachtung erstmals klinisch untersucht. Da HSV-1 der typische Auslöser

von Herpes labialis ist, wurde eine offene Studie bei Patientinnen durchgeführt die sich einer Farbtätowierung des Lippenrots, einem so genannten Permanent Make-up, unterzogen. Durch das Einbringen des Farbstoffs in den Rand des Lippenrots kommt es bei Individuen mit Herpes labialis regelmäßig zu einer Herpes-Reaktivierung. Damit war dieses klinische Modell besonders geeignet, um mögliche prophylaktische Effekte einer den Mikroalgenextrakt und Calcium Spirulan als aktive Substanzen enthaltenden topischen Formulierung im Vergleich zu einer konventionellen topischen und systemischen antiviralen Therapie zu untersuchen. In der klinischen Studie konnte bei 202 Probanden mit rezidivierendem Herpes labialis in der Vorgeschichte die sich dieser Maßnahme unterzogen ein protektiver Effekt der topischen Formulierung gegen eine Reaktivierung von Herpes labialis nachgewiesen werden. Die Wirkung der Calcium Spirulan und den *S. platensis* Mikroalgenextrakt enthaltenden Creme war hierbei den Effekten der topischen Anwendung von Aciclovir überlegen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der topischen Formulierung im Vergleich zur systemischen Aciclovir-Therapie eine Reduktion der Krustenbildung bei der Abheilung der Herpes-Reaktivierung bewirkte.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die antiviralen Wirkungen von Calcium Spirulan nicht auf Effekte gegenüber HSV beschränkt sind. Es gelang erstmals, potente antivirale Effekte von Calcium Spirulan auf das Humane Herpes Virus Typ 8 (HHV-8) nachzuweisen, das als wichtiger viraler Auslöser einer malignen Entartung kutaner Endothelzellen und damit der Entwicklung eines Kaposi-Sarkoms angesehen wird (daher auch die Bezeichnung als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, KSHV). In Analogie zu den Befunden bei HSV, konnte mittels einer neu etablierten durchflußzytometrischen Analyse des KSHV/HHV-8-spezifischen Hüllproteins ORF45 gezeigt werden, dass auch diese antiviralen Effekte von Calcium Spirulan vor allem auf einer Hemmung des viralen Eintritts zu beruhen scheinen.

Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass Calcium Spirulan ein potenter Inhibitor der HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten sowie der KSHV/HHV-8-Infektion *in vitro* ist. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung bestätigen die therapeutische Relevanz im Sinne einer prophylaktischen Wirkung von Calcium Spirulan bei Herpes labialis-Reaktivierungen.

## SUMMARY

Earlier studies indicated an antiviral activity of a hot-water extract from *S. platensis* against herpes simplex virus (HSV) and other herpesviruses [183; 205]. These data were criticized for their methods and the use of susceptible cell lines instead of herpes virus host cells [185]. These studies suppose Calcium spirulan, the isolated polysaccharide from *S. platensis* microalgae extract, to be the active compound and to inhibit early timepoints of virus-cell-interaction [184; 186].

First of all, the antiviral effects of a *S. platensis* microalgae extract and purified Calcium spirulan against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) were analyzed in susceptible cells. The antiviral activity was detected by the determination of cytopathic effects and a quantitative PCR for HSV-1 specific DNA was established. The results showed a potent inhibition of HSV-1 infection by Calcium spirulan in Vero cells in both methods. This antiviral effect was comparable to the activity of acyclovir. These experiments were repeated in human keratinocytes, the primary target cells for HSV-1. The potent antiviral effect of Calcium spirulan and *S. platensis* microalgae extract was confirmed in keratinocytes.

Furthermore, the potential mechanism of HSV-1 inhibition by Calcium spirulan and the *S. platensis* microalgae extract was analyzed in comparison to the HSV-1 inhibitors heparin (blocks the virus attachment) and acyclovir (inhibits viral DNA replication). 'Time-of-addition' and 'adsorption' assays showed strong evidence, that Calcium spirulan inhibits the entry of HSV-1 in keratinocytes. To analyze this mechanism, the detection of the viral tegument protein VP16 by immunofluorescence and flow cytometry analysis was established in human keratinocytes. The results showed that the dose-dependent inhibition of viral attachment is the underlying mechanism of Calcium spirulan. This effect was comparable to the activity of heparin.

Because of these findings *in vitro*, the therapeutic potential of Calcium spirulan was investigated in a clinical model for the first time. The prophylactic and therapeutic effect of a newly developed cream, containing Calcium spirulan and *S. platensis* microalgae extract, was evaluated in comparison to topical and systemical antiviral therapies, mainly acyclovir, in a clinical model of mechanical herpes reactivation by permanent make-up (PMU). Prophylactic and therapeutic effects for the topical formulation against herpes labialis reactivation in 202 patients were detected. The effectivity of the Calcium spirulan and *S. platensis* microalgae extract containing formulation was superior to that of topical acyclovir. The use of the topical

formulation in comparison to systemical acyclovir showed a decrease in healing with a crust after herpes reactivation.

Furthermore, the spectrum of antiviral effects of Calcium spirulan to Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) *in vitro* was extended. KSHV is the viral cause of Kaposi's Sarcoma, a malignant tumor, and also known as human herpesvirus type 8 (HHV-8). Potential antiviral activity of Calcium spirulan against KSHV/HHV-8 infections could be detected. Finally, the potential mechanism of KSHV/HHV-8 inhibition by Calcium spirulan was analyzed. A flow cytometry analysis for the detection of the KSHV/HHV-8 specific tegument protein ORF45 was established and showed inhibition of viral entry by Calcium spirulan. This mechanism was similar to the inhibition of HSV-1 attachment to human keratinocytes by Calcium spirulan.

These results primarily revealed Calcium spirulan as a potent inhibitor of HSV-1 attachment to human keratinocytes and KSHV/HHV-8 infection *in vitro*. The successful use of a newly developed cream containing Calcium spirulan and *S. platensis* microalgae extract in a clinical model of HSV reactivation indicated a potential clinical relevance of these findings.

## 1. EINLEITUNG

Die antiviralen Eigenschaften eines *Spirulina Platensis* Mikroalgen-Extrakts (SPME) und dem daraus isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan (Ca-SP) wurden in der vorliegenden Arbeit in zwei divergenten Ansätzen erforscht: der experimentellen (*in vitro*) und der klinischen (*in vivo*) Untersuchung. Für die experimentelle Untersuchung wurde SPME sowie Ca-SP jeweils als Lösung verwendet. Für die klinische Untersuchung wurde eine kosmetische Creme, welche SPME und Ca-SP enthält, als Testprodukt verwendet. Die Grundlage beider Untersuchungen, sowohl der verwendeten Lösungen als auch des Testproduktes, bilden der mittels patentiertem Verfahren gewonnene SPME sowie das daraus isolierte Ca-SP.

In diesem Abschnitt der Arbeit werden zunächst die Herpesviren im Allgemeinen sowie die für die realisierte Forschungsarbeit relevanten Herpesviren Herpes Simplex Virus Typ 1 und Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus mit ihren morphologischen und charakteristischen Eigenschaften vorgestellt. Im Anschluss erfolgt eine eingehende Betrachtung der antiviralen Therapien sowie der verschiedenen Inhibitoren beider Herpesviren, bevor besonders auf die Konsequenzen der üblichen antiviralen Therapien und der daraus resultierenden Risiken und Herausforderungen eingegangen wird.

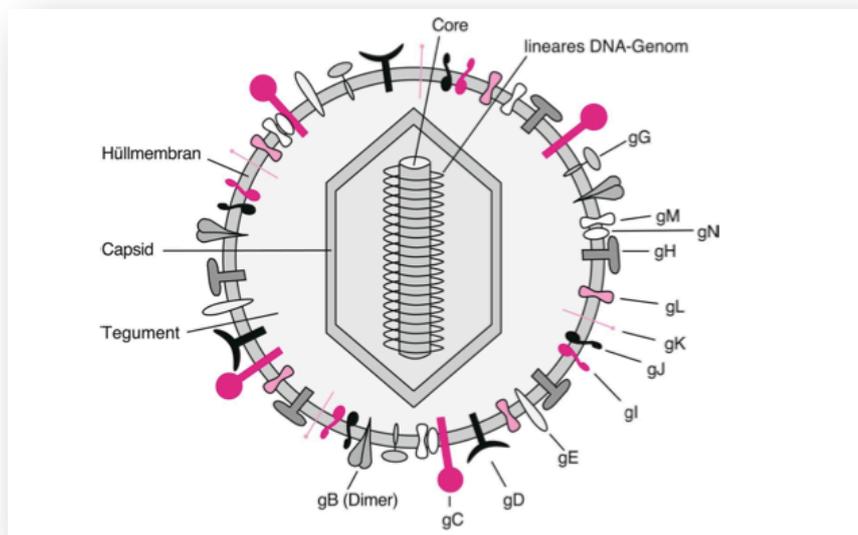
Nachfolgend werden die Spezies und Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten Mikroalge *Spirulina platensis*, dem daraus gewonnenen Extrakt sowie das aus der Mikroalge isolierte Polysaccharid Calcium Spirulan erläutert, bevor die bisherigen Forschungsergebnisse zur Wirkung von *Spirulina platensis* und Calcium Spirulan vorgestellt werden. Dieses Kapitel dient zur Einbettung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen aktuellen Ergebnisse.

Der darauffolgende Abschnitt befaßt sich mit der Behandlungsmethode des Permanent Make-up, welche für die klinische Untersuchung in dieser Forschungsarbeit als geeignetes Herpes labialis-Modell diene. Danach werden das Risiko von Herpes labialis bei Permanent Make-up Behandlungen sowie dessen Prophylaxe und Therapie eingehend betrachtet, bevor im Anschluss die Ergebnisse der experimentellen und klinischen Untersuchung aufgezeigt und vor dem Hintergrund der Zielsetzung dieser Arbeit anhand von aktueller und vorausgehender grundlegender Forschungsliteratur diskutiert werden.

### 1.1. Herpesviren: Charakterisierung und Klassifizierung

Herpesvirusinfektionen lassen sich sowohl beim Menschen als auch bei zahlreichen Wirbeltieren wie z.B. Affen, Katzen, Fröschen und Fischen in Form unterschiedlicher Erkrankungen diagnostizieren. Trotz der variierenden Symptome weisen Herpesviren sehr enge strukturelle und morphologische Gemeinsamkeiten auf. Das Genom, welches als

doppelsträngige DNA den Kern des Virions (Viruspartikels) bildet, ist von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, wobei die Genomgröße je nach humanem Herpesvirus zwischen 124 kbp (Varicella-Zoster-Virus) und 230 kbp (Cytomegalovirus) variiert. Das Kapsid ist umgeben vom Tegument, einer amorphen Proteinmatrix, die aus zahlreichen Strukturproteinen, den Tegumentproteinen, besteht [1; 2]. Eine Hüllmembran, bestehend aus einer Vielzahl von Lipiden und Glykoproteinen, welche von essentieller Bedeutung bei der Adsorption und Penetration in die Wirtszelle sind, umschließt die Virionen [3]. Am Beispiel des Herpes Simplex Virus ist der schematische Aufbau eines Herpesvirions dargestellt (s. Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus eines typischen Herpesvirions (HSV-1).** Das Virion des Herpes Simplex Virus besteht aus dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom in der Mitte des Viruspartikels. Das Genom ist von einem ikosaedrischen Kapsid, bestehend aus mehreren Virusstrukturproteinen, umschlossen. Um das Kapsid ist das Tegument mit zahlreichen Strukturproteinen angeordnet, welches von der äußeren Hüllmembran geschützt wird. In der Hüllmembran sind beim Herpes Simplex Virus elf verschiedene Proteine (gB – gG) mit unterschiedlichen Aufgaben eingelagert. Abbildung 1 übernommen aus [1].

Die Herpesviren umfassen zahlreiche animale und acht humanpathogene Viren, die innerhalb der Familie der Herpesviridae bezüglich ihrer Pathogenität, des Zelltropismus sowie der charakteristischen Replikationseigenschaften in Alpha-, Beta- und Gamma-Herpesviren klassifiziert werden [2].  $\alpha$ -Herpesviren weisen ein breites Wirtsspektrum mit einem kurzen Replikationszyklus *in vitro* auf, wobei sie *in vivo* in neuronalen Ganglien persistieren. Zu den  $\alpha$ -Herpesviren zählen die Herpes Simplex sowie die Varicella-Zoster-Viren.  $\beta$ -Herpesviren besitzen dagegen ein enges Wirtsspektrum mit einem längeren Replikationszyklus und einer

folglich langsamen Ausbreitung *in vitro*. Die bekanntesten Viren dieser Unterfamilie sind die Cytomegalieviren. Die dritte Unterfamilie der Herpesviridae, die  $\gamma$ -Herpesviren, sind charakterisiert durch die Infektion von B-Lymphozyten (Epstein-Barr-Virus, Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, KSHV/HHV-8) oder u.a. von T-Zellen (KSHV/HHV-8), wo sie den Zustand der Viruslatenz induzieren. Eine lytische Infektion von Epithel- oder Fibroblastenzellen ist bei einigen Viren ebenfalls möglich. Überdies erfolgt eine differenziertere Einteilung von Herpesviren z.B. nach ihrer Sequenz der Virus-DNA sowie des Genomaufbaus [1; 2]. Des Weiteren ist den humanen Herpesviren neben der Replikation im Zellkern gemein, dass sie viruseigene Replikationsenzyme aufweisen, die überwiegend in der Struktur deutlich abweichend gegenüber körpereigenen Enzymen sind. Eine therapeutische Hemmung wird dadurch ermöglicht [4].

## 1.2. Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)

Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) ist ein human-pathogenes Virus, welches vor allem Läsionen im Bereich der Lippen sowie der oralen Mukosa verursacht. Ein weiterer Vertreter der  $\alpha$ -Herpesviren ist das Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2), wobei die Prädilektionsstelle von HSV-2 überwiegend im Genitalbereich angesiedelt ist. Die Infektion mit HSV-2 im Bereich der Lippen und oralen Mukosa sowie von HSV-1 im Genitalbereich ist ebenfalls möglich. Beide Serotypen sind morphologisch identisch, wobei sie sich durch ihre klinischen und epidemiologischen Muster differenzieren lassen [4].

Das Genom von HSV-1 liegt im Virion als lineare, doppelsträngige (ds) DNA vor. Es hat eine Länge von etwa 152 kbp und kodiert für über 74 Gene [1; 5; 6]. Das HSV-1 Genom besteht aus einem Abschnitt einheitlicher Sequenzfolgen, den *unique long* ( $U_L$ -Region, 126 kbp) und *unique short* ( $U_S$ -Region, 26 kbp) Regionen, die von repetitiven Sequenzen getrennt (*Internal Repeat*, IR) oder flankiert (*Terminal Repeat*, TR) sind [5–7]. Die Nukleotidsequenzen von HSV-1 und HSV-2 weisen eine Homologie von 85 % auf [8].

### 1.2.1. Epidemiologie, Pathogenese und Klinik

Weltweit sind Infektionen, hervorgerufen durch HSV-1 sehr verbreitet wobei Herpes Simplex Viren zu den häufigsten Krankheitserregern zählen [1]. Die Durchseuchung der Bevölkerung mit dem Virus wächst im Kindesalter konstant an und erlangt in der Pubertät ihren Höhepunkt. Dies hat zur Folge, dass 60-90 % der Weltbevölkerung seropositiv sind, wobei 20-40 % der infizierten Personen regelmäßige Rezidive erlangen [4; 9].

Auf Grund seiner Lipidproteinhülle ist HSV-1 sehr anfällig gegenüber Austrocknung und mittels Desinfektionsmittel sowie Seifen schnell inaktivierbar, was zu einer geringen Überlebensdauer auf Gegenständen führt. Folglich wird HSV-1 überwiegend durch direkten Kontakt übertragen, was in der Regel im Kindesalter erfolgt. Als wichtigste Infektionsquelle ist das chronisch-rezidivierende Herpes Simplex anzusehen, das die Hornschicht nur durch Eintrittspforten penetrieren kann [10]. Üblicherweise kommt es vorwiegend an der leicht penetrierbaren Mundschleimhaut zu einer subklinischen Primärinfektion durch Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt oder Sekreten der Mundhöhle. Nach der primären Infektion gelangen die Viren über Zell-Zell-Kontakt von den Epithelzellen in die freien Nervenendigungen, die das infizierte Gewebe versorgen. Von dort erfolgt der retrograde, axonale Transport des Virus in die neuronalen Ganglien, wo es sich hauptsächlich im Ganglion trigeminale im oro-facialen Bereich ansiedelt. Bei HSV-2 dagegen ist das Virus in den Lumbal- und Sakralganglien vorzufinden [4].

Hier persistiert das Virus lebenslang in latenter Form. Als Latenz wird der Ruhezustand beschrieben, in dem das Virus im Organismus ohne Symptome schlummert [11; 12]. Während der Latenz kann es immer wieder zu akuten Ausbrüchen kommen. Nach der Primärinfektion liegt das Virus dauerhaft im Organismus in nicht-infektiöser Form vor. Das virale Genom ist in der Latenz ein stabiler Bestandteil der Zellen. Die Virusreplikation ist in diesem Stadium jedoch unterdrückt [11; 12].

Folglich sind Phasen ohne nachweisbare Virusreplikation bei latenter Perсистенz möglich.

Die latente Infektion hat zur Folge, dass der Betroffene entweder zum asymptomatischen Virusträger wird, der trotz der Asymptomatik infektiös ist und das Virus übertragen kann oder es erfolgt eine Reaktivierung des Virus. Die Reaktivierung des Virus wird in die asymptomatische Form, bei der lediglich eine geringe Menge an Virus frei gesetzt wird, sowie in die rezurrente Infektion differenziert. Die rezurrente Infektion tritt üblicherweise in Form eines klinisch manifestierten Herpes-Rezidivs auf, wobei Herpes labialis die häufigste Manifestation der rezurrenten Infektion darstellt [13].

Die Reaktivierung des Virus wird durch verschiedene exogene und endogene Triggerfaktoren bedingt. Hierzu zählen u.a. folgende Faktoren: UV-Exposition, Immundefizienz, hormonelle Disbalance/Menstruation, Infektionen, lokales Trauma, emotionaler Stress sowie bestimmte Chemikalien, wie z.B. Adrenalin und Immunsuppressiva [8; 13]. Durch einen Triggerfaktor wird die Virussynthese erneut aktiviert. Die neuronale, systemische Virusausbreitung ist die Folge [13]. Die Viren deszendieren entlang der Nervenbahnen in die Haut, wo sie replizieren. Die Ausbreitung der Viren im Epithel erfolgt durch Zerstörung der Wirtszelle und Freisetzung neuer Virionen sowie durch die Verschmelzung

benachbarter Zellen durch Zell-Zell-Kontakt. Die Zerstörung der Epithelzellen äußert sich klinisch durch eine Entzündungsreaktion an der Haut in Form eines Herpes-Rezidivs [14].

Charakteristisch für das Herpes Simplex-Rezidiv ist ein erneutes Auftreten der Bläschen an der gleichen Stelle, an der die Primärinfektion erfolgte. Herpes Simplex-Rezidive können sowohl als einmalige Episode oder wiederholt als chronisch-rezidivierender Herpes Simplex auftreten. Die häufigste Manifestation der HSV-1 Infektion ist der rezidivierende Herpes Simplex, auch Herpes labialis genannt. Selten treten HSV-1-Rezidive in Form von schwerwiegenden Erkrankungen auf, wie z.B. Ekzema herpeticatum, Herpes corneae oder einer Enzephalitis [4].

Kennzeichnend für Herpes labialis Episoden ist der Verlauf der Reaktivierung in Phasen. Die Prodromalphase leitet das Herpes-Rezidiv mit Symptomen wie Schmerzen, Kribbeln, Brennen, Jucken und Spannungsgefühlen ein. Histologische Untersuchungen konnten eine Korrelation zwischen dieser Phase und der frühen Phase der Virusreplikation nachweisen [15]. In der anschließenden Papelphase folgen auf eine erythematöse Veränderung des betroffenen Areals schmerzhafte Papeln am Lippenrand. Durch das Auftreten von gruppierten (herpetiformen) Vesiculae (Bläschen) im Bereich der Mundschleimhaut, der Lippen und perioral an der Grenze zum Lippenrot (s. Abbildung 2) wird die Vesicelphase eingeleitet.



**Abbildung 2: Herpes labialis Infektion.** Vesiculae auf erythematösem Grund mit gelblicher Krustenbildung im Bereich der Lippen sowie im Übergang vom Lippenrot zur perioralen Haut. Abbildung 2 übernommen aus [16].

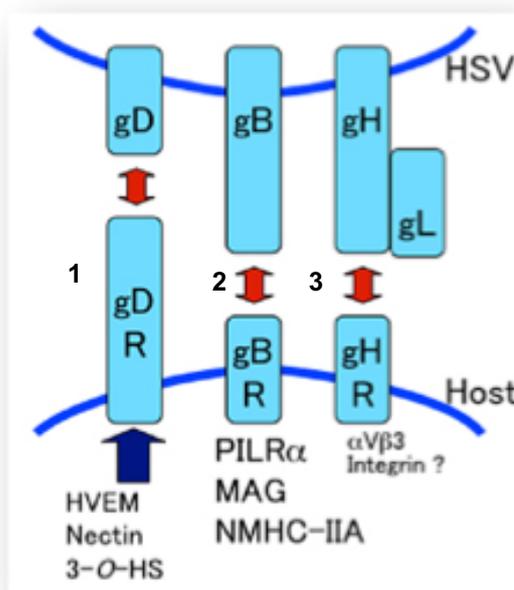
Die Vesiculae sind flüssigkeitsgefüllt und zwischen 2 bis 5 mm groß. In der histologischen Untersuchung weisen die Vesicuale degenerierte Keratinozyten und durch Zellfusion entstandene Riesenzellen auf [1].

Neben Schwellungen des betroffenen Areals zählen erythematische Veränderungen der Haut sowie ein Jucken und Brennen der Vesiculae zu der Morphologie von Herpes labialis. In der

nachfolgenden Ulzerationsphase öffnen sich die Vesiculae und verschmelzen miteinander zu nässenden, schmerzhaften Wunden. Das austretende Sekret ist hoch infektiös und eine häufige Ursache für die Übertragung des Herpes Simplex Virus [15]. Die Abheilung der Vesiculae, die mit Eiter, welcher vorwiegend durch *Staphylococcus aureus* [17] hervorgerufen wird, gefüllt sind, weist in der Regel eine gelbliche Krustenbildung auf. Im Allgemeinen heilt das Herpes-Rezidiv nach 10 Tagen narbenfrei ab. Komplikationen des Herpes labialis können u.a. größere Ulzera und Nekrosen sein sowie bedingt durch eine bakterielle Superinfektion in Form von Gingivostomatitis auftreten [4].

### 1.2.2. Replikationszyklus

HSV-1 kann sich im lytischen Replikationszyklus vermehren oder latent in den Zellen verbleiben. Der Replikationszyklus von HSV-1 wird mittels Anheftung (*attachment*) an die Zelle initialisiert. Die Bindung des Viruspartikels an die Oberfläche der Zielzelle erfolgt durch die Interaktion der viralen Glykoproteine gC und gB mit Heparansulfatproteoglykan (HSPG) (s. Abbildung 4, Markierung 1) der Zelle. Diese Bindung ist reversibel, wobei deren Stabilisierung durch die Interaktion von Glykoprotein gD mit verschiedenen zellulären Rezeptoren erfolgt [18] (s. Abbildung 3, Markierung 1) Die zellulären Rezeptoren lassen sich differenzieren in *HVEM* (*herpes virus entry mediator*), *Nectin-1* und *Nectin-2* sowie *3-O-sulfatiertes Heparansulfat* [19–21].



**Abbildung 3: Virale Glykoproteine von HSV-1 und essentielle zelluläre Rezeptoren bei der Virus-Zell Interaktion.**

Die aufgeführten Rezeptoren sind essentiell

(1) für die stabile

Bindung von HSV-1 an der Zelloberfläche

sowie (2,3) für das Eindringen des Virus

in die Zielzelle.

Abbildung 3 modifiziert nach [22].

Die Rezeptoren der Zelloberfläche lassen sich verschiedenen Klassen zuordnen, wobei HVEM ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Superfamilie ist. Nektin-1 und -2 werden der Superfamilie der Immunglobuline zugeordnet und in verschiedenen Zelltypen (Epithel-, Nervenzellen und Fibroblasten) exprimiert. 3-O-sulfatiertes Heparansulfat ist strukturell mit Heparin, einem Glykosaminoglykan, verwandt und ist u.a. im Gehirn zu detektieren.

Auf Grund dessen könnte 3-O-sulfatiertes Heparansulfat für die neuronale Ausbreitung von HSV-1 von Bedeutung sein [23] (s. Abbildung 3, Markierung 2). Des Weiteren ist der PILR $\alpha$  (paired immunoglobulin-like type 2 receptor) Rezeptor als Rezeptor für das Glykoprotein gB bekannt [24]. Zusätzlich zu dem PILR $\alpha$  Rezeptor kann das Glykoprotein gB eine Bindung mit den Rezeptoren MAG (myelin-associated glycoprotein) und NMHC-IIA (non-muscle myosin heavy) eingehen (s. Abbildung 3, Markierung 3). Für den viralen Glykoproteinkomplex, bestehend aus den Glykoproteinen gH und gL, wird eine essentielle Bindung an das Transmembranprotein  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin vermutet [25], wobei neuere Literatur postuliert, dass  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin nicht allein als Rezeptor für die Bindung von gH und gL dient [19; 20; 26; 27].

Im Anschluss an die Anheftung und Bindung des Virus an die Zelloberfläche erfolgt das Eindringen des Virus in die Zelle, welches aus drei Phasen besteht [28]. Durch die Bindung von gD an einen der drei Zelloberflächenrezeptoren wird die Verschmelzung der Hüllmembran des Virus mit der zellulären Plasmamembran hervorgerufen, in dem beide Membranen sich räumlich stark annähern. Daraufhin folgt die Interaktion des Glykoproteins gB mit dem Heterodimerkomplex gH/gL, was die Hemifusion der äußeren Membranen zur Folge hat sowie eine Konformationsänderung der Profusion-Domäne von gB. Im Anschluss erfolgt unter Beteiligung von gB die vollständige Fusion der beiden Lipidmembranen [29]. Für einige Zielzellen wird neben dem pH-abhängigen Fusionsprozess die Endozytose von Viruspartikeln mit anschließender Freisetzung der Kapside ins Zytoplasma erwähnt [30]. Gefolgt von der Fusion werden die Tegumentproteine pUL36, pUL37 sowie die Proteinkinase pUS3, welche an den Kapsiden verbleiben [31; 32], entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (s. Abbildung 4, Markierung 2) [33]. Durch die Bindung der Nukleokapside an Kernporenkomplexe wird das virale Genom über die zelluläre Transportmaschinerie aus dem Kapsid in den Zellkern entlassen [33; 34].

Unverzüglich nach dem Eintritt in den Zellkern findet die Zirkularisierung des viralen Genoms statt (s. Abbildung 4, Markierung 3), gefolgt von der Transkription, der DNA-Replikation und der Neusynthese von Nukleokapsiden [35]. Die Transkription der viralen Gene erfolgt wie bei allen Herpesviren kaskadenartig (s. Abbildung 4, Markierung 4). Die viralen Gene werden in drei Kategorien differenziert: die sehr frühen (*immediate-early*,  $\alpha$ ), die frühen (*early*,  $\beta$ ) und die späten (*late*,  $\gamma$ ) Gene [36]. Durch die zelluläre DNA-abhängige RNA Polymerase II erfolgt die Transkription der viralen Gene. Sechs *immediate-early* Gene sind für HSV-1 bekannt, wobei deren Proteinprodukte (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, pUS1.5) für die Regulation der

*early*-Gene essentiell sind. Die *immediate-early* Gentranskription (s. Abbildung 4, Markierung 4) ist 1 bis 4 Stunden nach der Virusinfektion detektierbar [37]. Einige der *early*-Gene (s. Abbildung 3, Markierung 4; unten) spielen eine elementare Rolle bei der DNA-Synthese und sind 5 bis 8 Stunden nach der Virusinfektion feststellbar [37].

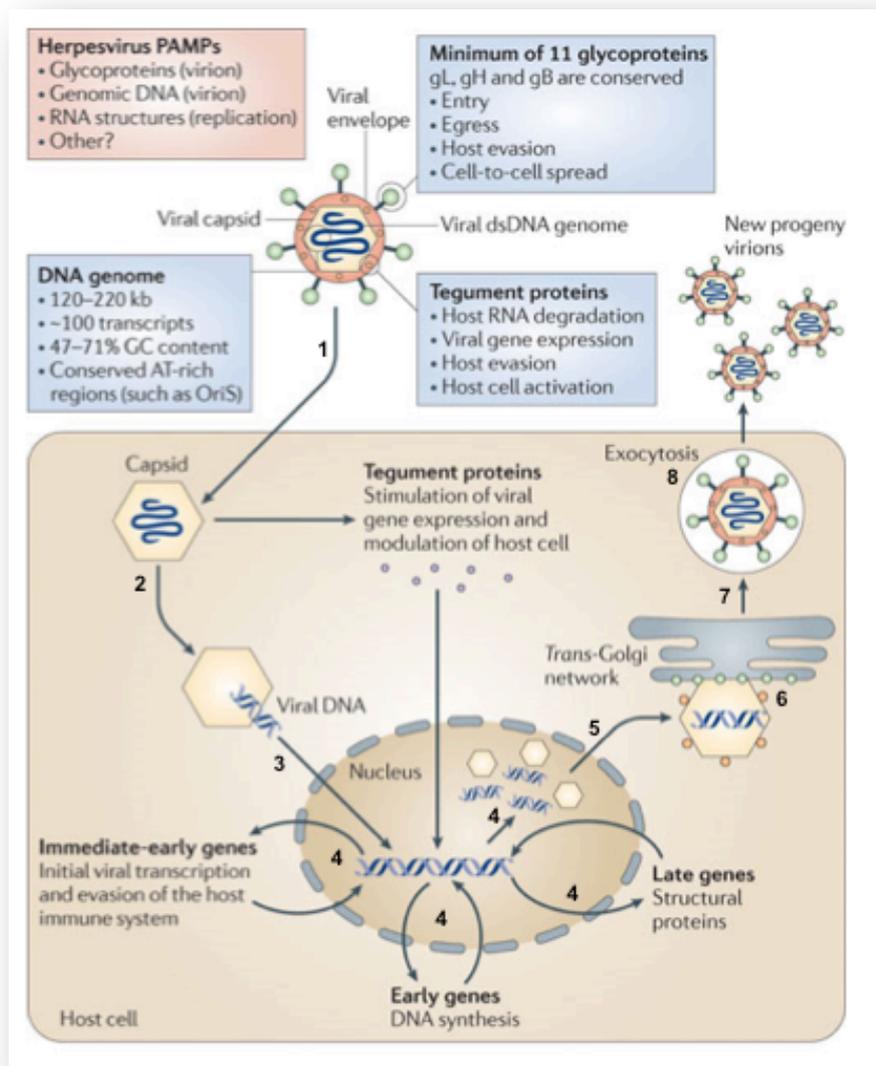
Die *late*-Gene (s. Abbildung 4, Markierung 4) kodieren hauptsächlich virale Strukturproteine, wobei deren Transkription abhängig von der DNA-Replikation ist [36; 37]. Die virale DNA-Replikation (s. Abbildung 4, Markierung 4) findet in bestimmten Kompartimenten des Zellkerns, den so genannten Replikations-kompartimenten, statt [38]. Durch die Neusynthese von Nukleokapsiden im Zellkern entstehen ikosaedrische Kapside. Diese erhalten ihre primäre Umhüllung durch die Auswanderung aus dem Zellkern in zwei Schritten: nach dem ersten Knospungsprozess an der inneren Kernmembran gelangen die Kapside in den perinukleären Raum. Hier entstehen die primär umhüllten Viruspartikel. Anschließend erfolgt die Fusion der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran, wodurch die Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma erfolgt (s. Abbildung 4, Markierung 5) [39].

Die primäre Umhüllung ist mit dem vollständigen Einbau der viralen DNA in die Nukleokapside verbunden [40; 41]. Im Zytoplasma verlieren die Nukleokapside ihre primäre Umhüllung sowie einen Teil der primären Tegumentproteine, bevor der vollständige Zusammenbau des finalen Teguments in mehreren Schritten erfolgt. Die Tegumentation findet durch die Interaktionen zwischen viralen Kapsid-, Tegument- und Glykoproteinen statt. Die finale, sekundäre Umhüllung der Kapside erfolgt nun durch Knospung der tegumenthaltigen Kapside an modifizierten Membranen des Trans-Golgi-Netzwerkes. Hier sind die viralen Glykoproteine in glykosylierter Form eingelagert [39; 42].

Durch die sekundäre Umhüllung erhalten die Nukleokapside ihre endgültige Struktur (s. Abbildung 4, Markierung 6). Bei diesem komplexen Prozess ist die Beteiligung von mehr als 15 Tegumentproteinen und 10 Glykoproteinen nötig [43].

Über Transportvesikel gelangen die umhüllten, infektiösen Virionen anschließend zur Plasmamembran der Zelle (s. Abbildung 4, Markierung 7), wo sie durch Exozytose (s. Abbildung 4, Markierung 8) freigesetzt werden [41; 44].

Neben der Penetration freier Virionen in die Zelle ist die Ausbreitung über den sogenannten *cell-to-cell spread* ohne Freisetzung der Virionen möglich. Hierbei gelangen infektiöse Partikel von einer infizierten Zelle in eine benachbarte, uninfizierte Zelle [45], wobei u.a. der zelluläre Rezeptor *Nectin-1* eine wichtige Rolle spielt [46].



**Abbildung 4: Schematischer Überblick über den Replikationszyklus von HSV-1.** (1) Anheftung an die Zielzelle, gefolgt von der Verschmelzung der Plasmamembran vermittelt durch die Glykoproteine. (2) Der Transport der Nukleokapside zu den Kernporen erfolgt mittels Mikrotubuli. (3) Die Zirkularisierung der viralen DNA sowie die Überführung in den Zellkern findet statt. (4) Die Transkription der viralen Gene (immediate-early, early und late) erfolgt kaskadenartig und die DNA-Replikation findet statt. (5) Nach primärer Umhüllung der Nukleokapside werden diese nach der Fusion mit der äußeren Kernmembran in das Zytoplasma freigelassen. (6) Nach der sekundären Umhüllung am Trans-Golgi-Netzwerk gelangen die (7) Virionen mittels Transportvesikel an die Plasmamembran. (8) Es erfolgt die Freisetzung der Virionen mittels Exozytose. Abbildung 4 modifiziert nach [7].

Während der Latenz ist die Virus-DNA als Episom in den Zellen gelagert und wird durch die zellulären Polymerasen repliziert. HSV-1 etabliert eine reaktivierbare Latenz im humanen Organismus, die vor allem in den Neuronen der Spinalganglien, vorzugsweise im Ganglion trigeminale, vorliegt [47]. Während der Primärinfektion wandert das Virus über die Nervenendigungen der infizierten Epithelzellen in die Nervenzellen bis zum Ganglion. Eine dauerhafte Expression der *immediate-early* Gene konnte in den Ganglien bislang nicht detektiert

werden, was als Ursache für eine Latenz des Virus in den Ganglien vermutet wird. Infolgedessen bleibt die Synthese der *immediate-early* Gene und der dadurch bedingte lytische Replikationszyklus aus [1; 48]. Durch verschiedene endogene und exogene Faktoren ist die Reaktivierung des latenten Virusgenoms, welche die Initiierung der lytischen Genexpressions-Kaskade zur Folge hat, möglich. Diese geht einher mit einer erneuten Produktion infektiöser Viren [2; 48]. Die exakten molekularen Mechanismen, die dieser Reaktivierung zu Grunde liegen, sind größtenteils noch unbekannt. Die Expression des viralen Transaktivator-Proteins ICP0 stellt dabei vermutlich den ersten Schritt der Reaktivierung dar, welcher zur Genexpression und Virusproduktion in latent infizierten Zellen führt [2; 48].

### 1.3. Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus

Das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV), welches nach der Klassifizierung des Internationalen Komitees für die Taxonomie von Viren (*International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*) als humanes Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) bezeichnet wird [49], zählt zu der Familie der  $\gamma$ -Herpesviren und stellt ein gamma-2-lymphotrop-onkogenes Herpesvirus dar [50; 51], welches maßgeblich für die Entwicklung von Kaposi-Sarkomen verantwortlich ist [52; 53]. Der Wiener Dermatologe Moritz Kaposi (1837-1902) beschrieb 1872 erstmals die braun-lividen Tumorknoten v.a. im Bereich der Schleimhäute und unteren Extremität, woraus der Name Kaposi-Sarkome resultierte [54]. Kaposi-Sarkome werden in die klassische Form des Kaposi-Sarkoms sowie in Kaposi-Sarkome bei HIV-Infektionen differenziert. Beide Formen des Kaposi-Sarkoms stellen maligne, vaskuläre Neoplasien dar [55; 56]. Diese bösartige Neubildung von Körpergewebe im Bereich der Gefäße bei der klassischen Form des Kaposi-Sarkoms tritt selten auf und betrifft v.a. ältere Menschen in Süd- oder Osteuropa [54]. Kaposi-Sarkome bei HIV-Infektionen stellen entsprechend eine vaskuläre Neoplasie bei HIV-infizierten Patienten dar [55]. KSHV/HHV-8 verursacht u.a. Kaposi-Sarkome bei immundefizienten Patienten, vorwiegend allerdings bei HIV-Patienten [1; 52]. Der Nachweis von KSHV/HHV-8 im Gewebe eines Kaposi-Sarkom bei einem AIDS-Patienten wurde erstmals 1994 von Chang *et al.* beschrieben [50; 57; 58]. Neuere Forschungen konnten KSHV/HHV-8 in allen Formen des Kaposi-Sarkom Gewebes nachweisen, auch bei Patienten, die nicht am HI-Virus erkrankt sind [1; 59]. Neben der Infektion mit dem KSHV/HHV-8 Virus spielen genetische sowie immunologische Faktoren ebenso eine Rolle bei der Entstehung von Kaposi-Sarkomen [60]. Bei HIV-assoziierten Kaposi-Sarkomen sind multiple, braun-livide bis rötliche Knoten auf der Haut sowie der Mund- und Genitalschleimhaut erkennbar. Bei Ausbleiben einer Therapie ist die Ausbreitung sowie der Befall der ganzen Haut, der Schleimhäute, der Lunge, Leber, Nieren und Lymphknoten eine mögliche Konsequenz [55; 60]. Nachfolgend werden die Epidemiologie, Pathogenese und Klinik sowie der Replikationszyklus von KSHV/HHV-8 eingehend erläutert.

### ***1.3.1. Epidemiologie, Pathogenese und Klinik***

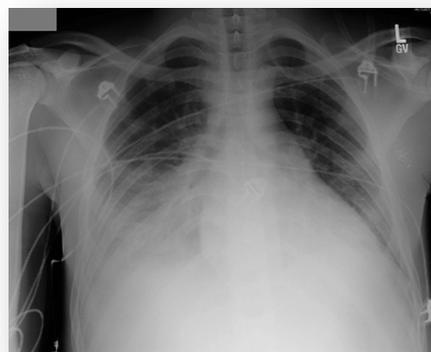
Im Jahre 2000 lag die Infektionsrate in weiten Teilen Europas, Asiens und in den USA bei weniger als 10 %, in den mediterranen Ländern bei 20-30 % und in Teilen der Sub-Sahara (Afrika) bei mehr als 50 % [58]. Wie hoch die Prävalenz von KSHV/HHV-8 in der Bevölkerung zur Zeit ist, lässt sich allerdings nicht eindeutig abschätzen [1].

KSHV/HHV-8 lässt sich in allen Formen von Kaposi-Sarkomen (epidemisch/ endemisch) nachweisen, wobei es vorzugsweise in Verbindung mit der Infektion mit dem HI-Virus auftritt [1]. 90 % der Patienten mit Kaposi-Sarkomen weisen Antikörper gegen KSHV/HHV-8 auf. Die Übertragung des Virus kann durch Speichel sowie durch den Sexualverkehr erfolgen [1; 61].

Die mögliche Ausbildung von Symptomen und Erkrankungen während der Primärinfektion ist noch ungeklärt. KSHV/HHV-8 zählt zu den Tumurviren und verursacht u.a. Kaposi-Sarkome, welche als lokale Tumore an der Haut auftreten (s. Abbildung 5). KSHV/HHV-8 kann bei einem kompetenten Immunsystem latent ohne Ausbildung von Symptomen, wie z.B. Fieber oder Hautausschlag, im humanen Organismus verbleiben. Bei Ausbildung einer Immundefizienz, z.B. durch HIV-Infektion, durch Organtransplantation oder Chemotherapie, kann die Virusinfektion mit KSHV/HHV-8 Kaposi-Sarkome ausbilden.



***Abbildung 5: kutanes Kaposi-Sarkom***  
*Abbildung 5 übernommen aus [62].*



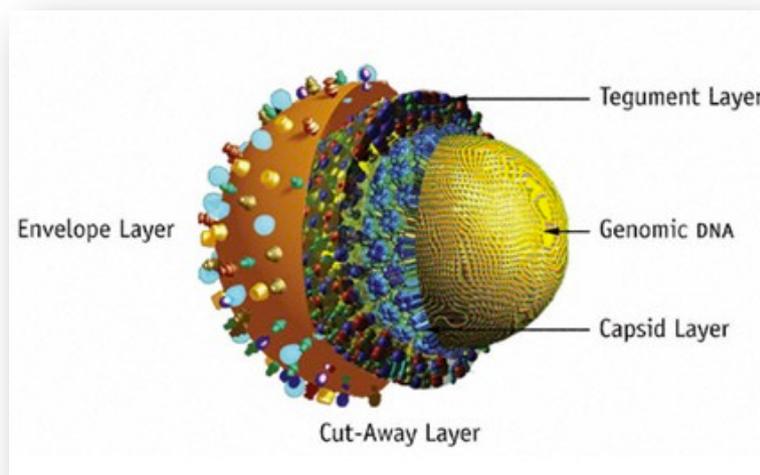
***Abbildung 6: Röntgenaufnahme der Brust bei einem Patienten mit primärem Effusionslymphom***  
*Abbildung 6 übernommen aus [63].*

Darüber hinaus lässt sich KSHV/HHV-8 in Effusionslymphomen (*primary body cavity-based lymphoma*, siehe Abbildung 6) in der Spätphase bei AIDS-Patienten nachweisen. Patienten, die an der multizentrischen *Castleman* Erkrankung (*Multicentric Castleman's Disease*) leiden, weisen ebenfalls eine KSHV/HHV-8 Infektion auf, wobei diese atypische lymphoproliferative Erkrankung zwar gehäuft, aber nicht ausschließlich bei Kaposi-Sarkomen vorkommt [64; 65].

### 1.3.2. Replikationszyklus

Das KSHV/HHV-8 Virus weist eine große, strukturelle Ähnlichkeit mit HSV-1 und anderen Herpesviren auf, wobei das Genom von KSHV/HHV-8 ca. 270 kbp umfasst und für ca. 90 Gene kodiert [1]. Wie bei HSV-1 und anderen Herpesviren ist das KSHV/HHV-8-Genom von einem ikosaedrischen Kapsid, den Tegumentproteinen sowie der äußeren Hüllmembran umschlossen (s. Abbildung 7).

Diese Hüllmembran inkorporiert neben den Lipiden auch virale Glykoproteine, welche gleichermaßen von essentieller Bedeutung bei der Anheftung und Penetration in die Wirtszelle sind wie bei anderen Herpesviren [1; 51]. Zu den Glykoproteinen der Hüllmembran von KSHV/HHV-8 zählen: gB (ORF8), gH (ORF22), gL (ORF47), gM (ORF 39) sowie gN (ORF 53) [51; 66; 67]. Des Weiteren weist KSHV/HHV-8 die sogenannten *unique lytic cycle-associated* Glykoproteine auf, nämlich ORF4, gpK8.1A, gpK8.1B, K1, K14 und K15 [51; 66; 67].



**Abbildung 7: Darstellung des Aufbaus eines Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirions (KSHV/HHV-8, 3-D Modell).** Abbildung 7 übernommen aus [68].

Die Anheftung und Bindung des Virus an die Wirtszelle sowie der virale Eintritt in die Zelle ist ein mehrstufiger Prozess, in den mindestens vier Glykoproteine (gB, gH/gL, gpK8.1) und verschiedene zelluläre Rezeptoren, wie z.B. Heparansulfatproteoglykane (HSPGs), verschiedene Integrine ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ) sowie der zelluläre Rezeptor *Ephrin receptor tyrosine kinase A2* (EphA2) involviert sind [69]. Die Anheftung des Virus an die Zelle wird durch das Glykoprotein gB vermittelt, welches an den Zelloberflächenrezeptor HSPG bindet [64; 70; 71]. Die initiale Anheftung an die Zelle durch Bindung an HSPGs ist vielen

Herpesviren gemein [72; 73]. Die Interaktion zwischen gB und HSPGs initiiert den zellulären Signalweg, welcher u.a. die Bindung von gH und gpK8.1 an Heparan Sulfat Moleküle umfasst. Dieser Initialbindung folgt die Interaktion von gB an verschiedene Integrine (α3β1 αVβ3 αVβ5 [64; 70]. Im Anschluss daran bilden die Glykoproteine gH und gL einen nicht-kovalenten Komplex, der für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle benötigt wird [70; 71; 74]. Dieser Glykoprotein-Komplex bindet an den zellulären Rezeptor EphA2 [69]. KSHV/HHV-8 Glykoproteine gB und gpK8.1 binden mit der gleichen Affinität wie die Glykoproteine gB und gC von HSV-1 an HSPGs [64; 75; 76].

Für den Eintritt in die Wirtszelle bevorzugt KSHV/HHV-8 die Endozytose, wobei die Beteiligung weiterer Glykoproteine und Rezeptoren für den viralen Eintritt noch nicht eindeutig identifiziert ist [70; 76–78].

Nach der Infektion bildet KSHV/HHV-8 eine Latenz in B-Lymphozyten oder endothelialen Zellen aus, wo u.a. das virale Antigen *LANA* (*latency-associated nuclear antigen, ORF73*) sowie weitere virale Gene, wie *viral cyclin* (*vCyclin, ORF72*), *viral FLICE inhibitor* (*vFLIP, ORF71*), *Kaposin* (*K12*), und ~12 virale *mikroRNAs* (*miRNAs*) exprimiert werden [1; 79].

Das Virus verbleibt während der Latenz als Episom in den Zellen, wo es über den zellulären Replikationszyklus repliziert. *LANA* bindet die virale DNA an zelluläre Chromosomen und supprimiert virale Gene, die für die lytische Replikation nötig sind. Die Reaktivierung des latenten Virus zur lytischen Replikation kann durch verschiedene Triggerfaktoren wie z.B. Inflammationen, Hypoxie oder chemische Substanzen [80; 81] erfolgen. Das virale Protein, welches den Übergang zwischen der latenten und lytischen Replikation startet, ist RTA (*replication and transcription activator*; Replikations- und Transkriptionsaktivator), welches durch ORF50 (*open reading frame 50*) kodiert wird.

Der vollständige lytische Replikationszyklus von KSHV/HHV-8 wird durch RTA induziert. Des Weiteren wird das RTA Protein zur Transkription der *immediate-early* Gene sowie zur Induzierung von einer Vielzahl an zellulären und viralen Genen benötigt [82–84]. Die Transkription der viralen Gene erfolgt wie bei HSV-1 kaskadenartig. Auf die *immediate-early* Gene folgt die Transkription der *early* Gene, welche essentiell für die virale DNA-Replikation sind und eine Transkription der *late* Gene zur Folge hat. Bedingt durch die Transkription der viralen Gene erfolgt die Synthese der viralen Nukleokapside, welche in das Cytoplasma freigesetzt werden. Hier erfolgt die Umhüllung der Nukleokapside und sie erhalten ihre endgültige Struktur. Die Virionen werden abschließend über die Plasmamembran freigesetzt [82–84].

## **1.4. Antivirale Therapien und Inhibitoren von HSV-1 und KSHV/HHV-8**

### ***1.4.1. Antivirale Therapie: topische und systemische Therapeutika bei HSV-1-Infektionen***

Die antivirale Therapie von Herpes labialis erfolgt topisch oder systemisch (oral oder intravenös) mittels verschiedener Virostatika und richtet sich nach der klinischen Symptomatik. Zu Virostatika werden Medikamente gezählt, die in den Vermehrungs- oder Freisetzungsprozess von Viren hemmend eingreifen und folglich zur Prävention oder Therapie von viralen Erkrankungen angewendet werden. Virostatika weisen unterschiedliche Wirkmechanismen auf und werden, je nachdem, wo sie in den viralen Replikationszyklus eingreifen, in unterschiedliche Gruppen unterteilt [85].

Bei milderem Verlauf einer Herpesinfektion werden überwiegend topische Präparate zur lokalen Anwendung verwendet. Cremes oder Salben mit antiviralen Substanzen, wie z.B. Aciclovir (ACV), Penciclovir, Vidarabin oder Tromantadin, zählen zu den gängigen topischen Therapeutika, wobei ACV als Wirkstoff überwiegend Verwendung findet. Des Weiteren werden antiseptische sowie antibakterielle Präparate zur symptomatischen Behandlung und Vermeidung von Sekundärinfektionen verwendet [4]. Neben der gängigen Therapie von Herpes labialis finden schmerzstillende Gele, Zinksulfat sowie Produkte mit natürlichen Inhaltsstoffen wie Melissenextrakt, Kamillenextrakt, Aloe Vera oder Teebaumöl vielfach Verwendung. Zusätzlich zur konservativen Therapie kommen homöopathische Mittel, wie z.B. Globuli bei Herpes labialis-Rezidiven, zum Einsatz [86–88]. Globuli stellen kleine Kügelchen dar, die vielfach aus einem Großteil Saccharose sowie Substanzen in erheblicher Verdünnung bestehen, denen eine heilende Wirkung zugesprochen wird.

Obwohl Herpes labialis schmerzhaft, unangenehm und kosmetisch sehr störend sein kann, ist eine topische frühzeitige Therapie bei immunkompetenten Menschen üblicherweise effektiv. Die Wirksamkeit von Cremes und Salben mit ACV in der Herpes Therapie wird in der Fachliteratur kontrovers diskutiert und Studien weisen unterschiedliche Ergebnisse auf. Die Verwendung sowie die Wirksamkeit von topischen aciclovir-haltigen Therapeutika wurde in den 1980er Jahren in einigen Studien als ineffektiv gegenüber Herpes labialis Rezidiven postuliert [89–91]. Andere Untersuchungen zeigten eine statistisch signifikante positive Wirkung von topischer Therapie mit ACV bei Herpes labialis [92]. Die Verringerung der Dauer des vesikulären Stadiums sowie der Heilungszeit zählten zu den gezeigten Therapieerfolgen [92; 93]. Untersuchungen bezüglich des Therapiebeginns sowie des Zeitpunktes der Applikation und deren möglicher Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie zeigten keinerlei Korrelationen [94–96]. Eine topische Therapie bei Herpes labialis im Prodromal- oder Erythemstadium (früher Therapiebeginn) zeigte keinen effektiven Wirkvorteil gegenüber einer Therapie im Papel- oder Vesiculaestadium (später Therapiebeginn) [94–96]. Da gängige Virustatika allerdings nur

während der Virusreplikation wirksam sind, sollte trotzdem frühzeitig mit der antiviralen Therapie vor Ausbildung der Läsionen begonnen werden, um den viralen Replikationszyklus rechtzeitig zu unterbinden und folglich einen optimalen Therapieerfolg zu erzielen [96].

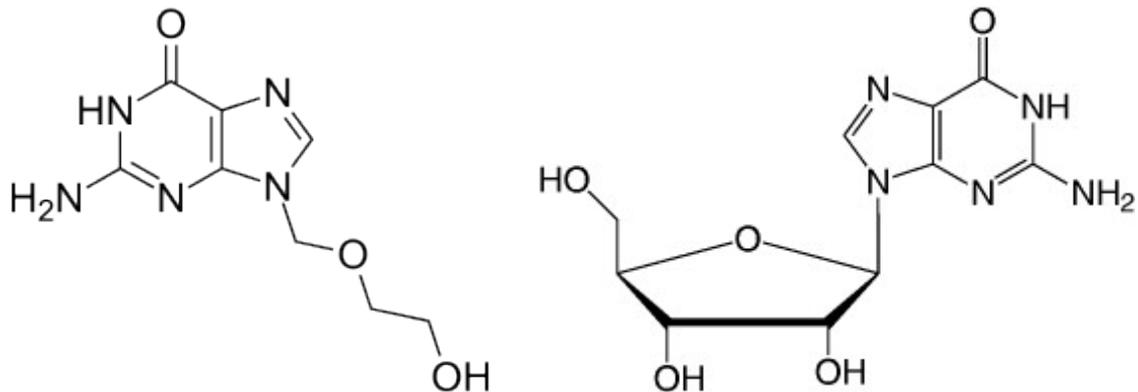
Da ACV eine sehr niedrige Penetrationsrate durch das Stratum corneum aufweist, besteht eine weitere Herausforderung der Therapie darin, eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration in die tiefer gelegenen Hautschichten der Epidermis einzubringen. Neben einem frühzeitigen Beginn der antiviralen, topischen Therapie ist eine hohe Dosierung des Therapeutikums nötig, damit der Wirkstoff in ausreichend hoher Konzentration den Wirkort erreicht [97–99].

Bei schwereren Krankheitsverläufen und häufig auftretenden Rezidiven sowie bei Patienten mit Immundefizienz wird die Herpesinfektion mit systemischen oralen Therapeutika behandelt. Neben ACV als Wirkstoff werden auch Valaciclovir, ein *Prodrug* von ACV, welches in ACV umgewandelt wird und eine gesteigerte Resorption aufweist, sowie Famciclovir, ein verwandtes Purinanalogs, eingesetzt. Valaciclovir weist mit 54 % im Gegensatz zu ACV eine 3 bis 5-fach höhere Bioverfügbarkeit auf, was den Vorteil einer geringeren Dosierung bei ähnlicher Wirksamkeit bietet [100]. Die Bioverfügbarkeit von ACV nach oraler Einnahme liegt zum Vergleich bei 10 bis 20 % mit einer gleichen Plasmahalbwertszeit von 2 bis 3 Stunden [101]. Durch die systemische Therapie wird die Virusreplikation gestoppt und die klinischen Symptome werden gemildert. Die Wirkung der Therapeutika erfolgt zeitnah nach Beginn der Einnahme. Des Weiteren wird die Neubildung von Läsionen vermindert und die Abheilung der Virusinfektion findet schneller statt. Die Ausbildung der viralen Latenz bei einer Primärinfektion wird durch die systemische Therapie nicht verhindert [4]. Studien belegen, dass der frühzeitige Beginn der systemischen Therapie im Prodromal- oder Erythemstadium die Abheilungsdauer signifikant verkürzt [102; 103].

Eine kurzzeitige Behandlung von Herpes-Rezidiven mit Virostatika hat ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Dauer der Herpesinfektion und wird als effektive Therapie angewandt [100]. Sehr häufig auftretende Herpes-Rezidive ( $> 6$  x pro Jahr) können mit einer Langzeit-Suppressionstherapie mit systemischen Virostatika über einen definierten Zeitraum wirksam behandelt werden. Bei Herpes labialis-Rezidiven, hervorgerufen durch einen bestimmten Triggerfaktor oder durch geplante mechanische Traumata, wie z.B. Laser oder Permanent Make-up Behandlungen, kann eine Suppressionstherapie als Prophylaxe über einen kurzen Zeitraum das Herpes-Rezidiv verhindern bzw. das Auftreten in Intensität und Dauer verringern [104].

### 1.4.2. Inhibition von HSV-1 durch Aciclovir

ACV stellt ein acyclisches Analogon des Guanosins (s. Abbildung 8), einem Bestandteil der Nukleinsäure, dar und inhibiert die virale DNA-Replikation von HSV-1.



**Abbildung 8: Strukturformel von Aciclovir (links) und Guanodin (rechts) im Vergleich.**

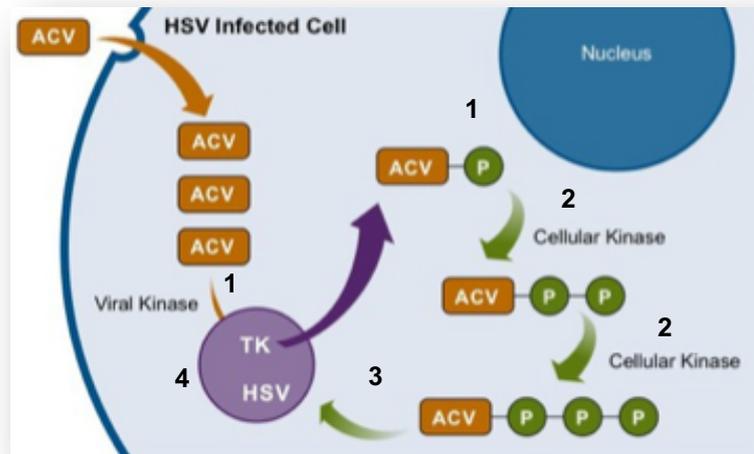
Die chemische Zusammensetzung und Bezeichnung von ACV lautet: 2-Amino-9-(2-hydroxyethoxy)methyl-1,9-dihydro-6H-purin-6-on. Die chemische Zusammensetzung und Bezeichnung von Guanodin lautet: 9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-2-amino-1H-purin-6-on. Abbildung 8 entnommen aus [105; 106].

ACV weist keine antivirale Aktivität auf, solange es nicht in die aktive Form des ACV Triphosphat umgewandelt wird. Dieser Prozess wird durch die virale Thymidinkinase katalysiert (s. Abbildung 9, Markierung 1).

Die virale Thymidinkinase (Tk), die weitaus effizienter (3000-mal) als die zelluläre Tk bei der Phosphorylierung wirkt, wandelt ACV in die Monophosphatform um (s. Abbildung 9, Markierung 2) Die Monophosphatform wird durch zelluläre Kinasen in zwei weiteren Phosphorylierungsschritten in das aktive Aciclo-GTP (Aciclo-Guanosintriphosphat) umgewandelt (s. Abbildung 9, Markierung 3) und durch die DNA-Polymerase zur DNA-Replikation verwendet.

Die Affinität von Acyclo-GTP zur viralen DNA-Polymerase ist weitaus höher (ca. 100 mal) als zur zellulären DNA-Polymerase (s. Abbildung 9, Markierung 4) Der Einbau von Aciclo-GTP führt zum Strangabbruch der DNA-Synthese. Dieser wird durch die fehlende 3'-OH-Gruppe beim Aciclo-GTP bedingt, da die 3'-OH-Gruppe für die Bindung des Desoxinukleotid-Triphosphat (dNTP) essentiell ist.

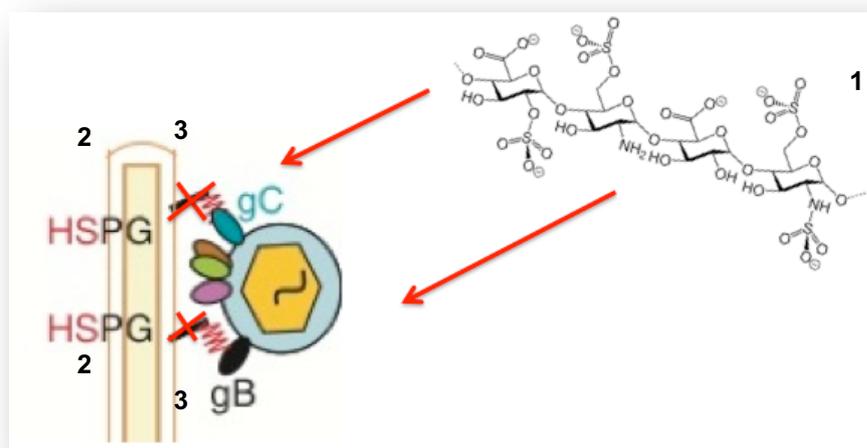
Die spezifische Inhibition des zellulären Stoffwechsels, bedingt durch die aktive phosphorylierte Form von ACV, findet auf Grund der viralen Tk nur in infizierten Zellen statt [1; 107; 108].



**Abbildung 9: Wirkmechanismus von Aciclovir bei HSV-1 Infektion.** (1) Aktivierung von ACV in der infizierten Zelle durch die virale Thymidinkinase in ACV Monophosphat. (2) Weitere Phosphorylierungen durch die zellulären Kinasen in Aciclo-GTP. (3) Die Verwendung von Aciclo-GTP zur DNA-Replikation durch die virale DNA-Polymerase (4) führt zum Strangabbruch der DNA-Synthese und folglich zur Inhibition von HSV-1. Abbildung 9 übernommen aus [109].

### 1.4.3. Inhibition von HSV-1 durch Heparin

Heparin und Heparansulfat-Glykosaminoglykan (HS-GAG) sind Polysaccharide, die strukturell sehr ähnlich sind, wobei Heparin das synthetische lösliche Analogon von Heparansulfat ist [110].



**Abbildung 10: Wirkmechanismus von Heparin bei HSV-1 Infektion.** (1) Heparin, als Strukturformel dargestellt, konkurriert mit Heparansulfatproteoglykan (2) um die Bindung an den Glykoproteinen C und B des HSV-1 Virus. Die initiale Anheftung des Virus an der Zelloberfläche wird durch Heparin verhindert. Abbildung 10 modifiziert nach [111].

Heparin wird üblicherweise in der medizinischen Therapie als Gerinnungshemmer eingesetzt und eignet sich entsprechend nicht zur klinischen Therapie von Herpes labialis Reaktivierungen. Im Gegensatz zu HS-GAG wird es primär in der Zellkultur zur antiviralen Forschung verwendet, und inhibiert die Anheftung (*attachment*) von HSV-1 an die Zielzelle. HS-GAG stellt einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix dar und wird von allen Zelltypen produziert.

Bei der Virus-Zell Interaktion ist die Anheftung von HSV-1 an den Zell-Oberflächen Rezeptor Heparansulfatproteoglykan (HSPG) für das initiale Anheften (*attachment*) des Virus an die Zelloberfläche essentiell, welche durch die Glykoproteine C und B vermittelt wird [73; 110–112].

Heparin (s. Abbildung 10, Markierung 1) konkurriert direkt mit HSPG (s. Abbildung 10, Markierung 2) um die Bindung an gC und gB (s. Abbildung 10, Markierung 3) und inhibiert dadurch die Anheftung des Virus an der Zelloberfläche [73; 110–112].

#### ***1.4.4. Antivirale Therapie bei KSHV/HHV-8-Infektionen***

Üblicherweise erfolgt die Therapie von lokalen Kaposi-Sarkomen mittels Chemotherapie oder Exzision. Die effektivste Therapie von Kaposi-Sarkomen bei AIDS-Patienten stellt eine anti-retrovirale Therapie von HIV dar [113]. Antivirale Therapeutika wie z.B. Ganciclovir oder Foscarnet, die die virale Replikation hemmen, haben sich als sehr effektiv bei der Prävention von Kaposi-Sarkomen bei AIDS-Patienten erwiesen, wobei die Therapie nach Ausbildung von Kaposi-Sarkomen mittels Virostatika erwiesenermaßen ineffektiv ist [79; 114; 115]. Dagegen weist ACV als antivirale Therapie zur Prävention von KSHV/HHV-8 nur eine sehr moderate Wirkung auf [79; 116; 117].

#### ***1.4.5. Inhibition von KSHV/HHV-8 durch Foscarnet und Heparin***

Foscarnet, auch bekannt unter der chemischen Nomenklatur Phosphono-ameisensäure (*phosphonoformic acid*, PFA) [118], ist ein Virostatikum, das bei der Therapie von verschiedenen Herpesviren z.B. HSV-1 und HSV-2, humanes Cytomegalievirus (HCMV) und Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV/HHV-8), verwendet wird [119]. Foscarnet wird überwiegend intravenös eingesetzt, wobei die Halbwertszeit im Blut bei durchschnittlich 5 Stunden [120; 121] und die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme bei 12 bis 22 % liegt [122]. Eine lokale topische Therapie von Viruserkrankungen mit Foscarnet ist ebenfalls je nach Symptomatik möglich. Foscarnet ist ein selektives Pyrophosphat-Analogon, welches die virale DNA-Polymerase sowie die reverse Transkriptase hemmt. Foscarnet bindet als selektiver

Inhibitor der viralen DNA-Polymerase direkt an der Pyrophosphatbindungsstelle, wodurch die DNA-Replikation gehemmt wird. Für die virale Inhibition benötigt Foscarnet im Vergleich zu ACV keine Phosphorylierung durch die Thymidinkinase [119; 120]. Die Blockierung der reversen Transkriptase ermöglicht eine Wirkung von Foscarnet bei HIV [123].

Heparin hat sich ebenso wie bei HSV-1 neben weiteren sulfatierten Polysacchariden [124] als potenter Inhibitor der KSHV/HHV-8 Infektion erwiesen [70; 71]. Die antivirale Wirkung von Heparin ist dosisabhängig, wobei der Wirkmechanismus mit der Blockierung der HSV-1 Infektion vergleichbar ist [70]. Durch die Bindung von Heparin an den Zelloberflächen-Rezeptor HSPG und die dadurch bedingte Sättigung der Rezeptoren wird die initiale Anheftung und Bindung des Virus an die Zielzelle verhindert. Der Eintritt des Virus in die Zelle sowie die dadurch initiierte, anschließende Signalinduktion wird verhindert [70; 71; 74]. Heparin verhindert neben HSV-1 und KSHV/HHV-8 Infektionen bei einer Vielzahl weiterer und Herpesviren die virale Infektion [73; 125–131].

### **1.5. Resistenzen gegenüber antiviralen Therapeutika: Herausforderungen und Konsequenzen für die antivirale Therapie**

Resistenzen gegenüber vielfach verwendeten wirksamen antiviralen Therapeutika, wie z.B. ACV, dessen *Prodrug* Valaciclovir, Ganciclovir und Foscarnet, können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entstehen [132; 133]. Durch die außerordentliche Verwendung von ACV als Virostatikum zur Prophylaxe sowie als Kurzzeit - oder Langzeittherapie von Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2 Infektionen und Rezidiven, stellen vor allem Resistenzen gegenüber ACV eine große Problematik dar. Resistenzen gegen ACV im Rahmen der Herpes-Therapie werden überwiegend bei immundefizienten Patienten nachgewiesen [134], was u.a. an einer geringeren Immunantwort gegenüber Viren und deren fortwährender Replikation liegt [12]. Die Prävalenz von ACV - Resistenzen bei immundefizienten Patienten liegt zwischen 3,5 bis 10 % [135–139] im Vergleich zu einer Prävalenz bei immunkompetenten Patienten von 0,1 bis 0,7 % [95; 135; 136; 139–142]. Drei Grundmechanismen sind für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber ACV bekannt: eine umgewandelte Spezifität der Tk, die Abwesenheit oder eingeschränkte Produktion der viralen Tk sowie eine alterierte virale DNA-Polymerase. Der häufigste Grund für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber ACV, der in klinischen Isolaten gefunden wurde, liegt in einer unzureichenden Tk Aktivität [143–146].

Vor allem bei der Therapie von immundefizienten Patienten sowie bei schweren Komplikationen der HSV Infektion, wie z.B. Ekzema herpeticatum, Herpes corneae oder Herpes keratitis, stellt die ACV - Resistenz eine große Schwierigkeit dar. Eine Resistenz

gegenüber oralem ACV hat in der Regel eine höhere Dosierung intravenös verabreichtem ACV oder die orale Therapie mit einem anderen Virostatikum zur Konsequenz. Bei Ausbleiben eines Therapieerfolges empfiehlt sich die intravenöse Gabe von Foscarnet bzw. Cidofovir in hohen Dosen [147]. Viele pflanzliche und marine Extrakte wurden in der Vergangenheit, zur Lösung dieser Problematik und Entwicklung neuer topischer Virostatika, hinsichtlich ihrer antiviralen Wirkung getestet [148; 149].

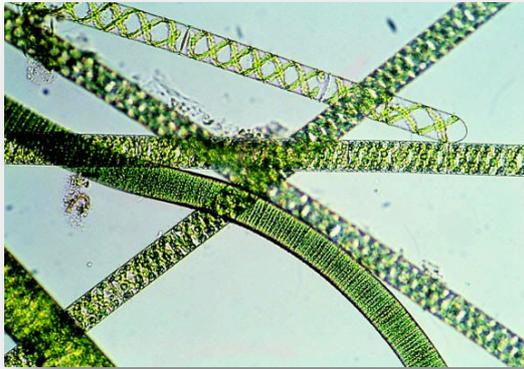
Auf Grund der Zunahme von Transplantationen und Krebserkrankungen ist ein Anstieg immundefizienter Patienten zu verzeichnen, die gehäuft Resistenzen gegenüber Herpes Simplex Virus Therapien aufweisen [147]. Folglich werden neue Therapeutika gegen HSV- Infektionen und - Reaktivierungen benötigt, deren Effektivität einem anderen Wirkmechanismus unterliegt und die bei ACV resistenten Herpes-Simplex-Viren effizient wirken.

### ***1.5.1. Spirulina platensis Mikroalgen: Algenspezies und Charakteristika***

*Spirulina platensis* (*S. platensis*), auch bekannt als *Arthrospira platensis*, zählt zu der Spezies der blau-grünen Mikroalgen (s. Abbildung 11 und 12). Unter dem lateinischen Wort „Alge“ werden Organismen zusammengefasst, die Chlorophyll enthalten sowie aus einem bewachsenen Habitus bestehen, der nicht in Wurzeln, Stamm und Blätter differenziert werden kann [150]. Ursprünglich wurden unter dieser Definition makroskopische marine Pflanzen wie Seegräser oder Tang aufgeführt, welche durch die Aufnahme von makroskopischen phototropen Organismen wie den Mikroalgen ergänzt wurde. *S. platensis* Mikroalge ist ein fadenförmiges, prokaryotisches Cyanobakterium. Folglich ist unter der Bezeichnung „Alge“ keine biologische Gruppierung sondern eine Lebensform zu verstehen, wobei Mikroalgen eine vielfältigere Taxonomie im Gegensatz zu höheren Pflanzen aufweisen [151]. Cyanobakterien zählen zu den ältesten Organismen und bewohnen die Erde seit mehr als 3 Milliarden Jahren [152]. Im Laufe der Zeit haben Cyanobakterien nahezu alle irdischen Habitate bevölkert und erscheinen in ihrer Morphologie, Physiologie und ihrem Metabolismus vielfältig divergent [153].

Die Synthese von hochgradig bioaktiven Stoffwechselprodukten ist eine lang bewährte Überlebensstrategie der Cyanobakterien gegenüber Rivalen [154; 155]. Diese Eigenschaft der Produktion bioaktiver Stoffwechselprodukte ist gegenwärtig bekannt und von vielfältigem, zunehmendem Interesse [156].

Mikroalgen und die daraus gewonnenen Extrakte werden u.a. in der Kosmetik, im Bereich der Gesundheit, in der Chemie sowie in der Lebensmittelindustrie und als Biokraftstoff verwendet. *S. platensis* wird auf Grund ihres hohen Proteingehaltes vorwiegend als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt, wobei die dafür verwendete Trockenmasse der Mikroalge aus 60 bis 70 % Proteinen besteht [157].



**Abbildung 11: *S. platensis* Trichome.**  
Zylinderförmige Filamente der Mikroalge.  
Abbildung 11 übernommen aus [159].



**Abbildung 12: *S. platensis* nach der Ernte**  
Abbildung 12 übernommen aus [158].

Der reichhaltige Nährstoffgehalt von *S. platensis* ist auf einen großen Anteil an Eisen und essentiellen ungesättigten Fettsäuren, vorwiegend - Linolsäure, zurückzuführen. Dieser erhebliche Anteil an - Linolsäure ist bislang einzigartig innerhalb der Spezies der Mikroalgen.

Des Weiteren weist *S. platensis* eine leicht verwertbare Zellwand auf. Die Mikroalge ist eine der reichhaltigsten natürlichen Pflanzenquellen von Vitamin B<sub>12</sub> sowie dem ganzen Spektrum des Vitamin B-Komplexes und natürlicher Karotine [160–162]. Außerdem enthält *S. platensis* Vitamin E, Phenolsäure, verschiedene Mineralien sowie Calcium Spirulan (Ca-SP). Es sind mehr als 35 Subspezies der Mikroalge bislang bekannt [163].

### **1.5.2. *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakt**

Die Verwendung von *S. platensis* als Nahrungsquelle hat eine lange Historie und wurde traditionell bei den Azteken und afrikanischen Völkern verwendet [164]. Eine natürliche Quelle von *S. platensis* stellen ausschließlich vulkanische Seen in Afrika, Mexiko und Myanmar mit einem hohen pH-Wert zwischen 9.5 - 10.5, dar [165; 166]. Industrielle Produktionen der Mikroalge, gewonnen aus den natürlichen Seen, finden überwiegend in Mexiko und Myanmar statt, wobei die kommerzielle Gewinnung der *S. platensis* Biomasse in seichten, offenen Becken in Kalifornien und Mexiko sowie u.a. auf Hawaii, in Japan und in China vollzogen wird [167].

Langfristige Kooperationen zwischen Wissenschaftlern aus Myanmar und Deutschland haben eine nachhaltige Produktion der *S. platensis* Biomasse unter kontrollierten Bedingungen sowie die Entwicklung einer geeigneten Technologie zur Herstellung von Extrakten aus der *S.*

*platensis* Biomasse sowie eine hohe Qualitätskontrolle ermöglicht. Die aus den Becken geerntete *S. platensis* Mikroalge wird in speziellen Behältern gelagert und von dort aus weiterverarbeitet. Durch verschiedene Waschschriffe und anschließende Trocknung der Biomasse unter hohem Druck entsteht eine teig-artige Algenmasse, welche mittels Extrudierverfahren weiterverarbeitet und erneut getrocknet wird. Die gewonnene *S. platensis* Biomasse wird u.a. für Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel sowie Kosmetikprodukte weiterverarbeitet [168–170].

Der *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakt (SPME), der in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, wurde in einem mehrstufigen patentierten Verfahren aus der Biomasse *S. platensis* gewonnen und in Ethanol rückgelöst. Das detaillierte Verfahren wird im Unterabschnitt 2.2.2. **Zur Gewinnung und Herstellung von *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakt** ausführlich beschrieben.

### 1.5.3. Calcium Spirulan

Calcium Spirulan (Ca-SP) ist ein intrazelluläres, sulfatiertes Polysaccharid, welches aus der Biomasse des *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extraktes (SPME) isoliert wird. Das aus der Alge gewonnene Polysaccharid Ca-SP zählt zu den Biopolymeren, deren vielfältige, biologische Wirkung auf das breite Spektrum der einzelnen Komponenten der Polysaccharide zurückzuführen ist.

Aus Algen gewonnene Polysaccharide wirken u.a. als Zell-Stabilisatoren während anhaltender Dehydrationsphasen. Durch die Fähigkeit, innerhalb weniger Minuten zu Rehydrieren, wird die Verschmelzung zellulärer Membranen verhindert. Außerdem verhindern Algen-Polysaccharide eine durch oxidativen Stress hervorgerufene Schädigung der Zellen und errichten eine Barriere gegen toxische Substanzen [171].

Algen-Polysaccharide gewinnen in der Forschung immer mehr an Bedeutung und besitzen zum Teil wichtige Eigenschaften für die Pharmakologie sowie für antivirale, antibakterielle und/oder anti-koagulierende Wirkungen. Auf Grund dieser biologischen Fähigkeiten und der physiochemischen Eigenschaften werden Polysaccharide aus Mikroalgen zunehmend für die Entwicklung neuer Medikamente eingesetzt und gewinnen auf Grund ihrer kolloidalen Fähigkeiten an Bedeutsamkeit für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie sowie in der Grundlagenforschung [171; 172].

Ca-SP setzt sich neben verschiedenen Zuckern (Rhamnose, 3-O-Methylrhamnose, 2,3-di-O-Methylrhamnose, Glukose, Galaktose, 3-O-Methylxylose) aus Uronsäuren (Galacturonsäure) sowie aus Sulfat Ester und Calcium zusammen.

Die chemische Analyse von Ca-SP hat die folgende Zusammensetzung ergeben:

<b>Bekannte Bestandteile von Calcium Spirulan</b>	
Rhamnose	39,0%
Glukose	17,7%
Galaktose	8,5%
Xylose	16,7%
Galakturonsäure	18,1%
Sulfat Ester	8,9%

**Tabelle 1: Bekannte Bestandteile von Ca-SP in %;  
Zusammengestellt nach [173–175].**

Das in dieser Arbeit untersuchte *Ca-SP* wurde aus dem SPME isoliert und in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst verwendet. Die Isolierung von Ca-SP aus SPME ist detailliert im Unterabschnitt 2.2.3. **Über die Isolierung von Calcium Spirulan aus dem *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakt** erläutert.

#### **1.5.4. Bisherige Forschung - Wirkung von *Spirulina platensis* und Calcium Spirulan**

Die bisherige Untersuchung von *S. platensis* umfasst hauptsächlich die Erforschung als Nahrungsergänzungs- und Lebensmittel in Tiermodellen [176]. Die Fütterung mit *S. platensis* zeigte im Tiermodell unter Stimulation des Immunsystems eine Zunahme der phagozytischen Aktivität und der Antikörperbildung sowie eine Mobilisierung der T- und B-Zellen im Blut [177]. Weitere Studien, die überwiegend in Nagetiermodellen durchgeführt wurden, zeigen auf, dass ein Zusammenhang zwischen der anti-oxidativen Wirkung von *S. platensis* und protektiven Eigenschaften gegenüber der Schädigung verschiedener Organe, wie z.B. Leber, Herz und Niere, im Tiermodell besteht [178–180]. Alle oben erwähnten Studien wurden ausschließlich im Tiermodell bei oraler Gabe von *S. platensis* durchgeführt. Die Untersuchung von *S. platensis* als Nahrungsergänzungsmittel bei Nagetieren sollten als kritisch angesehen werden in Bezug auf die protektiven Eigenschaften beim Menschen. Aussagen über die Sicherheit und Wirksamkeit von *S. platensis* lassen sich auf Grund dieser Daten nicht treffen.

Eine aktuelle Studie [181] konnte bedingt durch die orale Gabe von *S. platensis* eine Reduktion der UV-induzierten Hautentzündungen in Zusammenhang mit der Karzinogenese in Wildtyp-Mäusen nachweisen. Eine positive Korrelation zwischen der oralen Gabe von *S. platensis* und einer verringerten epidermalen DNA-Schädigung bedingt durch 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin bei Mäusen wurde ebenfalls in immunhistochemischen Analysen nachgewiesen [181]. Als Limitierung dieser Studie ist die verwendete Kontrollgruppe der Mäuse zu nennen. Als Kontrollgruppe dienten historische Daten von Mäusen, die mit den aktuellen Daten der Mäuse aus dieser Studie verglichen wurden. Die Gruppe der Mäuse war zudem sehr klein und 40% der Gesamtpopulation wies am Ende der Studie maligne Tumore auf.

Die Wirkung von *S. platensis* auf den Menschen ist dagegen bislang wenig publiziert.

Eine Studie, die die Blut-Zellen von gesunden männlichen Probanden nach der regelmäßigen oralen Einnahme von *S. platensis* untersuchte, konnte einen positiven Zusammenhang zwischen der Einnahme von *S. platensis* und einer gesteigerten Immunabwehr sowie Interferon-Produktion, bedingt durch die Stimulation des Immunsystems mittels BCG Gabe (*Bacillus Calmette-Guérin*, Tuberkuloseimpfstoff), zeigen [182]. Auch in dieser Studie wurde die protektive Wirkung von *S. platensis* als Nahrungsergänzungsmittel untersucht. Allerdings lassen diese Daten auf Grund der Stimulation der Blut-Zellen *in vitro* lediglich eine indirekte Beurteilung der Wirkung auf den Menschen zu.

Die publizierten Ergebnisse zur antiviralen Wirkung von SPME beziehen sich ausschließlich auf die Untersuchung eines Heißwasser-Extraktes, gewonnen aus *S. platensis*. Eine antivirale Wirkung dieses Extraktes gegen HSV-1 Infektionen konnte in Vero-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze, *African Green Monkey Kidney Cells*) mit einer ED<sub>50</sub> (mittlere Effektivdosis) von 173 µg/ml, gemessen mittels *Virus yield-Reduktionsmethode*, und HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) nachgewiesen werden [183].

Die antivirale Wirkung von *S. platensis* wird auf ein sulfatiertes Polysaccharid zurückgeführt, welches als Calcium Spirulan (Ca-SP) benannt wurde [184]. Untersuchungen zur antiviralen Wirkung von Ca-SP, getestet in Vero-Zellen mittels *Virus yield-Reduktionsmethode* zu verschiedenen Zeitpunkten der Virusinfektion, zeigten eine Blockierung der HSV-1 Penetration der Wirtszelle [184]. Die indirekte Nachweismethode (*Virus yield-Reduktionsmethode*) der antiviralen Wirkung von SPME und Ca-SP sowie die fehlenden Kontrollen von wirksamen, bekannten Inhibitoren gegen HSV-1 sind als Problematik dieser Studien eindeutig zu nennen.

Weitere strukturelle Analysen von Ca-SP ergaben, dass die Chelatbildung der Calcium Ionen mit sulfatierten Gruppen essentiell für die antivirale sowie für die antikoagulierende Wirkung ist [174; 175; 184]. Die Untersuchungen von intra- und extrazellulären Polysacchariden, gewonnen

aus der *Arthrospira platensis*, die chemische und strukturelle Ähnlichkeiten mit Ca-SP aufweisen, zeigten ebenfalls eine antivirale Wirkung gegenüber HSV-1 und anderen Herpes-Viren [185]. Ob weitere Komponenten von *S. platensis* für die antivirale Wirkung verantwortlich sind, ist bislang nicht bekannt und läßt sich auf Grund der aktuellen Datenlage nicht ausschließen. Eine antivirale Wirkung gegenüber HCMV (Humanes Cytomegalievirus), HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), Influenza, Masern und Mumps-Virus konnte ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden [177; 178; 186; 186]. Die Bestätigung dieser antiviralen Effekte von *S. platensis* und den daraus isolierten Polysacchariden auf die zuvor genannten Virusinfektionen *in vivo* ist bislang nicht publiziert.

Neben der antiviralen Wirkung zeigte Ca-SP eine Stimulation der Stoffwechselaktivität und positive Effekte auf die Kollagensynthese von Fibroblasten. Eine anti-inflammatorische Wirkung gegenüber der UV-A induzierten Schädigung von Fibroblasten konnte ebenfalls gezeigt werden [173]. Diese protektiven Eigenschaften von Ca-SP konnten *in vitro* nachgewiesen werden, was lediglich Vermutungen über die Wirkung beim Menschen *in vivo* zulässt.

Ferner konnte eine anti-bakterielle und anti-fungale Wirkung von *S. platensis* im Tiermodell sowie *in vitro* nachgewiesen werden [187; 188]. Die Untersuchung einer *S. platensis* enthaltenen topischen Formulierung hinsichtlich anti-bakterieller Effekte erfolgte *in vitro*. Hierfür wurden Präparate von Mäusen (Ohren) und Kühen (Euter) mit einer topischen Formulierung behandelt und auf die bakterielle Besiedlung von MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) analysiert [188]. Die notwendige Bestätigung dieser anti-bakteriellen Wirksamkeit von topisch applizierten *S. platensis* Extrakten beim Menschen ist bislang allerdings nicht publiziert.

Die Untersuchungen von *S. platensis* und Ca-SP zeigen bislang eine Vielzahl von protektiven Eigenschaften auf. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind diese Daten allerdings überwiegend auf die Erforschung im Tiermodell sowie auf die Analyse als Nahrungsergänzungsmittel beschränkt. Eine Relevanz dieser Ergebnisse für die Wirkung auf humane Virusinfektionen bleibt daher kritisch anzumerken. Weitere Limitierungen dieser Studien stellen die indirekten Nachweismethoden [185] und fehlenden Kontrollen dar. Die Untersuchung der Wirkmechanismen sowie potentieller Nebenwirkungen *in vivo* ist ebenfalls von Bedeutung bei der Entwicklung neuer Therapien bei humanen Virusinfektionen und der Lösung der Resistenzen gegenüber gängigen Herpes-Therapien.

## 1.6. Permanent Make-up (PMU)-Behandlungen

Für die klinische Untersuchung wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein klinisches Modell gesucht, welches sich für die Erforschung der topischen und systemischen Prophylaxe und Therapie von Herpes labialis eignet. Permanent Make-up (PMU) stellt hierbei das optimale klinische Herpes labialis-Modell dar, weshalb die klinische Untersuchung im Rahmen von PMU-Behandlungen durchgeführt wurde.

PMU, auch als Mikropigmentierung oder Conture Make-up bezeichnet, ist eine Behandlung, die Pigmente mittels elektrischer oder manuell betriebener Nadeln in die Dermis (siehe Abbildung 13) einbringt [189].

Die Mikropigmentierung stellt eine kosmetische Tätowierung von mittelfristiger Dauer dar [190]. PMU-Behandlungen werden vorwiegend in PMU-Instituten durchgeführt, wobei sie in kosmetische und medizinische Pigmentierung differenziert werden. Die medizinische Pigmentierung umfasst neben Behandlungen bei Alopecia Areata, Vitiligo und Lippen-Vitiligo u.a. auch Narbenretouchierungen oder Mammillenrekonstruktionen [191].

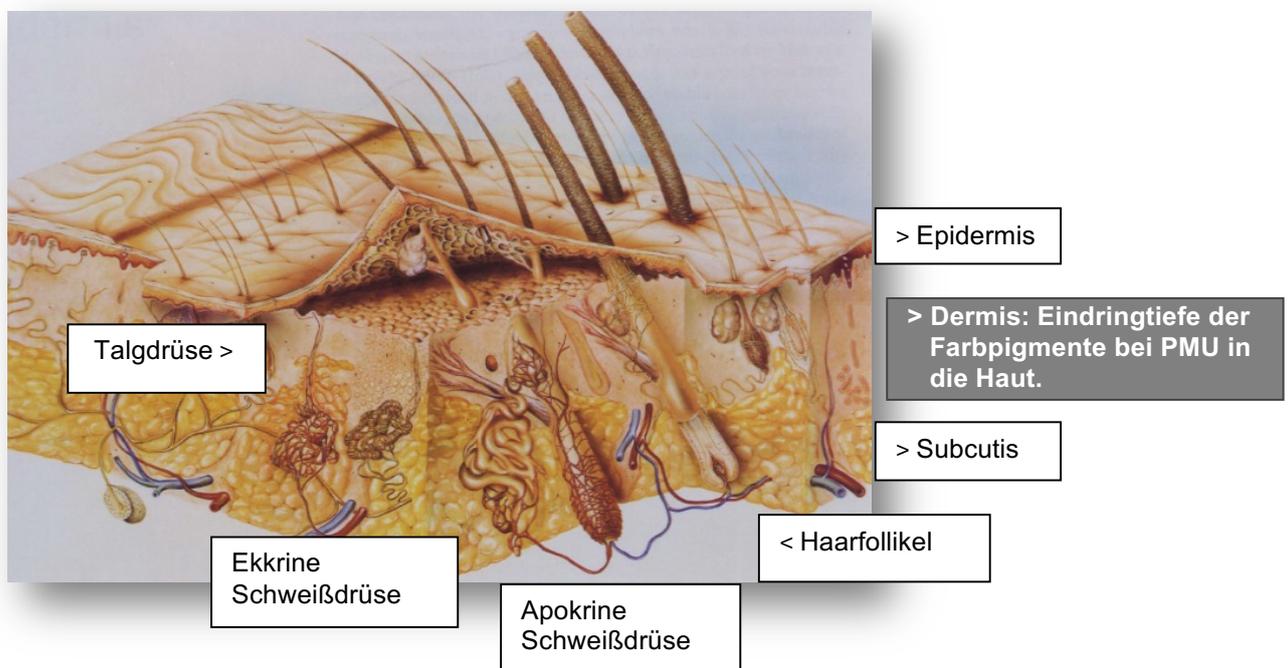


Abbildung 13: Aufbau der Haut. Abbildung 13 entnommen aus [192].

Medizinische Pigmentierungen werden außerdem ergänzend nach operativen Verfahren eingesetzt, z.B. nach Rekonstruktionen. Zu den kosmetischen Pigmentierungen zählen rein ästhetische Behandlungen wie z.B. die Pigmentierung des Lidstrichs, der Augenbrauen, der Lippenkontur oder Vollschattierung der Lippen. Die Pigmentierung von konturlosen Lippenrändern, hervorgerufen durch ausgeprägte Herpes labialis-Rezidive, zählt ebenfalls dazu [193].

Bei der Mikropigmentierung werden mittels feinsten Spezialnadeln Farbpigmente mit einer Partikelgröße von  $\approx 6 \mu\text{m}$  zwischen die obere und mittlere Dermis eingebracht. Die Farbpigmente sind intra- und extrazellulär dauerhaft fixiert, wobei ein Teil der Pigmente nach einiger Zeit ( $\approx 3$  Jahre) von Phagozyten aufgenommen und über die Phagozytose abgebaut wird. Die bei der Mikropigmentierung verwendeten Farbpigmente sollten metabolisch inaktiv, nicht toxisch, nicht allergen jedoch gewebsstabil sein [189]. Die Farbpigmente, die in die Haut eingebracht werden, unterliegen auch in Deutschland den Regulationen der FDA (Food and Drug Administration [194]). Die Pigmentiertechniken sind vielfältig und umfassen, z.B. *Conturing* (Pigmentieren einer Kontur), *Shade* (Schattierungen), *Point-to-Point* (Regulation des Hautbildes mittels Farbangleich), *U-Turn-Shade* (um Stellen zwischen Conturing und Shade zu schließen) und *Camouflage* (Farbangleichung). Da es durch das Einbringen der Farbpigmente in die Haut zu einer Verletzung der Epidermis und Dermis kommt, ist das Risiko für bakterielle sowie virale Infektionen sowie weitere Komplikationen wie z.B. Blutungen (Minuten bis zu einer Stunde), Schwellungen (2-5 Tage), Krustenbildung (2-3 Tage) und allergischen Reaktionen sehr hoch. Ebenso kann es zu einer hypertrophen Narben- und Keloidbildung kommen sowie zum Verlust von Wimpern und zu Vernarbungen auf dem Augenlid [189; 190; 193].

### ***1.6.1. Risiko von Herpes labialis bei PMU-Behandlungen***

PMU-Behandlungen der Lippen sowie andere kosmetische Verfahren, wie z.B. tiefere Dermabrasionsbehandlungen, periorale Laserbehandlungen sowie Botulinumtoxin Injektionen, können bedingt durch die mechanische Reizung eine Reaktivierung der Herpes labialis-Infektion hervorrufen [104; 195; 196]. Diese Reaktivierung, die bei seropositiven HSV-1-Patienten auftritt, zählt zu den am häufigsten vorkommenden, ungewollten Nebeneffekten der Mikropigmentierung [189]. Als Resultat dieser Herpes labialis-Reaktivierung können die in die Dermis eingebrachten Pigmente nicht dauerhaft fixiert und folglich vom Lymphsystem abgetragen werden. Weitere PMU-Behandlungen mit dem erneuten Risiko der Herpes labialis-Reaktivierung sind die Folge. Eine multifaktorielle Reaktivierung der Herpes labialis-Infektion, bedingt durch verschiedene Triggerfaktoren, wird ebenfalls postuliert. Neben mechanischen Traumata werden emotionalem Stress und Angst vor der Behandlung eine große Bedeutung

zugesprochen [195]. Herpes labialis-Rezidive nach Traumata, wie z.B. PMU-Behandlungen aber auch Zahnoperationen, verlaufen häufig besonders intensiv oder können mehrere Infektionsschübe zur Folge haben [104; 195; 197]. Aus diesem Grund zählen HSV-1 seropositive Patienten, die eine Mikropigmentierung im Bereich der Lippen durchführen lassen möchten, zu einer Hochrisiko-Gruppe [189; 193].

Eine weitere Hochrisiko-Gruppe bei PMU-Behandlungen stellen Patienten mit atopischer Dermatitis dar, bei denen eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Herpes - Rezidiven nachgewiesen werden konnte [198–200]. Als Gründe dafür werden eine defekte Hautbarriere sowie verminderte zelluläre Abwehrmechanismen gegenüber Viren diskutiert [199]. Eine gesteigerte Virusreplikation konnte bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunder Haut nachgewiesen werden [198].

Eine schwerwiegende Erkrankung im Rahmen der Herpesinfektion stellt das Ekzema herpeticum dar. Die flächenhafte Infektion der Haut mit herpetiformen Bläschen, die überwiegend durch HSV-1 hervorgerufen und bedingt durch HSV-2 Infektionen verursacht wird, kann komplikationsbedingt zu einer Herpessepsis oder Herpes-Simplex-Enzephalitis führen. Das Ekzema herpeticum tritt mit einer Korrelation von 10-20 % bei Patienten mit atopischer Dermatitis auf [201].

Patienten, die durch ein gesteigertes Risiko von Herpes labialis-Rezidiven bei PMU-Behandlungen zur Hochrisiko-Gruppe zählen, erfordern ein hohes Maß an effektiver, prophylaktischer und therapeutischer antiviraler Therapie.

### ***1.6.2. Prophylaxe und Therapie bei PMU-Behandlungen***

Die Therapie von Herpes labialis bei PMU-Behandlungen umfasst Virostatika, die keinen Effekt auf die Latenz des Virus haben, aber die Häufigkeit und den Schweregrad der Herpes labialis Reaktivierung reduzieren. Das Nukleosidanalogon ACV wird überwiegend in der topischen und systemischen Therapie verwendet [107]. ACV und andere antiherpetische Wirkstoffe, wie z.B. Valaciclovir, Penciclovir, Cidofovir oder Foscarnet, verhindern die virale Replikation durch Blockierung der viralen DNA-Synthese. Verschiedene Studien haben die Wirksamkeit von ACV gegen Herpes labialis-Rezidive belegt, wobei die Entstehung von Resistenzen gegenüber ACV, wie bereits erwähnt, ein Problem darstellt [96; 202].

Um das Risiko der Herpes labialis-Reaktivierung, ausgelöst durch PMU-Behandlungen, zu minimieren, ist eine prophylaktisch verwendete antivirale Therapie ratsam. Die topische oder

systemische Herpes labialis-Prophylaxe sollte während der gesamten Dauer der PMU-Behandlung und therapeutisch nach der Behandlung eingenommen werden, um ein Herpes labialis-Rezidiv zu vermeiden. Systemische Therapeutika können bei Auftreten einer Herpes labialis-Reaktivierung die Intensität und Dauer des Rezidivs mindern [196]. Nach der PMU-Behandlung ist eine antivirale Therapie essentiell, um ein aufgetretenes Herpes labialis-Rezidiv schnellstmöglich einzudämmen und zu verhindern, dass das Ergebnis der Pigmentierung durch eine Herpes-Reaktivierung negativ beeinflusst wird [189; 191]. Neben der topischen und systemischen antiviralen Therapie werden nach der PMU-Behandlung vielfach Pflegeprodukte verwendet, um die Austrocknung der Lippen, bedingt durch die Pigmentierung und Abheilung, zu vermindern. Die Rezeptur des Pflegeproduktes ist dabei von größter Bedeutung, da falsche Inhaltsstoffe, wie z.B. Kortison, häufig die Ursache dafür sind, dass Phagozyten die eingebrachten Farbpigmente aufnehmen und aus der Haut migrieren. Neben konservativen topischen und systemischen Virostatika werden Hausmittel, homöopathische Globuli sowie pflanzliche Extrakte, wie z.B. Aloe Vera, Kamillen- oder Melissen-, und ätherische Öle vielfach bei PMU-Behandlungen als natürliche Herpes-Therapie verwendet. Einigen pflanzlichen Extrakten und ätherischen Ölen konnten antiherpetische Eigenschaften nachgewiesen werden, und ausgewählte ätherische Öle wiesen in Studien eine geringe Toxizität sowie eine hohe antivirale Wirksamkeit auf [203; 204].

Einheitliche Standards in der prophylaktischen und therapeutischen antiviralen Therapie bei PMU-Behandlungen gibt es nicht, was vor allem für Patienten der Hochrisiko-Gruppen ein erhebliches Risiko der Herpes labialis-Reaktivierung mit möglichen schwerwiegenderen Verläufen bedeutet.

Auf Grund der Entstehung von Resistenzen gegenüber ACV sowie der fehlenden Standards werden antivirale Therapeutika benötigt, die mit einer gesteigerten Wirksamkeit und einem anderen Wirkmechanismus eine effizientere Alternative zur konventionellen Herpes-Therapie mit Nukleosidanaloga bieten.

### **1.7. Zielsetzung der Forschungsaufgabe**

Frühere Studien mit einem Heißwasser-Extrakt aus *S. platensis* deuteten auf eine antivirale Wirkung gegenüber Herpes Simplex Viren (HSV) sowie einigen anderen Herpesviren hin [183; 205]. Des Weiteren ergab sich aus diesen frühen Arbeiten der Verdacht, dass das aus der Mikroalge *S. platensis* isolierte Polysaccharid Calcium Spirulan eine Hemmung früher Schritte der Virus-Zell-Interaktion bewirken und für die antivirale Wirkung verantwortlich sein könnte [184; 186].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die experimentelle und klinische Erforschung antiviraler Effekte eines *S. platensis* Mikroalgen-Extrakts sowie dem daraus isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan. Diese Effekte sollten mit folgenden Schritten untersucht werden:

(1) Zunächst sollten die antiviralen Effekte eines definierten Extrakts aus *S. platensis* sowie hochgereinigtem Calcium Spirulan gegenüber Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) in einer typischen empfänglichen Zelllinie mit verschiedenen Methoden eindeutig belegt werden. Diese Experimente sollten mit einer humanen Keratinozytenzelllinie wiederholt werden, um potentielle antivirale Effekte an einer natürlichen HSV-1 Wirtszelle [206] nachweisen zu können.

(2) Des Weiteren sollte der Wirkmechanismus von Calcium Spirulan sowie des *S. platensis* Extrakts im Vergleich zu Modellsstoffen wie Heparin (hemmt die Anheftung von HSV an die Wirtszelle) und Aciclovir (hemmt die virale DNA-Replikation) bei HSV-1 aufgeklärt werden.

(3) Neben der experimentellen Untersuchung sollte das therapeutische Potenzial von Calcium Spirulan und dem *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurde eine topische Formulierung, bestehend u.a. aus dem *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt sowie Calcium spirulan, hinsichtlich ihrer Wirkung auf Herpes labialis in einer Hochrisiko-Gruppe im Rahmen eines klinischen Modells der mechanischen Herpes labialis-Reaktivierung durch Permanent Make-up (PMU) getestet.

(4) Schließlich sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die antiviralen Wirkungen von Calcium Spirulan auf Effekte gegenüber HSV beschränken, oder ob auch andere Viren der Herpesgruppe gehemmt werden könnten. Dafür sollte das antivirale Wirkspektrum von Calcium Spirulan auf das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus, dem wichtigen viralen Auslöser einer malignen Entartung kutaner Endothelzellen und damit der Entwicklung eines Kaposi-Sarkoms, untersucht werden. Die Gewinnung erster Hinweise zum möglichen Wirkmechanismus von Calcium Spirulan auf KSHV/HHV-8-Infektionen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

## 2. MATERIAL – eingesetztes Material, genutzte Substanzen und weitere Hilfsmittel

In den nachfolgenden Unterabschnitten 2.1. und 2.2. werden jene Materialien, Substanzen und weitere Hilfsmittel in erstellten Tabellen, Übersichten sowie als bloße Angaben aufgelistet und benannt (z.T. untersuchungsbezogen konkretisiert bzw. ergänzt), die bei den in der erfolgten Forschungsarbeit angewandten Methoden (siehe Abschnitt 3. der vorliegenden Arbeit) verwendet wurden.

### 2.1. Material – Die experimentelle Untersuchung betreffend

#### 2.1.1. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium	Beschreibung
<b>Vero</b>	ATCC CCL-81	DMEM 8 % FCS, 1 % PS	epitheliale Nierenzellen der afrikanischen, grünen Meerkatze; Interferon alpha und beta Defizienz, Interferon-Rezeptor ist vorhanden
<b>HaCaT</b>	CLS Nr. 300493	DMEM 10 % FCS, 1 % PS	spontan transformierte humane Keratinozyten
<b>RPE-1</b>	ATCC CRL-4000	DMEM 10 % FCS, 1 % PS	humane retinale Pigment-Epithelzellen, immortalisiert mit hTERT

**Tabelle 2: Zelllinien**

#### 2.1.2. Zellkulturmedium und Puffer

*Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) mit Glucose (PAA Laboratories GmbH)

*RosKavität Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI) mit L-Glutamin (Life Technologies)

Dulbeccos PBS (D-PBS) ohne Calcium und Magnesium (PAA Laboratories GmbH)

Trypsin (PAA Laboratories GmbH)

Fötales Kälber Serum (FCS) (PAN Biotech GmbH)

**2.1.3. Viren**

Virus	Beschreibung	Referenz
HSV-1, strain17+	$\alpha$ -Herpesvirinae, GenBank NC_001806.1	[6]
KSHV/HHV-8-LYT	$\gamma$ -Herpesvirinae, BAC 16 basiertes, GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) exprimierendes (lytisch replizierendes) KSHV/HHV-8	[208]

Tabelle 3: Viren

**2.1.4. Antibiotika**

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Anwendung	Hersteller
Penicillin	100 U/ml	Zellkulturmediumzusatz	PAA
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml	Zellkulturmediumzusatz	PAA

Tabelle 4: Antibiotika

**2.1.5. Oligonukleotide**

Primerbezeichnung	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'	Anwendung
HSV1-qPCR-1-FOR	GGTAGGTCTTCGGGATGTAAAG	PCR / qPCR
HSV-1-qPCR-1-REV	CTAAACCTGACTACGGCATCTC	PCR / qPCR
HSV-1-qPCR-2-FOR	GGGATTAGCGTAAGGATGATGG	PCR / qPCR
HSV-1-qPCR-2-REV	CAACAACCTCGGTCCCGTAAA	PCR / qPCR
KSHV-ORF25-FOR	GGTCCACCCCTTCTTTGATT	PCR / qPCR
KSHV-ORF25-REV	GCGAGCGGTTGTGGTATATT	PCR / qPCR
ACTB-qPCR2-FOR	GCTGAGGCCAGTTCTAAAT	PCR / qPCR
ACTB-qPCR2-REV	TTCAAGTCCCATCCCAGAAAG	PCR / qPCR

Tabelle 5: Primer-Sequenzen

### 2.1.6. Kit-System und Enzyme

#### Kit-System

innuPREP DNA Mini Kit (Analytic Jena AG)

#### Enzyme

DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas GmbH)

Proteinase K (Fermentas GmbH)

### 2.1.7. Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Hergestellt in	Verdünnung	Beschreibung / Referenz
Nucleolin	mAB, C23, MS-3	Maus	IF: 1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
VP16 (HSV-1)	V4388	Kaninchen	IF: 1:100 FACS: 1:50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ORF45 (KSHV)	sc-53883	Maus	FACS: 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabelle 6: verwendete Primärantikörper

Antigen & gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff	Bezeichnung	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ - Kaninchen AlexaFluor 488	Anti-Kaninchen	IF: 1:500 FACS: 1:500	Invitrogen
$\alpha$ - Maus AlexaFluor 555	Anti-Maus	IF: 1:500	Invitrogen
$\alpha$ - Maus AlexaFluor 888	Anti-Maus	FACS: 1:500	Invitrogen

Tabelle 7: verwendete Sekundärantikörper

### 2.1.8. Größenstandards

DNA-Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas GmbH)

### **2.1.9. Chemikalien und Reagenzien**

Standardchemikalien, Reagenzien, Lösungen und Lösungsmittel wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Merck KGaA oder AppliChem GmbH bezogen. Alle anderen Chemikalien wurden vom jeweils angegebenen Hersteller bezogen.

Agarose

Aqua Poly/Mount (Polyscience Inc.)

Cycloheximid (CHX)

DAPI

dNTP Mix

DRAQ5

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Essigsäure

Ethanol

Ethidiumbromid

Gelatine

IgG (Immunglobulin G) human

Isopropanol

Kristall-Violett

Methanol

MTS Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega GmbH)

Natriumchlorid

Natriumhydrogenphosphat

Paraformaldehyd

PMS (phenazine methosulfate) (Promega GmbH)

Staurosporin (STS)

Sybr<sup>®</sup> Green I (Life Technologies)

Trizma (Tris)

Triton-X 100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)

Wasser (H<sub>2</sub>O)

### **2.1.10. Inhibitorische Substanzen/ Virostatika**

Aciclovir (ACV; Sigma-Aldrich GmbH); 700 µg/ml in H<sub>2</sub>O; bei -20°C gelagert

Calcium Spirulan (Ca-SP; IGV GmbH, Potsdam); 1 %-ige Lösung in H<sub>2</sub>O; bei 4°C gelagert

Heparin Natrium Salz (Sigma-Aldrich GmbH); 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O; bei -20°C gelagert

Foscarnet (PFA; Sigma-Aldrich GmbH); 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O; bei -20°C gelagert

Spirulina platensis Mikroalgen-Extrakt (SPME; IGV GmbH); 268,75 mg/ml in Ethanol (98 %);  
bei 4°C gelagert

### **2.1.11. Puffer und Lösungen**

#### **FACS**

- Paraformaldehyd in PBS 2 % (Fixier-Lösung) Lagerung bei -20°C
- Saponin in PBS 0,1 % (Permeabilisierungs-Lösung) Lagerung bei 4°C
- BSA in PBS 1 % (Beschichtungs-Lösung) Lagerung bei 4°C

#### **IgG (Sigma-Aldrich GmbH)**

Humanes IgG zur Prävention von späteren HSV-1 Infektionen via Medium

- Humanes IgG 1 mg/ml
- gelöst in DMEM
- Lagerung bei -20°C

#### **Immunfluoreszenz**

- Gelatine in PBS 0,4 % (Beschichtungs-Lösung) Lagerung bei 4°C
- Paraformaldehyd in PBS 4 % (Fixier-Lösung) Lagerung bei -20°C
- Ammoniumchlorid 50 mM (Aldehyd-Blockierungs-Lösung) Lagerung bei 4°C
- TritonX-100 in PBS 0,3 % (Permeabilisierungs-Lösung) Lagerung bei 4°C
- Gelatine in PBS 0,2 % (Blockierungs-Lösung) Lagerung bei 4°C

#### **Kristall-Violett (Merck KGaA)**

Lösung zum Fixieren und Färben der Zellen (0,1 %)

- Kristallviolett 0,1 g
- H<sub>2</sub>O steril 50 ml
- Methanol 50 ml
- Lagerung bei 4°C

#### **MNT-Puffer**

Puffer zur HSV-1 Verdünnung (500 ml)

- MES 20 mM
- NaCl 100 mM
- Tris 30 mM

- H<sub>2</sub>O steril 400 ml
- pH 7.2
- Lagerung bei 4°C

#### TAE-Puffer

TrisAcetatEDTA Puffer – Laufpuffer für die Agarose-Gelelektrophorese

- Tris 2 M
- Essigsäure 5,7 %
- EDTA 50 mM pH 8,0
- pH 8; Lagerung bei Raumtemperatur (RT)

#### **2.1.12. Verbrauchsmaterialien**

Cryo-Röhrchen 2 ml steril (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Deckgläser Dmr. 18 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml) (Brandt)

Glasplättchen 1,5 x 15 mm (Hartenstein)

Objektträger 76 x 26 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Pipettenspitzen (VWR, Carl Roth, Greiner, BioZym)

Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Reaktionsgefäße (Roth, Hartenstein, Biozym, VWR)

Röntgenfilme (X-Ray Retina)

Spritzenfilter 0,22 µm oder 0,45 µm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Hartenstein)

Whatman Papier 3 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Wasserbadschutz-Lösung (Hartenstein)

Zellkulturschaber (VWR)

Zellkulturwaren (Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP, Renner, Biochrome, Applied Biosystems)

#### **2.1.13. Geräte**

ABI 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystem)

Axiovert Mikroskop 25, 200 M, PrimoVert (Zeiss)

Bakterienbrutschränke (Memmert)

FACS Canto I Flow Cytometer (BD Biosciences)

Finnpette<sup>®</sup> Multistep (ThermoFisher)

FluoStar Omega Microplate Reader (BMG Labtech)  
Geldokumentation XR+ & Image Lab (Bio-Rad)  
GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400  
Gene Pulser XCell (Bio-Rad)  
Inverted Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss)  
Konfolkales Laserscanning Mikroskop Axioplan LSM510 (Zeiss)  
Kühlblöcke -20°C (Neolab)  
Magnetrührer (IKA Werke)  
Mikrozentrifugen (Eppendorf, Hereus)  
Mini-Rocket Shaker MR-1 (Hartenstein)  
Multiplate Absorbance/Fluorescence Reader (Tecan, Omega)  
Multistepper (ThermoFisher)  
Nanodrop (Peqlab)  
PerfectBlue Gelsystem Mini S & Maxi S (Peqlab)  
pH-Meter 211 (Hanna Instruments)  
Pipettboy acu (IBS)  
Pipetten (0,2-1000µl) (Gilson)  
Spannungsgenerator Electrophoresis Power Supply EPS 301 (GE Healthcare)  
TC10TM Automated Cell Counter (Bio-Rad)  
Thermomixer (Eppendorf)  
Vortex Mixer 7-2020 (Neolab, Scientific Industries)  
Weißlichttisch 220V 50HZ (REX-Leuchtplatte)  
Zellkulturinkubator CO<sub>2</sub> HeraCell (ThermoFisher)  
Zellkulturwerkbank HeraSafe (ThermoFisher)  
Zellkulturzentrifuge 5810R (Eppendorf)  
Zentrifuge Sorvall<sup>®</sup> RC 5C Plus (ThermoFisher)

#### ***2.1.14. Software***

FACSDiva Ver. 5.0.3. Software; BD Biosciences  
Image Lab<sup>™</sup>; Software 170-9690; BioRAD  
LSM Image Browser-Software; Carl Zeiss  
Omega Control; BMG Labtech  
Prism 5.03; GraphPad  
SDS 2.3, 2013; Applied Biosystems

## 2.2. Material – Die klinische Untersuchung betreffend

Für das methodische Vorgehen im Rahmen der klinischen Untersuchung zur Forschungsaufgabe, die in der vorliegenden Dissertation behandelt wird, kamen die nachfolgend abgehandelten Produkte, Substanzen und Materialien (siehe Abschnitte 2.2.1. bis 2.2.7.) zum Einsatz.

### 2.2.1. Testprodukt

Das verwendete Testprodukt *Spirularin*<sup>®</sup> HS Creme (SPME+Ca-SP; Ocean Pharma GmbH, Reinbek/Hamburg) ist ein Kosmetikum zur Pflege und zum Schutz herpesempfindlicher Lippen. Neben einem Lichtschutzfaktor 15 (UVA/UVB) sind folgende Inhaltsstoffe gemäß der INCI (Internationale Nomenklatur für kosmetische Inhaltsstoffe) - Deklaration darin enthalten:

*Aqua* (gereinigtes Wasser), *Carthamus Tinctorius Seed Oil*\* (Distelöl), *Ricinus Communis Seed Oil*\* (Rizinusöl), *Butyrospermum Parkii Butter* (Sheabutter), *Simmondsia Chinensis Seed Oil*\* (Jojobaöl), **Glycerin**, **Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexylbenzoate**, **Polyglyceryl-3 Polyricinoleate**, **Ethylhexyl Triazone**, **Polyglyceryl-2-Dihydroxystearate**, *Spirulina Platensis* Extract (Algenextrakt), **Glyceryl Oleate**, *Cera Flava*\* (Bienenwachs), **Zinc Sulfate** (Zinksulfat), **Alcohol**, **Tocopherol** (Vitamin E), *Helianthus Annuus Seed Oil*\* (Sonnenblumenöl), *Ascorbyl Palmitat* (Vitamin C Palmitat), **Glyceryl Caprylate**. \* aus kontrolliert biologischem Anbau

Eine Kanülentube *Spirularin*<sup>®</sup> HS Creme á 10 ml enthält 0,103 g SPME und 0,1545 g Ca-SP. Folglich sind SPME und Ca-SP in einem Verhältnis von 1 zu 1,5 (SPME 10 mg/g : Ca-SP 15 mg/g) in der Creme eingesetzt.

### 2.2.2. Zur Gewinnung und Herstellung von *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakt

SPME ist ein Extrakt, der in einem mehrstufigen patentierten Extraktionsverfahren mittels Extruder (Ocean Pharma GmbH, Reinbek, Germany) aus der Rohmasse der Mikroalge *Spirulina platensis* (*S. platensis*) gewonnen wird. Das aus der *S. platensis* Biomasse im IGV / Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Potsdam hergestellte Pulver wurde mit H<sub>2</sub>O resuspendiert und mittels Extruder großem Druck (bis zu 150 Bar) sowie hohen Temperaturen (bis zu 160°C) ausgesetzt, um die Extraktion antibakterieller Substanzen zu steigern. Die Zellen wurden durch dieses Prozedere aufgespalten und durch Ethylacetat resuspendiert, was die Abspaltung aktiver Substanzen von den Zelltrümmern zur Folge hatte. Hierfür wurden 12,5 g

Algenmasse über Nacht in 20 ml Ethylacetat bei 120 rpm gelöst, homogenisiert, in Zentrifugationsröhrchen überführt und unter Zugabe von 50 ml Ethylacetat bei 4700 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung in einen *SpeedVac-Vial* Trichter. Die Trocknung des Algenmaterials wurde im *SpeedVac* über Nacht mit einem Faltenfilter und 1 g Aktivkohle durchgeführt. Das getrocknete Algenmaterial wurde in 5 ml Ethanol resuspendiert und abschließend über einen 45 µm-Filter filtriert. Der in dieser Untersuchung verwendete SPME ist ein in 98 %-igem Ethanol resuspendierter Mikroalgen-Extrakt mit einer Arbeitskonzentration von 268,7 mg/ml. Der im Testprodukt eingesetzte SPME sowie der in der experimentellen Forschung verwendete SPME wurden beide im gleichen Herstellungsverfahren wie oben beschrieben gewonnen und in Ethanol gelöst. Die Gewinnung des Algenmaterials erfolgte im IGV (Potsdam; siehe oben). Der SPME wiederum wurde bei der Ocean Pharma GmbH (Reinbek) hergestellt.

### ***2.2.3. Über die Isolierung von Calcium Spirulan aus dem Spirulina platensis Mikroalgen-Extrakt***

Ca-SP wurde in einem mehrstufigen, chromatographischen Verfahren durch das IGV (Potsdam) aus der Mikroalge *S. platensis* isoliert. Die Isolierung des Polysaccharids erfolgte in Anlehnung an ein bereits publiziertes Protokoll [174] mit entsprechenden, nicht publizierbaren Modifizierungen. Das in dieser Arbeit verwendete lyophilisierte Ca-SP mit einer Reinheit zwischen 94 und 98 % wurde in sterilem H<sub>2</sub>O mit einer Arbeitskonzentration von 10 mg/ml resuspendiert. Das lyophilisierte und resuspendierte Ca-SP bildet sowohl für die experimentelle Untersuchung als auch für das Testprodukt die Grundlage.

### ***2.2.4. Antivirale Therapeutika***

Für die klinische Untersuchung war die Verwendung von topischen und systemischen antiviralen Therapeutika sowie pflanzlich-homöopathischen Produkten gegen Lippenherpes explizit vorgesehen.

Zu den verwendeten topischen Therapeutika zählten folgende handelsübliche ACV-haltige Cremes und Salben:

**Zovirax** (GlaxoSmithKline), **Acic Creme** (Hexal), **Aciclovir Lippenherpes Creme** (Ratiopharm), **Aciclostad** (Stada), **Supraviron Creme** (Grünenthal), **Aciclovir Akut Creme** (1A Pharma), **Aciclobeta Lippenherpes Creme** (Betapharma), **Dynexan Herpescreme** (Kreussler & Co GmbH), **Acido Ct Creme** (Ct-Arzneimittel), **Aciclovir AL Creme** (Alinol Phara), **Aciclovir Heumann Creme** (Heumann Ph GmbH & Co KG).

Alle diese aufgeführten topischen Präparate enthalten bei einer Kanülentube von 2 g jeweils 50 mg ACV als Wirkstoff.

Zu den verwendeten systemischen Therapien zählten vor allem Präparate zur oralen Einnahme mit ACV als anti-herpetischem Wirkstoff, mit den gängigen Dosismengen von 200 mg, 400 mg und 800 mg, die je nach individuellem Herpesrisiko mehrmals täglich eingenommen wurden. Außerdem wurde Valaciclovir als Virostatikum systemisch verwendet. Valaciclovir ist ein ACV-Derivat und in Dosierungen von 250 mg, 500 mg und 1000 mg erhältlich. Die Einnahme der systemischen Therapeutika erfolgte nach Absprache und Rezeptierung des jeweils behandelnden Arztes.

Die Einnahme von pflanzlich-homöopathischen Produkten gegen Lippenherpes war im Rahmen der klinischen Untersuchung ebenfalls nicht ausgeschlossen und umfasste neben Melissen- und Kamillenöl sowie Propolisextrakt auch Teebaumöl, Aloe Vera Produkte und homöopathische Globulis.

### **2.2.5. Fragebögen**

Für die Erhebung von Daten im Rahmen der klinischen Untersuchung wurden zwei Fragebögen verwendet. Der erste Fragebogen umfasste neben den demographischen Daten, wie z.B. Alter und Geschlecht, insgesamt 10 Fragen zur Vorgeschichte der Probanden bezüglich Herpes labialis Reaktivierungen, Therapien und vorangegangenen PMU-Behandlungen. Der zweite Fragebogen bestand aus zwei Seiten mit insgesamt 14 Fragen. Dieser Fragebogen erfasste Informationen zur Behandlung vor und nach dem PMU und möglichen Herpes labialis - Reaktivierungen im Rahmen der klinischen Untersuchung. Beide Fragebögen befinden sich in den Anlagen der Dissertation (siehe Anlagen 7.1.).

### **2.2.6. Informationsmaterial - Permanent Make-up Institute**

Die PMU-Institute, die an der klinischen Untersuchung teilgenommen haben, erhielten zu Beginn des Projektes jeweils eine ausführliche Projektinformation, die Fragebögen 1 und 2 in ausreichender Anzahl, Flyer für die Akquise der Probanden sowie eine ausreichende Anzahl an Testprodukten *Spirularin*<sup>®</sup> HS Creme (SPME+Ca-SP). Die Projektinformation (siehe Anlagen 7.1.) umfasste neben den Kontaktdaten der Studienverantwortlichen ausführliche Informationen zu folgenden Themen: Kurzinformation über das Projekt, Hintergrundinformationen, Präparat-Inhaltstoffe des Produktes gemäß INCI-Deklaration, gesuchte Personen, Ablauf des Projektes und Datenschutz.

### ***2.2.7. Informationsmaterial und Einverständniserklärung – Probanden***

Die Probanden, die an der klinischen Untersuchung partizipiert haben, erhielten von den jeweiligen PMU Instituten eine ausführliche Probandeninformation sowie eine Erklärung zum Datenschutz. Die bei den Probanden eingesetzte Kundeninformation (siehe Anlagen 7.1.) klärte diese über das erhöhte Risiko von auftretendem Lippenherpes bei PMU-Behandlungen auf. Weiterhin wurden die Probanden über den Ablauf und das Ziel der Untersuchung sowie die Teilnahmebedingungen und über den Umgang mit ihren persönlichen Daten aufgeklärt. Eine zusätzliche Erklärung zum Datenschutz (siehe Anlagen 7.1.) wurde von den Probanden vor Einschluss in die Untersuchung unterzeichnet und sie erhielten diese in Kopie ausgehändigt. Alle persönlichen Daten der Probanden wurden im Rahmen der Datenschutzvereinbarungen anonymisiert erfasst, gespeichert und vertraulich behandelt. Die im Rahmen der klinischen Untersuchung erhobenen Probandendaten unterliegen dem persönlichen Datenschutz.

### **3. ANGEWANDTE METHODEN**

#### **3.1. Angewandte Methoden – Die experimentelle Untersuchung betreffend**

##### **3.1.1. Zellbiologische Methoden**

Basis der Realisierung der zellbiologischen Untersuchungsmethoden war eine dafür geschaffene Zellkultur. Die genutzte Zellkultur wurde in einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen herangezogen und durchgeführt, wobei die Zellkultivierung in Zellkulturinkubatoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> humider Atmosphäre bei einer Luftfeuchtigkeit von 80 % erfolgte.

###### ***3.1.1.1. Zellkultur: Pflege, Einfrieren und Auftauen von Zellen***

Die Kultivierung der jeweiligen Zelllinien erfolgte in DMEM (4,5 g Glukose/ l) mit L-Glutamin sowie einer Zugabe von 8-10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS). Sobald die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren, wurden sie im Rhythmus von 2 bis 3 Tagen passagiert. Dafür wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 3-5 Minuten (Vero - & RPE-1-Zellen) bzw. 5-7 Minuten (HaCaT-Zellen) mit Trypsin inkubiert. Die Inaktivierung von Trypsin erfolgte mit frischem Medium, gefolgt von der Resuspendierung der Zellen. In Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie und der anschließenden Verwendung in Versuchsdurchführungen (1:8 bis 1:12) wurden sie in neue Zellkulturschalen überführt wurden. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Hierzu wurden die Zellen nach der Trypsinierung in Medium aufgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert (1000 g, 2 Minuten, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml FCS/DMSO (9:1) resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C zur vorübergehenden Lagerung eingefroren. Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, gefolgt von einer Resuspendierung in 10 ml DMEM (8-10 % FCS, 1 % PS). Nach einer Zentrifugation (500 g, 5 Minuten, 37°C) wurde das Zellpellet in 15 ml frischem DMEM resuspendiert und in 10 cm Schalen zur Kultivierung ausgesät.

###### ***3.1.1.2. Viruspräparation***

Zur Präparation von HSV-1-Virusstocks wurden subkonfluente Vero-Zellen in 15 cm Schalen mit einer niedrigen MOI von 0,01 PFU (*Plaque-Forming Units*) / Zelle für 2 Stunden bei RT auf einem Kippschüttler infiziert. Anschließend erfolgte die Inkubation der infizierten Zellen mit 25 ml frischem DMEM bei 37°C im Brutschrank, bis zu ihrer vollständigen Abrundung. Ein

Zytopathischer Effekt (CPE) war auf Grund des schnellen Replikationszyklus von HSV-1 bereits nach 3-4 Tagen zu erkennen.

Für die Virusernte wurde das Zellkulturmedium mit den enthaltenen Viren abgenommen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (4000 g, 10 Minuten, 4°C) entfernt. Die Pelletierung des Virus erfolgte anschließend mittels 4 - stündiger Zentrifugation (15000 g, 4°C). Das Viruspellet wurde mit 700 µl MNT Puffer bedeckt über Nacht auf Eis bei 4°C inkubiert und anschließend vorsichtig resuspendiert. Die Viruspräparation wurde mit einem Stößel homogenisiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **3.1.1.3. Methoden zur Bestimmung der Virustiter für HSV-1 und KSHV/HHV-8**

Um die Menge an HSV-1 infektiösen Viruspartikeln in einer Viruspräparation zu quantifizieren, erfolgte die Bestimmung der Anzahl von PFU/Kavität für HSV-1 mittels Plaque assay. Zur Quantifizierung von PFU/Kavität wurden nahezu konfluent (ca. 80 %) gewachsene Vero- und HaCaT-Zellen mit HSV-1 Viruspräparationen infiziert. Hierfür wurde von der zu titrierenden Viruspräparation eine Verdünnungsreihe in 10 er Potenzschritten von  $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$  hergestellt. Pro Verdünnung von  $10^{-5}$  bis  $10^{-9}$  wurden jeweils 500 µl Viruspräparation auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 1 Stunde bei RT auf einem Kippschüttler infiziert. Im Anschluss wurde der gesamte Überstand entfernt und die Zellen mit DMEM inklusive humanem IgG (1 mg/ml) im Brutschrank für 48 Stunden inkubiert.

Wird humanes IgG in ausreichender Menge zu HSV-1 infizierten Zellen pipettiert, ist die Diffusion des Virus über das Medium auf Grund der hohen Konzentration des IgG nicht mehr möglich [209]. Die Virusinfektion ist nur noch direkt von Zelle zu Zelle übertragbar, was in der Ausbildung von einzelnen Plaques pro infektiöser Einheit resultiert. Folglich ist eine genaue Quantifizierung der Konzentration an infektiösen Viruseinheiten in der jeweiligen Probe möglich [209].

Nach Ausbildung von Plaques wurde der Zellrasen mit Methanol (-20°C) fixiert, anschließend mit Kristallviolett (0,1 %) in H<sub>2</sub>O gefärbt und mit PBS gewaschen. Die Bestimmung des Titers erfolgte im doppelten Ansatz. Hierfür wurde die Zahl der Plaques am Mikroskop (Inverted Mikroskop Axiovert 200M, Carl Zeiss) ausgezählt und der Virustiter (PFU/ml) berechnet.

Zur Quantifizierung der infektiösen Viruseinheiten von GFP-exprimierendem, lytisch replizierendem KSHV/HHV-8 in einer Viruspräparation wurde die mittlere *tissue culture infective dose* pro ml (TCID<sub>50</sub>/ml) mittels TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode bestimmt [210]. Die Verdünnung einer Viruspräparation, die nötig ist, um 50% der Zellen in einer Probe zu infizieren, wird als TCID<sub>50</sub> angegeben. Zur Bestimmung der TCID<sub>50</sub> wurden nahezu konfluent gewachsene RPE-1-Zellen mit Viruspräparationen infiziert. Zu diesem Zweck wurde von der zu

titrierenden Viruspräparation eine Verdünnungsreihe in 10er Potenzschritten von  $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$  hergestellt. Pro Verdünnung von  $10^{-5}$  bis  $10^{-9}$  wurden jeweils 100  $\mu$ l Viruspräparation auf die Zellen pipettiert, die infizierten Zellen wurden zentrifugiert (37°C, 30 Minuten, 500 g) und bei 37°C, bis grün fluoreszierende Foci (Kumulation von infizierten Zellen, die bereits einen CPE aufweisen) nach ca. 8 Tagen detektierbar waren.

Die Bestimmung des Titers erfolgte im doppelten Ansatz. Hierfür wurde die Zahl der Foci am Mikroskop (Inverted Mikroskop Axiovert 200M, Carl Zeiss) ausgezählt und mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode wurde dann der Titer mit der folgenden Formel berechnet [211]:

$$\text{Titer} = \frac{10^N}{\text{Infektionsvolumen [ml]}} \quad \text{TCID}_{50}/\text{ml}$$

$$N = X - 0,5 + \frac{\text{Summe der Plaque-positiven Kavitäts ab X}}{\text{Anzahl der Kavitäts pro Verdünnung}}$$

X = höchste Verdünnung, bei der alle Kavitäten Plaque-positiv sind ( $10^{-3} = 3$ ;  $10^{-4} = 4$ ;  $10^{-5} = 5$  etc.)

### 3.1.1.4. MTS-Testung zur Bestimmung der Zellviabilität

Der *MTS-assay*, auch Viabilitätstest genannt, dient dem Nachweis der Zellviabilität in einer bestimmten Probe. Durch die Behandlung der Zellen mit einem gelblichen Farbstoff, dem Verbund eines Tetrazoliumsalses (MTS), lässt sich der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen bestimmen. Der Wirknachweis dieser Methode beruht auf der biochemischen Reduktion des gelblichen MTS-Farbstoffs durch den Zellmetabolismus in einen blau-violetten Farbstoff des Formazan. Die Menge des verstoffwechselten und gemessenen Farbstoffs dient als Maß der Zellviabilität und ist direkt proportional zu der Anzahl lebendiger Zellen. Alle in dieser Untersuchung verwendeten Substanzen und Lösemittel wurde mittels MTS-Testung auf Zelltoxizität getestet. Hierfür wurden konfluente Zellrasen aller verwendeten Zelllinien in 96-Kavität Platten mit verschiedenen Verdünnungen der Substanzen in Medium für 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach Zugabe einer 1 mg/ml Lösung MTS [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Salz; MTS plus ein elektronengekoppeltes Reagenz (Phenazin-methosulfat) PMS] und weiteren 4 Stunden

Inkubation. Die photometrische Messung wurde mittels *FluoStar Omega Microplate Reader* (BMG Labtech, OD 490 nm) ausgeführt. Als Kontrolle wurden in DMEM inkubierte Zellen ohne Substanzen verwendet und als Referenzsubstanz bzw. Positivkontrolle diente Staurosporin (STS), da es eine bekannte apoptotische Wirkung auf die Zellen besitzt. Der Einfluss der Substanzen auf die Zellviabilität wurde in drei unabhängigen Experimenten, jeweils im Triplikat, bestimmt. Die Anwendung der MTS-Testung basierte auf Herstellerangaben (Promega) zum *CellTiter 96® One Solution Cell Proliferation Assay*.

### 3.1.1.5. Konzentrationen der verwendeten Testsubstanzen

Die Konzentrationen der verwendeten Testsubstanzen, die die maximale Wirkung auf HSV-1 Infektionen ohne toxischen Effekt auf die Zellen zeigten, wurden mittels Plaque-Reduktionstest (PRA, *Plaque reduction assay*; siehe 3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*) vorab bestimmt. Des Weiteren wurden die optimalen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen gesucht, die die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) ergaben. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>), die üblicherweise bei antiviralen Testungen für Inhibitoren angegeben wird, ist die Konzentration, die benötigt wird, um 50 % der viralen Infektion zu hemmen. Dafür erfolgten mehrere Testungen der Substanzen in unterschiedlichen Verdünnungen. Für die Verdünnungen der Kontrollsubstanzen ACV, PFA und Heparin wurde auf die Literatur zurückgegriffen und die dort publizierten Verdünnungen im PRA getestet. Die dabei eingesetzten Substanzen SPME und Ca-SP sowie die Kombination aus SPME + Ca-SP entsprachen bzw. ähnelten den publizierten Konzentrationen [183; 184; 186] sowie weiteren gewählten Konzentrationen und wurden mittels PRA getestet.

Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Substanzen sind nachfolgend aufgelistet:

Substanzen	Konzentrationen
<b>Aciclovir</b>	0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1 und 2 µg/ml
<b>Heparin</b>	0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 und 10 µg/ml
<b>Foscarnet</b>	6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 und 400 µM
<b>Spirulina platensis Mikroalgen Extrakt</b>	0,13; 0,4; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3; 100 und 300 µg/ml
<b>Calcium Spirulan</b>	0,006; 0,02; 0,06; 0,19; 0,56; 1,67; 5 und 15µg/ml
<b>SPME+Ca-SP (Verhältniss 1:1,5)</b>	0,004/0,0069; 0,01/0,02; 0,04/0,06; 0,12/0,19; 0,37/0,56; 1,1/1,6; 3,3/5 und 10/15 µg/ml

**Tabelle 8: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen**

Die Konzentrationen der Kombination aus SPME und Ca-SP wurde in Anlehnung an das im Testprodukt (*Spirularin*<sup>®</sup> HS Creme) eingesetzte Verhältnis beider Substanzen (1:1,5) zueinander gewählt. Die letztlich verwendeten Verdünnungen der Substanzen wurden vor Durchführung der finalen Experimente mittels MTS-Testung hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zellviabilität untersucht.

### **3.1.2. Methoden zur Testung der antiviralen Wirkung von Substanzen**

Zur Testung der Wirkung von Substanzen gegen unterschiedliche Viren gibt es verschiedene antivirale Testmethoden, die mehr oder weniger etabliert und standardisiert sind. Folglich empfiehlt es sich, die mit einer antiviralen Testmethode gewonnenen Ergebnisse mittels einer zweiten Methode zu verifizieren. Ziel dieser Methoden ist die Quantifizierung der Virusmenge in einer bestimmten Probe unter Zugabe der zu testenden Substanzen. Dies ermöglicht Aussagen über die antivirale Wirkung der Substanzen sowie die Etablierung neuer antiviraler Therapien.

#### **3.1.2.1. Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1**

Die antivirale Wirkung der verwendeten Substanzen wurde mittels PRA, dem etablierten "Goldstandard" [212; 213] der antiviralen Testung zur Virusquantifizierung, ermittelt. Hierfür wurden PRA zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionszyklus von HSV-1 (2 Stunden vor der Infektion, 0 Stunden/während der Infektion und 1 Stunde nach der Infektion) durchgeführt. Die Testung des SPME, Ca-SP sowie beider Substanzen zusammen erfolgte im Vergleich mit ACV, einem bekannten Inhibitor gegen HSV-1.

Die Testungen wurde zuerst in Vero-Zellen, einer üblicherweise bei Testungen zur viralen Quantifizierung von HSV-1 verwendeten Zelllinie, durchgeführt. In der Folge wurden alle Testungen in HaCaT-Zellen, einer humanen Keratinozyten-Zelllinie, wiederholt.

Für die Durchführung des PRA wurden Zellen in einer bestimmten Zellzahl (Vero-Zellen:  $2.5 \times 10^5$ ; HaCaT-Zellen:  $3.5 \times 10^5$ ) in 6-Kavität Schalen ausgesät, so dass die Zellen nach 24 Stunden nahezu konfluent gewachsen waren. Im Anschluss erfolgte die Infizierung der Zellen mit HSV-1 in einer gewählten MOI von 50 pfu/Kavität in RPMI. Alle zu testenden Substanzen wurden in fortlaufenden Verdünnungen (siehe Tabelle 8) 2 Stunden vor der Infektion, 0 Stunden/simultan mit dem Virus oder 1 Stunde nach der Infektion zu den Zellen pipettiert. Die Testungen jeder Substanzverdünnung erfolgten jeweils im Duplikat und für die Infektionskontrolle dienten infizierte unbehandelte Zellen. Die Virusinfektion dauerte 1 Stunde auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur, gefolgt von der Entfernung des Überstands. Die

infizierten Zellen wurden mit DMEM, welchem humanes IgG (1 mg/ml) zugesetzt war, bei 37°C inkubiert. Optional wurden zusätzlich zu DMEM Substanzverdünnungen zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung von Plaques inkubiert, was eine Inkubationszeit für Vero-Zellen von 48 Stunden und für HaCaT-Zellen von 72 Stunden zur Folge hatte. Die Plaques wurden mit Methanol (-20°C) fixiert, mit 0,1 % Kristallviolett in H<sub>2</sub>O gefärbt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Plaques wurden am Mikroskop ausgezählt und als “Dosis-Wirkungs-Kurve” dargestellt. Die IC<sub>50</sub>-Werte (µg/ml) der jeweiligen Substanzen wurde aus diesen Kurven im Vergleich zur Infektionskontrolle berechnet. Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte aus drei individuellen Experimenten, welche jeweils im Triplikat durchgeführt wurden.

### 3.1.2.2. Time-of-addition assays – HSV-1

Um detaillierter ermitteln zu können, zu welchem Zeitpunkt der Virus-Zell-Interaktion die Substanzen die Virusinfektion hemmen, erfolgten *Time-of-addition assays*. Nahezu konfluente Zellrasen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Das Protokoll sowie die Infektion wurden identisch dem Vorgehen beim PRA (siehe 3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*) vollzogen.

Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 2xIC<sub>50</sub> [214] (siehe Tabelle 9; unten) zu folgenden Zeitpunkten zu den Zellen pipettiert: 2 Stunden vor der Infektion, 0 Stunden/simultan mit dem Virus sowie 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach der Infektion.

Substanzen	HaCaT-Zellen	Vero-Zellen
<b>2 Stunden vor der Infektion</b>		
SPME	16µg/ml	60µg/ml
Ca-SP	0,2µg/ml	0,1µg/ml
SPME+Ca-SP	5 / 0,2µg/ml	7 / 0,4µg/ml
Aciclovir	0,12µg/ml	0,12µg/ml
Heparin	0,12µg/ml	0,06µg/ml
<b>0 Stunden/während der Infektion</b>		
SPME	70µg/ml	70µg/ml
Ca-SP	0,4µg/ml	0,2µg/ml
SPME+Ca-SP	4 / 0,2µg/ml	8 / 0,4µg/ml
Aciclovir	0,2µg/ml	0,2µg/ml
Heparin	0,3µg/ml	0,18µg/ml
<b>1 Stunde nach der Infektion</b>		
SPME	120µg/ml	285µg/ml
Ca-SP	0,6µg/ml	0,8µg/ml
SPME+Ca-SP	40 / 2µg/ml	95 / 5µg/ml
Aciclovir	0,2µg/ml	0,3µg/ml
Heparin	0,8µg/ml	1,2µg/ml

**Tabelle 9: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen (2 x IC<sub>50</sub>)**

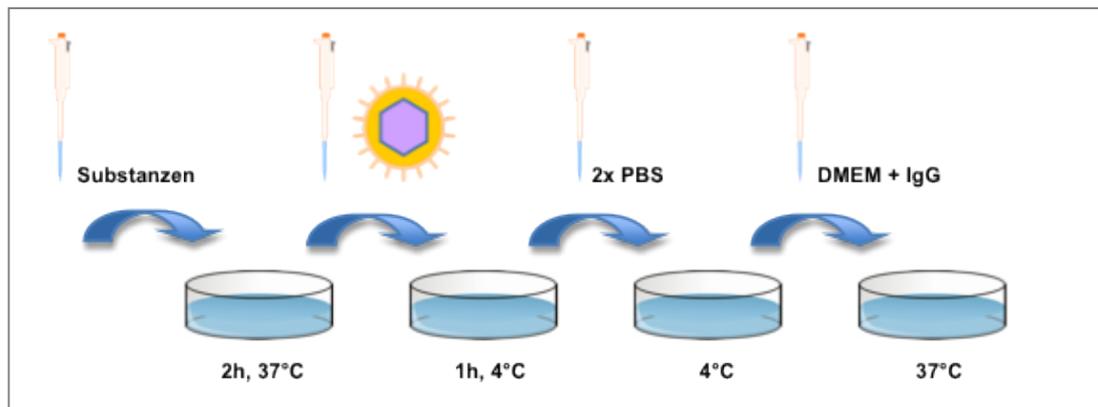
Die Zellen wurden nach der Infektion mit DMEM plus IgG inkubiert und nach 48 Stunden (Vero-Zellen) bzw. nach 72 Stunden (HaCaT-Zellen) zu den jeweiligen Zeitpunkten fixiert und gefärbt. Anschließend erfolgte die Auszählung der Plaques. Mit infizierten unbehandelten Zellen erfolgte die Negativkontrolle.

Um die Wirkung der Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichen zu können, wurden zusätzlich Inhibitoren verwendet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Virus - Zell Interaktion wirken. Um wiederum einen späten Zeitpunkt dieser Interaktion zu blockieren, wurde Aciclovir, ein bekannter Inhibitor der viralen DNA Polymerase [215] verwendet. Ausserdem erfolgte die Behandlung der Zellen mit Heparin, damit eine Inhibition der Virusanheftung [216], entsprechend eine frühe Blockierung des Virusinfektion, festgestellt werden konnte.

### ***3.1.2.3. Anheftungs – Experiment: Wirkweise von Ca-SP auf frühe Schritte der Virus-Zell Interaktion***

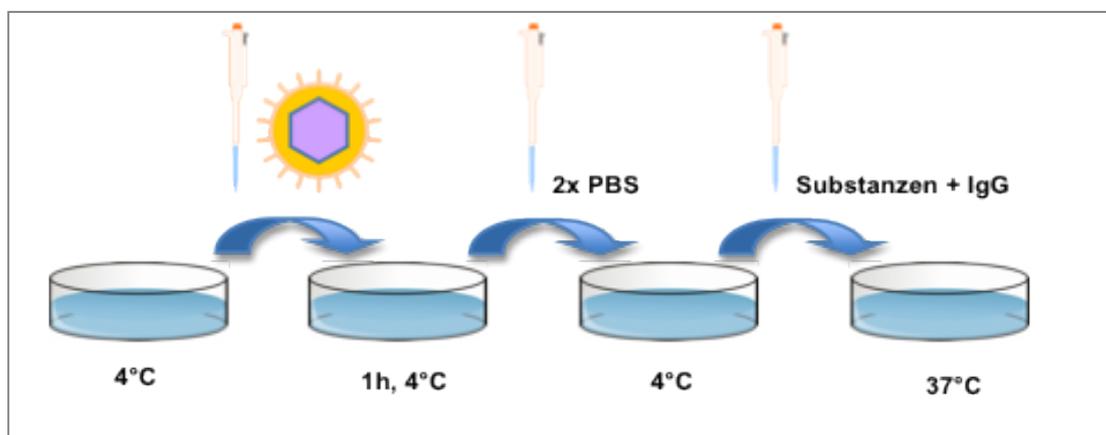
Die Wirkung von Ca-SP auf frühe Schritte der Virus-Zell Interaktion wurde mittels eines modifizierten PRA in zwei unterschiedlichen Protokollen untersucht. Um den Zeitpunkt der Wirkung von Ca-SP mit der Wirkweise bekannter HSV-1 Inhibitoren vergleichen zu können, wurden Heparin als bekannter Anheftungs-Inhibitor sowie ACV als Inhibitor der DNA-Replikation in diesem Experiment verwendet.

Für Protokoll A, die Untersuchung der frühen Schritte (Prä-Anheftung) der Virus-Zell Interaktion, wurden die Substanzverdünnungen 2 Stunden vor der Infektion bei 37°C zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C herabgekühlt und mit kalter Virussuspension (MOI 50 pfu/Kavität) für 1 Stunde bei 4°C in der Anwesenheit von Substanzen infiziert. Die Kühlung der Zellen auf 4°C hat zur Folge, dass sich das Virus lediglich an die Zelloberfläche anheftet, sein Eindringen in die Zelle ist allerdings gehindert [217]. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Zellen mit PBS, damit das restliche Virus, welches sich während der Infektionszeit nicht an der Zelloberfläche angelagert hat, entfernt werden konnte. Die infizierten Zellen wurden mit DMEM und IgG, aber exclusive Substanzverdünnungen, bei 37°C für 48 Stunden (Vero-Zellen) bzw. 72 Stunden (HaCaT-Zellen) inkubiert (s. Abbildung 14). Die Fixierung, Färbung und Auswertung der Zellen erfolgte wie beim PRA.



**Abbildung 14: Protokoll A – Prä-Anheftungs-Experiment.** Untersuchung früher Schritte der Virus-Zell-Interaktion; Positivkontrolle: Heparin. Abbildung 14 von J. Mader.

Für Protokoll B, die Untersuchung der späten Schritte (Post-Anheftung) der Virus-Zell-Interaktion, wurden vorgekühlte Zellen (4°C) genauso infiziert und behandelt wie in Protokoll A dargestellt. Allerdings wurden die Substanzverdünnungen erst 1 Stunde nach der Infektion bei 37°C zu den Zellen pipettiert (s. Abbildung 15). Die anschließende Inkubation bei 37°C erfolgte inklusive der Substanzverdünnungen wie für Protokoll A beschrieben.



**Abbildung 15: Protokoll B – Post-Anheftungs-Experiment.** Untersuchung später Schritte der Virus-Zell-Interaktion; Positivkontrolle: Aciclovir. Abbildung 15 von J. Mader.

#### 3.1.2.4. TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode – KSHV/HHV-8

Mittels der TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode wurde die antivirale Wirkung von Ca-SP bei KSHV/HHV-8 Infektionen untersucht. Die Infektion von Zellen mit KSHV/HHV-8 führt zu einer degenerativen Veränderung der Zellmorphologie, dem zytopathischen Effekt (CPE) und

wird im weiteren Infektionsprozess in ausgedehnten, kumulativen, grün fluoreszierenden Foci sichtbar. Die Virusquantifizierung der durch KSHV/HHV-8 hervorgerufenen Foci erfolgte mittels TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode. Die statistische Auswertung der mit dieser Endpunkt-Verdünnungsmethode gewonnenen Virustiter erfolgt anhand der Spearman-Kärber-Formel [211] in Exceltabellen und wird als TCID<sub>50</sub>/ml ausgedrückt.

Für die Testung mittels TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode wurden humane retinale Pigment-Epithelzellen (RPE-1-Zellen) verwendet, da KSHV/HHV-8 in RPE-1-Zellen besonders produktiv repliziert. Um die antivirale Wirkung von Ca-SP auf KSHV/HHV-8 eingehender zu untersuchen, erfolgte die Testung im Vergleich zu Foscarnet, einem bekannten Inhibitor von KSHV/HHV-8. Hierfür wurden RPE-1-Zellen in 96-Kavität Schalen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Als antivirale Substanzen wurden Ca-SP und Foscarnet in jeweils 7 fortlaufenden Verdünnungen (siehe Tabelle 8) zeitgleich mit der Virusverdünnung (100 µl pro Kavität) zu den Zellen pipettiert. Die Infektion der Zellen sowie die Auswertung der Foci erfolgte entsprechend der Darstellung in Abschnitt 3.1.1.3. *Methoden zur Bestimmung der Virustiter für HSV-1 und KSHV/HHV-8.*

Die Durchführung der Experimente erfolgte jeweils im Triplikat und als Kontrollen dienten infizierte Zellen ohne Substanzen sowie unbehandelte uninfizierte Zellen (als Mock bezeichnet).

### **3.1.2.5. Testung verschiedener Calcium Spirulan Chargen**

Natürliche Rohstoffe können, bedingt durch verschiedene Einflüsse, bei der Kultivierung, Gewinnung und Fraktionierung geringe Abweichungen in ihrer chemischen Homogenität und Zusammensetzung aufweisen. Diese Irregularität kann Schwankungen in der Wirksamkeit zur Folge haben. Um zu ermitteln, inwieweit die Effektivität der Wirkung von Ca-SP gegen HSV-1 in verschiedenen Chargen stabil ist, wurden verschiedene Chargen getestet. Alle untersuchten Ca-SP-Proben hatte der Hersteller mittels gleicher Gewinnungs- und Extraktionsmethoden behandelt, gefriergetrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Die getesteten Proben bestanden zum Einen aus der Charge, die in allen Experimenten verwendet wurde (H17/18; Ca-SP in H<sub>2</sub>O, 1 %) sowie einer neuen Charge (H20; Ca-SP in H<sub>2</sub>O, 1 %) und einer Probe lyophilisiertem Ca-SP, welches im Labor in sterilem H<sub>2</sub>O direkt vor der Testung gelöst wurde. Alle Proben wurden als 1 %-ige Lösung in H<sub>2</sub>O steril verwendet. Die Testung der Wirksamkeit erfolgte mittels PRA an Vero - Zellen. Dafür wurden nahezu konfluente Vero-Zellen mit Substanzverdünnungen 2 Stunden vor der Infektion bei 37°C inkubiert. Die bisher gewählten Substanzverdünnungen wurden ebenso wie infizierte unbehandelte Zellen als Kontrolle bei dieser Testung verwendet.

Die Infektion der Zellen mit HSV-1 erfolgte entsprechend dem Protokoll des PRA (siehe 3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*). Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen

gemäß dem Protokoll fixiert, gefärbt und ausgewertet. Die Testung wurde im Triplikate realisiert.

### **3.1.2.6. Testung von Calcium Spirulan mittels Virus yield-Reduktionsmethode**

Die Wirkung von Ca-SP bei der HSV-1-Infektion wurde in bereits publizierten Untersuchungen von Hayashi et al. [186] mittels der *Virus yield-Reduktionsmethode* getestet. Um diese Ergebnisse mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Wirkung von Ca-SP vergleichen zu können, wurde das publizierte Protokoll wiederholt.

Hierfür wurde die in allen Experimenten dieser Untersuchung eingesetzte Charge Ca-SP (H17/18) verwendet. Anstatt, wie von Hayashi et al. 1996 beschrieben, in 24-Kavität Schalen, wurden Vero-Zellen in 6-Kavität Schalen ausgesät und der nahezu konfluente Zellrasen wurde mit 5 Konzentrationen Ca-SP (0,32; 1,6; 8; 40 & 200 µg/ml) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, gefolgt von der Infektion mit HSV-1 bei einer MOI von 0.2 pfu/Zelle. Die Infektion erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen mit DMEM und Substanzverdünnungen für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, statt, wie im Protokoll nach Hayashi et al. [186] beschrieben, bei 34°C. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen entfernt, 800 µl PBS hinzugefügt, die Zellen vorsichtig mit einem Spatel geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellernte erfolgte auf Eis.

Die Zellsuspension wurde für 12 Minuten bei 500 g und 37°C zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet für 2-3 Minuten in Isopropanol bei -80°C tiefgefroren. Anschließend erfolgte das Auftauen des Zellpellets im Wasserbad bei 37°C. Dieser Vorgang wurde dreimal mit dem Ziel wiederholt, die infizierten Zellen zu lysieren, so dass der virushaltige Überstand für die anschließende Titration verwendet werden konnte.

Mittels Zentrifugation (5 Minuten, 500 g, 37°C) wurden die Zellreste entfernt und das gewonnene Virus in DMEM resuspendiert. Für die Virustitration wurden für jede einzelne Ca-SP-Konzentration (0.32; 1.6; 8; 40 & 200 µg/ml) jeweils 8 Verdünnungen in 10er Potenzschritten ( $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$ ) hergestellt. Die Virusverdünnungen wurden anschließend auf Vero-Zellen in 6-Kavität Schalen pipettiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Fixierung der infizierten Zellen mit Methanol, die Färbung mittels Kristallviolett und das Auszählen der Plaques am Mikroskop (Inverted Mikroskop Axiovert 200M, Carl Zeiss) ausgezählt. Die Testung wurde im Duplikat durchgeführt.

### 3.1.2.7. Testung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME und Ca-SP

Die Testung eines möglichen synergistischen Effektes beider Substanzen in Kombination (SPME und Ca-SP) bei HSV-1-Infektion erfolgte mittels PRA. Hierfür wurde ein möglicher Einfluss von SPME auf die Wirkung von Ca-SP untersucht. Ca-SP wurde in einer festgelegten Konzentration ( $1 \times IC_{50}$ ) verwendet und 8 Verdünnungen SPME wurden dazu pipettiert (siehe Tabelle 10). Die Durchführung des PRA sowie die getesteten Zeitpunkte waren identisch mit dem Protokoll vom PRA (siehe 3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*). Als Kontrolle dienten infizierte unbehandelte Zellen sowie Ca-SP allein in der eingesetzten Konzentration ( $IC_{50}$ ). Die Testungen erfolgten jeweils in Vero- und HaCaT-Zellen im Triplikat.

Ca-SP: $1 \times IC_{50}$	Vero-Zellen	HaCaT-Zellen
<b>2h vor Infektion</b>	0,04 µg/ml	0,08 µg/ml
<b>0h/während der Infektion</b>	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml
<b>1h nach der Infektion</b>	0,4 µg/ml	0,3 µg/ml
<b>SPME: 8 Verdünnungen</b>	0,13; 0,4; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3; 100 und 300 µg/ml	

**Tabelle 10: Übersicht über die Konzentrationen der Kombination SPME und Ca-SP bei der Testung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME auf Ca-SP.**

### 3.1.3. Angewandte molekularbiologische Methoden

Um die Ergebnisse der Methoden zur Testung der antiviralen Wirkung von Ca-SP und SPME zu verifizieren, wurden weitere Testungen mittels molekularbiologischer Methoden durchgeführt. Diese Testungen erfolgten sowohl mit HSV-1 als auch mit KSHV/HHV-8.

#### 3.1.3.1. Isolierung von DNA

Für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) mit beiden Herpesviren wurde isolierte DNA aus den entsprechenden Proben benötigt.

Hierfür wurden die Zellen nach dem Protokoll des PRA (HSV-1) bzw. der  $TCID_{50}$ -Reduktionsmethode (KSHV/HHV-8, 6-Kavität Schalen) behandelt und infiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit erfolgte die Lyse der Zellen durch Lysispuffer und vorsichtiges Lösen mittels Spatel.

Die Isolierung der viralen und zellulären DNA aus den entsprechenden Proben wurde mittels „innuPrep DNA Mini Kit“ (Analytik Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Abschließend wurde das DNA-Pellet in einem angemessenem Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert und die DNA Konzentration konnte photometrisch mittels Nano-Drop-1000 UV/Vis-Spektralfotometer bestimmt werden.

### 3.1.3.2. *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Die PCR erfolgte, um DNA-Bereiche zu amplifizieren, die in der qPCR verwendet wurden. Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten DNA-Abschnitt unter Verwendung von spezifischen und komplementären Primern zu amplifizieren.

Der PCR-Ansatz wurde nach den Herstellerangaben der *DreamTaq Green DNA Polymerase* pipettiert. Berechnungen der Hybridisierungstemperatur (T<sub>m</sub>) sowie der Elongationszeit wurden in Abhängigkeit des verwendeten Primerpaares gewählt.

Für die Durchführung der PCR kam ein Thermocycler-Gerät mit folgendem PCR-Programm zum Einsatz:

Anzahl der Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	2 min
1	Denaturierung	95°C	30 sec
	Primerhybridisierung	58°C (T <sub>m</sub> -5°C)	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
33	Denaturierung	95°C	30 sec
	Primerhybridisierung	58°C (T <sub>m</sub> -5°C)	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
1	Elongation	72°C	2 min
1	Lagerung	4°C	∞

**Tabelle 11: PCR-Programm für die DreamTaq Green DNA Polymerase**

### 3.1.3.3. *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von Nukleinsäuresträngen (RNA oder DNA) nach ihrer Größe und Ladung. Für die Analyse der PCR-Produkte wurden kleine und mittelgroße Agarosegele (2 %) hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Laufpuffer gekocht und im Anschluss mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), einem DNA-interkalierenden Farbstoff, angereichert. Nach dem Gießen der Agarose in Gelkammern wurde das Gel nach Polymerisierung in einer Laufkammer mit den zu analysierenden Proben beladen.

Hierfür wurden die Proben zuvor mit Ladepuffer gemischt und in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Zur späteren Größendefinition der DNA-Fragmente wurde ein Marker (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, Fermentas GmbH) mit definierter Bandengröße verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Laufpuffer bei 120 Volt für ca. 60 Minuten bzw. bis zur Auftrennung der DNA-Fragmente. Die Analyse und Visualisierung der im Gel aufgetrennten Fragmente geschah anschließend auf einem Transilluminator (*Geldokumentation XR+ & Image Lab*, Bio-Rad) durch UV-Licht (312 nm).

### 3.1.3.4. *Quantitative real-time PCR (qPCR)*

Die Methode der qPCR ermöglicht die Erfassung der amplifizierten DNA-Fragmente in Echtzeit und beruht auf dem Prinzip der PCR. Die qPCR wurde bei der Forschung zu dieser Arbeit für die Messung der Genomkopien in infizierten Zellen verwendet, wobei die quantitative Bestimmung der Genomkopien des Zielgenoms im Vergleich zum zellulären Gen *ACTB* ( $\beta$ -Actin) erfolgte. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmente wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (ABI) verwendet. SYBR® Green ist ein Cyaninfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Der Farbstoff absorbiert blaues Licht ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) und emittiert grünes ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ). Bei der qPCR misst das Gerät (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) nach jedem PCR-Zyklus die emittierte Fluoreszenz. Der verwendete Ansatz für die qPCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Messung der qPCR erfolgte mittels 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und die Datenerfassung mit der Software SDS 2.3, 2013. Für die Durchführung der qPCR wurde das nachstehende Programm verwendet:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95°C	10 min
1 x	95°C	10 sec
1 x	60°C	30 sec
44 x wiederholt	95°C / 60°C	10 sec / 30 sec

**Tabelle 12: qPCR-Programm für den SYBR® Green PCR Master Mix**

Im Anschluss an die Messung wurde zur Überprüfung der Spezifität der Primer eine Schmelzkurve aufgenommen. Die Proben wurden im Triplikat gemessen und die Ergebnisse im Anschluss gemittelt.

Vor Durchführung der qPCR wurde die Effizienz der verschiedenen Primer getestet, die in der qPCR Verwendung finden sollten. Die Effizienz-Testung der Primer diente dem Zweck, die Ergebnisse der qPCR der Primer für das entsprechende Zielgen mit dem jeweiligen Primer des zellulären Gens vergleichen zu können. Folglich sollte die Wirksamkeit beider Primer, z.B. für HSV-1 und  $\beta$ -Actin, auf einer linearen Trendlinie liegen und die jeweilige Effizienz bei 90 bis 100 %. Die Abweichung der beiden Primer sollte nicht größer als 3 % sein, um die Ergebnisse der qPCR vergleichen zu können. Für die Durchführung der Effizienz-Testung wurden Zellen (Vero- und RPE-1-Zellen) ausgesät und nach 24 Stunden mit HSV-1 bzw. KSHV/HHV-8, wie bereits vorher beschrieben (3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*; 3.1.2.4. *TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode – KSHV/HHV-8*), infiziert. Nach einigen Stunden (48 h, HSV-1) bzw. mehreren Tagen (ca. 8 Tagen, KSHV/HHV-8) wurden die infizierten Zellen geerntet und die DNA aus den Proben isoliert. Für die Testung des zellulären Gens ACTB ( $\beta$ -Actin) wurden Zellen ohne Virus inkubiert, geerntet und die DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde in 6 Verdünnungen jeweils in eine 96-Kavität Platte pipettiert. Des Weiteren wurde der oben beschriebene qPCR Ansatz (Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix) dazu pipettiert. Für die Kontaminationskontrolle wurde ein H<sub>2</sub>O Ansatz für jedes Primerpaar mitgeführt. Die Testungen aller Verdünnungen erfolgten im Triplikate. Für die Effizienz-Messung fand das bereits beschriebene Programm für die qPCR Verwendung. Die Ergebnisse wurden im Anschluss gemittelt. Nach erfolgreicher Durchführung der Effizienz Testung der jeweiligen Primer wurde die qPCR Testung sowohl für HSV-1 als auch für KSHV/HHV-8 angewendet.

Für die Bestimmung der Genomkopien von HSV-1 infizierten Zellen mittels qPCR wurden Vero-Zellen behandelt, mit Substanzverdünnungen inkubiert und infiziert, so wie für den PRA (3.1.2.1. *Plaque-Reduktionstest (PRA) – HSV-1*) beschrieben. Es wurden alle drei Zeitpunkte (2 Stunden vor der Infektion, 0 Stunden/während der Infektion und 1 Stunde nach der Infektion) mittels qPCR getestet. Anschließend wurden die DNA isoliert und die DNA-Konzentrationen gemessen. Nach Vorlage von jeweils 2  $\mu$ l/Kavität verdünnter DNA in einer 96-Kavität Platte wurde der qPCR-Ansatz mit den spezifischen Primerpaaren dazu pipettiert. Für die Messung der HSV-1-Genomkopien fanden transkriptspezifische Primer für das Zielgen *gB* (Glycoprotein B) Verwendung sowie für das zelluläre Gen *ACTB* ( $\beta$ -Actin). Als Kontaminationskontrolle, um eine Bindung der virusspezifischen Primer an genomische DNA auszuschließen, wurden für jedes Primerpaar H<sub>2</sub>O-Ansätze sowie genomische DNA für *ACTB* ( $\beta$ -Actin) pipettiert. Infizierte unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Messung erfolgte für alle Verdünnungen und Proben im Triplikate, welche im Anschluss gemittelt wurden.

Um eine mögliche antivirale Wirkung der Substanzen auf KSHV/HHV-8 infizierte Zellen zu bestimmen, wurden RPE-1 Zellen gemäß dem Protokoll für die TCID<sub>50</sub>- Reduktionsmethode

infiziert und mit Substanzverdünnungen inkubiert. Anschließend wurde die DNA isoliert und die Konzentration gemessen. Der qPCR Ansatz sowie die Durchführung wurden wie bei der Quantifizierung der HSV-1-Genomkopien realisiert. Es wurden für die Messung der KSHV-Genomkopien spezifische Primer für das Zielgen *ORF25* verwendet sowie Primer für das zelluläre Referenzgen *ACTB* ( $\beta$ -Actin). Alle Ansätze wurden im Triplikат gemessen sowie nach Abschluss der Messung gemittelt.

### **3.1.4. Eingesetzte proteinbiochemische Methoden**

Mit Hilfe der proteinbiochemischen Methoden erfolgte die eingehendere Untersuchung des Mechanismus der Infektionshemmung durch die antiviralen Substanzen. Hierfür wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie die Lokalisation des viralen Tegument Proteins VP16 identifiziert und quantifiziert.

#### **3.1.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz**

Mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) ist die Detektion der zellulären Lokalisation von viralen Proteinen möglich. Die Primärantikörper sind an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder werden mittels Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht.

Hierfür wurden Vero-Zellen ( $1,8 \times 10^4$  Zellen/Kavität) und HaCaT-Zellen ( $2 \times 10^4$  Zellen/Kavität) auf Kammerdeckgläsern subkonfluent ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Substanzverdünnungen bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 4°C auf Eis gekühlt. Die Infektion der Zellen erfolgte in Anwesenheit der Substanzen mittels gekühlter HSV-1 Verdünnung und einer Ziel-MOI von 10 bei 4°C.

Der Virussuspension wurde Cycloheximid (CHX, 60  $\mu$ g/ml) zugesetzt. CHX als klassischer Translationshemmer hemmt die zelluläre Proteinbiosynthese. Diese kontrollierte Hemmung der Proteinbiosynthese ermöglicht eine gezielte Detektion bestimmter Proteine in der Zellkultur. Die Wirkung von CHX auf die Zellen ist nach Entfernen von CHX reversibel [219]. CHX wurde in der IF verwendet, um die Synthese von neuem VP16 zu hemmen und sicherzustellen, dass lediglich das bei der Virusinfektion eingebrachte VP16 mittels IF detektiert wird.

Nach 90 Minuten wurden die Proben dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit warmem Medium inklusive CHX für weitere 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Testung mittels IF fanden verschiedene Verdünnungen Ca-SP und Heparin Verwendung sowie ACV als Nachweis der viralen DNA-Replikationshemmung (Substanzkonzentrationen siehe Tabelle 13). Weiterhin wurden unbehandelte Zellen (Mock) sowie infizierte Zellen ohne Substanzen als Kontrollen

mitgeführt. Zur Kontrolle der zellulären Kernfärbung mit Hilfe eines Primärantikörpers gegen Nucleolin, einem zellulären Protein, wurde eine zusätzliche Kavität mit unbehandelten Zellen ausgesät. Eine weitere Kavität mit infizierten Zellen ohne Substanzen diente ebenfalls der Kontrolle. Diese infizierte Probe wurde lediglich mit dem Sekundärantikörper gefärbt, um auszuschließen, dass dieser ein unspezifisches Signal gibt.

Substanzen	Konzentrationen
Ca-SP	0,15; 0,75 und 1,5 µg/ml
Heparin	0,1; 0,5 und 1 µg/ml
Aciclovir	2 µg/ml

**Tabelle 13: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen in der IF**

5 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in Paraformaldehyd (4 % in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl; 50 mM in PBS) für 10 Minuten inkubiert, mit dem Ziel, freie Aldehydgruppen abzusättigen. Im Anschluss an die Blockierung der Aldehydgruppen erfolgte eine 10 minütige Permeabilisierung mit TritonX-100 (0,3 % in PBS). Eine Inkubationszeit von 10 Minuten mit Blockierungspuffer (0,2 % Gelatine in PBS) wurde nachfolgend durchgeführt, um unspezifische Antikörper-bindungsstellen abzusättigen. Die Proben wurden zwischen allen Inkubations-schritten zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Proteine mittels Primär- und Sekundärantikörper erfolgte jeweils für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden in Blockierungspuffer (0,2 % Gelatine in PBS) verdünnt. Zur Färbung mit dem Primärantikörper wurden die fixierten Proben mit jeweils 80µl/Kavität Antikörperverdünnung (VP16: 1:100; Nucleolin: 1:50) bedeckt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gründlich gewaschen und mit der Sekundärantikörperlösung (Verdünnung jeweils 1:500; 80 µl/Kavität) für 1 Stunde abgedunkelt zur Erhaltung des Fluoreszenzfarbstoffes inkubiert. Im Anschluss wurden die fixierten und gefärbten Zellen erneut mit PBS (2 x) gewaschen und die Färbung der Zellkerne mittels DRAQ5 (Verdünnung 1:1000) für 10 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Abschließend wurden die Proben jeweils dreimal mit PBS und H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor die Objektträger mit *Aqua PolyMount* Medium (Zellen nach unten) auf Deckgläsern (*Cover Slips, 1.5*) befestigt wurden. Zum Aushärten des Mountingmediums erfolgte die Trocknung der Proben über Nacht im Dunkeln. Mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie fand die Analyse der Proben statt.

### ***3.1.4.2. Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)***

Die Proben der Immunfluoreszenzfärbung wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) an einem Modell von Zeiss (LSM 510 Meta) analysiert. Für die Analyse der Immunfluoreszenz wurde das Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat 63x/1.2 verwendet und die konfokale Blende bei 1 gewählt. Dabei kamen die Laser 488 nm (Argon-Laser) und 405 nm (Dioden-Laser) zum Einsatz. Die Detektion der Bilder erfolgte mittels „Zeiss AxioCam“ und für die Auswertung der gemessenen Daten wurde die „Zeiss LSM Image Browser“-Software verwendet. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte in Adobe Photoshop CS5.

### ***3.1.4.3. Durchflusszytometrie (FACS)***

In der durchgeführten Forschung wurde mittels Durchflusszytometrie Analyse (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) das virale Tegument Protein VP16 in infizierten Zellen quantifiziert.

Hierfür wurden HaCaT-Zellen ( $3 \times 10^6$  Zellen/10 cm Schale) subkonfluent ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C mit Substanzverdünnungen für weitere 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wie bei der IF auf 4°C gekühlt und mit einer kalten Virusverdünnung mit einer MOI von 3 in Anwesenheit der Substanzverdünnungen infiziert. Auch hier wurde der Virusverdünnung CHX (60 µg/ml) zugesetzt, um lediglich bei der Infektion eingebrachtes VP16 zu quantifizieren und die Synthese von neuem VP16 ausschließen zu können. Nach 90 minütiger Infektion bei 4°C wurden die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen und mit warmem DMEM sowie CHX für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden verschiedene Substanzverdünnungen Ca-SP und Heparin sowie ACV zur Negativkontrolle verwendet.

Zwecks weiterer Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (Mock) sowie infizierte Zellen ohne Substanzen mitgeführt. Außerdem wurde pro Probe eine 10 cm Schale HaCaT - Zellen zusätzlich ausgesät, geerntet und nach FACS-Protokoll behandelt. Diese unbehandelten Zellen dienten lediglich der Vorinkubation des Primäantikörpers, um das in Vortestungen festgestellte Hintergrundsignal des Antikörpers zu reduzieren.

Für die FACS-Analyse kamen höhere Konzentrationen der einzelnen Substanzen zum Einsatz, um eine mögliche Reduktion des eingebrachten VP16 im Vergleich mit infizierten Zellen bei der hohen MOI von 3 quantifizieren zu können. Die verwendeten Konzentrationen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

Substanzen	Konzentrationen
Ca-SP	0,015; 0,15; 1,5; 15 und 50 µg/ml
Heparin	0,015; 0,15; 1,5; 15 und 50 µg/ml
Aciclovir	15 µg/ml

**Tabelle 14: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen in der FACS-Analyse**

3,5 Stunden nach Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in DMEM resuspendiert und in kleine Falcons überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 g, 10 Minuten), das Zellpellet anschließend in Paraformaldehyd (2 % in PBS) resuspendiert und die Zellen für 40 Minuten auf Eis fixiert. Für die Permeabilisierung erfolgte die Resuspendierung der Zellen im Permeabilisierungspuffer Saponin (0,1 % in PBS) für 30 Minuten. Der Färbung der Proben mittels Primärantikörper ging eine Vorinkubation des Antikörpers auf Zellen voraus. Hierfür wurden die dafür ausgesäten Zellen genauso behandelt wie die Proben und für die Färbung mit dem Primärantikörper gegen VP16 in einer Verdünnung von 1:50 mit jeweils 400 µl/Aliquot bei 4°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 10 Minuten) und der Überstand für die Färbung der eigentlichen Proben verwendet. Dafür wurden jeweils 70 µl/Probe Primär-Antikörperlösung pipettiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Für die Färbung der Proben mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mit einer Verdünnung von 1:500 mit jeweils 70 µl/Proben für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mehrfach gründlich gewaschen. Abschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 1 % BSA in PBS. Die Proben wurden auf Eis bis zur FACS Messung gelagert. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Proben mit PBS gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert, wobei alle Schritte auf Eis bzw. bei 4°C erfolgten. Die Messung der Proben erfolgte mittels FACS Canto I Flow Cytometer und FACSDiva Ver. 5.0.3. software. Pro Messung wurden 20000 Events gemessen, wobei der Messbereich für den *Forward scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC) nach Vorexperimenten definiert war. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel, wobei die Werte für die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität in % angegeben wurden. Die Messung erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Fluoreszenzintensität wurde aus den Duplikaten gemittelt. Um Aussagen über eine mögliche Reduktion von VP16 in den infizierten Zellen, bedingt durch die

inhibitorischen Substanzen, treffen zu können, erfolgte eine Normierung der Ergebnisse. Hierfür wurde für Mock=1 und für die infizierten Kontrollzellen=100 festgelegt.

Um den Wirkmechanismus von KSHV/HHV-8 zu untersuchen, erfolgte die Quantifizierung des viralen Tegument Proteins ORF45 in infizierten Zellen mittels FACS-Analyse.

Das angewendete Protokoll wurde wie für die FACS-Analyse bei HSV-1 durchgeführt. Hierfür wurden RPE-1-Zellen ( $6 \times 10^5$  Zellen/Kavität) subkonfluent ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C mit Substanzverdünnungen für weitere 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf 4°C gekühlt und mit einer kalten Virusverdünnung mit einer MOI von 0,5 in Anwesenheit der Substanzverdünnungen infiziert. Auch hier wurde der Virusverdünnung CHX (60 µg/ml) zugesetzt, um lediglich bei der Infektion eingebrachtes ORF45 zu quantifizieren. Nach 90 minütiger Infektion bei 4°C wurden die Zellen zentrifugiert (4°C, 30 Minuten, 500 g) und mit warmem DMEM sowie CHX für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden verschiedene Substanzverdünnungen Ca-SP und Heparin sowie Foscarnet zur Negativkontrolle verwendet. Es wurden die gleichen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen, die bereits bei der FACS-Analyse von HSV-1 eingesetzt wurden, verwendet (siehe Tabelle 14). Foscarnet wurde anstatt ACV als bekannter Inhibitor von KSHV/HHV-8-Infektionen in der gleichen Konzentration wie ACV eingesetzt. Zwecks weiterer Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (Mock) sowie infizierte Zellen ohne Substanzen mitgeführt.

3 Stunden nach Infektion wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und geerntet wie bereits für HSV-1 beschrieben. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde genau wie zuvor bei den HSV-1 infizierten HaCaT-Zellen durchgeführt. Die Färbung der RPE-1-Zellen erfolgte mit dem Primärantikörper gegen ORF45 in einer Verdünnung von 1:100. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Für die Färbung der Proben mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor 488 wurden die Zellen mit einer Verdünnung von 1:500 für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mehrfach gründlich gewaschen. Abschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 1 % BSA in PBS. Die Proben wurden auf Eis bis zur FACS Messung gelagert. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Proben mit PBS gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert, wobei alle Schritte auf Eis bzw. bei 4°C erfolgten.

Die Messung der Proben erfolgte ebenfalls mittels FACS Canto I Flow Cytometer und FACSDiva Ver. 5.0.3. software. Pro Messung wurden 10000 Events gemessen, wobei der Messbereich für den *Forward scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC) nach Vorexperimenten definiert war. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel, wobei die Werte für die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität in % angegeben wurden. Die Messung erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Fluoreszenzintensität wurde aus den

Duplikaten gemittelt. Um Aussagen über eine mögliche Reduktion von ORF45 durch die inhibitorischen Substanzen treffen zu können, erfolgte eine Normierung der Ergebnisse. Hierfür wurde für Mock=1 und für die infizierten Kontrollzellen=100 festgelegt.

### **3.2. Angewandte Methoden – Die klinische Untersuchung betreffend**

Die klinische Untersuchung diente der Erforschung des protektiven Effekts des SPME+Ca-SP zur Prophylaxe vor Herpes labialis bei PMU-Behandlungen. Des Weiteren war die Untersuchung des therapeutischen Effekts von SPME+Ca-SP auf Herpes labialis im Rahmen der PMU-Behandlungen ein Evaluierungsziel.

Diese Evaluierung wurde mittels Fragebogenerhebung in den PMU-Instituten durchgeführt, wobei die Dauer des Projektes zwischen 4-6 Wochen pro Proband angedacht war. Die klinische Untersuchung war eine multizentrische, nicht randomisierte, offene („*open-label*“) Beobachtungsstudie. Folglich wussten alle an dieser Untersuchung teilnehmenden und durchführenden Parteien (Probanden, Institutspersonal und Studienkoordinatoren) über die Verteilung und Anwendung der jeweiligen Herpes-Prophylaxe und -Therapie Bescheid.

Das verwendete Testprodukt, *Spirularin*<sup>®</sup> HS Creme (SPME+Ca-SP; Ocean Pharma Reinbek), wurde in der Untersuchung mit der herkömmlichen Prophylaxe und Therapie (*standard care*, SC) gegen Herpes labialis verglichen. Zur gängigen Prophylaxe und Therapie von Herpes labialis wurden neben systemischen Virostatika, wie z.B. ACV oder Valaciclovir, auch topische Therapeutika verwendet. Hierzu zählen ACV-, Penciclovir-, Docosanol- oder Foscarnet-haltige Cremes. Außerdem durften pflanzliche und homöopathische Produkte, wie z.B. ätherische Öle auf Basis von Melisse, Eukalyptus, Kamille oder Teebaumöl sowie Zahnpasta, Alkohol oder Globuli, angewendet werden.

Die klinische Untersuchung erfolgte in verschiedenen PMU-Instituten in ganz Deutschland im Rahmen der vom Kunden (Probanden) geplanten PMU-Behandlung. Die PMU-Behandlung musste im Bereich der Lippen erfolgen, was sowohl die Vollschatierung des gesamten Lippenareals und/oder die Kontur der Lippen einschloss.

Als gewünschte Ziel-Anzahl der Studienteilnehmer wurden vor Beginn des Projektes 200 Kunden, nachfolgend Probanden genannt, festgelegt. Die Verteilung der Probanden auf die Verum- bzw. Kontrollgruppe sollte am Ende der Untersuchung gleich groß sein, also 100 Probanden in der Verumgruppe (SPME+Ca-SP) und 100 in der Kontrollgruppe (SC).

Im Rahmen der PMU-Behandlung erfolgte die Fragebogenerhebung im jeweiligen Institut sowie eine Produktanwendung zur Prophylaxe und Nachbehandlung gegen Herpes labialis durch den Probanden zu Hause. Als Kontrollgruppe dienten Probanden, die die im jeweiligen Institut bisher übliche prophylaktische Therapie gegen Herpes labialis vor der PMU-Behandlung sowie die übliche Therapie zur Nachbehandlung verwendeten.

Es wurden ausschließlich Probanden in das Projekt eingeschlossen, die bereits in der Vergangenheit mindestens einmal von Herpes labialis betroffen waren und eine PMU-Behandlung an den Lippen wünschten. Das schriftliche Einverständnis der Probanden bezüglich des Datenschutzes war für die Teilnahme an der Studie erforderlich.

Zur Fragebogenerhebung gehörten zwei Fragebögen. Der erste erfasste die demographischen Daten sowie die Vorgeschichte des Probanden vor der PMU-Behandlung. Der zweite Fragebogen betraf die Behandlung im Rahmen des kosmetischen Projektes und wurde am Ende der Untersuchung beim Nachkontrolltermin im Institut ausgefüllt.

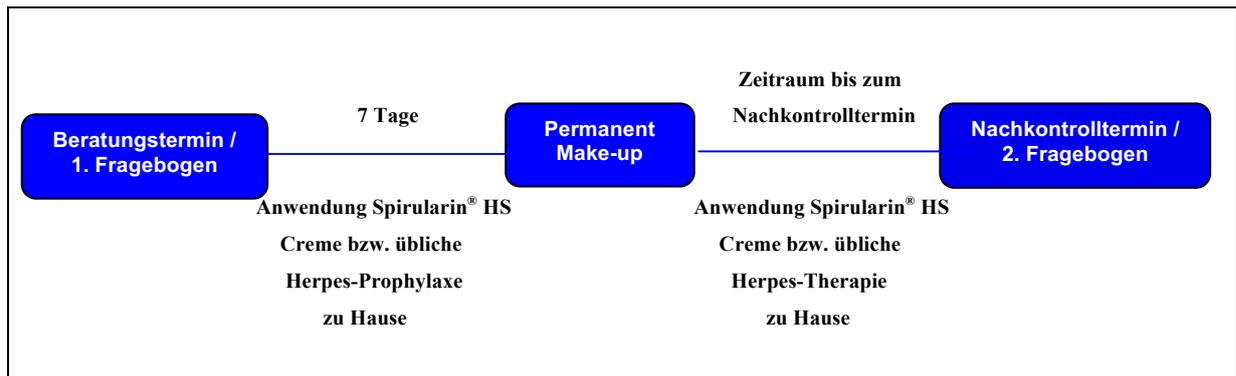
Beim ersten Besuch im PMU-Institut wurden die Probanden über die geplante Untersuchung informiert. Nach gründlichem Durchlesen der Kundeninformation und der Unterzeichnung der Datenschutzerklärung wurde an diesem Tag der erste Fragebogen zur Erfassung der Anamnese im Institut ausgefüllt. Die Probanden hatten die Möglichkeit, sich zwischen der Anwendung des Testproduktes oder der im jeweiligen Institut üblicherweise durchgeführten Herpes-Prophylaxe zu entscheiden.

Die Anwendung des Testproduktes begann optimalerweise bereits 7 Tage vor der geplanten PMU Behandlung und wurde bis zum Nachkontrolltermin durchgehend angewendet. Das Testprodukt wurde 2 mal täglich morgens und abends dünn auf die Lippen appliziert. Die herkömmliche Prophylaxe und Therapie gegen Herpes labialis wurde entsprechend der Anleitung des jeweiligen Institutes bzw. behandelnden Arztes ausgeführt, wobei die topische Prophylaxe und Therapie ebenfalls 2 mal täglich anzuwenden war.

Eine Woche nach Einschluss der Probanden in die Untersuchung und Anwendung des Testproduktes zu Hause wurde die geplante PMU-Behandlung im Institut durchgeführt. Die Anwendung des Testproduktes erfolgte nach der Behandlung wie gewohnt weiter bis zum Nachkontrolltermin. Die Anwendung der instituts-spezifischen Herpes-Therapie erfolgte gemäß Empfehlung der Pigmentiererin.

Der Nachkontrolltermin erfolgte je nach PMU-Institut 3-5 Wochen nach der PMU-Behandlung im Institut. Der zweite Fragebogen zur Erfassung der Behandlung wurde von den Probanden selbst ausgefüllt und im Institut verwahrt. Der Nachkontrolltermin war der Abschluss des kosmetischen Projektes im Rahmen der Untersuchung.

In der folgenden Abbildung ist der Ablauf des Projektes schematisch dargestellt:



*Abbildung 16: Ablauf des kosmetischen Projektes. Abbildung 16 von J. Mader.*

Das primäre Ziel der klinischen Untersuchung war die Erfassung des prophylaktischen sowie therapeutischen Effekts und der Verträglichkeit des Testproduktes bei Herpes labialis im Vergleich zur herkömmlichen Herpes labialis-Prophylaxe und -Therapie. Das sekundäre Ziel war die Erfassung der Probandenzufriedenheit im Vergleich zur herkömmlichen Herpes-Therapie.

## 4. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG

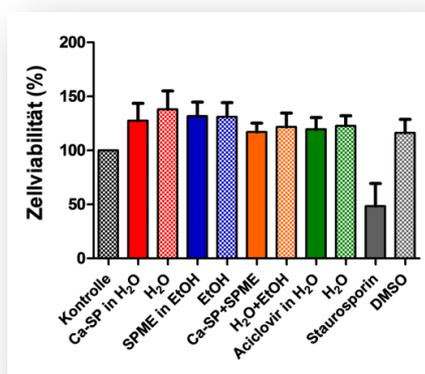
### 4.1. Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME gegen HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten

Für die Lösung der Forschungsaufgabe wurde der antivirale Effekt von Ca-SP und SPME auf die HSV-1-Infektion untersucht. Da beide dabei verwendeten Substanzen (Ca-SP und SPME) keine standardisierten Präparationen sind, wurde zu Beginn der experimentellen Untersuchung der Effekt der verschiedenen Substanzen auf die Zellviabilität in unterschiedlichen Zelllinien erforscht. Anschließend erfolgte die Untersuchung der antiviralen Wirkung von gereinigtem, aufbereitetem Ca-SP und dem mittels mehrstufigen Extraktionsverfahren gewonnenem SPME gegenüber HSV-1-Infektionen in verschiedenen Zelllinien, um eine mögliche antivirale Wirkung dieser unkonventionellen Substanzen feststellen zu können und ggf. die Ergebnisse mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen zu vergleichen.

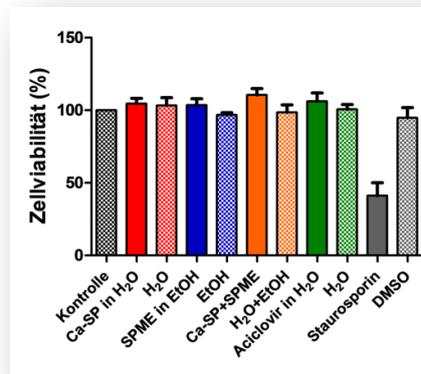
#### 4.1.1. Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität

Der Einfluss der in der erfolgten Untersuchung verwendeten Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität wurde zunächst mit Hilfe der MTS-Testung untersucht. Hierfür wurden alle eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Substanzen und Lösemittel zu konfluenten Vero- bzw. HaCaT-Zellen pipettiert und nach 48 Stunden Inkubation wurde die Zellviabilität durch Zugabe einer MTS-Lösung und einer weiteren Inkubationszeit von 4 Stunden mittels *FluoStar Omega Microplate Reader* gemessen. Unbehandelte Zellen dienten der Kontrolle. Als Indikator für proapoptotische Effekte wurde Staurosporin, gelöst in DMSO, zur Positivkontrolle genutzt. Die Messung der Zellviabilität zeigte keine Abnahme durch die verwendeten Substanzen und Lösemittel in Vero- und HaCaT-Zellen. Folglich wiesen die verwendeten Substanzen und Lösemittel in den jeweiligen Konzentrationen keine messbare toxische Wirkung auf die Zellen auf. Die mit Staurosporin behandelten Zellen zeigten die erwartete Reduktion der Viabilität um ca. 50 %. Abbildung 17 zeigt die jeweils höchsten Konzentrationen der Substanzen und Lösemittel im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Ergebnisse der Viabilitätstestung waren für die nachfolgende experimentelle sowie klinische Untersuchung von größter Bedeutung. Der Versuch zeigte keinen Hinweis auf eine toxische Wirkung der getesteten Konzentrationen der einzelnen Substanzen. Diese Feststellung ermöglichte die Verwendung der Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen für die weitere experimentelle Untersuchung. Eine mögliche virale Inhibition, gemessen im PRA, konnte folglich auf die Wirkung der Substanzen zurückgeführt werden.

a)



b)



c)

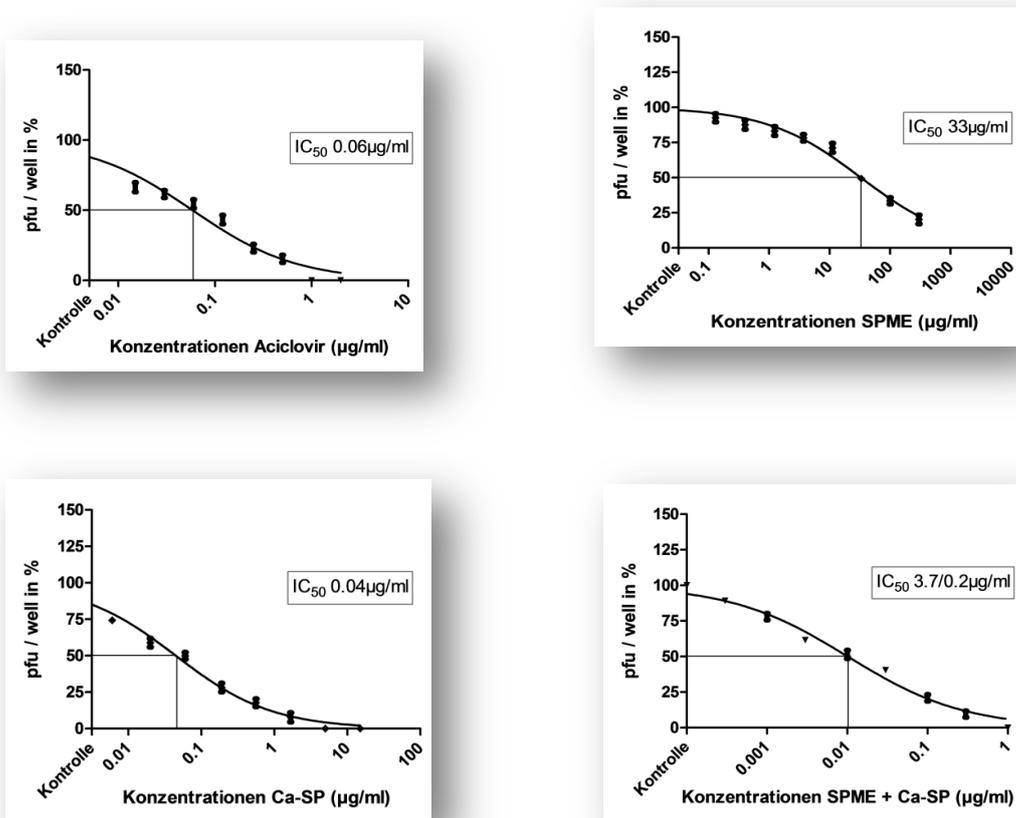
Substanz	höchste Konzentration	Lösemittel	höchste Konzentration
Ca-SP	15 µg/ml	H <sub>2</sub> O	1,5 % Vol.
SPME	300 µg/ml	Ethanol (98%)	0,7 % Vol.
Ca-SP+SPME	15 + 10 µg/ml	DMSO	5 µM
ACV	2 µg/ml		
Staurosporin	5 µM		

**Abbildung 17: Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität.** Die Zellviabilität von a) Vero-Zellen und b) HaCaT-Zellen wurde 48 Stunden nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen (Ca-SP, SPME, Kombination von Ca-SP+SPME, ACV, Staurosporin) und Lösemitteln (H<sub>2</sub>O, Ethanol, DMSO) mittels MTS-Testung gemessen. Staurosporin gelöst in DMSO wurde als Positivkontrolle verwendet. c) Die jeweils höchsten Konzentrationen, die in allen experimentellen Untersuchungen verwendet wurden, sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) abgebildet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung in % für drei jeweils im Triplikat durchgeführte unabhängige Experimente. Die Kontrolle wurde mit 100 % gleich gesetzt.

#### 4.1.2. Inhibitorische Wirkung der antiviralen Substanzen getestet mittels Plaque-Reduktionstest (PRA)

Die antivirale Wirkung von Ca-SP sowie SPME wurde mit dem PRA als etablierte „Goldstandard-Methode“ zur Virusquantifizierung durchgeführt. Ziel dieser Testung war die Quantifizierung der Virusmenge in einer bestimmten Probe unter Zugabe der verschiedenen Substanzen. Diese Testung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Virusinfektion im Vergleich mit dem gängigen HSV-1-Inhibitor ACV. Zuerst wurde die Virusquantifizierung mittels PRA in Vero-Zellen durchgeführt. Vero-Zellen werden üblicherweise bei der Untersuchung inhibitorischer Substanzen gegen HSV-1 Infektionen *in vitro* verwendet [220]. Des Weiteren sind die Ergebnisse mit den bereits publizierten Ergebnissen zur antiviralen Wirksamkeit des Heißwasser-Extraktes, gewonnen aus *S. platensis*, sowie von Ca-SP in Vero-Zellen vergleichbar [183; 184; 186]. Die Testung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten mit

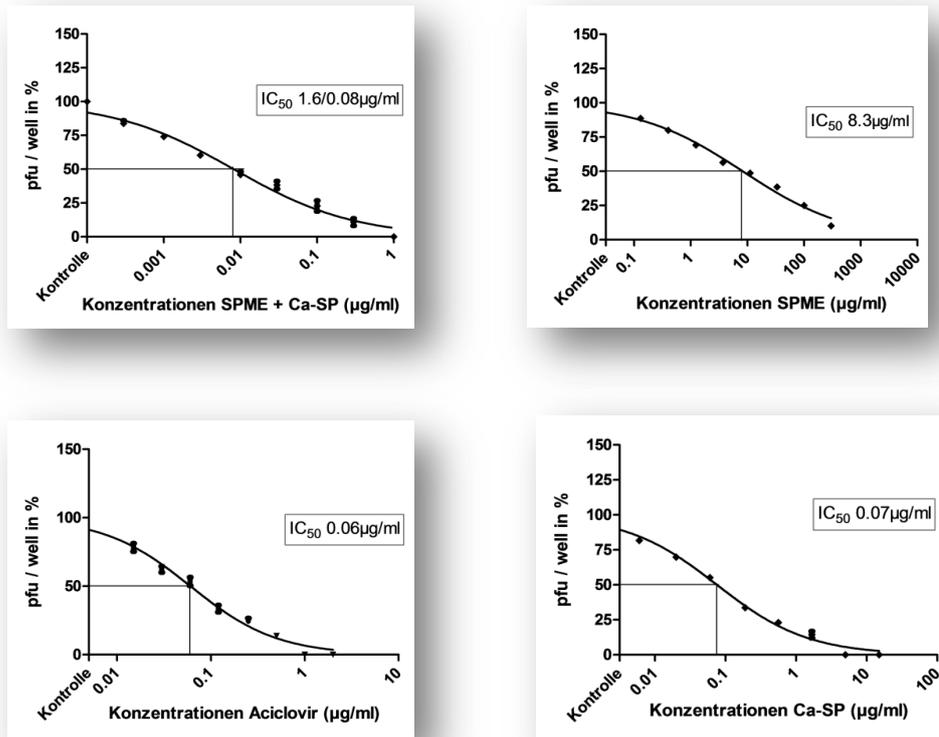
dem Ziel, bei einer potentiellen antiviralen Wirkung erste Hinweise auf die Wirksamkeit der Virus-Inhibition zu erhalten. Bei Zugabe der Substanzen (Ca-SP, SPME, Kombination von SPME+Ca-SP und ACV) 2 Stunden vor der Infektion konnte eine antivirale Wirkung gegen HSV-1 in Vero-Zellen festgestellt werden (s. Abbildung 18). Der antivirale Effekt von Ca-SP war mit einer  $IC_{50}$  von  $0,04 \mu\text{g/ml}$  sehr potent und mit der Wirkung von ACV ( $IC_{50} 0,06 \mu\text{g/ml}$ ) vergleichbar.



**Abbildung 18: Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME gegen HSV-1-Infektion in Vero-Zellen 2 Stunden vor der Infektion (PRA).** Die Ergebnisse zeigten eine antivirale Wirkung von Ca-SP ( $0,04 \mu\text{g/ml}$ ), die vergleichbar mit der Inhibition der Virusinfektion durch ACV ( $0,06 \mu\text{g/ml}$ ) war. SPME wies eine geringere antivirale Wirkung ( $33 \mu\text{g/ml}$ ) auf, wobei die Kombination aus SPME+Ca-SP die HSV-1-Infektion im Vergleich stärker hemmte ( $3,7 / 0,2 \mu\text{g/ml}$ ). Alle Graphen zeigen die Zugabe der Substanzen 2 Stunden vor der HSV-1-Infektion sowie pfu/well in % im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Die antivirale Wirkung der Substanzen war bei zeitgleicher Gabe mit dem Virus ebenfalls feststellbar und nahm dagegen bei Zugabe 1 Stunde nach der Virusinfektion ab. Lediglich für ACV konnte eine potente antivirale Wirkung auch zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden (s. Tabelle 15). Für alle verwendeten Substanzen wurde eine dosisabhängige Wirkung festgestellt. Alle Experimente wurden im Vergleich zu infizierten Zellen ohne Substanzen (zur Kontrolle) durchgeführt. In Abbildung 18 sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für drei unabhängige

Experimente, jeweils im Triplikat durchgeführt, in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Da Vero-Zellen zwar für die Virusquantifizierung in der Zellkultur von großer Relevanz sind, allerdings bei der HSV-1-Infektion beim Menschen keine Bedeutung haben, wurden die gleichen Experimente in HaCaT-Zellen wiederholt (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME gegen HSV-1-Infektion in HaCaT-Zellen 2 Stunden vor der Infektion (PRA).** Die Ergebnisse zeigten eine antivirale Wirkung von Ca-SP (0,07 µg/ml), die vergleichbar mit der Inhibition der Virusinfektion durch ACV (0,06 µg/ml) war. SPME wies eine geringere antivirale Wirkung (8,3 µg/ml) als Ca-SP auf. Für die Kombination aus SPME+Ca-SP konnte ebenfalls eine Hemmung der HSV-1-Infektion (1,6/0,08 µg/ml) gemessen werden. Alle Graphen zeigen die Zugabe der Substanzen 2 Stunden vor der HSV-1-Infektion sowie pfu/well in % im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Da Keratinozyten bei der Virus-Infektion von Herpes Simplex Virus Typ 1 beim Menschen als Zielzellen eine essentielle Rolle spielen, wurden HaCaT-Zellen als humane Zelllinie für die Experimente ausgewählt [206]. Die inhibitorische Wirkung von Ca-SP (IC<sub>50</sub> 0,07 µg/ml) 2 Stunden vor der Infektion war ähnlich potent wie bereits in Vero-Zellen (IC<sub>50</sub> 0,04 µg/ml) gemessen. Die Wirkung war vergleichbar mit der von ACV (IC<sub>50</sub> 0,06 µg/ml; s. Abbildung 19). Die antivirale Wirkung von SPME in HaCaT-Zellen (IC<sub>50</sub> 8,3 µg/ml) war im Vergleich zu Vero-Zellen stärker. Für die Kombination aus SPME+Ca-SP konnte ebenfalls eine deutlich

stärkere Inhibition ( $IC_{50}$  1,6 / 0,08  $\mu\text{g/ml}$ ) der HSV-1-Infektion festgestellt werden. Die antivirale Wirkung von Ca-SP, SPME sowie der Kombination aus SPME+Ca-SP zeigte, ebenso wie in Vero-Zellen gemessen, eine Abnahme der Inhibition zu späteren Zeitpunkten (0 Stunden/während sowie 1 Stunde nach der Infektion). ACV hemmte die HSV-1-Infektion weiterhin potent (s. Tabelle 15).

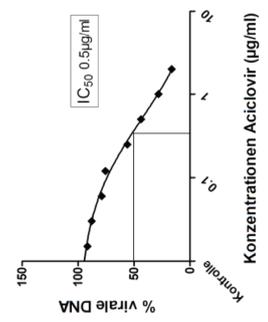
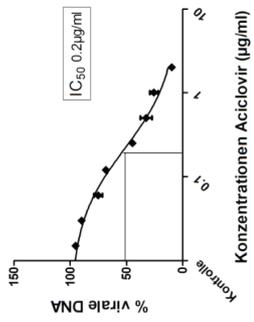
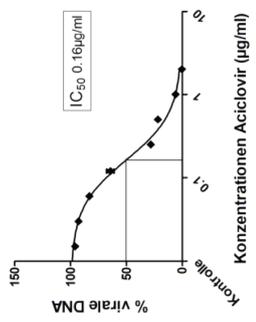
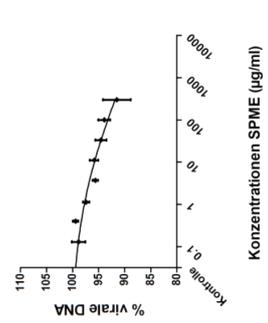
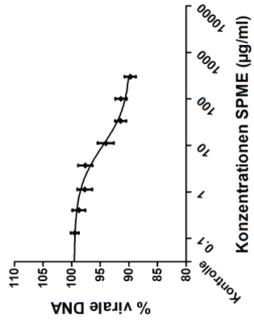
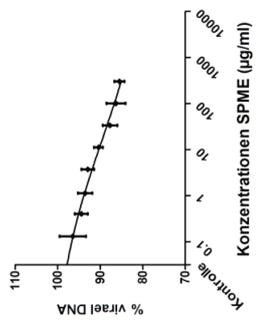
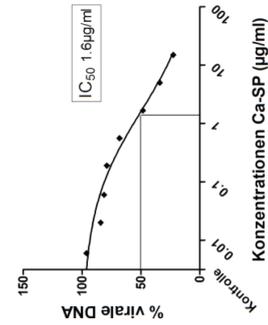
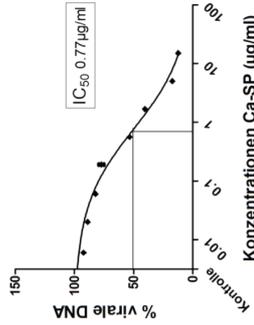
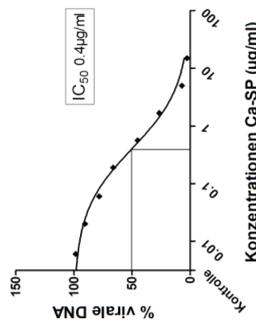
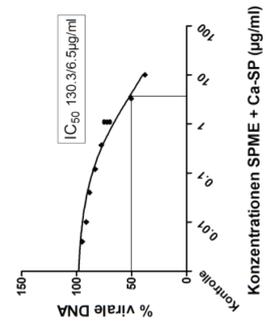
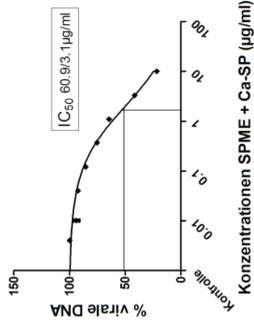
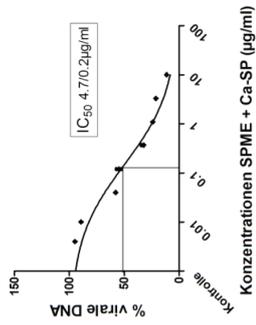
Die Testung mittels PRA in HaCaT-Zellen bestätigte die in Vero-Zellen detektierte dosisabhängige Wirkung der einzelnen Substanzen gegen HSV-1. Alle  $IC_{50}$ -Werte für beide Zelllinien zu den gemessenen Zeitpunkten sind in Tabelle 15 aufgelistet.

#### ***4.1.3. Verifizierung der antiviralen Wirkweise von Ca-SP und SPME mittels quantitativer real-time PCR (qPCR)***

Die qPCR wurde durchgeführt, um die Ergebnisse des PRA mittels einer weiteren unabhängigen Methode zu verifizieren. Zuerst wurde eine PCR mit den spezifischen und komplementären Primern zur Amplifikation der DNA-Abschnitte ausgeführt. Nach Abschluß der PCR erfolgte die Effizienztestung der jeweiligen Primer. Ziel der Effizienztestung ist die Vergleichbarkeit der mit den entsprechenden Primern gemessenen Ergebnisse.

Hierfür wurde die Effizienz der Primer des zellulären Gens *ACTB* ( $\beta$ -Actin) mit den verwendeten Primern für HSV-1 verglichen. Die Ergebnisse sind vergleichbar, wenn beide Primer ( $\beta$ -Actin & HSV-1) auf einer linearen Trendlinie mit einer Effizienz zwischen 90 - 100 % und einer maximalen Abweichung von 3 % liegen. Die Testung der Primer ergab für  $\beta$ -Actin eine Effizienz von 97 % und für HSV-1 eine Effizienz von 95 %. Beide Primer lagen auf einer linearen Trendlinie und bei einer Abweichung von 2 % konnten sie für die nachfolgende qPCR-Analyse verwendet werden (Daten nicht abgebildet).

Die antiviralen Effekte der einzelnen Substanzen, gemessen mittels PRA, ergaben keine zelllinienspezifischen Abweichungen. Folglich wurde die qPCR nur in Vero-Zellen durchgeführt (s. Abbildung 20). Für die Quantifizierung der Genomkopien erfolgte die DNA-Isolierung aus HSV-1 infizierten Vero-Zellen. Diese wurden nach dem PRA-Protokoll mit den entsprechenden Konzentrationen von Ca-SP, SPME, der Kombination aus SPME+Ca-SP sowie ACV inkubiert und infiziert.



**Abbildung 20: Verifizierung der antiviralen Wirkung der verschiedenen Substanzen gemessen mittels qPCR-Analyse in Vero-Zellen.** Die Ergebnisse der qPCR in Vero-Zellen konnten eine antivirale Wirksamkeit von Ca-SP vergleichbar mit ACV gegen HSV-1 bestätigen. Die qPCR-Analyse zeigte ebenfalls - wie die PRA Analyse - eine zeitlich bedingte Abnahme der Wirkung bei allen verwendeten Substanzen, wobei ACV auch 1 Stunde nach der Infektion noch eine antivirale Wirkung zeigt. Für Ca-SP, die Kombination aus SPME+Ca-SP sowie ACV liegen alle  $IC_{50}$  Werte über den im PRA ermittelten Ergebnissen. Eine Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte für SPME zu allen Zeitpunkten war auf grund der schwächeren Inhibition nicht möglich. Abbildung 20 zeigt alle drei gemessenen Zeitpunkte für alle verwendeten Substanzen, wobei die obere Reihe den frühen Zeitpunkt „2 Stunden vor der Infektion“, die mittlere Reihe den Zeitpunkt „0 Stunden/während der Infektion“ und die untere Reihe den späten Zeitpunkt „1 Stunde nach der Infektion“ zeigt. Alle Graphen bilden die Anzahl der viralen DNA Kopien in % im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle) ab. In den Dosis-Wirkungs-Kurven sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für 1 Experiment, im Triplikат gemessen, dargestellt.

Die quantitative Bestimmung der Genomkopien des Zielgenoms (HSV-1) im Vergleich mit dem zellulären Gen *ACTB* ( $\beta$ -Actin) wurde ebenfalls wie beim PRA zu allen drei Zeitpunkten gemessen. Die Analyse mittels qPCR bestätigte die zuvor im PRA gemessenen Ergebnisse. Es konnte eine dosisabhängige antivirale Wirkung von ACV, Ca-SP und der Kombination aus SPME+Ca-SP festgestellt werden. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte waren für alle Substanzen im Vergleich zu den PRA-Ergebnissen jedoch höher. Ebenso war auch in der qPCR die Inhibition von HSV-1 durch Ca-SP mit ACV vergleichbar. Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte für SPME war zu keinem gemessenen Zeitpunkt möglich, da mit den eingesetzten Konzentrationen keine 50 %-ige Hemmung erreicht wurde. Für die Analyse der qPCR erfolgte die Quantifizierung der viralen DNA-Kopien im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle) in %. Die dosisabhängigen Wirkungskurven (s. Abbildung 20) stellen jeweils ein Experiment, das im Triplikат durchgeführt wurde, dar. Alle mittels PRA und qPCR gemessenen  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Zusammenfassend konnte eine potente antivirale Wirkung von Ca-SP v.a. zu frühen Zeitpunkten (2 Stunden vor der Infektion) der HSV-1-Infektion mittels PRA in Vero- Zellen und humanen Keratinozyten detektiert werden. Die dosisabhängige Wirkung ist in beiden Zelllinien mit der Inhibition von ACV vergleichbar. Im Vergleich zu Ca-SP zeigte SPME im PRA eine deutlich geringere antivirale Wirkung gegen HSV-1. Die Kombination aus SPME+Ca-SP wies eine dosisabhängige antivirale Wirkung zu frühen Zeitpunkten der HSV-1-Infektion auf. Die Effekte der Kombination waren weniger wirksam gegenüber HSV-1 als Ca-SP allein. Entsprechend konnte für die Kombination keine additive Wirkung festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten für alle Substanzen (Ca-SP, SPME, Kombination aus SPME+Ca-SP) eine Abnahme der antiviralen Wirkung zu späteren Zeitpunkten der HSV-1-Infektion. Diese Ergebnisse konnten mittels qPCR-Analyse in Vero-Zellen bestätigt werden. In der qPCR Analyse konnte eine von der Dosis und dem Zeitpunkt abhängige, antivirale Wirkung

für Ca-SP gezeigt werden. Diese Wirkung war vergleichbar mit den Effekten von ACV. Die Kombination aus SPME+Ca-SP wies ebenfalls eine Dosis und Zeitpunkt abhängige, antivirale Wirkung auf.

	HSV-1a, b,c					
	2 Stunden vor der Infektion		0 Stunden/während der Infektion		1 Stunde nach der Infektion	
	Vero-Zellen	HaCaT-Zellen	Vero-Zellen	HaCaT-Zellen	Vero-Zellen	HaCaT-Zellen
Aciclovir	0,06	0,06	0,1	0,13	0,11	0,09
	0,16d		0,2d		0,5d	
SPME	33	8,3	37	34,6	143,3	66,8
	–		–		–	
Ca-SP	0,04	0,07	0,06	0,09	0,4	0,3
	0,4d		0,77d		1,6d	
SPME+Ca-SP	1,7/0,1	1,6/0,08	3,7/0,2	3,0/0,2	47/2,4	15,8/0,8
	4,7/0,2d		60,9/3,1d		130,3/6,5d	

**Tabelle 15: Übersicht über die IC<sub>50</sub>-Werte gemessen in Vero- und HaCaT-Zellen mittels PRA und qPCR.** a, b) Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die inhibitorische Wirkung, dargestellt als IC<sub>50</sub>-Werte (µg/ml), für ACV, Ca-SP, SPME sowie die Kombination aus SPME+Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen, analysiert mittels PRA in Vero- und HaCaT-Zellen. (c) Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus den Mittelwerten ± Standardabweichung von 3 individuellen Experimenten, jeweils im Triplikat gemessen, berechnet. (d) Die Anzahl der viralen DNA-Kopien, gemessen mittels qPCR in Vero-Zellen, zeigen die IC<sub>50</sub>-Werte für ACV, Ca-SP und die Kombination aus SPME+Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen. Eine Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte für SPME war zu keinem Zeitpunkt der Analyse auf Grund der niedrigeren Inhibition von HSV-1 möglich. Die IC<sub>50</sub>-Werte der qPCR Analyse wurden aus einem Experiment, jeweils im Triplikat durchgeführt, (Mittelwert ± Standardabweichung) ermittelt.

#### 4.2. Wirkmechanismus von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten

Nachdem die antivirale Wirkung von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten mit zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden konnte, sollte der potentielle Wirkmechanismus von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen erforscht werden. Vier verschiedene Methoden wurden für diese Untersuchung in Vero- und HaCaT-Zellen angewandt. Die Untersuchung der HaCaT-Zellen, auf Grund ihrer Bedeutung bei der Herpes simplex

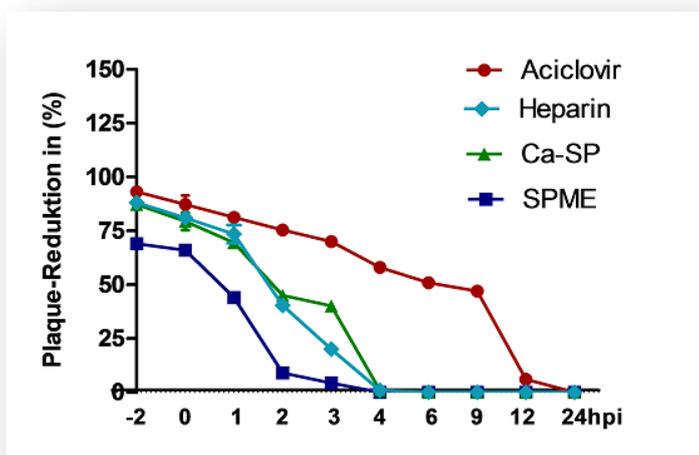
Infektion beim Menschen, war hier von größter Bedeutung. Nachfolgend werden die Ergebnisse aller vier eingesetzten Methoden in humanen Keratinozyten vorgestellt.

#### 4.2.1. Time-of-addition assay: Wirkung von Ca-SP auf frühe Schritte der HSV-1-Infektion

Durch die potente Wirkung von Ca-SP zu frühen Zeitpunkten der Virusinfektion (2 Stunden vor der Infektion; PRA) konnten erste Hinweise erlangt werden, dass Ca-SP vor allem die frühen Schritte der Virus-Zell-Interaktion inhibiert. Um die zeitpunkt-basierte Wirkung der antiviralen Substanzen gegen HSV-1 identifizieren zu können, wurde zuerst ein *Time-of-addition assay* durchgeführt [221]. Dafür wurden die antiviralen Substanzen in einer definierten Konzentration ( $2 \times IC_{50}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten zu infizierten HaCaT-Zellen pipettiert. Die gewählten Zeitpunkte waren an die zeitliche Abfolge des HSV-1-Replikationszyklus angelehnt. Die Reduktion der Plaque-Bildung wurde 72 Stunden nach Infektion im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (zur Kontrolle) ermittelt.

Als Referenz-Inhibitoren für frühe und späte Zeitpunkte der Virus-Zell-Interaktion wurden Heparin und ACV neben Ca-SP und SPME verwendet. Da die Wirkung von Heparin als Inhibitor der Virusanheftung u.a. an humane Keratinozyten bekannt ist, wurde es für die Untersuchung des Wirkmechanismus verwendet [216]. ACV dagegen wurde als Referenz-Inhibitor für die Inhibition der viralen DNA-Replikation verwendet [215].

Die effektivste Blockierung der HSV-1-Infektion durch Ca-SP, SPME, Heparin und ACV konnte bei Zugabe 2 Stunden vor der Infektion (s. Abbildung 21) gemessen werden. Die antivirale Wirkung von ACV war in diesem Experiment bis zu 9 Stunden nach der Infektion feststellbar, wobei ab diesem Zeitpunkt eine deutliche Abnahme der Wirkung zu detektieren war. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Zeitpunkt der viralen DNA-Synthese überein, die ungefähr 7 bis 9 Stunden nach der Infektion [37] stattfindet.



**Abbildung 21: Inhibierung der frühen Phase der HSV-1-Infektion in humanen Keratinozyten durch Ca-SP.** Die antivirale Wirkung von Ca-SP war vergleichbar mit der Kinetik von Heparin. Eine drastische Abnahme der Wirkung 1 Stunde nach der Infektion (hpi) war für Ca-SP, SPME und Heparin zu erkennen. Eine Wirkung von ACV war bis zu 9 hpi feststellbar. Abbildung 21 zeigt

*die Mittelwerte  $\pm$  Standard-abweichung für 3 individuelle Experimente.*

Im Vergleich dazu konnte eine drastische Reduktion der antiviralen Wirkung bei einer Zugabe der Substanzen später als 1 Stunde nach der HSV-1-Infektion für Heparin, Ca-SP und SPME festgestellt werden. Die Kinetik von Ca-SP war nahezu identisch mit der Wirkung von Heparin. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass Ca-SP die frühe Phase des Replikationszyklus, mutmaßlich des viralen Eintritts, in die Zellen inhibiert.

#### ***4.2.2. Inhibierung der HSV-1 Anheftung an humane Keratinozyten durch Ca-SP***

Der Eintritt von HSV-1 in die Zielzelle ist ein mehrstufiger Prozess, bestehend aus der Virusanheftung und der Penetration des Virus in die Zelle. Um die Wirkung von Ca-SP auf den Eintrittsprozess von HSV-1 in humane Keratinozyten detaillierter zu analysieren, wurde ein modifizierter PRA in zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Die frühen Schritte (vor Anheftung) des Virus-Eintritts wurden hierbei von den späteren Schritten (nach Anheftung) separiert. Heparin und ACV als Referenz-Inhibitoren für die Blockierung der Prä- und Post-Anheftungsschritte fanden in diesem Experiment ebenfalls Verwendung.

HaCaT-Zellen wurden auf 4 °C gekühlt und mit HSV-1 (4°C) für 1 Stunde infiziert. Im Anschluss an die Infektion wurden die Zellen gewaschen und bei 37°C bis zur Auszählung der Plaques inkubiert.

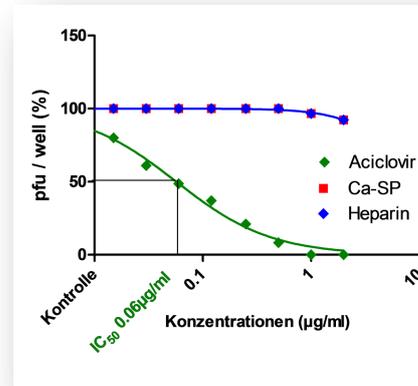
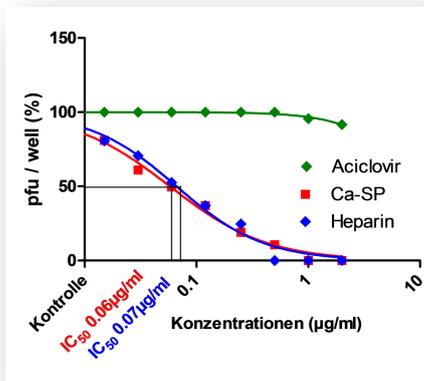
Die Kühlung der Zellen sowie die Infektion bei 4°C ermöglicht eine Anheftung des Virus an die Zellen. Das Penetrieren des Virus in die Zellen ist aufgrund des unterbundenen Zellmetabolismus bei 4°C zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht möglich [217]. Das anschließende Waschen der Zellen diente dazu, dass lediglich das an der Zelloberfläche gebundene Virus in der Probe verblieb. Jegliches Virus, welches im Medium noch ungebunden vorhanden war, wurde dadurch entfernt. Durch die nachfolgende Temperaturerhöhung und die Inkubation der Zellen bei 37 °C war die Penetration des restlichen, an der Zelloberfläche gebundenen Virus, möglich.

Dieses Protokoll ermöglichte eine Aussage über den Mechanismus von Ca-SP auf die Blockierung von HSV-1- Infektionen. Aufgrund der Trennung des Eintrittsprozesses in die Phase der Anheftung und Penetration des Virus lässt sich die Wirkung von Ca-SP auf die jeweiligen Schritte in der Virus-Zell-Interaktion bestimmen.

Verschiedene Konzentrationen Ca-SP, Heparin und ACV wurden entweder ausschließlich 2 Stunden vor der Infektion (Protokoll A, s. Abbildung 22a) oder 1 Stunde nach der Infektion (Protokoll B, s. Abbildung 22b) zu den Zellen pipettiert.

**a) Prä - Anheftung**

**b) Post – Anheftung**



**Abbildung 22: Inhibition der Virus-Anheftung durch Ca-SP in humanen Keratinozyten.** a) Die Untersuchung der antiviralen Wirkung auf die Prä-Anheftung von HSV-1 zeigte eine vergleichbar potente Wirkung von Ca-SP (0,06 µg/ml) mit Heparin (0,07 µg/ml) bei Zugabe der Substanzen 2 Stunden vor der Infektion. ACV wies in diesem Experiment keinen antiviralen Effekt auf. b) Die Untersuchung der Wirkung auf die Post-Anheftung des Virus zeigte keine Effekte von Ca-SP und Heparin bei Zugabe der Substanzen 1 Stunde nach der Infektion. Eine potente Inhibition des Virus durch ACV (0,06 µg/ml) konnte gemessen werden. In Graph a) und b) sind jeweils die Dosis-Wirkungskurven (Mittelwerte ± Standardabweichung für 3 individuelle Experimente, jeweils im Triplikat) im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle) als pfu/well in % dargestellt.

Das Ergebnis des Versuchs nach Protokoll A (Zugabe der Substanzen ausschließlich während der Anheftungsphase) zeigt, dass Ca-SP und Heparin die Anheftung des Virus in Abhängigkeit von der Dosis inhibieren (s. Abbildung 22a). Bei Zugabe nach der Anheftung (s. Abbildung 22b) war für beide Substanzen kein Effekt auf die HSV-1-Infektion feststellbar.

Im Gegensatz dazu wies ACV eine potente antivirale Wirkung nur bei Zugabe nach der Anheftung (Protokoll B, s. Abbildung 22b) auf. Bei Zugabe von ACV nur während der Anheftungsphase (Protokoll A, s. Abbildung 22a) war keine Hemmung der Infektion festzustellen. Dieses Ergebnis war für ACV als Inhibitor der viralen DNA-Replikation zu erwarten.

Zusammengefasst zeigten diese Experimente eine Inhibierung der HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten durch Ca-SP. Die betreffende IC<sub>50</sub> Wirkung war vergleichbar mit dem Effekt von Heparin.

#### **4.2.3. VP16 Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF)**

Nach der Anheftung des Virus an die Zielzelle erfolgt die Penetration, bei der das Kapsid und Tegumentproteine ins Zytosol entlassen werden. Dies ermöglicht den Nachweis von Tegumentproteinen in infizierten Zellen.

Um die Inhibierung der HSV-1-Anheftung an HaCaT-Zellen durch Ca-SP unmittelbar zu untersuchen, wurde die Aufnahme des viralen Tegument Proteins VP16 nach der HSV-1-Infektion mittels IF analysiert.

HaCaT-Zellen wurden nach der Inkubation mit den jeweiligen Substanzverdünnungen (Ca-SP, Heparin und ACV) gekühlt und bei 4°C mit HSV-1 (MOI 10) infiziert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C.

Cycloheximid (CHX) wurde als Translationshemmer [219] zu der Virussuspension zugegeben mit dem Ziel, ausschließlich eingebrachtes VP16 mittels IF zu detektieren.

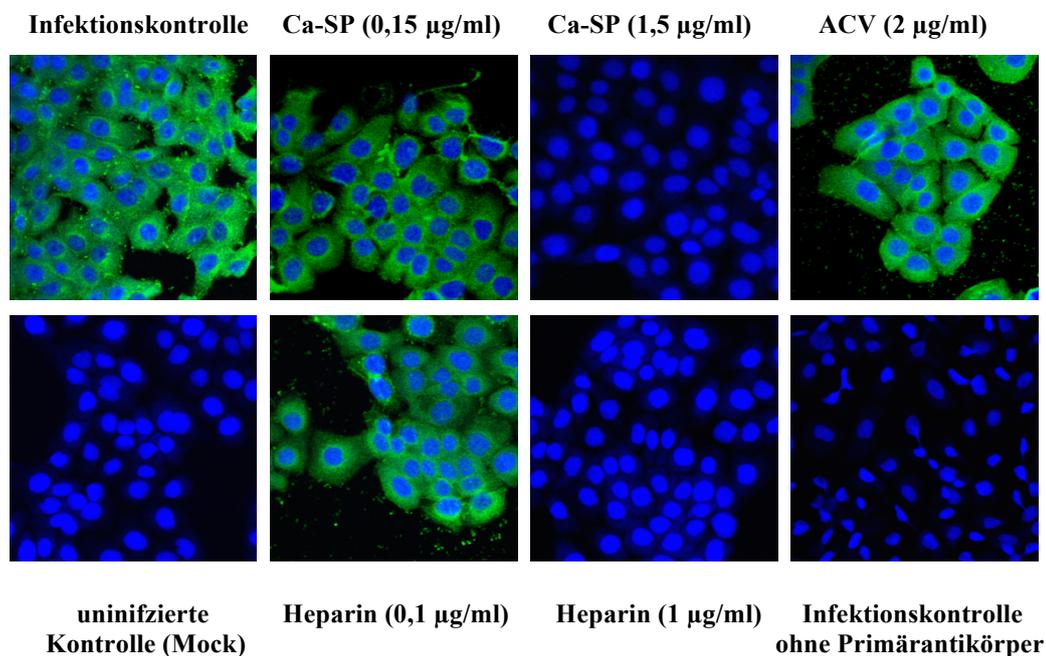
Als Kontrollen wurden uninfizierte Zellen (Mock) sowie infizierte unbehandelte Zellen ohne Substanzen (zur Infektionskontrolle) verwendet. Eine weitere Kontrolle erfolgte, um ein unspezifisches Signal des Sekundärantikörpers auszuschließen. Hierfür wurden infizierte unbehandelte Zellen nur mit dem Sekundärantikörper (Infektionskontrolle ohne Primärantikörper) gefärbt. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Axioplan LSM510, Zeiss).

Abbildung 23 zeigt, dass bei geringeren Konzentrationen von Ca-SP (0,15 µg/ml) und Heparin (0,1 µg/ml) die Anheftung des Virus nicht blockiert wurde, da eingebrachtes VP16 im Zytosol der Zellen detektierbar war. Dagegen konnte bei Zugabe von hohen Konzentrationen Ca-SP (1,5 µg/ml) und Heparin (1 µg/ml) vor der Virus-Anheftung an die Zellen keinerlei VP16 im Zytosol detektiert werden. Die Anheftung des Virus wurde bei diesen Konzentrationen der Substanzen vollständig inhibiert. Die Verwendung höherer Konzentrationen von Ca-SP und Heparin waren in diesem Experiment auf Grund der hohen MOI von 10 notwendig. Um das bei der Infektion eingebrachte VP16 nachweisen zu können, ist eine hohe MOI notwendig. Dies wiederum erfordert höhere Konzentrationen der jeweiligen Substanzen, um eine Blockierung von HSV-1 nachweisen zu können.

Damit verglichen war keine Inhibition durch ACV (2 µg/ml) auf die Anheftung des Virus feststellbar. Die Infektionskontrolle wies, ebenso wie die mit ACV behandelte Probe, eingebrachtes VP16 in den Zellen auf. Im Gegensatz dazu konnte keinerlei VP16 in den uninfizierten Kontrollzellen (Mock) nachgewiesen werden. Die Infektionskontrolle, die lediglich mit dem zweiten Antikörper gefärbt wurde, zeigte keine unspezifische Bindung dieses Antikörpers an andere virale Proteine.

Die Ergebnisse der IF bestätigten eine Inhibierung der Virus-Anheftung an humane Keratinozyten durch höhere Konzentrationen Ca-SP. Dieser Effekt war vergleichbar mit der

Wirkung von Heparin. Eine Quantifizierung des Virus war auf Grund der dosisabhängigen Wirkung von Ca-SP und Heparin mittels IF nicht möglich.



**Abbildung 23: Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP und Heparin mittels VP16 Detektion.** Mit der IF konnte eine Blockierung von HSV-1 mittels VP16 Detektion durch hohe Konzentrationen von Ca-SP (1,5 µg/ml) und Heparin (1 µg/ml) nachgewiesen werden. Geringe Konzentrationen Ca-SP (0,15 µg/ml) und Heparin (0,1 µg/ml) dagegen zeigten keinen Einfluss auf die Anheftung des Virus an die humanen Keratinozyten. Zellen, die mit ACV behandelt worden waren, wiesen keine sichtbaren Unterschiede hinsichtlich der Menge VP16 im Vergleich zur Infektionskontrolle auf. Eine Quantifizierung von eingebrachtem VP16 war jedoch in der IF nicht möglich.

#### 4.2.4. Quantifizierung von VP16 in HSV-1 infizierten HaCaT Zellen

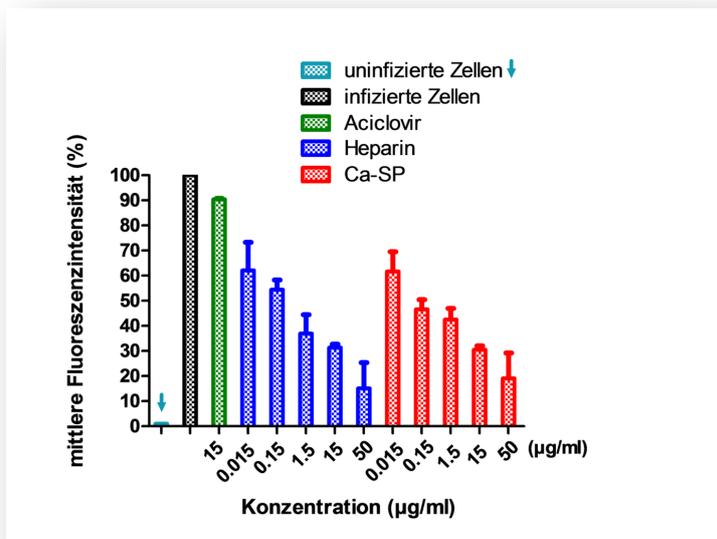
Mittels IF konnte eine Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP gezeigt werden. Auf Grund dessen, dass diese Methode nicht sehr sensitiv ist und die Quantifizierung einer dosisabhängigen Wirkung nicht möglich war, wurde die Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Diese Methode ermöglichte die Quantifizierung von eingebrachtem VP16 und den damit verbundenen Nachweis der dosisabhängigen Wirkung von Ca-SP auf den Eintritt des Virus.

Hierfür wurden HaCaT-Zellen gemäß dem Protokoll der IF mit den jeweiligen Substanzverdünnungen (Ca-SP, Heparin und ACV) vorinkubiert und mit HSV-1 infiziert (MOI 3). Nach einer weiteren Inkubationszeit erfolgte die Präparation der Zellen für die FACS-Analyse. Für die Quantifizierung von VP16 wurde der Virussuspension ebenfalls CHX zugefügt, was die Blockierung der Synthese von VP16 zur Folge hatte. Zur Kontrolle wurden

unbehandelte uninfizierte Zellen (Mock) sowie infizierte Zellen ohne Substanzen mitgeführt. In der FACS-Analyse erfolgte die Verwendung höherer Konzentrationen der einzelnen Substanzen. Dies ermöglichte die Quantifizierung der Reduktion des eingebrachten VP16 im Vergleich zu den infizierten Zellen bei der hohen MOI von 3.

Die FACS-Analyse wurde mit dem FACS Canto I Flow Cytometer durchgeführt, wobei die Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität in % angegeben wurden. Die Messung erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Fluoreszenzintensität wurde aus den Duplikaten gemittelt.

Abbildung 24 zeigt die Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP und Heparin sowie eine dosisabhängige Reduktion von VP16. Im Vergleich dazu konnte für ACV keine sichtbare Wirkung auf den Transport von VP16 in die humanen Keratinozyten festgestellt werden. Die Menge an VP16 in den infizierten Kontrollzellen war nur geringfügig höher als bei den mit ACV behandelten Zellen.



**Abbildung 24:**  
**Quantifizierung von VP16 in HSV-1 infizierten HaCaT-Zellen mittels FACS-Analyse.**  
 Das Ergebnis der FACS-Analyse zeigte eine dosisabhängige Reduktion von VP16 durch Ca-SP, die vergleichbar mit der Wirkung von Heparin war. Eine Divergenz dazu wies ACV auf. Es konnte keine sichtbare Reduktion von VP16 im Vergleich zu infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die mittlere Fluoreszenz-intensität in % wurden normiert, wobei für Mock = 1 und die infizierten Kontrollzellen=100 festgelegt wurde.

Als wesentliches Ergebnis zeigten die vier angewandten Methoden zur Untersuchung des Wirkmechanismus von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen, dass Ca-SP die Anheftung des Virus an humane Keratinozyten inhibiert. Die Blockierung der Virus-Anheftung war in allen durchgeführten Methoden ähnlich der Wirkung von Heparin.

### **4.3. *S. platensis* Mikroalgen Extrakt und Calcium Spirulan: Experimente zum erweiterten Wirkungsverständnis**

Neben der vorangegangenen Testung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP und SPME sowie den Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Ca-SP wurden zusätzliche Experimente durchgeführt.

Sie hatten das Ziel, weiterführende Einsichten zur Wirksamkeit von Ca-SP und SPME zu erlangen. Hierzu erfolgte die Überprüfung der Wirkungsstabilität von Ca-SP in verschiedenen Chargen. Die Bestimmung des antiviralen Effektes mittels der *Virus yield-Reduktionsmethode* nach einem publizierten Protokoll war ein weiterer Bestandteil dieser Experimente [186]. Die Untersuchung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME und Ca-SP diente ebenfalls den angestrebten weiterführenden Erkenntnissen zur Wirksamkeit von Ca-SP und SPME.

#### **4.3.1. Testung verschiedener Ca-SP Chargen auf ihre antivirale Wirkungsstabilität**

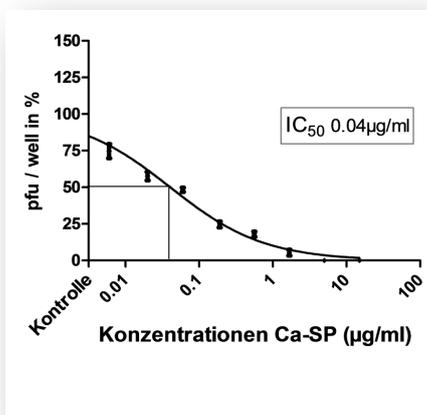
Auf Grund dessen, dass das in der durchgeführten Forschungsarbeit verwendete Ca-SP keine standardisierte, konventionell erwerbliche Präparation ist, wurde die Stabilität der antiviralen Wirkung verschiedener Chargen mittels PRA auf HSV-1-Infektionen untersucht.

Das vom Hersteller mit gleichen Gewinnungs- und Extraktionsmethoden isolierte Ca-SP wurde sowohl als 1% -ige Lösung in H<sub>2</sub>O als auch in lyophilisierter Form für diese Testung zur Verfügung gestellt.

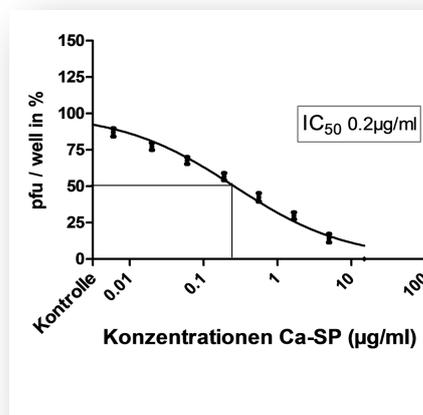
Für die Untersuchung der Wirkungsstabilität wurde die in allen Experimenten eingesetzte Charge (H17/18), eine neue Charge Ca-SP (H20) sowie lyophilisiertes Ca-SP, welches im Labor direkt vor der Testung in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst wurde, verwendet. Die Auswertung des PRA in HaCaT-Zellen zeigte für alle drei untersuchten Chargen IC<sub>50</sub>-Werte von 0,04 bis 0,2 µg/ml.

Die in allen Experimenten verwendete Charge (H17/18, s. Abbildung 25a) wies in dieser Testung einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04 µg/ml und in den vorangegangenen Experimenten zur Testung der antiviralen Wirksamkeit einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04 µg/ml in Vero- und 0,07 µg/ml in HaCaT-Zellen auf. Die neu hergestellte Charge (H20, s. Abbildung 25b) konnte die HSV-1-Infektion mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,2 µg/ml inhibieren, wogegen die lyophilisierte Probe (s. Abbildung 25c), die direkt vor der Testung in H<sub>2</sub>O resuspendiert wurde, einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,06 µg/ml aufwies.

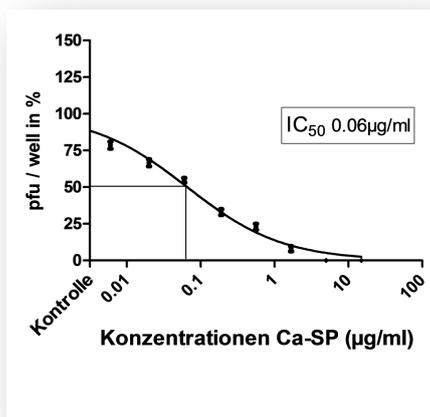
a)



b)



c)



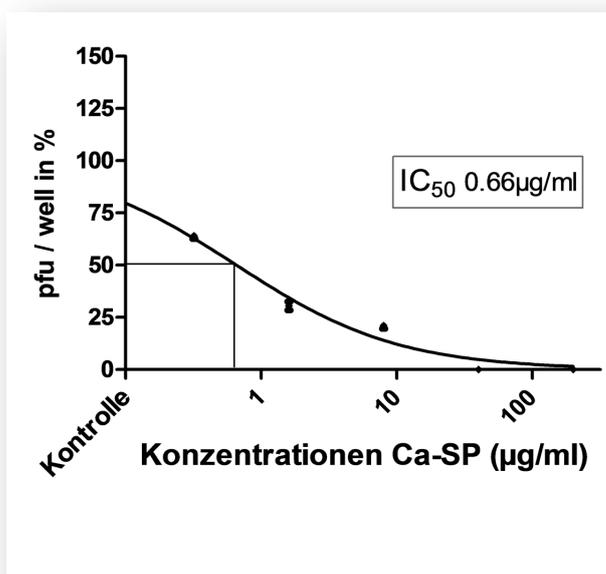
**Abbildung 25: Testung verschiedener Ca-SP Chargen auf ihre Wirkungsstabilität.** a) Die in allen Experimenten verwendete Charge (H17/18) wies mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04 µg/ml eine potente Wirkung auf. b) Die neu hergestellte Charge (H20) dagegen zeigte eine reduzierte antivirale Wirksamkeit gegen HSV-1 (IC<sub>50</sub> 0,2 µg/ml). Abbildung c) zeigt, daß die Wirkung der lyophilisierten Probe (IC<sub>50</sub> 0,06 µg/ml) mit Charge a) vergleichbar potent war. Abbildung 25 zeigt die Testung der verschiedenen Chargen mittels PRA bei Zugabe von Ca-SP 2 Stunden vor der Infektion im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle). Die Auswertung und Darstellung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde wie beim PRA durchgeführt. Die Daten zeigen ein im Triplikat durchgeführtes Experiment in HaCaT-Zellen.

Zusammenfassend zeigt die Testung der verschiedenen Ca-SP-Chargen eine Stabilität der Wirkung gegen HSV-1. Bei der bisher verwendeten Charge (H17/18) konnte in dieser Testung eine potente antivirale Wirkung (0,04 µg/ml) festgestellt werden. Bei früheren Testungen im PRA war der antivirale Effekt in HaCaT-Zellen etwas niedriger (0,07 µg/ml). Die lyophilisierte Probe bestätigte die potente antivirale Wirkung, wobei die neue Charge (H20) einen 5-fach geringeren antiviralen Effekt (0,2 µg/ml) zeigte. Natürliche Rohstoffe wie Ca-SP können geringe Abweichungen in ihrer chemischen Homogenität und Zusammensetzung, bedingt durch verschiedene Einflüsse bei der Kultivierung, Gewinnung und Fraktionierung, aufweisen. Diese Abweichungen können zu Schwankungen der Stabilität in der Wirkung führen. Die Schwankungen zwischen der bislang verwendeten Charge H17/18 und der neuen Charge H20 zeigten eine Abnahme der antiviralen Wirkung um das Zehnfache.

#### 4.3.2. Die Messung der antiviralen Wirkung von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen mit der Virus yield-Reduktionsmethode

Eine antivirale Wirkung von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen wurde bereits von Hayashi et al. [186] publiziert. Diese Wirkung wurde mittels *Virus yield-Reduktionsmethode* in Vero-Zellen gemessen und zeigt eine deutlich niedrigere antivirale Wirksamkeit für Ca-SP im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen. Auf Grund dieser starken Abweichung wurde die Wirkung von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen nach Vorgabe des publizierten Protokolls von Hayashi et al. [186] wiederholt. Diese Messung ermöglichte die Einordnung der gemessenen Wirkung in die bereits publizierten Effekte von Ca-SP.

Für die Durchführung der *Virus yield-Reduktionsmethode* wurde die in allen Experimenten eingesetzte Charge Ca-SP (H17/18) verwendet. Vero-Zellen wurden in 6-Kavität Schalen mit 5 Konzentrationen Ca-SP für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und mit einer MOI von 0,2 pfu/Zelle für 1 Stunde infiziert. Eine weitere Inkubation der Zellen mit Substanzverdünnungen ohne Virus erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet bei -80°C tiefgefroren. Das Auftauen des Zellpellets im Wasserbad folgte. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die infizierten Zellen zu lysieren. Der virushaltige Überstand wurde anschließend für die Titration mit 8 Verdünnungen in 10er Potenzschritten verwendet. Die Virusverdünnungen wurden zu Vero-Zellen pipettiert bevor diese für 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Nach Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte die Auswertung der Plaques am Mikroskop. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt.



**Abbildung 26: Bestimmung der antiviralen Wirkung von Ca-SP mittels Virus yield-Reduktionsmethode.** Die Messung der Ca-SP Charge H17/18 ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von 0,66 µg/ml im Vergleich zu 0,92 µg/ml bzw. 0,86 µg/ml, gemessen und publiziert von Hayashi et al. [186]. In Abbildung 26 ist die Dosis-Wirkungskurve für 1 Experiment im Duplikat gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) als pfu/well in % im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

Ein antiviraler Effekt von 0,66 µg/ml ( $IC_{50}$ ) konnte hier für Ca-SP im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (zur Kontrolle) gemessen werden (s. Abbildung 26). Im Gegensatz dazu ermittelten Hayashi et al. [186] eine antivirale Wirkung von Ca-SP gegen HSV-1 in Vero-Zellen von 0,92 µg/ml bzw. 0,86 µg/ml.

Folglich war die mit dieser Methode gemessene antivirale Wirkung der Charge Ca-SP (H17/18) mit den bereits publizierten Effekten von Ca-SP vergleichbar. Die potente antivirale Wirkung von Ca-SP, die zuvor mittels PRA detektiert wurde, lässt sich auf die direkte Nachweismethode des PRA zurück führen. Vermutlich sind die unterschiedlichen Methoden zur Virusquantifizierung (*Virus yield-Reduktionsmethode*; PRA) für die große Abweichung der antiviralen Effekte von Ca-SP verantwortlich.

#### ***4.3.3. Die antivirale Wirkung von Ca-SP unter Zugabe von SPME***

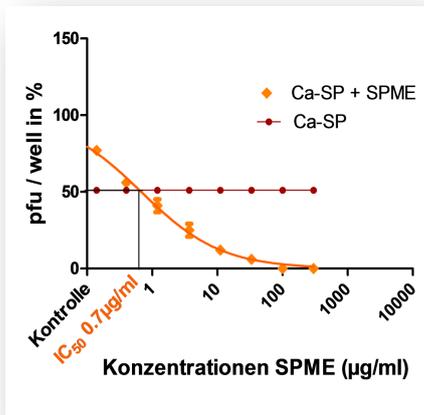
Sowohl Ca-SP als auch SPME sind Hauptbestandteile der topischen Formulierung, die in der klinischen Studie untersucht wurde. Folglich wurde ein möglicher synergistischer Effekt beider Substanzen in Kombination untersucht. Da Ca-SP in den vorangegangenen Testungen mittels PRA eine potente antivirale Wirkung gezeigt hatte, wurde ein möglicher Einfluss von SPME auf die Wirkung von Ca-SP ermittelt.

Hierfür erfolgte der Einsatz von Ca-SP in einer festgelegten Konzentration ( $1 \times IC_{50}$ ) sowie 8 Verdünnungen SPME. Es wurden alle drei Zeitpunkte (2 Stunden vor, 0 Stunden/während und 1 Stunde nach der Infektion) jeweils im Triplikat gemessen. Zur Kontrolle wurden infizierte unbehandelte Zellen sowie Ca-SP in der eingesetzten Konzentration ( $1 \times IC_{50}$ ) allein getestet.

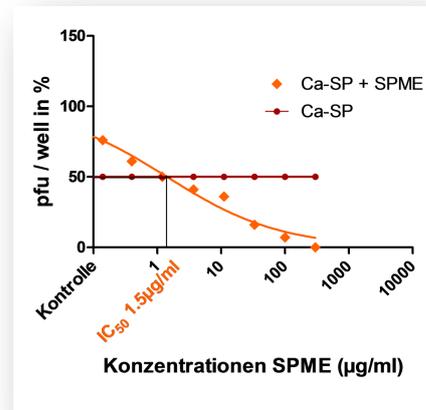
Die Testung der Kombination vom Ca-SP+SPME zeigte für den frühen Zeitpunkt (2 Stunden vor der Infektion, s. Abbildung 27a) eine antivirale Wirkung von  $IC_{50}$  0,7 µg/ml. Die vorherige Testung von Ca-SP allein im PRA ergab einen  $IC_{50}$  Wert von 0,07 µg/ml. Bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen mit dem Virus (s. Abbildung 27b) konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von 1,5 µg/ml für die Kombination und von 0,09 µg/ml für Ca-SP allein in der vorherigen Testung ermittelt werden. Die Auswertung des späten Zeitpunktes (1 Stunde nach der Infektion, s. Abbildung 27c) ergab eine schwache antivirale Wirkung von 47,3 µg/ml für die Kombination von Ca-SP+SPME. Im Vergleich dazu wies die frühere Testung von Ca-SP allein eine Wirkung von 0,3 µg/ml auf. In diesem Experiment wies Ca-SP allein in der eingesetzten Konzentration ( $1 \times IC_{50}$ ) eine 50 %-ige Inhibition der HSV-1-Infektion zu allen Zeitpunkten auf.

Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein synergistischer Effekt bei der Verwendung beider Substanzen (Ca-SP und SPME) in Kombination festgestellt werden. Der Einfluss von SPME zeigt eine Abnahme der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen.

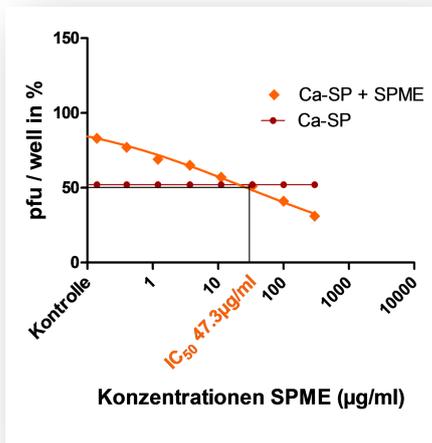
a)



b)



c)



**Abbildung 27: Stabile Wirkung von Ca-SP unter Zugabe von SPME.** a) Die Testung von Ca-SP plus SPME (2 Stunden vor der Infektion) zeigte eine antivirale Wirkung von  $IC_{50}$  0,7  $\mu\text{g/ml}$ . b) Der antivirale Effekt der Kombination nahm bei gleichzeitiger Gabe mit dem Virus (0 Stunden/während der Infektion) ab ( $IC_{50}$  1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und zeigte c) 1 Stunde nach der Infektion eine schwache antivirale Wirkung von  $IC_{50}$  47,3  $\mu\text{g/ml}$ . Abbildung 27 zeigt die Dosis-Wirkungskurven jeweils für 1 Experiment im Triplikat in HaCaT-Zellen gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung als pfu/well (%) im Vergleich zur Kontrolle.

Als Resultat dieser durchgeführten Experimente konnte ein weiterführendes Verständnis über die Wirksamkeit von Ca-SP und SPME erreicht werden. Die Daten zeigten eine Wirksamkeitsstabilität für Ca-SP in verschiedenen Chargen und ermöglichten eine Einordnung der Wirksamkeit von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen in die bisher publizierten Ergebnisse.

Außerdem kann geschlußfolgert werden, dass die Bestimmung eines nichtsynergistischen Effektes von SPME auf die Wirksamkeit von Ca-SP für die Entwicklung zukünftiger antiviraler Therapiestrategien von Bedeutung sein könnte.

#### **4.4. Prophylaktische und therapeutische Effekte einer SPME und Ca-SP enthaltenen topischen Formulierung gegen Herpes labialis im klinischen Modell**

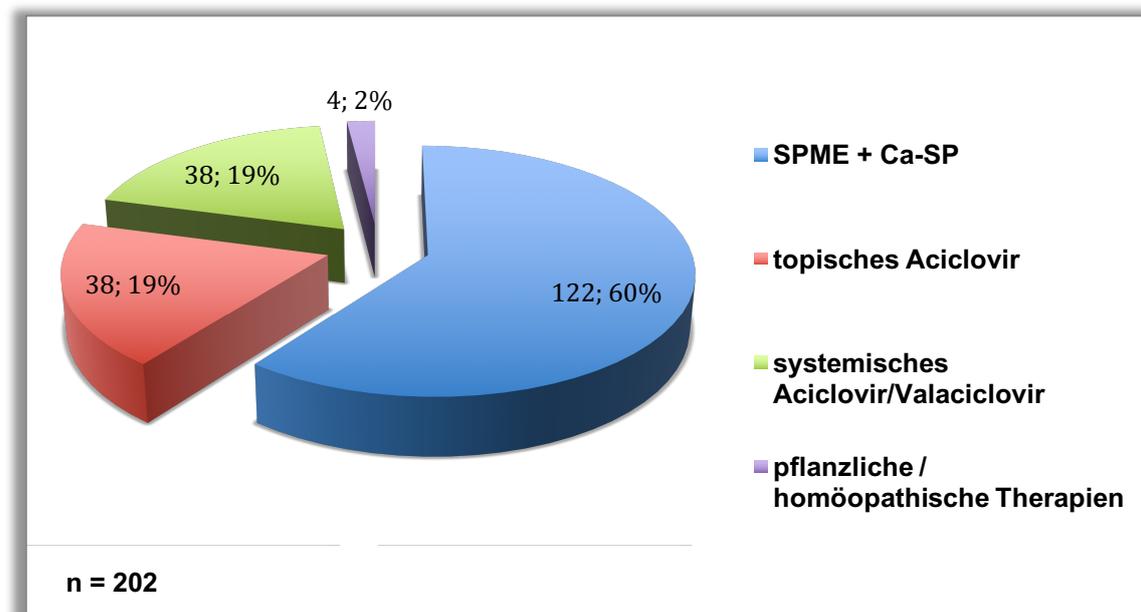
Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchung zeigen die Inhibierung der HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten durch Ca-SP. Aus diesem Grund wurde ein potentieller prophylaktischer und therapeutischer Effekt einer topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) gegen Herpes labialis untersucht.

Die neu entwickelte topische Formulierung besteht u.a. aus dem *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt (10 mg/g) sowie Calcium Spirulan (15 mg/g). Die Wirksamkeit wurde bei Herpes labialis-Rezidiven in einer Hochrisiko-Gruppe im Rahmen eines klinischen Modells untersucht. Obwohl die experimentelle Untersuchung der Kombination von Ca-SP und SPME keine synergistischen inhibitorischen Effekte nachweisen konnte, wurde SPME u.a. wegen der nachgewiesenen positiven Wirkung auf die Zellregeneration in der topischen Formulierung eingesetzt [173].

Ausserdem konnte eine antibakterielle Wirkung von SPME nachgewiesen werden [188], die für die Therapie von Herpes labialis-Rezidiven und der damit einhergehenden Begleiterscheinung von bakteriellen Infektionen von großer Bedeutung ist [17].

##### ***4.4.1. Basis-Informationen zur klinischen Untersuchung und zum Probandenkollektiv***

An der klinischen Anwendungsbeobachtung nahmen insgesamt 35 PMU-Institute aus ganz Deutschland teil, wovon 29 PMU-Institute die Untersuchung abgeschlossen haben. Die übrigen 6 Institute hatten aus internen Gründen oder wegen ausgeschiedener Probanden die klinische Untersuchung abgebrochen. Insgesamt wurden 260 Fragebögen an die PMU-Institute versandt. Am Ende konnten 202 vollständig ausgefüllte Fragebögen ausgewertet werden. Abbildung 28 zeigt, daß 122 von 202 Probanden die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) 2 bis 3 mal täglich als Prophylaxe und Therapie gegen Herpes labialis-Reaktivierung verwendet haben. 38 Probanden benutzten die topische ACV-Prophylaxe und -Therapie, die ebenfalls 2 bis 3 mal täglich aufgetragen wurde.



**Abbildung 28: Verwendung der jeweiligen Herpes labialis-Prophylaxe und -Therapie im Rahmen der PMU-Behandlung.** 122 (60 %) Probanden hatten die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) verwendet, wogegen 38 (19 %) Probanden topische ACV Produkte zur Herpes-Prophylaxe und -Therapie genutzt hatten. Ebenfalls 38 (19 %) Probanden nahmen systemische ACV oder Valaciclovir Tabletten ein und 4 (2 %) Probanden hatten eine Herpes labialis-Prophylaxe und -Therapie, bestehend aus pflanzlichen und/oder homöopathischen Produkten, gewählt. In Abbildung 28 sind die Daten von 202 Probanden abgebildet, die in die Auswertung der klinischen Untersuchung einfließen konnten.

Die systemische Prophylaxe und Therapie, bestehend aus ACV oder Valaciclovir, wurde nach Angaben der jeweils behandelnden Ärzte von 38 Probanden eingenommen. 4 Probanden hatten sich für eine aus pflanzlichen und/oder homöopathischen Produkten bestehende Prophylaxe und Therapie entschieden.

Die nachfolgende Tabelle 16 zeigt die Basis-Charakteristika des Probandenkollektivs der klinischen Untersuchung. Alle Probanden, die an der Untersuchung teilnahmen, waren weiblich und im Alter von 21 bis 76 Jahren.

Ein Einschlusskriterium war u.a., daß mindestens eine vorangegangene PMU-Behandlung sowie bereits eine Herpes labialis-Reaktivierung in der Vorgeschichte der Probanden vorlagen. Die Erfassung der Anzahl der Herpes labialis-Reaktivierungen in den vergangenen 5 Jahren vor der klinischen Untersuchung ergab eine durchschnittliche Reaktivierung von 5,14.

Die Reaktivierung von 5,14 Mal in den letzten 5 Jahren bedeutete für die Betroffenen eine Herpes labialis-Reaktivierung von einmal pro Jahr. Die Anzahl der Reaktivierungen variierte bei allen Probanden insgesamt zwischen 1 bis 50 Mal in den letzten 5 Jahren.

	Alle Therapien	SPME + Ca-SP	Topisches Aciclovir	Systemisches Aciclovir/ Valaciclovir
Anzahl der Probanden (n)	198	122	38	38
Geschlecht weiblich (in %)	100	100	100	100
Alter (Jahre; M ± SD)	45,4 ± 10,02	45,4 ± 10,53	45,5 ± 9,23	45,3 ± 9,46
Alter (Jahre; Median (Range))	45 (21-76)	45 (21-76)	46 (27-70)	45 (24-68)
Vorangegangene Herpes labialis-Reaktivierung (in %)	100	100	100	100
Herpes labialis-Reaktivierung / letzten 5 Jahre (M)	5,14	4,16	5,05	6,65
Herpes labialis-Reaktivierung / letzten 5 Jahre (Median (Range))	3,25 (1-50)	3 (1-20)	3,2 (1-35)	4 (1-50)
Vorangegangene PMU-Behandlung (in %)	100	100	100	100
Jegliche Herpes labialis-Prophylaxe bei vorangegangener PMU-Behandlung n (in %)	107 (54,0)	63 (51,6)	18 (47,4)	26 (68,4)
Atopische Dermatitis n (in %)	6 (3,03)	2 (1,64)	0	4 (10,5)

**Tabelle 16: Basis-Charakteristika des Probandenkollektivs der klinischen Untersuchung.** Dargestellt sind die Daten für alle verwendeten Therapien zusammen, für das verwendete Testprodukt (SPME+Ca-SP) sowie für die topische ACV und systemische ACV/Valaciclovir-Therapie. Die Ergebnisse für die eingesetzte pflanzliche und/oder homöopathische Therapie wurden in diese Auswertung nicht mit einbezogen. In der Tabelle werden die Anzahl der Probanden (n) und zugehörige %-Werte (%) dargestellt. Des Weiteren sind Angaben zum Mittelwert (M) und der jeweiligen Standardabweichung (SD, *standard deviation*) sowie für den Median und den entsprechenden Bereich (*Range*) aufgeführt.

Von weiterem Interesse war die Verwendung einer Herpes labialis-Prophylaxe bei der vorangegangenen PMU-Behandlung, die von 107 Probanden (54%) verwendet wurde. 63 Probanden, die bei der letzten PMU-Behandlung eine Prophylaxe verwendet hatten, entschieden sich in der klinischen Untersuchung zur Verwendung des Testprodukts (SPME+Ca-SP). 18 Probanden (47,4%) dagegen benutzten die topische ACV-Prophylaxe und 26 Probanden (68,4%) entschieden sich für eine systemische Prophylaxe.

Neben der vorangegangenen Herpes labialis-Historie wurde ausserdem erfasst, ob die Probanden eine atopische Dermatitis aufwiesen. Probanden, die an der chronischen Ekzemerkrankung leiden, zählen bei Herpes labialis-Reaktivierung zur Hochrisiko-Gruppe.

6 von 202 Probanden der klinischen Untersuchung gehörten zum Kreis der Atopiker, wobei 2 Probanden das Testprodukt (SPME+Ca-SP) und 4 Probanden die systemische Prophylaxe verwendeten. Folglich bestand für 3 % der Probanden ein erhöhtes Risiko der Herpes labialis-Reaktivierung durch die atopische Dermatitis und die Herpes labialis-Historie.

In Tabelle 16 sind die Daten für alle Therapien zusammen sowie für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP), die topische ACV-Prophylaxe und die systemische ACV/Valaciclovir-Prophylaxe dargestellt.

Die Daten der 4 Probanden mit einer pflanzliche und/oder homöopathische Prophylaxe und Therapie wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen, da diese Form der Prophylaxe und Therapie keine Standardtherapie darstellt und nicht mit der topischen Formulierung vergleichbar war. Alle 4 erlitten nach der PMU-Behandlung eine Herpes labialis-Reaktivierung.

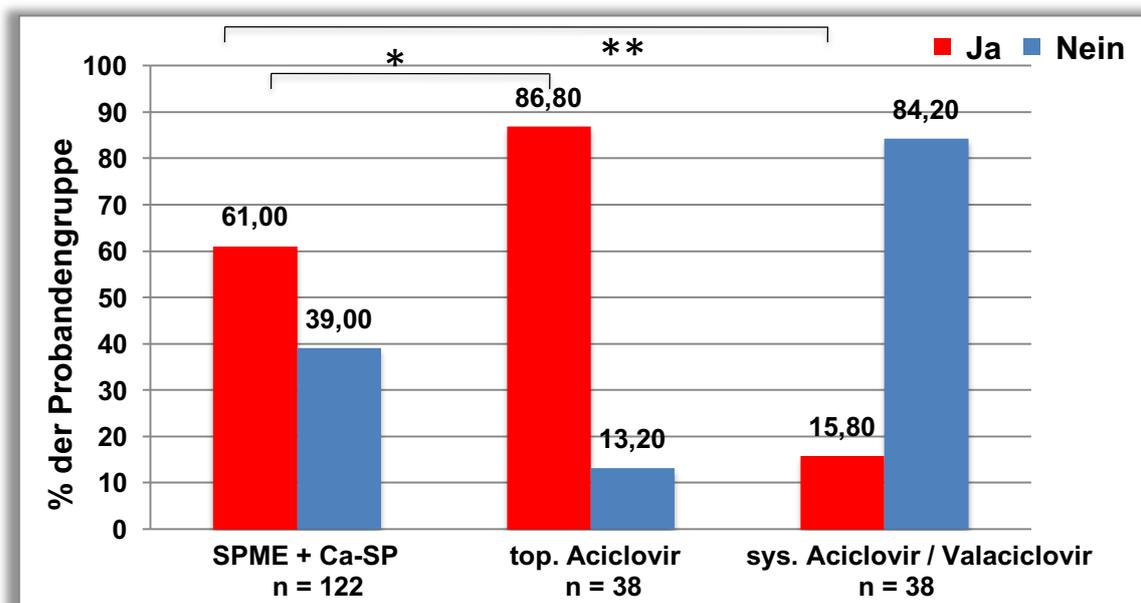
#### ***4.4.2. Klinische Evaluation der Herpes labialis-Reaktivierung bei Hochrisiko-Probanden nach der PMU-Behandlung***

Die Auswertung der klinischen Untersuchung zeigte, (s. Abbildung 29) dass 61 % der Probanden, die die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) verwendet hatten, eine Herpes labialis-Reaktivierung nach der PMU-Behandlung bekamen.

39 % dagegen wiesen keine Herpes-Reaktivierung auf. Die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) wies eine signifikant schwächere Wirkung als die systemische ACV/Valaciclovir-Prophylaxe und -Therapie auf. 15,8 % der Probanden erlitten unter der systemischen Prophylaxe und Therapie eine Herpes labialis-Reaktivierung. 84,2 % waren dagegen nach der PMU-Behandlung frei von Herpes-Rezidiven.

Im Vergleich zur topischen ACV-Prophylaxe und -Therapie war die Verwendung des Testproduktes (SPME+Ca-SP) bei der Prävention von Herpes labialis-Rezidiven signifikant wirksamer.

86,8 % der Probanden erlitten ein Herpes labialis-Rezidiv mit der topischen ACV-Prophylaxe und -Therapie, wogegen 13,2 % der Probanden keinerlei Herpes-Reaktivierung nach Verwendung der topischen ACV-Produkte zeigten (s. Abbildung 29).

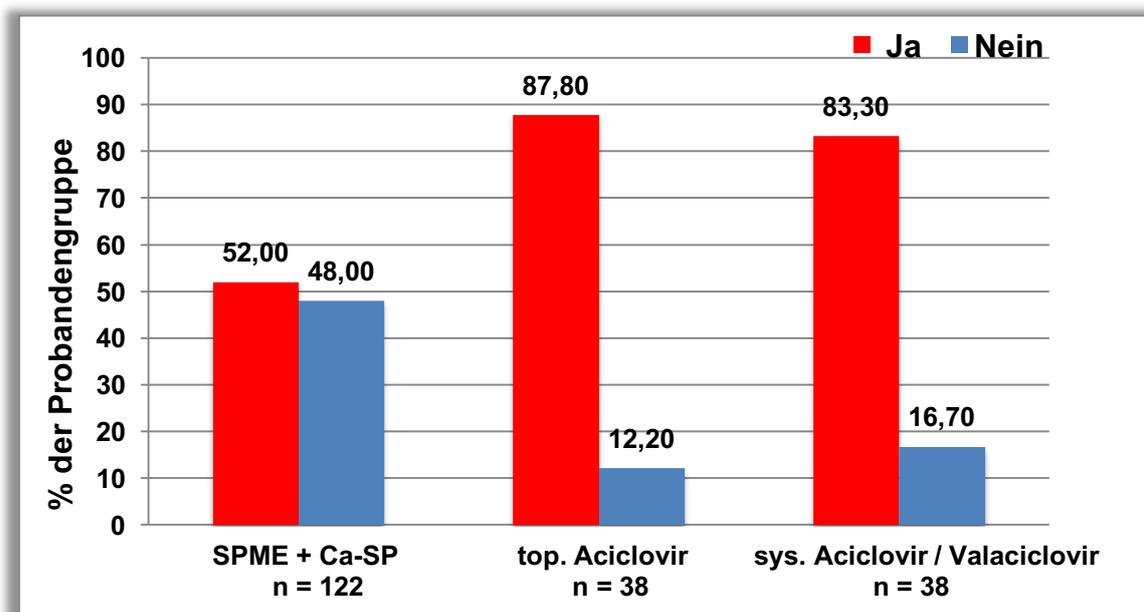


**Abbildung 29: Herpes labialis-Reaktivierung nach PMU-Behandlung bei Verwendung der topischen Formulierung im Vergleich zur herrkömmlichen topischen oder systemischen Prophylaxe und Therapie.** Die topische Formulierung wies eine signifikante Wirkung bei der Prophylaxe von Herpes labialis-Reaktivierungen im Vergleich zu topischen ACV-Produkten auf (übergreifender  $\chi^2$ -Test; \* Testprodukt vs. topisches ACV  $p=0.0015$ ). Die Prophylaxe von Herpes labialis-Reaktivierungen war im Vergleich zur systemischen ACV/Valaciclovir-Prophylaxe und -Therapie signifikant schwächer (\*\*Testprodukt vs. systemische Antivirale-Therapie  $p<0.0001$ ; (beide durch Marascuilo's post hoc multiple proportion comparison ermittelt). Die Ergebnisse sind in % der jeweiligen Probandengruppe abgebildet.

Die Abheilung der Herpes labialis-Reaktivierung erfolgt üblicherweise mit einer gelblichen Krustenbildung, hervorgerufen durch *Staphylococcus aureus* [17]. Folglich war die Erhebung der Verhinderung dieser Krustenbildung auf Grund der antibakteriellen Wirkung von SPME in der topischen Formulierung von Bedeutung.

Abbildung 30 zeigt die Abheilung des Herpes-Rezidivs mit einer Kruste. Die Verwendung der topischen Formulierung verhinderte bei 48 % der Probanden eine Krustenbildung.

Im Vergleich dazu heilte die Herpes labialis-Reaktivierung bei 87,8 % der Probanden, die topische ACV-Produkte verwendet hatten, mit einer Kruste ab. 12,2 % der Probanden zeigten eine krustenfreie Abheilung. Die Ergebnisse für die systemische Prophylaxe/Therapie waren ähnlich: 83,3 % der Probanden erlitten eine Krustenbildung nach Auftreten des Herpes-Rezidivs und bei 16,7 % der Probanden heilte das Herpes-Rezidiv ohne eine Kruste ab.

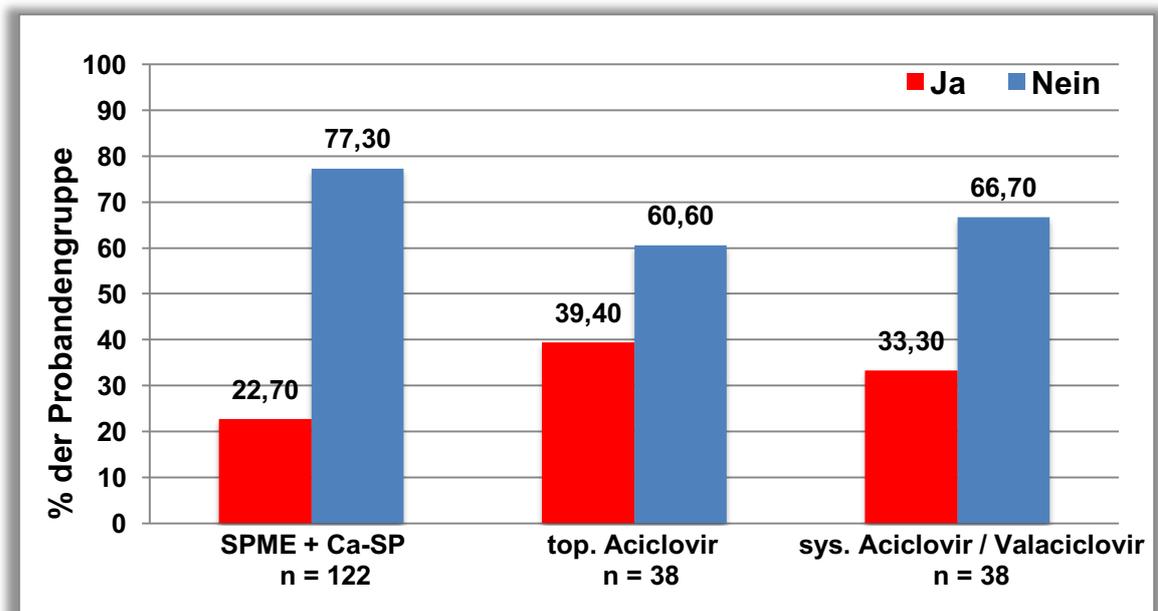


**Abbildung 30: Abheilung des Herpes-Rezidivs mit einer Kruste.** *Abbildung 30 zeigt die Auswertung (in %) der Krustenbildung (Ja) bzw. Verhinderung (Nein) während der Abheilung der Herpes labialis-Reaktivierung unter Verwendung der verschiedenen Prophylaxen und Therapien. Die Verwendung der topischen Formulierung wies ein reduziertes Auftreten von Krusten auf. Die topische und systemische ACV und/oder Valaciclovir-Therapie zeigte geringe Differenzen in der Krustenbildung bei der Abheilung.*

Des Weiteren wurde in der klinischen Untersuchung analysiert, ob die Abheilung der Herpes labialis-Reaktivierung mit trockenen Lippen einherging.

Die Abbildung 31 zeigt, dass nach Verwendung der topischen ACV-Therapie 39,4 % der Probanden trockene Lippen hatten. 60,6 % dieser Probanden hatten keine trockenen Lippen nach Abheilung des Herpes-Rezidivs.

Nach Verwendung der systemischen Therapie litten 33,3 % an trockenen Lippen und 66,7 % verneinten dies. Im Vergleich dazu wiesen 22,7 % der Probanden nach Verwendung der topischen Formulierung trockene Lippen auf, wogegen 77,3 % keine trockenen Lippen hatten.



*Abbildung 31: Trockene Lippen nach der Abheilung des Herpes-Rezidivs unter Verwendung der verschiedenen topischen und systemischen Therapien im Vergleich zur topischen Formulierung. Das Auftreten von trockenen Lippen nach der Abheilung des Herpes-Rezidivs war unter der Verwendung der topischen ACV-Therapie (39,4 %) vergleichbar mit dem Auftreten nach der Einnahme der systemischen Therapie (33,3 %). Die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) wies mit 22,7 % eine Reduktion der trockenen Lippen im Vergleich zur übrigen Herpes- Therapie auf.*

Die Dauer der Herpes labialis-Reaktivierung war mit durchschnittlich 5 bis 8 Tagen unter Verwendung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) vergleichbar mit der Verwendung der topischen ACV-Prophylaxe und -Therapie. Probanden, die eine systemische ACV/Valaciclovir-Therapie eingenommen hatten, litten im Gegensatz dazu nur 1 bis 4 Tage an dem Herpes-Rezidiv (Daten nicht abgebildet).

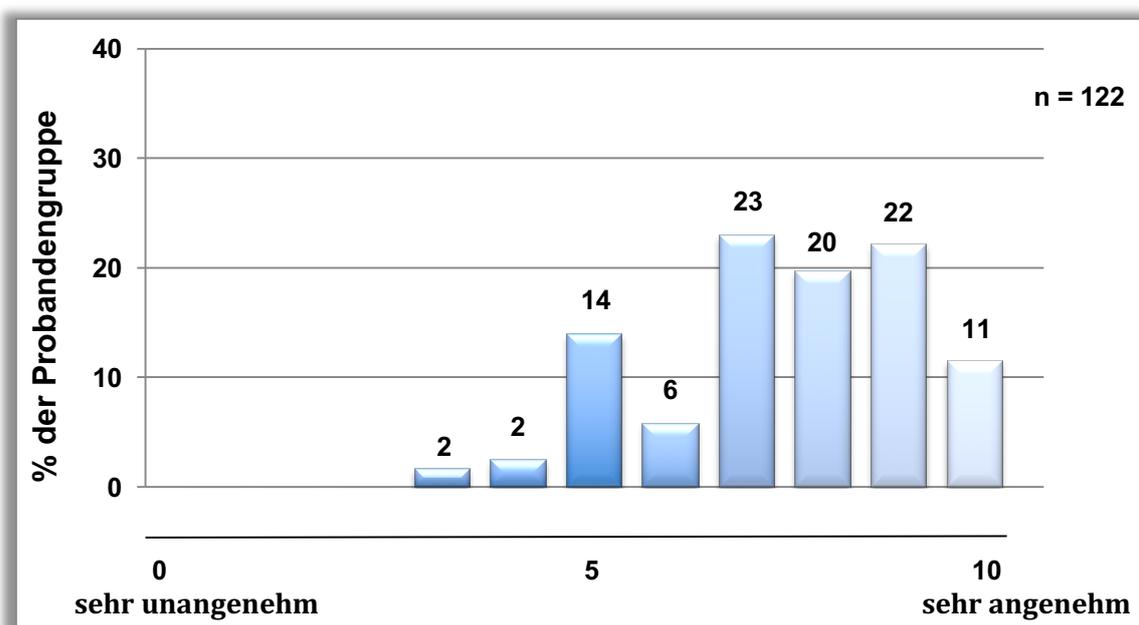
#### **4.4.3. Die topischen Formulierung - Verträglichkeit und Probandenzufriedenheit**

Die Probanden, die die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) als Prophylaxe und Therapie verwendet hatten, wurden bezüglich eventueller Reaktionen und Unverträglichkeiten auf das Testprodukt befragt. Des Weiteren wurden unangenehme Eigenschaften sowie die Produktzufriedenheit erfasst.

Die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) wurde von allen Probanden (n = 122) sehr gut vertragen und es kam zu keinerlei Unverträglichkeiten oder Reaktionen. Als unangenehm

beurteilten 12 Probanden den Geruch des Produktes und 8 Probanden empfanden die gelbliche Farbe der topischen Formulierung als nicht angenehm.

Außerdem wurden die Probanden gebeten, die topische Formulierung auf einer Skala von 0 = sehr unangenehm bis 10 = sehr angenehm zu bewerten. Abbildung 32 zeigt, daß der Großteil der Probanden das Testprodukt als angenehm (Wertung 5) bis sehr angenehm (Wertung 10) einstufte. 2 % der Probanden beurteilten das Produkt als etwas weniger angenehm (Wertung 4) und 2 % empfanden das Produkt als nicht sehr angenehm (Wertung 3). Dagegen beurteilten 11 % der Probanden das Produkt als sehr angenehm (Wertung 10).

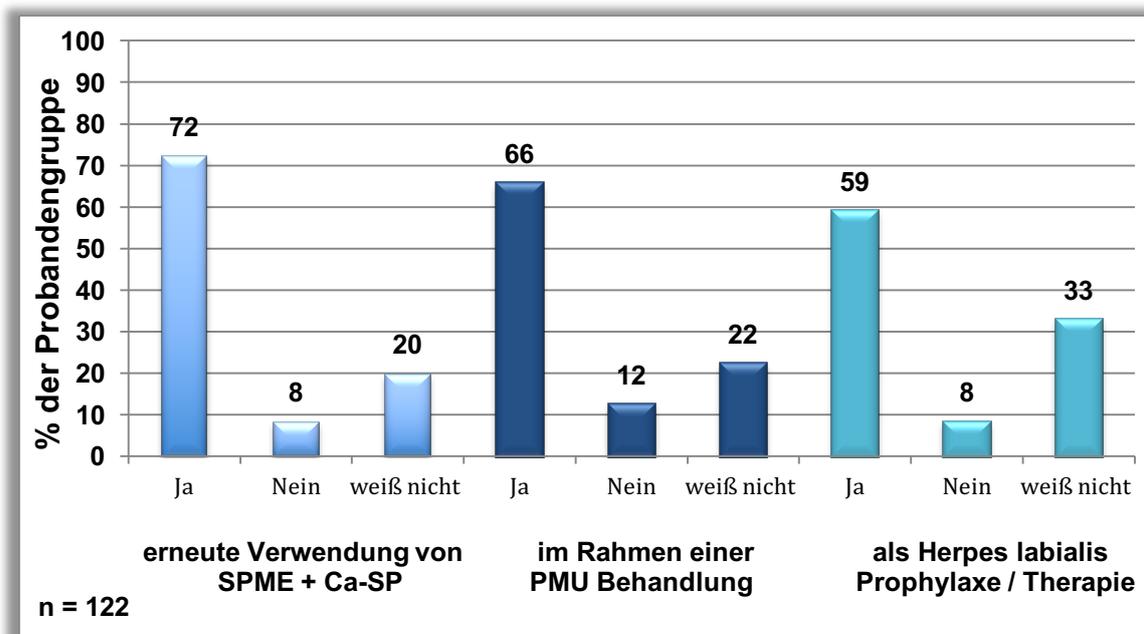


**Abbildung 32: Zufriedenheit der Probanden - Beurteilung der topischen Formulierung.** Die Probanden wurden gebeten, anhand einer Skala von 0 = sehr unangenehm bis 10 = sehr angenehm das topische Testprodukt zu beurteilen. Die Auswertung dieser Daten (in %) zeigte eine Beurteilung der topischen Formulierung durch einen Großteil der Probanden als angenehm (5) bis sehr angenehm (10). 4 % der Probanden beurteilten das Testprodukt als weniger angenehm.

Abschließend wurde in der klinischen Untersuchung ermittelt, ob die Probanden die topische Formulierung erneut anwenden würden sowie in welchem Zusammenhang.

Abbildung 33 zeigt, daß 72 % der Probanden die Frage nach der erneuten Verwendung des Testproduktes mit Ja und 8 % dagegen mit Nein beantworteten. 20 % waren sich zu diesem Zeitpunkt nicht sicher, ob sie das Testprodukt nochmals einsetzen würden. 66 % der Probanden gaben an, die topische Formulierung im Rahmen einer weiteren PMU-Behandlung zu nutzen und 22 % konnten dies noch nicht eindeutig beantworten. 12 % würden das Testprodukt bei der nächsten PMU-Behandlung nicht erneut benutzen. Als Prophylaxe und/oder Therapie einer

Herpes labialis-Reaktivierung würden 59 % der Probanden die topische Formulierung einsetzen wobei 8 % auf andere Therapien ausweichen würden. 33% der Probanden waren sich noch nicht sicher, ob sie die topische Formulierung oder eine andere Form der Prophylaxe und/oder Therapie verwenden würden.



**Abbildung 33: Beurteilung einer erneuten Verwendung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP).** Ein Großteil der Probanden (72 %) würde die topische Formulierung im Allgemeinen wieder verwenden, wobei 66 % die Formulierung im Rahmen der nächsten PMU-Behandlung als Prophylaxe und/oder Therapie einsetzen würden. 59 % der Probanden gaben eine erneute Anwendung der topischen Formulierung als Herpes labialis-Prophylaxe und/oder -Therapie an. Wenige Probanden würden das Testprodukt weder allgemein (8 %) noch bei einer PMU-Behandlung (12 %) oder als Herpes labialis-Prophylaxe/-Therapie (8 %) benutzen. Einige Probanden waren sich zum Zeitpunkt der Fragebogenerhebung noch nicht sicher, ob sie die topische Formulierung generell erneut anwenden (20 %) oder bei einer weiteren PMU-Behandlung nutzen würden (22 %). 33 % konnten noch keine eindeutige Angabe zu der Verwendung als Prophylaxe und/oder Therapie von Herpes labialis machen.

Als Fazit der klinischen Anwendungsbeobachtung war eine prophylaktische und therapeutische Wirkung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) gegen Herpes labialis-Rezidive in einer Hochrisiko-Gruppe feststellbar. Diese prophylaktische Wirkung war der Wirkung topischer ACV-Therapien überlegen, wogegen systemische ACV und Valaciclovir-Therapien einen stärkeren Effekt aufwiesen.

Unter Verwendung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) kam es nach Auftreten einer Herpes labialis-Reaktivierung zu einer verminderten Krustenbildung und geringeren Ausbildung von trockenen Lippen im Vergleich zur konventionellen Herpes labialis-Therapie.

Zugleich konnte eine sehr gute Verträglichkeit ohne Auftreten von Nebenwirkungen und Reaktionen sowie eine hohe Probandenzufriedenheit für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) festgestellt werden.

#### **4.5. Ca-SP inhibiert die KSHV/HHV-8-Infektion in humanen retinalen Pigment-Epithelzellen**

Eine weitere wichtige Fragestellung der Untersuchung war, ob die Wirkung von Ca-SP virusspezifisch gegenüber HSV sei, oder ob auch andere Viren der Herpesgruppe gehemmt werden könnten. Hierfür wurden potentielle antivirale Effekte von Ca-SP auf das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV/HHV-8) untersucht.

KSHV/HHV-8 gilt als wichtiger viraler Auslöser einer malignen Entartung kutaner Endothelzellen und wird somit als Ursache für die Entwicklung kutaner Kaposi-Sarkome, vorwiegend bei immundefizienten Patienten [52], angesehen.

##### ***4.5.1. Einfluss der antiviralen Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität von RPE-1 -Zellen***

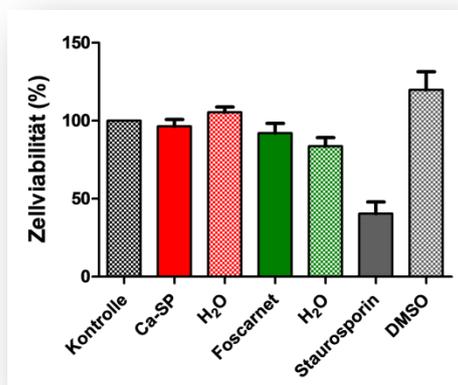
Vor der Untersuchung der antiviralen Wirkung von Ca-SP gegenüber KSHV/HHV-8-Infektionen wurde eine Testung des Einflusses der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität durchgeführt.

Dafür wurden RPE-1-Zellen mit Ca-SP, Foscarnet und Staurosporin sowie mit den jeweiligen Lösemitteln (H<sub>2</sub>O und DMSO) inkubiert. Die Durchführung sowie die Messung der MTS-Testung erfolgte wie zuvor für Vero- und HaCaT-Zellen (vgl. 4.1.1. *Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität*) beschrieben.

Abbildung 34 zeigt, dass keine toxischen Effekte für Ca-SP, Foscarnet und H<sub>2</sub>O in den eingesetzten Konzentrationen auf RPE-1-Zellen festgestellt werden konnten. Staurosporin wies auch in dieser Testung eine Reduktion der Zellviabilität von ca. 55 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen (zur Kontrolle) auf.

Die MTS-Testung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten jeweils im Triplikat.

a)



b)

Substanz / Lösemittel	höchste Konzentration
Ca-SP	15 µg/ml
Foscarnet	400 µM
Staurosporin	5 µM
H <sub>2</sub> O	3 % Vol.
DMSO	5 µM

**Abbildung 34: Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität von RPE-1-Zellen.** Die Zellviabilität von a) RPE-1-Zellen wurde 48 Stunden nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen (Ca-SP, Foscarnet, Staurosporin) und Lösemitteln (H<sub>2</sub>O, DMSO) mittels MTS-Testung gemessen. Staurosporin gelöst in DMSO wurde als Positivkontrolle verwendet. b) Die jeweils höchsten Konzentrationen, die in allen experimentellen Untersuchungen verwendet wurden, sind im Vergleich zu unbehandelten Zellen (zur Kontrolle) abgebildet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung in % für drei jeweils im Triplikat durchgeführte unabhängige Experimente. Die Kontrolle wurde mit 100 % gleich gesetzt

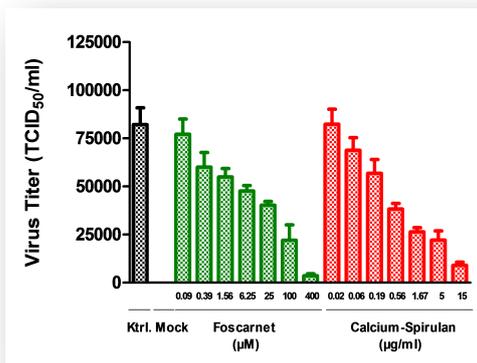
#### 4.5.2. KSHV/HHV-8 - Inhibierung durch Ca-SP im Vergleich zu Foscarnet

Zunächst wurde eine mögliche antivirale Wirkung von Ca-SP auf KSHV/HHV-8- Infektionen mittels TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode untersucht. Hierfür wurden RPE-1-Zellen mit KSHV/HHV-8 sowie mit verschiedenen Konzentrationen Ca-SP und Foscarnet als Referenz-Inhibitor inkubiert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte nach der Spearman-Kärber-Formel [211] und wurde als TCID<sub>50</sub>/ml ausgedrückt. Nach Berechnung der Virustiter in TCID<sub>50</sub>/ml wurden die Ergebnisse für die jeweiligen Substanzen in Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt und die dosisabhängige Wirkung als IC<sub>50</sub> ausgedrückt. Die Darstellung der dosisabhängigen Wirkung in IC<sub>50</sub> diente einer besseren Vergleichbarkeit der Wirkung von Ca-SP und Foscarnet. Die Experimente wurden jeweils im Triplikat durchgeführt und als Kontrollen dienten infizierte Zellen ohne Substanzen (zur Kontrolle) sowie unbehandelte uninfizierte Zellen (Mock).

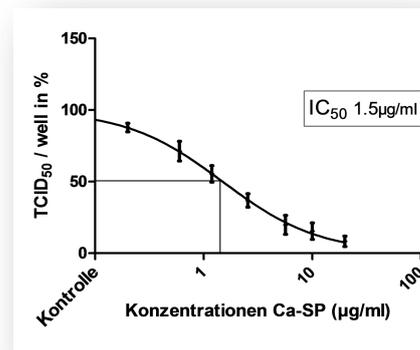
Aus Abbildung 35a geht hervor, daß Ca-SP eine potente, dosisabhängige Reduktion der Virustiter von KSHV/HHV-8-Infektionen in RPE-1-Zellen aufwies. Die Wirkung von Ca-SP war vergleichbar mit der Inhibition der Virustiter durch Foscarnet. Die Zellen der Infektionskontrolle dagegen wiesen einen hohen Virustiter auf, wogegen in den unbehandelten uninfizierten Zellen keinerlei Virus detektierbar war. Abbildung 35b zeigt die potente antivirale

Wirkung von Ca-SP (1,5 µg/ml) gegen KSHV/HHV-8-Infektionen, dargestellt als IC<sub>50</sub>. Zum Vergleich lag die Inhibition von HSV-1 durch Ca-SP in HaCaT-Zellen bei IC<sub>50</sub> 0,07 µg/ml (2 Stunden vor der Infektion).

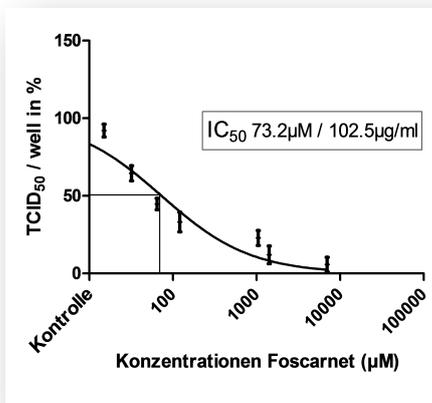
a)



b)



c)



**Abbildung 35: KSHV/HHV-8-Inhibition durch Ca-SP im Vergleich zu Foscarnet.** a) Dosisabhängige Reduktion der Virustiter (TCID<sub>50</sub>/ml) durch Ca-SP und Foscarnet im Vergleich zu infizierten unbehandelten Zellen (Kontrolle). b) Die potente Inhibition von KSHV/HHV-8 durch Ca-SP war dosisabhängig mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,5 µg/ml. c) Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Foscarnet zeigt eine Inhibition der KSHV/HHV-8-Infektion von IC<sub>50</sub> 73,2 µM / 102,5 µg/ml. a-c) In allen Graphen sind die Ergebnisse (Mittelwerte ± Standardabweichung) für drei unabhängige Experimente, jeweils im Triplikat pipettiert, dargestellt.

Aus Abbildung 35c wird ersichtlich, dass Foscarnet mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 102,5 µg/ml (73,2 µM) eine schwächere antivirale Wirkung im Vergleich zu Ca-SP aufwies. Diese Wirkung lag jedoch im Rahmen der für Foscarnet publizierte Wirkung (50 - 100 µM; [114]) gegen KSHV/HHV-8.

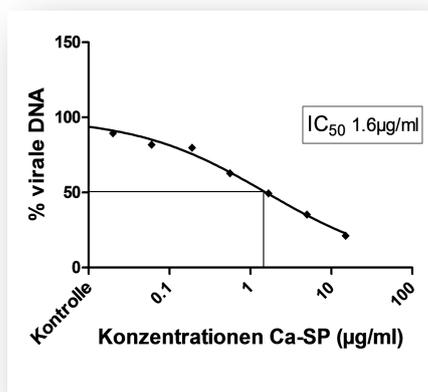
#### 4.5.3. Bestätigung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen

Die antiviralen Effekte von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8 wurde ebenfalls wie bei HSV-1 mit der Methode der qPCR untersucht. Die Ausführung der qPCR erfolgte mit dem Ziel, die antivirale Wirksamkeit von Ca-SP mit einer zweiten standardisierten Methode bestätigen zu können.

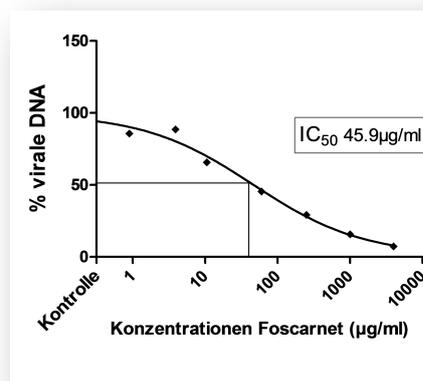
Nach der Durchführung der PCR folgte die Bestimmung der Effizienz für die KSHV/HHV-8-Primer im Vergleich zu den Primern des zellulären Gens *ACTB* ( $\beta$ -Actin). Die Effizienz für die  $\beta$ -Actin Primer lag bei 94 % und die Testung der KSHV/HHV-8-Primer ergab eine Effizienz von 92 %. Da beide Primer auf einer linearen Trendlinie lagen und eine Abweichung von 2 % in der Effizienz aufwiesen, konnten sie für die nachfolgende qPCR-Analyse verwendet werden (Daten nicht abgebildet).

Die qPCR wurde, wie bereits für die Testung von Ca-SP gegen HSV-1 (vgl. 4.1.3. *Verifizierung der antiviralen Wirkweise von Ca-SP und SPME mittels quantitativer real-time PCR (qPCR)*) beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels quantitativer Bestimmung der Genomkopien des Zielgenoms (KSHV/HHV-8) im Vergleich zum zellulären Gen *ACTB* ( $\beta$ -Actin).

a)



b)



**Abbildung 36: Bestätigung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8 im Vergleich zu Foscarnet detektiert mittels qPCR.** a) Ca-SP wies eine dosisabhängige Wirkung gegen KSHV/HHV-8-Infektionen in RPE-1-Zellen mit  $\text{IC}_{50} 1,6 \mu\text{g/ml}$  auf. b) Antivirale Effekte von Foscarnet waren ebenfalls dosisabhängig ( $\text{IC}_{50} 45,9 \mu\text{g/ml}$ ) und im Vergleich zur  $\text{TCID}_{50}$ -Reduktionsmethode ( $\text{IC}_{50} 102,5 \mu\text{g/ml}$ ) deutlich potenter. Die Quantifizierung der viralen DNA Kopien von Ca-SP und Foscarnet behandelten RPE-1-Zellen wurden im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Zellen gemessen und in % angegeben.

In Abbildung 36a) ist eine dosisabhängige antivirale Wirksamkeit von Ca-SP ( $IC_{50}$  1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) gegen KSHV/HHV-8-Infektionen dargestellt. Diese mittels qPCR-Analyse gemessene Wirkung war vergleichbar mit den Effekten von Ca-SP in der  $TCID_{50}$ -Reduktionsmethode ( $IC_{50}$  1,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Zum Vergleich wies die qPCR-Analyse der HSV-1 infizierten Vero-Zellen eine Inhibierung durch Ca-SP von  $IC_{50}$  0,4  $\mu\text{g/ml}$  auf.

In Abbildung 36b) ist zu sehen, dass für Foscarnet eine dosisabhängige Reduktion der viralen DNA-Kopien ( $IC_{50}$  45,9  $\mu\text{g/ml}$ ) in der qPCR-Analyse detektierbar war. Diese Reduktion war im Vergleich zur mittels  $TCID_{50}$ -Reduktionsmethode gemessenen Wirksamkeit ( $IC_{50}$  73,2  $\mu\text{M}/102,5 \mu\text{g/ml}$ ) effektiver.

Für die Analyse der qPCR erfolgte die Quantifizierung der viralen DNA-Kopien im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Zellen (zur Kontrolle) in %. Die von der Dosis abhängigen Wirkungskurven stellen jeweils ein Experiment dar, welches im Triplikate durchgeführt wurde.

Resümierend ist hervorzuheben, dass die Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen in RPE-1-Zellen eine potente Wirkung zeigte. Diese Wirkung war mit den antiviralen Effekten von Foscarnet als bekanntem KSHV/HHV-8-Inhibitor vergleichbar. Dieses mit Hilfe der  $TCID_{50}$ -Reduktionsmethode detektierte Ergebnis ließ sich durch die qPCR-Analyse verifizieren.

#### **4.5.4. Quantifizierung von ORF45 in KSHV/HHV-8 infizierten RPE-1-Zellen**

Um feststellen zu können, ob Ca-SP die KSHV/HHV-8-Infektion mit dem gleichen Mechanismus blockiert wie zuvor für HSV-1 festgestellt, wurde die FACS-Analyse durchgeführt. Dieser Versuch wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine dosisabhängige Wirkung von Ca-SP auf den viralen Eintritt von KSHV/HHV-8 zu quantifizieren. Hierfür erfolgte die Quantifizierung des viralen Tegument Proteins ORF45 in infizierten RPE-1-Zellen.

RPE-1-Zellen wurden gemäß dem Protokoll der FACS-Analyse bei HSV-1 mit den jeweiligen Substanzverdünnungen (Ca-SP, Heparin und Foscarnet) vorinkubiert und mit KSHV/HHV-8 infiziert (MOI 0,5).

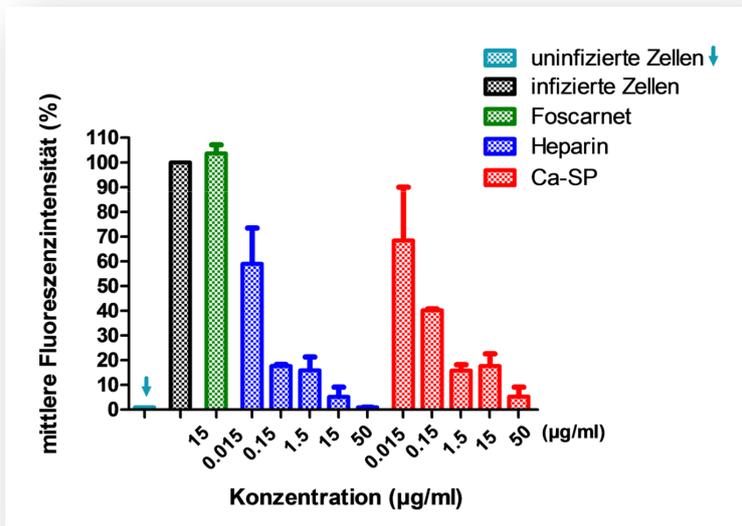
Die Verwendung einer höheren MOI war in diesem Experiment auf Grund der notwendigen, hohen Zellzahl nicht möglich, da KSHV/HHV-8 sehr langsam und in niedrigeren Titern als HSV-1 repliziert. Eine höhere MOI hätte eine nicht praktikable Menge an Virus bedeutet.

Nach einer weiteren Inkubationszeit erfolgte die Präparation der Zellen für die FACS-Analyse. Für die Quantifizierung von ORF45 wurde der Virussuspension ebenfalls CHX zugefügt, was die Blockierung der Synthese von ORF45 zur Folge hatte. Zur Kontrolle wurden unbehandelte uninfizierte Zellen (Mock) sowie infizierte Zellen ohne Substanzen mitgeführt.

Die FACS-Analyse wurde ebenso wie für HSV-1 mit dem FACS Canto I Flow Cytometer durchgeführt, wobei die Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität in % angegeben wurden. Die Messung erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Fluoreszenzintensität wurde aus den Duplikaten gemittelt.

Abbildung 37 zeigt die Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP und Heparin sowie eine dosisabhängige Reduktion von ORF45. Im Vergleich dazu konnte für Foscarnet keine sichtbare Wirkung auf den Transport von ORF45 in die humanen retinalen Pigment-Epithelzellen festgestellt werden.

Die Menge an ORF45 in den infizierten Kontrollzellen war nur geringfügig höher als bei den mit Foscarnet behandelten Zellen.



**Abbildung 37:**  
**Quantifizierung von ORF45 in KSHV/HHV-8 infizierten RPE-1-Zellen mittels FACS-Analyse.**  
 Das Ergebnis der FACS-Analyse zeigte eine dosisabhängige Reduktion von ORF45 durch Ca-SP. Die Ergebnisse wurden nomiert, wobei für Mock =1 und für die infizierten Zellen der Kontrolle =100 festgelegt wurde.

Mittels FACS-Analyse konnte die dosisabhängige Blockierung der KSHV/HHV-8-Infektion durch Ca-SP gezeigt werden.

Die Inhibition der Virus-Anheftung war vergleichbar mit der Wirkung von Heparin und bestätigt den zuvor für HSV-1 detektierten Wirkmechanismus.

Ca-SP blockiert die HSV-1-Infektion sowie die durch KSVH/HHV-8 hervorgerufene Infektion durch Blockierung der Virus-Anheftung.

#### 4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in der experimentellen und klinischen Untersuchung ermittelten Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst und zur Übersicht aufgelistet:

- Ca-SP zeigte eine potente Inhibition von Herpes Simplex Virus Typ 1-Infektionen *in vitro* in einer typischen empfänglichen Zelllinie, den Vero-Zellen.
- Die potente antivirale Wirkung von Ca-SP konnte in einer humanen Keratinozytenzelllinie, der natürlichen HSV-1 Wirtszelle, bestätigt werden.
- Der verwendete *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt (SPME) wies ebenfalls in beiden Zelllinien antivirale Effekte auf.
- Die Inhibition durch Ca-SP war vergleichbar mit der Wirkung von Aciclovir.
- Der antivirale Wirkmechanismus von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen beruht auf der dosisabhängigen Blockierung der Virus-Anheftung an humane Keratinozyten.
- Der Wirkmechanismus von Ca-SP ist vergleichbar mit dem Mechanismus von Heparin, welches die Anheftung von HSV an die Wirtszelle hemmt.
- Die antivirale Wirkung von SPME und Ca-SP konnte in einer klinischen Untersuchung *in vivo* bestätigt werden.
- In dieser klinischen Untersuchung wurden protektive und therapeutische Effekte einer SPME und Ca-SP enthaltenen topischen Formulierung bei Herpes labialis in einer Hochrisiko-Gruppe im Vergleich zur konventionellen topischen und systemischen ACV-Therapie nachgewiesen.
- Die Wirkung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) war der Wirkung der topischen ACV-Therapie hierbei überlegen.
- Die potenten antiviralen Effekte von Ca-SP konnten überdies bei KSHV/HHV-8-Infektionen *in vitro* nachgewiesen werden.
- Ca-SP inhibiert KSHV/HHV-8 durch Blockierung der Virus-Eintritts in humane retinale Pigment-Epithelzellen.
- Der Wirkmechanismus von Ca-SP auf die KSHV/HHV-8-Infektion ähnelt dem Mechanismus der HSV-1-Inhibierung.

## 5. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Herpes Simplex Viren zählen zu den häufigsten Erregern von humanen Infektionen [222]. HSV-1 ruft eine Vielzahl von Erkrankungen hervor, die von milderen bis schweren Herpes labialis-Rezidiven bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie z.B. Herpes-Enzephalitis oder Ekzema Herpeticatum, reichen [223]. Herpes labialis-Rezidive können durch verschiedene exogene und endogene Triggerfaktoren verursacht werden. Das Auftreten der juckenden und brennenden herpetiformen Vesiculae im Bereich der Lippen und oralen Mukosa wird dabei von den meisten Betroffenen als unangenehm empfunden und im Umgang mit anderen Menschen als beschwerlich angesehen [4; 8; 9]. Die antivirale Therapie von Herpes labialis umfasst eine Vielzahl an topischen und systemischen Virostatika sowie zahlreiche Produkte mit natürlichen Wirkstoffen. Die Erforschung neuer Substanzen und Therapiealternativen auf Grund von zunehmenden Resistenzen gegenüber konservativen Therapien ist von ansteigender Bedeutung [149].

Die antivirale Wirkung des *Spirulina platensis* Mikroalgen-Extrakts sowie dem daraus isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan gegen HSV-1-Infektionen wurde in zwei unterschiedlichen Untersuchungen erforscht.

Mit Hilfe der experimentellen Untersuchung konnte eine potente antivirale Wirkung von Ca-SP sowie eine moderate Wirkung von SPME gegen die HSV-1-Infektion in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß Ca-SP zu frühen Zeitpunkten der Virus-Zell-Interaktion die HSV-1-Infektion durch Verhinderung der Virus-Anheftung inhibiert. Dieser Wirkmechanismus ist ähnlich der Wirkung von Heparin, einem bekannten Inhibitor der HSV-1-Anheftung.

In der klinischen Untersuchung gelang es, prophylaktische und therapeutische Effekte einer SPME und Ca-SP enthaltenden topischen Formulierung bei Herpes labialis-Rezidiven in einer Hochrisiko-Gruppe nachzuweisen. Diese Wirkung wurde im Vergleich zu konventionellen topischen und systemischen ACV-Therapien festgestellt.

Für die topische Formulierung konnte eine der topischen ACV-Therapie überlegene Wirkung gegen Herpes labialis gezeigt werden.

Weiterhin war es in der experimentellen Untersuchung gelungen, eine nicht-viruspezifische Wirkung von Ca-SP auf humane Herpesviren nachzuweisen. Ca-SP wies eine potente antivirale Wirkung gegen KSHV/HHV-8-Infektionen in humanen retinalen Pigment-Epithelzellen auf. Die Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP konnte sowohl für HSV-1 als auch für KSHV/HHV-8-Infektionen nachgewiesen werden.

In den folgenden Ausführungen des Abschnitts 5 dieser Arbeit werden die Ergebnisse der beiden Untersuchungen sowie die Wirkung von SPME und Ca-SP eingehend dargestellt und in Beziehung zueinander gesetzt. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt vor dem Hintergrund vorangestellter Erläuterungen zu den Herpesviren HSV-1 und KSHV/HHV-8, zu antiviralen Therapien sowie zu Herpes labialis-Rezidiven bei PMU-Behandlungen.

### **5.1. Marine Mikroalgen und Polysaccharide – bisherige Forschung und Wirkung von *Spirulina platensis* und Calcium Spirulan**

Die Lebensräume der Meere beherbergen eine Fülle verschiedener Mikroorganismen und Viren, wobei die Viren zu den großen Motoren der ozeanischen Biogeochemie und mikrobiellen Evolution zählen [224]. Mikroorganismen, wie z.B. *Spirulina platensis*, haben im Laufe der Evolution von Millionen Jahren antivirale Abwehrstrategien entwickelt. Diese Abwehrstrategien sind in letzter Zeit von zunehmendem Interesse der Forschung.

Die bisherige Erforschung der Mikroalge wurde vorwiegend im Tiermodell durchgeführt und fokussierte sich, neben Untersuchungen von *Spirulina platensis* als Nahrungsergänzungs- und Lebensmittel [176], auf die stimulierende Wirkung der Mikroalge auf das Immunsystem [177]. Eine positive Korrelation zwischen der anti-oxidativen Wirkung von *S. platensis* und den protektiven Eigenschaften bei der Schädigung verschiedener Organe, wie z.B. Leber, Herz und Niere [178–180] wurde ebenfalls nachgewiesen. Außerdem konnte eine Reduktion von UV-induzierten Hautentzündungen in Zusammenhang mit der Karzinogenese in Wildtyp-Mäusen, bedingt durch die orale Gabe von *S. platensis*, aufgezeigt werden [181].

Es war zudem möglich, die Inhibition einer MRSA (**M**ethicillin-**r**esistenter *Staphylococcus aureus*)-Besiedlung der Haut durch eine *S. platensis* enthaltene topische Formulierung nachzuweisen. Diese antibakterielle Wirkung wurde im Tiermodell bei Mäusen und Kühen nachgewiesen [188].

In einer Studie an gesunden männlichen Probanden konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der oralen Einnahme von *S. platensis* und der Steigerung der Immunabwehr gezeigt werden. Des Weiteren konnten positive Effekte von *S. platensis* auf die Interferon-Produktion, bedingt durch die Stimulation des Immunsystems mittels BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, Tuberkuloseimpfstoff)-Gabe, ermittelt werden [182].

Die antivirale Wirkung eines Heißwasser-Extraktes, gewonnen aus *S. platensis*, bei HSV-1-Infektionen konnte bislang im experimentellen Modell in der Zellkultur sowie im Tiermodell an Hamstern nachgewiesen werden [183].

Natürliche antivirale Wirkstoffe und deren Wirkstrategien erlangen wachsende Aufmerksamkeit als potentielle Ressource für die Entwicklung neuer Therapien humaner Erkrankungen [225].

Insbesondere hat die Erforschung der antiviralen Eigenschaften mariner Polysaccharide zur Identifizierung einer Vielzahl von vielversprechenden Molekülen geführt [149]. Marine Polysaccharide weisen eine enorme strukturelle Vielfalt auf und werden je nach Ursprung und Struktureigenschaften in drei Haupt-Gruppen klassifiziert: marine tierische Polysaccharide, marine pflanzliche und marine mikrobielle Polysaccharide [226]. Eine Vielzahl an Bioaktivitäten, wie z.B. antikoagulierende, anti-inflammatorische, antioxidative und antivirale Effekte, konnten für marine Polysaccharide nachgewiesen werden [226].

Ca-SP, das aus der Mikroalge *S. platensis* isolierte marine Polysaccharid, wies in experimentellen Untersuchungen in der Zellkultur antivirale Eigenschaften gegen HSV-1-Infektionen auf [184]. Weiterhin konnte eine Stimulation der Stoffwechselaktivität und positive Effekte auf die Kollagensynthese von Fibroblasten festgestellt werden [173]. Die Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von extra- und intrazellulären Polysacchariden, isoliert aus der Mikroalge *Athrospira platensis*, von Rechter et al. [185] erfolgte durch die Anwendung direkter, standardisierter *in vitro*-Methoden zur Virusquantifizierung. Für diese Polysaccharide, die hohe strukturelle Ähnlichkeiten mit Ca-SP aufwiesen, konnten antivirale Effekte gegen HSV-1 und andere Viren, wie z.B. HCMV und HIV, detektiert werden [185]. *In vivo* Studien zur Bestätigung dieser antiviralen Wirkung waren bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Die publizierten Ergebnisse der Mikroalge *S. platensis* zeigen verschiedene Limitationen auf. Hierzu zählen u.a. ein Mangel der Standardisierung der natürlichen Ressourcen sowie der jeweiligen Extraktions- und Isolationsprozesse. Dies gilt ebenso für die publizierten Studien über die Wirkung von Ca-SP. Die vielfache Verwendung indirekter Nachweismethoden von antiviralen Effekten ist ebenfalls kritisch zu vermerken [185].

Für die Entwicklung neuer natürlicher Produkte und Therapien wird neben der Auswahl von entsprechenden Algen-Quellen die Weiterentwicklung und Standardisierung der Untersuchungsmethoden von antiviralen Effekten als essentiell angesehen [227].

Außerdem zeigen die bislang veröffentlichten Daten, ermittelt in Tiermodellen sowie durch Zellkulturmethoden, eine fragliche Relevanz für die Untersuchung der Wirkung auf humane Virusinfektionen auf.

Bislang sind überzeugende aussichtsreiche Strategien für die medizinische Verwendung von marinen Polysacchariden bei der Behandlung von humanen Virusinfektionen selten.

Um Standardisierungsprobleme von Mikroalgen-Extrakten, gewonnen aus *S. platensis*, in der vorliegenden experimentellen und klinischen Untersuchung zu überwinden, wurde eine neue,

auf dem Extrudierverfahren beruhende Methode zur Gewinnung und Herstellung von SPME, entwickelt.

Dafür wurde die Biomasse *S. platensis* von einer *Spirulina*-Quelle aus Myanmar bezogen, in Ethanol gelöst und der für die Untersuchung verwendete SPME hergestellt. Es erfolgte die Isolierung von gereinigtem Ca-SP in einem modifizierten drei-stufigen Verfahren aus der *S. platensis* Biomasse [174]. Folglich stammen beide in der durchgeführten Forschung verwendeten natürlichen Substanzen aus der gleichen Quelle in Myanmar.

## **5.2. Antivirale Effekte von Ca-SP bei HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten**

### **5.2.1. Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME in HSV-1-infizierten humanen Keratinozyten**

Die Testung von Ca-SP und SPME mittels PRA ergab eine antivirale Wirkung gegen HSV-1-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten der Virusinfektion.

Die anfänglich in Vero-Zellen untersuchte antivirale Wirkung von SPME (s. Abbildung 18) war bei Zugabe 2 Stunden vor der Infektion mit 33 µg/ml (IC<sub>50</sub>) am wirksamsten und nahm bei Testung der späteren Zeitpunkte ab (1 Stunde nach Infektion 143,3 µg/ml; IC<sub>50</sub>). Die für den Heißwasser-Extrakt bereits von Hayashi et al. publizierte antivirale Wirkung lag im Vergleich dazu zwischen 150 bis 300 µg/ml (IC<sub>50</sub>) [183; 205].

Die Testung der antiviralen Wirkung von Ca-SP (s. Abbildung 18) gegen HSV-1 ergab eine potente Inhibition von 0,04 µg/ml (IC<sub>50</sub>) zum frühen Zeitpunkt der Virusinfektion (2 Stunden vor der Infektion). Bei Zugabe von Ca-SP 1 Stunde nach der Virusinfektion konnte eine inhibitorische Wirkung von 0,4 µg/ml festgestellt werden. Für alle natürlichen Substanzen war ein Wirkverlust zu späteren Zeitpunkten festzustellen. Die antiviralen Effekte wurden im Vergleich zu ACV gemessen, um die Ergebnisse mit einem bekannten Inhibitor als Referenz beurteilen zu können. Die gemessene Wirkung für ACV lag bei 0,06 µg/ml (IC<sub>50</sub>). Die antiviralen Effekte von Ca-SP gegen HSV-1 sind im PRA mit der Wirkung von ACV vergleichbar und weisen eine potente antivirale Wirkung auf. Die für ACV publizierte inhibitorische Konzentration gegen HSV-1-Infektionen, gemessen in Zellkultur-Experimenten, liegt zwischen 0,02 bis 0,9 µg/ml [228]. Folglich lassen sich die in der Untersuchung für diese Arbeit gemessenen Ergebnisse von Ca-SP und ACV mit der bekannten Wirkung von ACV vergleichen. Folglich können sie als valide beurteilt werden.

Auf Grund der chemischen Homogenität und Zusammensetzung von Ca-SP, bedingt durch verschiedene Einflüsse bei der Kultivierung, Gewinnung und Fraktionierung, kann es zu

Schwankungen der Stabilität der Wirkung kommen. Um Abweichungen der Wirkung von verschiedenen Ca-SP-Chargen ausschließen zu können, wurden drei unterschiedliche Ca-SP Chargen getestet.

Die in allen Experimenten eingesetzte Charge Ca-SP (H17/18) wies eine potente Wirkung mit einer inhibitorischen Konzentration von 0,04 µg/ml auf (s. Abbildung 25a). Die Testung der neuen Charge (H20) zeigte eine Abnahme der Wirkung mit einer inhibitorischen Konzentration von 0,2 µg/ml (s. Abbildung 25b), wobei die lyophilisierte Probe Ca-SP mit einer  $IC_{50}$  von 0,06 µg/ml eine potente antivirale Wirkung aufwies (s. Abbildung 25c). Die geringen Schwankungen zwischen Charge H17/18 und Charge H20 können auf kleine Unterschiede des chemischen Homogenitätsgrads zurückzuführen sein. Bereits minimale Unterschiede des chemischen Homogenitätsgrads können zu abweichenden biologischen Aktivitäten und Wirkungseffizienzen führen [185].

Die antivirale Wirkung von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen in publizierten Untersuchungen von Hayashi et al. lag zwischen 0,86 und 0,92 µg/ml (3 Stunden vor der Infektion;  $IC_{50}$ ). Diese Wirksamkeit wurde mit der *Virus yield-Reduktionsmethode* in Vero-Zellen gemessen [184]. Das publizierte Protokoll von Hayashi et al. wurde mit dem bei der Untersuchung zu dieser Arbeit verwendeten Ca-SP (Charge H17/18) wiederholt, um die Effizienz sowie die Unterschiede der Wirksamkeit vergleichen zu können. Die Testung von Ca-SP (Charge H17/18) mittels *Virus yield-Reduktionsmethode* ergab eine inhibitorische Konzentration von  $IC_{50}$  0,66 µg/ml (s. Abbildung 26). Die von Hayashi et al. gemessene inhibitorische Konzentration betrug dagegen 0,86 und 0,92 µg/ml [184].

Im PRA konnte dagegen eine potente antivirale Wirkung für Ca-SP von 0,04 µg/ml ( $IC_{50}$ ) nachgewiesen werden. Für die gravierenden Unterschiede der Wirkung von Ca-SP und SPME im Vergleich zu früheren Daten von Hayashi et al. könnte u.a. die Verwendung verschiedener Mikroalgen aus unterschiedlichen Quellen sowie die abweichenden Extraktionsmethoden verantwortlich sein [174; 183; 184; 186].

Bedingt durch unterschiedliche Kulturbedingungen und Abweichungen der pH-Werte sowie der Temperaturen sind Unterschiede in der biologischen Aktivität und der daraus resultierenden antiviralen Wirkung der jeweiligen Extrakte und Polysaccharide möglich [169; 185]. Außerdem gibt es bezüglich der Resuspendierung der Algen-Biomasse erhebliche Unterschiede: Alle bislang publizierten Ergebnisse zur antiviralen Wirkung von SPME beziehen sich ausschließlich auf die Untersuchung eines Heißwasser-Extraktes. Im Gegensatz dazu wurde der hier eingesetzte SPME in Ethanol anstatt in H<sub>2</sub>O gelöst, um die Extraktion der fettlöslichen Komponenten der *S. platensis* zu ermöglichen [229]. Ebenfalls können je nach experimenteller Methode und durchgeführtem Protokoll unterschiedliche inhibitorische Konzentrationen für die

gleiche antivirale Substanz detektiert werden [230]. Die ursprünglichen Daten, die eine inhibitorische Wirkung für Ca-SP zeigten [186], wurden für die Verwendung indirekter Nachweismethoden kritisch bewertet [185].

Als Konsequenz aus dieser Kritik wurde das antivirale Potential des gereinigten Ca-SP und dem mittels Extraktionsverfahren gewonnenen SPME in der vorliegenden experimentellen Untersuchung mit einer standardisierten etablierten Methode zur Virus-Quantifizierung, dem PRA, ermittelt [212].

Weiterhin erfolgte die Untersuchung dieser antiviralen Wirkung mit einer zweiten etablierten Methode zur Virusquantifizierung. Die quantitative Analyse der DNA-Kopien mittels qPCR bestätigte Ca-SP als potenten Inhibitor von HSV-1-Infektionen in Vero-Zellen (s. Abbildung 20). Die inhibitorische Wirkung von Ca-SP (0,4 bis 1,6 µg/ml) war ebenfalls zeitpunktabhängig und mit den Effekten von ACV auf HSV-1-Infektionen (0,16 bis 0,5 µg/ml) vergleichbar.

Die mittels PRA und qPCR gemessenen Unterschiede der inhibitorischen Konzentrationen für Ca-SP und ACV lassen sich auf die ungleichen Messmethoden und den jeweiligen "Read-Out" zurück führen.

Es wurden für die unterschiedlichen Methoden zur Virusquantifizierung bereits verschiedene inhibitorische Konzentrationen publiziert. Die Wirkung von ACV, gemessen mittels qPCR-Analyse, liegt zwischen 0,16 bis 1 µg/ml. Die inhibitorischen Konzentrationen, die mittels PRA für ACV festgestellt wurden, betragen zwischen 0,01 bis 5 µg/ml [230].

Für Ca-SP konnte mit der qPCR eine inhibitorische Konzentration von 0,4 bis 1,6 µg/ml gemessen werden. Diese Wirkung ist vergleichbar mit der bereits publizierten Wirkung für Ca-SP. Die strukturell ähnlichen Polysacchariden, isoliert aus *S. platensis*, wiesen eine inhibitorische Konzentration von 0,8 bis 2 µg/ml in vergleichbaren Testungen auf [185; 186].

Die antivirale Wirkung der natürlichen Substanzen konnte in humanen Keratinozyten, den Zielzellen für die humane HSV-1-Infektion, bestätigt werden [206; 216].

Die potente Wirkung von Ca-SP (0,07 bis 0,3 µg/ml; 2 Stunden vor Infektion bis 1 hpi) war ebenfalls mit der Wirkung von ACV (0,06 bis 0,09 µg/ml; 2 Stunden vor Infektion bis 1 hpi) vergleichbar (s. Abbildung 19).

Die Wirkung von SPME wies im Vergleich zu Vero-Zellen (33 bis 143,3 µg/ml; 2 Stunden vor Infektion bis 1 hpi) einen stärkeren antiviralen Effekt in HaCaT-Zellen (8,3 bis 66,8 µg/ml; 2 Stunden vor Infektion bis 1 hpi) auf (s. Tabelle 15). Möglicherweise ist dies auf die unterschiedlichen, zelllinienspezifischen Mechanismen bei der HSV-1-Infektion zurückzuführen [216].

Vero-Zellen sind keine humanen Zellen und weichen in den exakten Mechanismen, die mit der HSV-1-Infektion verbunden sind sowie in ihrer Sensitivität gegenüber HSV- inhibitorischen

Substanzen von humanen Zelllinien ab [216]. Allerdings konnten für Ca-SP und ACV keine relevanten Differenzen zwischen den unterschiedlichen Zelllinien gemessen werden.

Die Kombination von SPME+Ca-SP wies in allen Testsystemen und Zelllinien antivirale Effekte gegen HSV-1 auf (s. Abbildung 18, 19). Diese Wirkung war zu den verschiedenen, gemessenen Zeitpunkten schwächer als die Wirkung von Ca-SP. Die Wirkung der Kombination war jedoch effektiver gegenüber HSV-1 als SPME allein (s. Tabelle 15). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass SPME keinen wirkungssteigernden Einfluss auf Ca-SP aufweist. Folglich ist Ca-SP die aktive inhibitorische Substanz des SPME.

Die Testung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME auf Ca-SP bestätigt das vorangestellte Ergebnis. Es konnte kein synergistischer Effekt bei der Verwendung beider Substanzen (Ca-SP und SPME) in Kombination zu keinem Zeitpunkt in der Zellkultur festgestellt werden (s. Abbildung 27). Durch die Zugabe von SPME verringerte sich die inhibitorische Konzentration von Ca-SP zu allen drei Zeitpunkten ( $IC_{50}$  0,7  $\mu\text{g/ml}$  bis 47,3  $\mu\text{g/ml}$ ; s. Abbildung 27a-c) gegenüber der alleinigen Verwendung von Ca-SP.

Alle in der experimentellen Untersuchung verwendeten Substanzen wurden mittels MTS-Testung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellviabilität untersucht. Für keine Substanz in den eingesetzten Konzentrationen konnte eine Reduktion der Zellviabilität festgestellt werden. Die antivirale Wirkung basiert folglich nicht auf möglichen toxischen Effekten der Substanzen (s. Abbildung 17a,b).

Zusammenfassend ist eindeutig festzuhalten, daß die antivirale Wirkung von SPME und Ca-SP bei HSV-1-Infektionen mittels verschiedener standardisierter Methoden zur Virusquantifizierung nachgewiesen werden konnte. Die für Ca-SP und SPME detektierte Wirksamkeit war vor allem zu frühen Zeitpunkten der Virus-Zell-Interaktion potent und mit der Wirkung von ACV vergleichbar.

Diese antiviralen Effekte wurden in humanen Keratinozyten nachgewiesen und liefern relevante Ergebnisse für zukünftige Untersuchung der Wirkung auf humane Virusinfektionen. Zusätzlich konnte eine Stabilität der Wirkung für Ca-SP in verschiedenen Chargen bei HSV-1-Infektionen festgestellt werden.

### ***5.2.2. Inhibition der Virus-Anheftung durch Ca-SP an humane Keratinozyten***

Die Zugabe von Ca-SP zu frühen Zeitpunkten der Virus-Infektion wies eine potente antivirale Wirksamkeit gegen HSV-1 im PRA und der qPCR auf. Folglich wurden *Time-of-addition* Experimente zur detaillierteren Analyse des Wirkmechanismus durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigen eine potente antivirale Wirkung von Ca-SP bei Zugabe 2 Stunden vor der Infektion sowie bei gleichzeitiger Gabe mit dem Virus (s. Abbildung 21). Zu den gemessenen Zeitpunkten nach der Infektion war ein drastischer Wirkverlust feststellbar. Diese Wirkung war ähnlich der Wirkungskurve für Heparin. ACV als Referenz-Inhibitor von HSV-1 zu späteren Zeitpunkten (virale DNA-Replikation) wies eine potente Wirkung auf. Diese Wirkung war bis zu 9 Stunden nach der Infektion in reduzierter Form feststellbar. Ein totaler Wirkverlust von ACV 10 Stunden nach der Infektion von HSV-1 in *Time-of-addition* Experimenten ist vielfach publiziert [214; 231; 232].

Diese zeitpunkt- und dosisabhängige Wirkung von Ca-SP auf die frühen Schritte der Virus-Zell-Interaktion bestätigt die bereits publizierte antivirale Wirkung von Ca-SP. Mittels *Virus yield-Reduktionsmethode* konnte eine Blockierung des HSV-1-Eintritts in Vero-Zellen gezeigt werden [184; 186].

Der Virus-Eintritt in die Zielzelle ist ein mehrstufiger Prozess, welcher in die Anheftung des Virus an die Zelle sowie in die Penetration in die Zielzelle differenziert wird [216]. Die Anheftung des Virus an die Zelle wird durch die Interaktion der viralen Glykoproteine C und B mit dem Zelloberflächen-Rezeptor Heparansulfatproteoglykan (HSPG) initialisiert. Diese reversible Bindung wird durch die Bindung von gD, gB sowie dem Hetero-Oligomer gH/gL an verschiedene zelluläre Rezeptoren stabilisiert und vermittelt die Penetration des Virus in die Zelle [19; 20].

Heparin konkurriert direkt mit HSPG um die Bindung an die viralen Glykoproteine C und B und inhibiert dadurch die Anheftung des Virus an der Zelloberfläche [73; 110–112]. Hung et al. konnten eine Inhibierung von HSV-1 in humanen oralen Keratinozyten, basierend auf der Blockierung der viralen Anheftung, durch Heparin zeigen. Die virale Penetration wird dagegen nicht blockiert [216].

Obwohl der exakte Mechanismus sowie die viralen und zellulären Anforderungen für den Eintritt von HSV-1 in humane Keratinozyten nicht vollständig bekannt ist und die Strukturen der Proteoglykane der verschiedenen Zelllinien differieren [216], konnte ein Zell-Tropismus für HSV-1 gegenüber humanen oralen Keratinozyten nachgewiesen werden [233; 234].

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von Ca-SP auf den viralen Eintritt, differenziert in die Blockierung der Virus-Anheftung und -Penetration, war bedeutsam für die experimentelle Untersuchung.

Hierfür wurden Experimente zur viralen Anheftung mit unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Dies ermöglichte die differenzierte Untersuchung der Prä- und Post-Anheftung von HSV-1.

Die Ergebnisse dieser Experimente zur viralen Anheftung bestätigen eine Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP an humane Keratinozyten. Die Separierung der Prä-Anheftung (s. Abbildung 22a) von der Post-Anheftung (s. Abbildung 22b) konnte eine Wirkung

vergleichbar mit den Effekten von Heparin nachweisen. ACV zeigte dagegen keinerlei Effekte gegen HSV-1 in der Prä-Anheftung (s. Abbildung 22a,b).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß Ca-SP, ähnlich dem Wirkmechanismus von Heparin, die Anheftung des Virus an die Zelle blockiert. Der exakte molekulare Mechanismus von Ca-SP ist allerdings noch ungeklärt.

Eine Möglichkeit könnte die Blockierung der viralen Anheftung durch die Bindung von Ca-SP an die viralen Glykoproteine B und C und die dadurch verhinderte Interaktion des Virus mit der Zelle darstellen [216]. Ebenfalls vorstellbar wäre die direkte Interaktion von Ca-SP mit den zellulären Oberflächen-Rezeptoren. Hierdurch wäre die Virus-Anheftung auf Grund der nicht zur Verfügung stehenden Interaktions-Rezeptoren blockiert.

Die Untersuchung der Lokalisation des viralen Tegument Proteins VP16 in der IF (s. Abbildung 23) sowie die Quantifizierung von VP16 mittels FACS-Analyse (Abbildung 24) verifiziert die Annahme, dass Ca-SP die HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten blockiert.

Die Messung einer ausreichenden Menge eingebrachtem VP16 während der Virus-Infektion erforderte die Verwendung einer hohen MOI von 10 [235–237]. Die Synthese von VP16 wurde durch die Zugabe von CHX blockiert, so dass ausschließlich eingebrachtes VP16 mittels IF detektiert wurde [238].

Die Verwendung der hohen MOI von 10 könnte ein Grund dafür sein, dass die Quantifizierung der Wirkung von Ca-SP und Heparin auf HSV-1 mittels IF nicht möglich war. Um dieses Problem zu überwinden, wurde die FACS-Analyse mit einer MOI von 3 durchgeführt. Dies ermöglichte sowohl die Detektion von eingebrachtem VP16 als auch die Quantifizierung der Wirkung von Ca-SP und Heparin (s. Abbildung 24).

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von Ca-SP gegen HSV-1-Infektionen konnte eine Blockierung der Virus-Anheftung an humane Keratinozyten nachweisen. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem Wirkmechanismus von Heparin. Diese Ergebnisse bekräftigen die Auffassung, dass die inhibitorischen Effekte von SPME vorwiegend auf die Anwesenheit von Ca-SP zurückzuführen sind, wobei andere in dem *S. platensis* Extrakt enthaltene Polysaccharide ebenfalls involviert sein könnten [185].

### 5.3. Prophylaktische und therapeutische Effekte einer SPME und Ca-SP enthaltenen topischen Formulierung gegen Herpes labialis im klinischen Modell

Die potentielle therapeutische Verwendung von SPME und Ca-SP bei humanen Infektionen ist wegen der unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten und der vielzähligen Problematiken, die damit verbunden sind, limitiert.

Eine Vielzahl von positiven Effekten für *S. platensis* als Nahrungsergänzung, überwiegend untersucht im Tiermodell auf Zellschäden sowie aktuell auf UV-induzierte Hautentzündungen und die damit zusammenhängende Karzinogenese [181], sind bereits bekannt.

Bislang berichten dagegen nur wenige Publikationen über medizinische Effekte von SPME und Ca-SP, die von Relevanz für humane Erkrankungen sind [239; 240]. Auf Grund der antikoagulierenden Wirkung von Ca-SP [184] könnte die Verwendung für die intravenöse Therapie bei Hochrisiko-Patienten sowie bei immundefizienten Patienten, die Resistenzen gegenüber gängigen Therapien aufweisen, problematisch sein.

Da in der experimentellen Untersuchung die Inhibierung der HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten durch Ca-SP nachgewiesen werden konnte, wurde der potentielle prophylaktische und therapeutische Effekt einer topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) gegen Herpes labialis untersucht.

Hierfür wurden SPME und Ca-SP in der topischen Formulierung in einer Konzentration eingesetzt, die eine ausreichende Mengen der Wirkstoffe an der Oberfläche der infektionsanfälligen Hautareale sicherstellt.

Die prophylaktische Wirkung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) wurde in einer klinischen Anwendungsbeobachtung bei der mechanischen Herpes labialis-Reaktivierung untersucht.

In dieser ersten multizentrischen, nicht-randomisierten, offenen („open-label“) Beobachtungsstudie konnte für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) eine effektive Prävention und Therapie von Herpes labialis-Reaktivierungen nachgewiesen werden.

Die prophylaktische und therapeutische Wirkung dieser topischen Formulierung gegen Herpes-Rezidive in einer Hochrisiko-Gruppe war wirksamer als die üblicherweise bei Herpes labialis eingesetzte konventionelle topische ACV-Therapie [96]. Die systemische ACV- und Valaciclovir-Therapie wies dagegen im Vergleich zur topischen Therapie eine signifikante Reduktion der Herpes labialis-Rezidive auf (s. Abbildung 29).

Unter Verwendung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP) kam es nach Ausbildung der Herpes labialis-Reaktivierung zu einer verminderten Krustenbildung (s. Abbildung 30) und

geringeren Entwicklung von trockenen Lippen (s. Abbildung 31) im Vergleich zur konventionellen Herpes-Therapie.

Die Reduktion der gewöhnlich durch *Staphylococcus aureus* [17] hervorgerufenen Krustenbildung bei der Abheilung des Herpes-Rezidivs lässt sich auf die antibakterielle Wirkung von dem in der topischen Formulierung enthaltenen SPME zurückführen [187; 188]. Die gleichfalls enthaltenen Pflegestoffe, wie z.B. Sheabutter, Jojobaöl und Bienenwachs, könnten wiederum Gründe für die Reduktion der trockenen Lippen gegenüber der konservativen ACV-Therapie nach der Abheilung der Herpes-Reaktivierung sein.

In der klinischen Untersuchung wurde der präzise Typ der Herpes labialis-Reaktivierung, HSV-1 oder HSV-2, nicht bestimmt. Obwohl die Mehrheit der Herpes labialis-Rezidive durch die Reaktivierung von HSV-1 verursacht werden, kann eine Reaktivierung von HSV-2 als Ursache nicht ausgeschlossen werden [241]. Hernández-Corona et al. konnten für einen *S. platensis* Extrakt die Wirksamkeit gegen HSV-2-Infektionen in Vero-Zellen *in vitro* nachweisen [205]. Folglich ist die Annahme einer antiviralen Wirkung von SPME und Ca-SP gegenüber HSV-2-Infektionen sowie der durch HSV-2 bedingten Herpes labialis-Reaktivierung nicht abwegig.

Für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) konnte des Weiteren eine sehr gute Verträglichkeit ohne Auftreten von Nebenwirkungen und Reaktionen sowie eine sehr hohe Probandenzufriedenheit ermittelt werden (s. Abbildung 32, 33).

Kosmetische und homöopathische Produkte auf Basis natürlicher Inhaltsstoffe vermitteln häufig dem Verbraucher besonders wirksam auf eine sensitive und heilsame Weise zu sein. Allerdings besteht bei natürlichen Wirkstoffen ein erhöhtes Risiko der allergischen Reaktionen und Nebenwirkungen [242].

Einheitliche Standards in der antiviralen Prophylaxe und Therapie bei PMU-Behandlungen gibt es bislang nicht. Dies stellt für die Betroffenen von Herpes labialis, besonders für diejenigen der Hochrisiko-Gruppen, ein erhebliches Risiko von schwerwiegenderen Verläufen der Herpes-Reaktivierung dar.

Die topische Therapie von Herpes labialis-Rezidiven mit ACV ist üblicherweise die Therapieform der ersten Wahl. In den 1980-er und 1990-er Jahren stellte sich allerdings die Therapie mit ACV in Salbenform als teilweise unwirksam heraus [89; 91]. Nachfolgende Studien wiesen dagegen für die topische ACV-Therapie, die Propylenglycol zur verbesserten Penetration enthielt, eine statistisch signifikante Wirkung bei Herpes labialis nach. Des Weiteren konnte eine teilweise reduzierte Dauer des vesikulären Stadiums und der Abheilung festgestellt werden [92; 93].

Als mögliche Begründung für die divergenten Ergebnisse wurde der Zeitpunkt der Anwendung diskutiert. Dies wurde daraufhin in aktuelleren Studien untersucht [94–96]. Es konnte dabei allerdings kein Unterschied bei der Abheilung der Herpes-Läsionen zwischen der frühen Anwendung im Prodromal- oder Erythemstadium sowie der späteren Verwendung im Papel- oder Bläschen-Stadium festgestellt werden [94–96]. Davon ausgehend wies die Mehrheit der Studien eine Abheilung der Herpes-Läsionen unabhängig vom jeweiligen Stadium und Beginn der Therapie nach. Dieser therapeutische Effekt, der größtenteils unabhängig vom Beginn der Behandlung zu sein scheint, steht im gravierenden Widerspruch zur Annahme, daß für eine effektive Therapie die Virusreplikation vor Ausbildung der Läsionen unterbrochen werden sollte [97].

Neben dem Zeitpunkt der Therapie-Anwendung ist eine ausreichende Konzentration des Wirkstoffs für eine erfolgreiche Wirkung der Virostatika essentiell [97]. ACV weist eine niedrige Penetrationsrate durch das Stratum corneum, der obersten Hautschicht der Epidermis, auf. Hierdurch entsteht die Gefahr einer nicht ausreichenden Wirkstoffkonzentration in den tieferen Schichten der Epidermis [97]. Zur Lösung dieses Problems werden üblicherweise topische ACV-Therapien mit Propylenglycol oder Dimethylsulfoxid zur gesteigerten Penetration verwendet. Die Häufigkeit der Produkt-Anwendung ist ebenfalls für den Erfolg der Therapie von Bedeutung.

Eine weitere mögliche Erklärung für die effektive Wirkung der topischen Therapie, unabhängig vom Zeitpunkt der Verwendung, könnte darin bestehen, daß zu frühen Phasen der Herpes-Reaktivierung wegen der intakten Epidermis nur eine geringe Wirkstoffkonzentration am Wirkort der Virusreplikation ankommt. Diese Wirkstoffkonzentration ist allerdings in späteren Stadien der Herpes-Läsionen aufgrund der defekten Epidermis gesteigert. Folglich sind die Konzentrationen von ACV am Wirkort zu späteren Zeitpunkten der Virusreplikation höher und die Therapie effektiver.

Bei einem gesteigerten Risiko von Herpes labialis-Rezidiven sowie einer ausgeprägten Erosion der Herpes-Läsionen erfolgt üblicherweise die Therapie mit systemischen Virostatika. Systemische Therapeutika können nachgewiesenermaßen bei Auftreten einer Herpes labialis-Reaktivierung die Intensität und Dauer des Rezidivs mindern [196]. Spruance et al. wiesen eine signifikante Reduzierung der Abheilung der Krusten nach systemischer ACV-Therapie um zwei Tage nach [102]. Der Beginn der Therapie innerhalb des Prodromal- oder Erythemstadiums war dabei essentiell.

Die Verwendung systemischer Virostatika sollte allerdings die Ausnahme bei immunkompetenten Menschen darstellen und nur bei zu erwartendem Risiko der Herpes labialis-Reaktivierung erfolgen.

Bei häufig auftretenden Herpes-Rezidiven von mehr als sechs Mal pro Jahr erfolgt die prophylaktische Therapie üblicherweise durch eine Langzeittherapie mittels systemischer Nukleosid-Analoga. Diese Dauertherapie sollte wegen des hohen Risikos der Ausbildung von Resistenz nach sechs bis zwölf Monaten unterbrochen werden [243].

Bei einer gesteigerten UV-Exposition sowie geplanten mechanischen Eingriffen im Bereich des Gesichts, wie z.B. zahnchirurgische-, Laser oder PMU-Behandlungen, ist eine prophylaktische topische oder systemische Herpes-Therapie empfehlenswert.

Durch die vermehrte Verwendung der topischen und systemischen ACV-Therapien und dem damit ansteigenden Risiko von Resistenzen [244] konnte eine zunehmende Toxizität für die systemische Therapie nachgewiesen werden. Es gelang, einen direkten Zusammenhang zwischen der oralen Einnahme von ACV und Ganciclovir und dem Auftreten von Neuro-Toxizitäten, v.a. bei Fehlfunktionen der Nieren, festzustellen [245; 246].

Neuartige Ansätze zur Prävention und Therapie von Herpes Simplex Virus Infektionen *in vitro* mit vielversprechenden Ergebnissen liegen publiziert vor [247; 248]. Nach wie vor werden jedoch alternative Therapien auf Basis neuer molekularer Mechanismen für die klinische Behandlung von HSV-Infektionen benötigt. Während des letzten Jahrzehnts stieg die Anzahl an antiviralen Therapeutika für die klinische Therapie von Herpes labialis auf mehr als dreißig Arzneimittel an [149]. Ein akutes Problem bei der Entwicklung von entsprechenden Medikamenten sind die antivirale Wirksamkeit, die Toxizität sowie hohe Kosten. Die bekannten Resistenzen stellen ebenfalls große Herausforderungen für die Entwicklung neuer antiviraler Substanzen dar. Folglich ist die Entwicklung von neuartigen antiviralen Therapien, die allein oder in Kombination mit bereits bestehenden Standardtherapien angewendet werden können, von außerordentlichem Interesse.

Aufgrund der langen Evolution bei der Entwicklung von Abwehr-Mechanismen gegenüber Viren sind Pflanzen für die Entwicklung alternativer antiviraler Therapien sehr bedeutsam.

Pflanzliche Extrakte und sekundäre Pflanzenstoffe erlangen zunehmend an Beachtung als potentielle antivirale Inhibitoren. Studien konnten für mannigfaltige Heilpflanzen aktive antivirale Komponenten gegen verschiedene humane Virusinfektionen nachweisen [148; 249; 250].

Für die SPME und Ca-SP enthaltene topische Formulierung konnten in der klinischen Untersuchung prophylaktische und therapeutische Effekte gegen Herpes labialis-Reaktivierungen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zum Wirkmechanismus, die in der experimentellen Untersuchung für die antiviralen Effekte von Ca-SP gegen HSV-1 detektiert werden konnten, lassen die Folgerung

zu, dass Ca-SP ein aussichtsreiches, natürliches Polysaccharid darstellt. Es scheint für die Entwicklung neuartiger antiviraler Therapien auf Basis alternativer Wirkmechanismen zur Lösung der Resistenz-Problematiken vielversprechend zu sein.

Die in der klinischen Untersuchung verwendete topische Formulierung zählt zu den kosmetischen Mitteln. Kosmetische Mittel sind in Deutschland und Europa nicht zulassungspflichtig. Die Hersteller kosmetischer Mittel sind allerdings verpflichtet die Rezeptur des Produktes offenzulegen. Des Weiteren müssen bestimmte verwendete Inhalts- und Zusatzstoffe, wie Konservierungs- und Farbstoffe sowie UV-Filter, zugelassen sein.

Alle kosmetischen Produkte, die mit der menschlichen Haut in Berührung kommen, müssen auf ihre Unbedenklichkeit überprüft worden sein. Die generellen Risiken dieser kosmetischen Mittel werden vom BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) hinsichtlich ihrer gesundheitlichen Unbedenklichkeit bewertet.

Sowohl die topische als auch die systemische Therapie mit Nukleosid-Analoga zählt zu den zugelassenen Arzneimitteln. Für eine Zulassung der topischen Formulierung als Arzneimittel muss dieses den Richtlinien des Arzneimittelgesetzes, Paragraph 21 Abs. 1, entsprechen.

Um die entsprechenden Zulassungsunterlagen zu erhalten, wären analytische, pharmakologisch-toxikologische und klinische Prüfungen sowie Sachverständigen-Gutachten notwendig. Außerdem müssten Gebrauchs- und Fachinformationen, Kennzeichnungstexte und Angaben zu den Packungsgrößen für diese Zulassung vorliegen. Das kosmetische Mittel muss für die Zulassung als Arzneimittel wirksam und unbedenklich sowie von erforderlicher, pharmazeutischer Qualität sein.

Auf Grund dessen, das *Spirulina platensis* und die daraus gewonnenen Extrakte und Polysaccharide bereits zunehmend Verwendung in biotechnologischen Bereichen, in der Gesundheits- und Kosmetikindustrie sowie als Nahrungsergänzung und als Biokraftstoff finden [251] sowie die Anwendung der topischen Formulierung bei Herpes labialis-Reaktivierungen als kosmetisches Mittel möglich ist, sollte der Aufwand für eine Arzneimittel-Zulassung zum jetzigen Zeitpunkt nicht betrieben werden.

Studien zur Wirkung von *S. platensis* als Nahrungsergänzungsmittel konnten bislang weder im Tiermodell noch beim Menschen toxische Effekte feststellen [176; 177; 182]. Eine Verwendung dieser natürlichen Substanzen als kosmetisches Mittel zum Auftragen auf die Haut hinsichtlich toxischer Nebeneffekte ist folglich als bedenkenlos einzustufen. Da SPME und Ca-SP nicht zur konventionellen Herpes-Therapie zählen, sind Resistenz-Entwicklungen bislang nicht zu erwarten.

Eine geringe Penetrationsrate durch das Stratum corneum könnte, ähnlich der topischen ACV Therapie, für die SPME und Ca-SP enthaltene topische Formulierung ein Problem darstellen. Auf Grund der Molekülgröße von Polysacchariden ist anzunehmen, dass eine geringe bis nicht ausreichende Wirkstoffkonzentration in den tieferen Schichten der Epidermis ankommt. Ein frühzeitiger Beginn der topischen Therapie zur Prophylaxe von Herpes labialis ist daher empfehlenswert.

Für die SPME und Ca-SP enthaltene topische Formulierung konnten prophylaktische und therapeutische Effekte gegen Herpes labialis-Reaktivierungen in einer Hochrisiko-Gruppe festgestellt werden. Diese Effekte waren der Wirkung gängiger topischer Virostatika überlegen. Die vorliegenden Ergebnisse der klinischen Anwendungsbeobachtung bieten eine gesicherte Grundlage zur Entwicklung neuartiger Herpes-Therapien auf der Basis eines anderen Wirkmechanismus sowie eine effiziente Alternative zur konventionellen Herpes-Therapie mit topischen Nukleosid-Analoga.

Folglich sind Polysaccharide, die aus der Mikroalge *S. platensis* isoliert werden, potentielle Kandidaten für die Entwicklung von antiviralen Virostatika auf Basis neuartiger Wirkmechanismen [185] und stellen für Hochrisiko-Patienten eine wirksame Alternative bei auftretenden Therapie-Resistenzen dar.

#### **5.4. Antivirale Effekte von Ca-SP bei KSHV/HHV-8-Infektionen in humanen retinalen Pigment-Epithelzellen**

Nach Feststellung prophylaktischer und therapeutischer Effekte für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) im klinischen Modell wurde untersucht, ob sich die antivirale Wirkung von Ca-SP auf HSV-1 beschränkt. Die Beantwortung dieser Fragestellung ist hinsichtlich der Entwicklung neuartiger Therapieansätze für andere humane Virusinfektionen von Bedeutung.

Mittels der experimentellen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die antivirale Wirkung von Ca-SP nicht auf die Inhibition von HSV-1-Infektionen begrenzt ist. Des Weiteren konnten für verschiedene umhüllte Viren, wie z.B. HCMV, HIV, Influenza A, Masern und Mumps-Virus, bereits antivirale Effekte durch Ca-SP nachgewiesen werden [177; 178; 186; 186]. Die Frage nach der virusspezifischen Wirkung von Ca-SP war bei den experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit folglich von großem Interesse.

Hierfür wurde die Wirkung von Ca-SP bei KSHV/HHV-8-Infektionen untersucht. Die konventionelle Therapie von kutanen Kaposi-Sarkomen, hervorgerufen durch KSHV/HHV-8,

die vorwiegend bei immundefizienten Patienten eingesetzt wird [52], umfasst überwiegend die antiretrovirale Kombinationstherapie und Exzision.

Antivirale Therapeutika wie z.B. Ganciclovir oder Foscarnet, die bei der konservativen KSHV/HHV-8-Therapie verwendet werden, hemmen die virale DNA-Replikation [114; 115]. Sie haben sich als sehr effektiv bei der Prävention von Kaposi-Sarkomen bei AIDS-Patienten erwiesen, wobei die Therapie nach Ausbildung der Kaposi-Sarkome mittels Virostatika nachgewiesenermaßen ineffektiv ist [79; 114; 115].

Der Anstieg von Resistenzen gegenüber Virostatika mit diesem Wirkmechanismus stellt ein zunehmendes Problem dar [79; 114]. Bodsworth et al. [207] gelang es, die maligne Hauterkrankung bei AIDS-Patienten mit topischem Alitretinoin-Gel zu therapieren. Alitretinoin (9-*cis*-Retinsäure) ist ein Wirkstoff, der überwiegend zur systemischen Therapie von chronischen Handekzemen eingesetzt wird und zur Gruppe der Retinoide zählt [252]. Mit der Phase-III-Studie von Bodsworth et al. konnte eine signifikante Wirkung von 0,1%-igem Alitretinoin-Gel auf die kutanen Kaposi-Sarkome belegt werden [207].

Die bislang erste Untersuchung der antiviralen Effekte von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen in humanen retinalen Pigment-Epithelzellen ist in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die Untersuchung dieser antiviralen Effekte wies in beiden verwendeten Testsystemen, der TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode und der qPCR, eine potente Wirkung auf. Die potente Wirkung von Ca-SP in diesen Testungen in der Zellkultur war der Wirkung von Foscarnet überlegen. Obwohl Foscarnet zu den konventionellen antiviralen Therapien von KSHV/HHV-8 zählt, wird seine Wirkung als moderat eingestuft [79]. Die publizierte inhibitorische Konzentration von Foscarnet gegen KSHV/HHV-8-Infektionen liegt zwischen 70 bis 140 µg/ml (TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode) [114] bzw. bei ungefähr 50 µg/ml (qPCR-Analyse) [253], je nach durchgeführter Methode.

Die mittels TCID<sub>50</sub>-Reduktionsmethode gemessene antivirale Wirkung von Ca-SP (1,5 µg/ml) war potenter als die Wirkung von Foscarnet (102,5 µg/ml; s. Abbildung 35). Diese Effekte konnten in der qPCR-Analyse bestätigt werden. Hier wurde eine inhibitorische Konzentration von 1,6 µg/ml für Ca-SP und ein Effekt von 45,9 µg/ml für Foscarnet ermittelt (Abbildung 36). Dieser für Foscarnet gemessene antivirale Effekt lag jedoch unter der für Foscarnet publizierten Wirkung gegen KSHV/HHV-8. Diese Differenzen sind aufgrund verschiedener Zelllinien sowie durch Variabilitäten in den einzelnen Messmethoden möglich [79; 116; 117].

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von Ca-SP bei KSHV/HHV-8-Infektionen wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt. Die Quantifizierung des viralen Tegument Proteins ORF45 wies eine dosisabhängige Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP auf, die

ähnlich dem für HSV-1 festgestellten Wirkmechanismus war. Die Inhibition der Virus-Anheftung durch Ca-SP war vergleichbar mit der bekannten Wirkung von Heparin.

Der exakte, molekulare Wirkmechanismus von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen ist allerdings bislang nicht bekannt.

Der in der experimentellen Untersuchung nachgewiesene Wirkmechanismus von Ca-SP bei HSV-1- sowie bei KSHV/HHV-8-Infektion, läßt folgende Vermutungen zu:

Ebenso wie bei HSV-1 ist der Eintritt von KSHV/HHV-8 in die Zielzelle ein mehrstufiger Prozess, der durch die initiale Anheftung des Virus, vermittelt durch das Glykoprotein gB an den Zelloberflächen-Rezeptor HSPG ausgelöst wird [64; 70; 71]. Diese Interaktion initiiert u.a. die Bindung von gH und gpK8.1 an Heparan-Sulfat-Moleküle sowie die Interaktion von gB an verschiedene Integrine (  $\alpha_1V$   $\alpha_2V$  [64; 70]. Für die anschließende Penetration des Virus in die Zelle bindet der nichtkovalente Glykoprotein-Komplex (gH und gL) an den zellulären Rezeptor EphA2 [69]. Die KSHV/HHV-8-Glykoproteine gB und gpK8.1 binden mit der gleichen Affinität wie die Glykoproteine gB und gC von HSV-1 an HSPGs [64; 75; 76].

Heparin inhibiert die KSHV/HHV-8-Infektion ebenso wie die HSV-1-Infektion durch die Bindung an die Glykoproteine C und B. Die daraus resultierende Blockierung der viralen Rezeptoren verhindert die Bindung des Virus an die Zielzelle [70; 71; 74]. Der dosisabhängige Wirkmechanismus von Heparin gegen KSHV/HHV-8-Infektionen ist mit der Blockierung von HSV-1-Infektionen vergleichbar [70].

Die ähnliche Virus-Zell-Interaktion beider humaner Herpesviren sowie die dabei beteiligten Glykoproteine und Zelloberflächen-Rezeptoren bekräftigen die Vermutung, dass die Inhibition von HSV-1 und KSHV/HHV-8 durch Ca-SP auf dem gleichen Wirkmechanismus beruht. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchung bestätigen diese Aussage.

Die antivirale Wirkung von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen (qPCR Analyse: 1,6 µg/ml; Abbildung 36) war vergleichbar potent wie gegen HSV-1 (qPCR Analyse: 0,4 µg/ml; Abbildung 20). Mittels FACS-Analyse konnte die Blockierung der Anheftung beider Herpesviren an humane Zellen durch die Quantifizierung der viralen Tegument Proteine VP16 (HSV-1) und ORF45 (KSHV/HHV-8) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte bei beiden humanen Herpesviren für Ca-SP eine antivirale Wirkung festgestellt werden, die vergleichbar mit dem Wirkung von Heparin war. Die Inhibition von HSV-1- und KSHV/HHV-8-Infektionen durch Ca-SP beruht auf der Blockierung der viralen Anheftung an humane Zielzellen.

Die antivirale Wirkung von Ca-SP konnte in der experimentellen Untersuchung mittels verschiedener Methoden zur Virusquantifizierung gegen KSHV/HHV-8-Infektionen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkung von Ca-SP nicht virusspezifisch ist, wobei dies bislang nur für behüllte Viren belegt wurde. Eine Analyse

antiviraler Effekte von Ca-SP auf unbehüllte Viren wäre in diesem Zusammenhang interessant. Aufgrund von wachsenden Resistenzen gegenüber gängiger Virostatika werden Therapien mit alternativen Wirkmechanismen benötigt. Der in der experimentellen Untersuchung erbrachte Nachweis des Wirkmechanismus von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8 könnte für die Entwicklung von topischen Therapien auf Basis alternativer Wirkmechanismen hilfreich sein, da kutane Kaposi-Sarkome prinzipiell für die topische Therapie zugänglich sind.

### 5.5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich basierend auf den gesicherten einschlägigen Forschungsergebnissen konstatieren, dass Ca-SP ein potenter Inhibitor von HSV-1-Infektionen *in vitro* ist. Dies konnte in der klinischen Anwendungsbeobachtung für die topische Formulierung (SPME+Ca-SP) bei Herpes labialis-Infektionen *in vivo* bestätigt werden. Ca-SP weist eine potente Inhibition von HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten auf, die von essentieller Relevanz bei humanen Herpes Simplex Virus Infektionen sind. Diese Inhibition ist mit der Wirkung gängiger antiviraler Therapien auf Basis des Nukleosid-Analogons Aciclovir vergleichbar. Ca-SP inhibiert die HSV-1-Anheftung an humane Keratinozyten, wobei dieser Wirkmechanismus mit dem von Heparin, dem bekannten Anheftungs-Inhibitor, vergleichbar ist. In der klinischen Anwendungsbeobachtung konnten erstmals prophylaktische und therapeutische Effekte für eine SPME und Ca-SP enthaltene topische Formulierung bei Herpes labialis-Rezidiven festgestellt werden. Es wurde ermittelt, daß die Wirkung der topischen Formulierung in einer Hochrisiko-Gruppe der Wirkung gängiger topischer Therapien mit ACV überlegen war. Ob weitere Komponenten aus dem *S. platensis* Mikroalgen-Extrakt für die antivirale Wirkung verantwortlich sind, ist bislang nicht bekannt. Überdies konnte in der experimentellen Untersuchung erstmalig eine potente antivirale Wirkung von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8-Infektionen in humanen retinalen Pigment-Epithelzellen nachgewiesen werden, die auf der Blockierung der Virus-Anheftung beruht.

Da *S. platensis* ein natürlicher nachwachsender Rohstoff ist, ist die Verwendung für zukünftige Forschungen und für die Nahrungsmittel-, Lebensmittel- und Kosmetikindustrie sowie für die Pharmazie und Medizin gesichert [254]. Für künftige *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP und SPME sollten allerdings die noch fehlenden Standards für die Algengewinnung, die Herstellung und Isolierung von Polysacchariden (Ca-SP) sowie von anderen Substanzen aus der *S. platensis* Mikroalge überwunden werden.

Die bislang geringe Anzahl von Studien, die die Wirkung von Ca-SP und SPME auf humane Erkrankungen und Virusinfektionen sowie mögliche Nebenwirkungen untersuchen,

beeinträchtigt die Entwicklung entsprechender alternativer Therapieansätze.

Die detaillierte und komplexe Analyse des molekularen Wirkmechanismus von Ca-SP sollte folglich Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, um antivirale Therapien auf der Basis divergenter Wirkmechanismen entwickeln zu können. Untersuchungen von SPME und Ca-SP bei humanen Virusinfektionen in randomisierten klinischen Studien im direkten Vergleich zur ACV-Therapie wären ebenfalls erstrebenswert. Diese Studien sowie die Analyse weiterer Komponenten des SPME und deren Wirksamkeit auf verschiedene Viren könnten zur Lösung des Resistenz-Risikos, v.a. bei Hochrisiko- und immundefizienten Patienten, beitragen.

Die weiterführende Untersuchung und Entwicklung potentieller topischer Therapien gegen KSHV/HHV-8-Infektionen sowie die Erforschung der Wirkung von Ca-SP gegen unbehüllte Viren sind überdies von großer klinischer Relevanz.

Die in der klinischen Untersuchung ermittelten prophylaktischen Effekte durch die SPME und Ca-SP enthaltene topische Formulierung gegen Herpes labialis-Reaktivierungen in einer Hochrisiko-Gruppe könnten die Basis weitere klinischer Studien darstellen.

Hierfür wären Untersuchungen der topischen Behandlung von Herpes-Rezidiven im genitalen, oralen und okularen Bereich, v.a. vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenz-Entwicklung aufgrund von Langzeit-Therapien mit Virostatika [255], vorstellbar.

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten und ausgewerteten Untersuchungsergebnisse dienen einem besseren Verständnis der antiviralen Wirkweise von dem aus der Mikroalge *S. platensis* isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan gegen HSV-1-Infektionen in humanen Keratinozyten. Die Resultate der klinischen Anwendungsbeobachtung ermöglichen eine neue topische Therapie von Herpes labialis-Rezidiven. Diese alternative Therapiemöglichkeit basiert auf der Wirkung der natürlichen Wirkstoffe SPME und Ca-SP.

Die topische Formulierung stellt folglich auf Grund der ermittelten Resultate eine Wahlmöglichkeit bei der Behandlung von Herpes labialis-Rezidiven zur gängigen Herpes-Therapie dar.

Die vorliegende Arbeit bietet auf Basis der experimentellen und klinischen Ergebnisse die Möglichkeit, neue Therapiestrategien bei humanen Herpesinfektionen zu entwickeln und zu etablieren. Der *S. platensis* Microalgen-Extrakt sowie das daraus isolierte Polysaccharid Calcium Spirulan sind hierbei als eine mögliche neue prophylaktische Therapie bei Herpes labialis anzusehen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [2] Roizman B, Pellett PM. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley P. *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, N.Y., 2007, 2479–2499.
- [3] Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006; 9(4): 423–429.
- [4] Fritsch P. *Dermatologie Venerologie - Grundlagen*. Klinik. Atlas. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.[
- [5] Jenkins FJ, Casadaban MJ, Roizman B. Application of the mini-Mu-phage for target-sequence-specific insertional mutagenesis of the herpes simplex virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 4773–4777.
- [6] McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 1988; 69 ( Pt 7)1531–1574.
- [7] Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(2): 143–154.
- [8] Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [9] Pica F, Volpi A. Public awareness and knowledge of herpes labialis. *J. Med. Virol.* 2011; 1(84): 132–7.
- [10] Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007; 32(6): 625–630.
- [11] Levine M, Goldin AL, Glorioso JC. Persistence of herpes simplex virus genes in cells of neuronal origin. *J. Virol.* 1980; 35(1): 203–210.
- [12] Field HJ. Persistent herpes simplex virus infection and mechanisms of virus drug resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 1989; 8(8): 671–680.
- [13] Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007; 32(6): 625–630.
- [14] Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007; 57(5): 737–763.
- [15] Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J. Infect. Dis.* 2006; 194 Suppl 1S11–18.
- [16] Herpes simplex [Internet]. Wikipedia 2014; [zitiert 2014 Sep 19 ] Available from: [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Herpes\\_simplex&oldid=133702021](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Herpes_simplex&oldid=133702021)

- [17] Hodnichak CM, Turley-Shoger E, Mohanty JG, Rosenthal KS. Visualization of herpes simplex virus type 1 attachment to target cells using *Staphylococcus aureus* as a morphologic tag. *J. Virol. Methods* 1984; 8(3): 191–198.
- [18] Mettenleiter TC, Spear PG. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 1994; 68(1): 500–504.
- [19] Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology* 2000; 275(1): 1–8.
- [20] Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.* 2004; 6(5): 401–410.
- [21] Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes Virus Fusion and Entry: A Story with Many Characters. *Viruses* 2012; 4(5): 800–832.
- [22] GlycoForum/GlycoScience/Glycomicrobiology [Internet]. [zitiert 2014 Sep 21 ] Available from: <http://glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM07/GM07E.html#2>
- [23] O'Donnell CD, Kovacs M, Akhtar J, Valyi-Nagy T, Shukla D. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology* 2010; 397(2): 389–398.
- [24] Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H. PILR $\alpha$  Is a Herpes Simplex Virus-1 Entry Coreceptor That Associates with Glycoprotein B. *Cell* 2008; 132(6): 935–944.
- [25] Parry C, Bell S, Minson T, Browne H. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to alphavbeta3 integrins. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt 1): 7–10.
- [26] Gianni T, Cerretani A, Dubois R, Salvioli S, Blystone SS, Rey F, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins H/L bind to cells independently of  $\{\alpha\}V\{\beta\}3$  integrin and inhibit virus entry, and their constitutive expression restricts infection. *J. Virol.* 2010; 84(8): 4013–4025.
- [27] Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev. Med. Virol.* 2007; 17(3): 205–215.
- [28] Fusco D, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102(26): 9323–9328.
- [29] Subramanian RP, Geraghty RJ. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104(8): 2903–2908.
- [30] Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 2003; 77(9): 5324–5332.
- [31] Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC. Entry of Pseudorabies Virus: an Immunogold-Labeling Study. *J. Virol.* 2005; 79(5): 3200–3205.
- [32] Luxton GWG, Lee JI-H, Haverlock-Moyns S, Schober JM, Smith GA. The Pseudorabies Virus VP1/2 Tegument Protein Is Required for Intracellular Capsid Transport. *J. Virol.* 2006; 80(1): 201–209.

- [33] Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 1997; 136(5): 1007–1021.
- [34] Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20(13): 4922–4931.
- [35] Granzow H, Weiland F, Jöns A, Klupp BG, Karger A, Mettenleiter TC. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* 1997; 71(3): 2072–2082.
- [36] Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 1974; 14(1): 8–19.
- [37] Khanna KM, Lepisto AJ, Hendricks RL. Immunity to latent viral infection: many skirmishes but few fatalities. *Trends Immunol.* 2004; 25(5): 230–234.
- [38] Malik AK, Shao L, Shanley JD, Weller SK. Intracellular localization of the herpes simplex virus type-1 origin binding protein, UL9. *Virology* 1996; 224(2): 380–389.
- [39] Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 2009; 143(2): 222–234.
- [40] Chang YE, Roizman B. The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *J. Virol.* 1993; 67(11): 6348–6356.
- [41] Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004; 106(2): 167–180.
- [42] Turcotte S, Letellier J, Lippé R. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* 2005; 79(14): 8847–8860.
- [43] Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996; 39(5-6): 389–400.
- [44] Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3675–3684.
- [45] Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Ben-Porat T. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 1992; 66(4): 2316–2325.
- [46] Even DL, Henley AM, Geraghty RJ. The requirements for herpes simplex virus type 1 cell-cell spread via nectin-1 parallel those for virus entry. *Virus Res.* 2006; 119(2): 195–207.
- [47] Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 1987; 235(4792): 1056–1059.
- [48] Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 2008; 454(7205): 780–783.

- [49] Blossom D. EBV and KSHV – related herpesviruses in non-human primates [Internet]. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- [50] Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266(5192): 1865–1869.
- [51] Ganem D, Knipe DM, Howley P, Griffin DE, Lamb RA, Martin B, Roizman B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Strauss SE. *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, 2007, 2875–2888.
- [52] Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2(5): 373–382.
- [53] Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332(18): 1186–1191.
- [54] Sternbach G, Varon J. Moritz Kaposi: idiopathic pigmented sarcoma of the skin. *J. Emerg. Med.* 1995; 13(5): 671–674.
- [55] Guttman-Yassky E, Dubnov J, Kra-Oz Z, Friedman-Birnbaum R, Silbermann M, Barchana M, Bergman R, Sarid R. Classic Kaposi sarcoma. Which KSHV-seropositive individuals are at risk? *Cancer* 2006; 106(2): 413–419.
- [56] Brown EE, Whitby D, Vitale F, Marshall V, Mbisa G, Gamache C, Lauria C, Alberg AJ, Serraino D, Cordiali-Fei P, Messina A, Goedert JJ. Virologic, hematologic, and immunologic risk factors for classic Kaposi sarcoma. *Cancer* 2006; 107(9): 2282–2290.
- [57] Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332(18): 1181–1185.
- [58] Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342(14): 1027–1038.
- [59] Gessain A, Sudaka A, Brière J, Fouchard N, Nicola MA, Rio B, Arborio M, Troussard X, Audouin J, Diebold J, de Thé G. Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castlemann's disease: is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood* 1996; 87(1): 414–416.
- [60] Feller L, Wood NH, Lemmer J. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2007; 104(4): 521–529.
- [61] Monini P, de Lellis L, Fabris M, Rigolin F, Cassai E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334(18): 1168–1172.
- [62] Kaposi's\_Sarcoma.jpg (JPEG-Grafik, 2700 × 1800 Pixel) - Skaliert (35%) [Internet]. [zitiert 2014 Okt 2 ] Available from: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Kaposi%27s\\_Sarcoma.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Kaposi%27s_Sarcoma.jpg)

- [63] aids532350.fig9.gif (GIF-Grafik, 500 × 466 Pixel) [Internet]. [zitiert 2014 Okt 2 ] Available from: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/532/350/aids532350.fig9.gif>
- [64] Chakraborty S, Veettil MV, Chandran B. Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. *Front. Microbiol.* 2012; 36.
- [65] Chandran B. Early Events in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection of Target Cells. *J. Virol.* 2010; 84(5): 2188–2199.
- [66] Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J. Virol.* 1997; 71(6): 4187–4192.
- [67] Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93(25): 14862–14867.
- [68] Henderson LE. Physicians' Research Network - Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) [Internet]. Physicians' Research Netw. 2002; [zitiert 2014 Dez 1 ] Available from: [http://www.prn.org/index.php/provider\\_resources/prn\\_art/kaposis\\_sarcoma\\_associated\\_herpes\\_virus\\_kshv\\_3\\_d\\_model](http://www.prn.org/index.php/provider_resources/prn_art/kaposis_sarcoma_associated_herpes_virus_kshv_3_d_model)
- [69] Hahn AS, Kaufmann JK, Wies E, Naschberger E, Panteleev-Ivlev J, Schmidt K, Holzer A, Schmidt M, Chen J, König S, Ensser A, Myoung J, Brockmeyer NH, Stürzl M, Fleckenstein B, Neipel F. The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Med.* 2012; 18(6): 961–966.
- [70] Akula SM, Wang F-Z, Vieira J, Chandran B. Human Herpesvirus 8 Interaction with Target Cells Involves Heparan Sulfate. *Virology* 2001; 282(2): 245–255.
- [71] Birkmann A, Mahr K, Ensser A, Yağuboğlu S, Titgemeyer F, Fleckenstein B, Neipel F. Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11583–11593.
- [72] Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, Brookes SM, Blakemore WE, Corteyn AH, Stuart DI, Newman JW, King AM. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 1996; 70(8): 5282–5287.
- [73] WuDunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 1989; 63(1): 52–58.
- [74] Hahn A, Birkmann A, Wies E, Dorer D, Mahr K, Stürzl M, Titgemeyer F, Neipel F. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gH/gL: glycoprotein export and interaction with cellular receptors. *J. Virol.* 2009; 83(1): 396–407.
- [75] Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J. Virol.* 2003; 77(17): 9542–9552.
- [76] Wang F-Z, Akula SM, Sharma-Walia N, Zeng L, Chandran B. Human Herpesvirus 8 Envelope Glycoprotein B Mediates Cell Adhesion via Its RGD Sequence. *J. Virol.* 2003; 77(5): 3131–3147.

- [77] Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J. Virol.* 2003; 77(2): 1524–1539.
- [78] Wang F-Z, Akula SM, Pramod NP, Zeng L, Chandran B. Human Herpesvirus 8 Envelope Glycoprotein K8.1A Interaction with the Target Cells Involves Heparan Sulfate. *J. Virol.* 2001; 75(16): 7517–7527.
- [79] Medveczky MM, Horvath E, Lund T, Medveczky PG. In vitro antiviral drug sensitivity of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *AIDS Lond. Engl.* 1997; 11(11): 1327–1332.
- [80] Budt M, Hristozova T, Hille G, Berger K, Brune W. Construction of a Lytically Replicating Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus  $\nu$ . *J. Virol.* 2011; 85(19): 10415–10420.
- [81] Lagunoff M, Bechtel J, Venetsanakos E, Roy A-M, Abbey N, Herndier B, McMahon M, Ganem D. De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells. *J. Virol.* 2002; 76(5): 2440–2448.
- [82] Gradoville L, Gerlach J, Grogan E, Shedd D, Nikiforow S, Metroka C, Miller G. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Open Reading Frame 50/Rta Protein Activates the Entire Viral Lytic Cycle in the HH-B2 Primary Effusion Lymphoma Cell Line. *J. Virol.* 2000; 74(13): 6207–6212.
- [83] Lukac DM, Kirshner JR, Ganem D. Transcriptional activation by the product of open reading frame 50 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells. *J. Virol.* 1999; 73(11): 9348–9361.
- [84] Sun R, Lin S-F, Gradoville L, Yuan Y, Zhu F, Miller G. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95(18): 10866–10871.
- [85] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Ruth P, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Endo-Prax. 2008; 24(03): 29–29.
- [86] Singh BB, Udani J, Vinjamury SP, Der-Martirosian C, Gandhi S, Khorsan R, Nanjegowda D, Singh V. Safety and effectiveness of an L-lysine, zinc, and herbal-based product on the treatment of facial and circumoral herpes. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 2005; 10(2): 123–127.
- [87] Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 2002; 4(11 Suppl): 923–927.
- [88] Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 2000; 7(1): 1–6.
- [89] Spruance SL, Crumpacker CS, Schnipper LE, Kern ER, Marlowe S, Arndt KA, Overall JC. Early, patient-initiated treatment of herpes labialis with topical 10% acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 25(5): 553–555.
- [90] Raborn GW, McGaw WT, Grace M, Percy J, Samuels S. Herpes labialis treatment with acyclovir 5% modified aqueous cream: A double-blind, randomized trial. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1989; 67(6): 676–679.

- [91] Raborn GW, McGaw WT, Grace M, Houle L. Herpes labialis treatment with acyclovir 5 per cent ointment. *J. Can. Dent. Assoc.* 1989; 55(2): 135–137.
- [92] Fiddian AP, Yeo JM, Stubbings R, Dean D. Successful treatment of herpes labialis with topical acyclovir. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 1983; 286(6379): 1699–1701.
- [93] Raborn GW, Martel AY, Grace MG, McGaw WT. Herpes labialis in skiers: randomized clinical trial of acyclovir cream versus placebo. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1997; 84(6): 641–645.
- [94] Spruance SL, Rea TL, Thoming C, Tucker R, Saltzman R, Boon R. Penciclovir cream for the treatment of herpes simplex labialis. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Topical Penciclovir Collaborative Study Group. *JAMA* 1997; 277(17): 1374–1379.
- [95] Boon R, Goodman JJ, Martinez J, Marks GL, Gamble M, Welch C. Penciclovir cream for the treatment of sunlight-induced herpes simplex labialis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Penciclovir Cream Herpes Labialis Study Group. *Clin. Ther.* 2000; 22(1): 76–90.
- [96] Spruance SL, Nett R, Marbury T, Wolff R, Johnson J, Group TS for TACS. Acyclovir Cream for Treatment of Herpes Simplex Labialis: Results of Two Randomized, Double-Blind, Vehicle-Controlled, Multicenter Clinical Trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(7): 2238–2243.
- [97] Freeman DJ, Sheth NV, Spruance SL. Failure of topical acyclovir in ointment to penetrate human skin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 29(5): 730–732.
- [98] Spruance SL, Schnipper LE, Overall JC, Kern ER, Wester B, Modlin J, Wenerstrom G, Burton C, Arndt KA, Chiu GL, Crumpacker CS. Treatment of Herpes Simplex Labialis with Topical Acyclovir in Polyethylene Glycol. *J. Infect. Dis.* 1982; 146(1): 85–90.
- [99] Sarkany I, Hadgraft JW, Caron GA, Barrett CW. The role of vehicles in the percutaneous absorption of corticosteroids. An experimental and clinical study. *Br. J. Dermatol.* 1965; 77(11): 569–575.
- [100] Spruance SL, Jones TM, Blatter MM, Vargas-Cortes M, Barber J, Hill J, Goldstein D, Schultz M. High-dose, short-duration, early valacyclovir therapy for episodic treatment of cold sores: results of two randomized, placebo-controlled, multicenter studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(3): 1072–1080.
- [101] Arduino PG, Porter SR. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral Dis.* 2006; 12(3): 254–270.
- [102] Spruance SL, Stewart JC, Rowe NH, McKeough MB, Wenerstrom G, Freeman DJ. Treatment of recurrent herpes simplex labialis with oral acyclovir. *J. Infect. Dis.* 1990; 161(2): 185–190.
- [103] Spruance SL, Bodsworth N, Resnick H, Conant M, Oeuvray C, Gao J, Hamed K. Single-dose, patient-initiated famciclovir: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial for episodic treatment of herpes labialis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 55(1): 47–53.
- [104] Nestor MS. Prophylaxis for and treatment of uncomplicated skin and skin structure infections in laser and cosmetic surgery. *J. Drugs Dermatol. JDD* 2005; 4(6 Suppl): s20–25.

- [105] Aciclovir – Wikipedia [Internet]. [zitiert 2014 Sep 22 ] Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>
- [106] Guanosin [Internet]. Wikipedia 2014; [zitiert 2015 Juni 30 ] Available from: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Guanosin&oldid=129904128>
- [107] Elion GB. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983; 12 Suppl B9–17.
- [108] Elion GB. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J. Med. Virol.* 1993; Suppl 12–6.
- [109] Case 2: Discussion - Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Infection-Dermatologic Manifestations - HIV Web Study [Internet]. [zitiert 2014 Sep 21 ] Available from: <http://depts.washington.edu/hiv aids/derm/case2/discussion.html#ref>
- [110] Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007; 446(7139): 1030–1037.
- [111] Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009; 276(24): 7228–7236.
- [112] McClain DS, Fuller AO. Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virology* 1994; 198(2): 690–702.
- [113] Yarchoan R, Tosato G, Little RF. Therapy insight: AIDS-related malignancies--the influence of antiviral therapy on pathogenesis and management. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2005; 2(8): 406–415; quiz 423.
- [114] Kedes DH, Ganem D. Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. *J. Clin. Invest.* 1997; 99(9): 2082–2086.
- [115] Martin DF, Kuppermann BD, Wolitz RA, Palestine AG, Li H, Robinson CA. Oral Ganciclovir for Patients with Cytomegalovirus Retinitis Treated with a Ganciclovir Implant. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340(14): 1063–1070.
- [116] Glesby MJ, Hoover DR, Weng S, Graham NM, Phair JP, Detels R, Ho M, Saah AJ. Use of antiherpes drugs and the risk of Kaposi's sarcoma: data from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Infect. Dis.* 1996; 173(6): 1477–1480.
- [117] Mocroft A, Youle M, Gazzard B, Morcinek J, Halai R, Phillips AN. Anti-herpesvirus treatment and risk of Kaposi's sarcoma in HIV infection. Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. *AIDS Lond. Engl.* 1996; 10(10): 1101–1105.
- [118] IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry: Home [Internet]. [zitiert 2014 Nov 3 ] Available from: <http://www.iupac.org/>
- [119] Kudlacek O, Mitterauer T, Nanoff C, Hohenegger M, Tang WJ, Freissmuth M, Kleuss C. Inhibition of adenylyl and guanylyl cyclase isoforms by the antiviral drug foscarnet. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(5): 3010–3016.
- [120] Alexander AC, Akers A, Matzke GR, Aweeka FT, Fraley DS. Disposition of foscarnet during peritoneal dialysis. *Ann. Pharmacother.* 1996; 30(10): 1106–1109.

- [121] Noormohamed FH, Youle MS, Higgs CJ, Martin-Munley S, Gazzard BG, Lant AF. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of oral foscarnet in human immunodeficiency virus-seropositive patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(2): 293–297.
- [122] Foscarnet [Internet]. DrugBank 2013; [zitiert 2014 Nov 3 ] Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00529>
- [123] Wagstaff AJ, Bryson HM. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 1994; 48(2): 199–226.
- [124] Inoue N, Winter J, Lal RB, Offermann MK, Koyano S. Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line. *J. Virol.* 2003; 77(14): 8147–8152.
- [125] Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993; 193(2): 834–841.
- [126] Liang X, Babiuk LA, Zamb TJ. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* 1993; 194(1): 233–243.
- [127] Mettenleiter TC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J. Virol.* 1990; 64(1): 278–286.
- [128] Neyts J, Snoeck R, Schols D, Balzarini J, Esko JD, Van Schepdael A, De Clercq E. Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1992; 189(1): 48–58.
- [129] Secchiero P, Sun D, De Vico AL, Crowley RW, Reitz MS, Zauli G, Lusso P, Gallo RC. Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* 1997; 71(6): 4571–4580.
- [130] Skrincosky D, Hocknell P, Whetter L, Secchiero P, Chandran B, Dewhurst S. Identification and Analysis of a Novel Heparin-Binding Glycoprotein Encoded by Human Herpesvirus 7. *J. Virol.* 2000; 74(10): 4530–4540.
- [131] Vanderplasschen A, Bublot M, Dubuisson J, Pastoret PP, Thiry E. Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology* 1993; 196(1): 232–240.
- [132] Coen DM, Schaffer PA. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980; 77(4): 2265–2269.
- [133] Coen DM, Schaffer PA. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2(4): 278–288.
- [134] Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, Mills J. Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(6): 1246–1250.

- [135] Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16(1): 114–128.
- [136] Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, Darby G. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(4): 868–872.
- [137] Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour HH. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann. Intern. Med.* 1990; 112(6): 416–422.
- [138] Nugier F, Colin JN, Aymard M, Langlois M. Occurrence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: report on a two-year sensitivity screening survey. *J. Med. Virol.* 1992; 36(1): 1–12.
- [139] Stránská R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, Wertheim-Van Dillen PM, Berkhout RJM, van Loon AM. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2005; 32(1): 7–18.
- [140] Bacon TH, Boon RJ, Schultz M, Hodges-Savola C. Surveillance for Antiviral-Agent-Resistant Herpes Simplex Virus in the General Population with Recurrent Herpes Labialis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(9): 3042–3044.
- [141] Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, Billaudel S, Chanzy B, Coste-Burel M, Finkielsztejn L, Fleury H, Hadou T, Henquell C, Lafeuille H, Lafon ME, Le Faou A, Legrand MC, Maille L, Mengelle C, Morand P, Morinet F, Nicand E, Omar S, Picard B, Pozzetto B, Puel J, Raoult D, Scieux C, Segondy M, Seigneurin JM, Teyssou R, Zandotti C. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 242–249.
- [142] Reyes M, Shaik NS, Graber JM, Nisenbaum R, Wetherall NT, Fukuda K, Reeves WC, Task Force on Herpes Simplex Virus Resistance. Acyclovir-resistant genital herpes among persons attending sexually transmitted disease and human immunodeficiency virus clinics. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163(1): 76–80.
- [143] Collins P, Larder BA, Oliver NM, Kemp S, Smith IW, Darby G. Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. *J. Gen. Virol.* 1989; 70 ( Pt 2)375–382.
- [144] Frobert E, Cortay J-C, Ooka T, Najjoulallah F, Thouvenot D, Lina B, Morfin F. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral Res.* 2008; 79(1): 28–36.
- [145] Hwang CB, Ruffner KL, Coen DM. A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *J. Virol.* 1992; 66(3): 1774–1776.
- [146] Schmit I, Boivin G. Characterization of the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus isolates from AIDS patients in whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed. *J. Infect. Dis.* 1999; 180(2): 487–490.
- [147] Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(2): 459–472.

- [148] Kott V, Barbini L, Cruaños M, Muñoz JD, Vivot E, Cruaños J, Martino V, Ferraro G, Cavallaro L, Campos R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 64(1): 79–84.
- [149] Wang W, Wang S-X, Guan H-S. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. *Mar. Drugs* 2012; 10(12): 2795–2816.
- [150] Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 1989.
- [151] Friedel T, Rybalka N, Kryvenda A. Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. In: Posten C, Walter C. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. De Gruyter, Berlin, 2012,
- [152] Schopf JW, Packer BM. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 1987; 237(4810): 70–73.
- [153] Whitton BA, Potts M. *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space* [Internet]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000.[zitiert 2014 Nov 7 ] Available from: <http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/book/978-0-7923-4735-4>
- [154] Nagle DG, Paul VJ. Production of Secondary Metabolites by Filamentous Tropical Marine Cyanobacteria: Ecological Functions of the Compounds. *J. Phycol.* 1999; 35(6): 1412–1421.
- [155] Berry JP, Gantar M, Perez MH, Berry G, Noriega FG. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Mar. Drugs* 2008; 6(2): 117–146.
- [156] Jaspars M, Lawton LA. Cyanobacteria - a novel source of pharmaceuticals. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 1998; 1(1): 77–84.
- [157] Becker W. Microalgae in Human and Animal Nutrition [Internet]. In: Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd, 2003, 312–351.[zitiert 2014 Nov 7 ] Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470995280.ch18/summary>
- [158] spirulina-150x150.jpg (JPEG-Grafik, 150 × 150 Pixel) - Skaliert (0%) [Internet]. [zitiert 2014 Nov 7 ] Available from: <http://naturalactives.com/wp-content/uploads/2008/10/spirulina-150x150.jpg>
- [159] SpirulinaFilament.jpg (JPEG-Grafik, 640 × 426 Pixel) - Skaliert (0%) [Internet]. [zitiert 2014 Nov 7 ] Available from: <https://microbewiki.kenyon.edu/images/b/b5/SpirulinaFilament.jpg>
- [160] Richmond A. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Taylor & Francis Group, 1986.
- [161] Rangel-Yagui C de O, Danesi EDG, de Carvalho JCM, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour. Technol.* 2004; 92(2): 133–141.
- [162] Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho JCM, Converti A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 2005; 243(1–4): 217–224.
- [163] Otleş S, Pire R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.* 2001; 84(6): 1708–1714.

- [164] Ciferri O, Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1985; 39:503–526.
- [165] Hills CB. *The Secrets of spirulina: medical discoveries of Japanese doctors*. University of the Trees Press in cooperation with *Journal of Nutritional Microbiology*, 1980.
- [166] Fox RD. *Spirulina: Production & Potential*. Edisud, 1996.
- [167] Henrikson R. *Spirulina World Food: How this micro algae can transform your health and our planet*. Ronore Enterprise Inc., Hana, 2010.
- [168] Batello C. *The Future Is an Ancient Lake: Traditional Knowledge, Biodiversity and Genetic Resources for Food and Agriculture in Lake Chad Basin Ecosystems*. Food & Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2004.
- [169] Posten C, Walter C. *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*. Walter de Gruyter, 2012.
- [170] Shelef G, Soeder CJ. *Algae Biomass: production and use*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, 1980.
- [171] Smelcerovic A, Knezevic-Jugovic Z, Petronijevic Z. Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14(29): 3168–3195.
- [172] van den Hoek C, Jahns HM, Mann DG. *Algen*. Thieme, Stuttgart, Stuttgart etc., 1993.
- [173] Pulz P, Sandau P. Untersuchungen zu bioaktiven Wirkungen des Polysaccharids Calcium Spirulan aus *Arthrospira Platensis*. *OM & Ernährung* 2010; Nr. 131S. F40 ff.
- [174] Lee JB, Hayashi T, Hayashi K, Sankawa U, Maeda M, Nemoto T, Nakanishi H. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 1998; 61(9): 1101–1104.
- [175] Lee JB, Srisomporn P, Hayashi K, Tanaka T, Sankawa U, Hayashi T. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2001; 49(1): 108–110.
- [176] Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005; 6(5): 373–379.
- [177] Luescher-Mattli M. Algae, A Possible Source for New Drugs in the Treatment of HIV and Other Viral Diseases. *Curr. Med. Chem. - Anti-Infect. Agents* 2003; 2(3): 219–225.
- [178] Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Naidu MUR, Sundaram C, Singh S, Kuppusamy P, Kutala VK. Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother. Res. PTR* 2005; 19(12): 1030–1037.
- [179] Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Rao Naidu MU, Prayag A, Kutala VK. *Spirulina* attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol. JAT* 2006; 26(5): 444–451.
- [180] Lu J, Ren D-F, Wang J-Z, Sanada H, Egashira Y. Protection by dietary *Spirulina platensis* against d-galactosamine- and acetaminophen-induced liver injuries. *Br. J. Nutr.* 2010; 103(11): 1573–1576.

- [181] Yogianti F, Kunisada M, Nakano E, Ono R, Sakumi K, Oka S, Nakabeppu Y, Nishigori C. Inhibitory Effects of Dietary *Spirulina platensis* on UVB-Induced Skin Inflammatory Responses and Carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134(10): 2610–2619.
- [182] Hirahashi T, Matsumoto M, Hazeki K, Saeki Y, Ui M, Seya T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int. Immunopharmacol.* 2002; 2(4): 423–434.
- [183] Hayashi K, Hayashi T, Morita N, Kojima I. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phytother. Res.* 1993; 7(1): 76–80.
- [184] Hayashi K, Hayashi T, Kojima I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996; 12(15): 1463–1471.
- [185] Rechter S, König T, Auerochs S, Thulke S, Walter H, Dörnenburg H, Walter C, Marschall M. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res.* 2006; 72(3): 197–206.
- [186] Hayashi T, Hayashi K, Maeda M, Kojima I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 1996; 59(1): 83–87.
- [187] Mudimu O, Rybalka N, Bauersachs T, Born J, Friedl T, Schulz R. Biotechnological Screening of Microalgal and Cyanobacterial Strains for Biogas Production and Antibacterial and Antifungal Effects. *Metabolites* 2014; 4(2): 373–393.
- [188] Lukowski G, Lindequist U, Mundt S, Kramer A, Julich W-D. Inhibition of dermal MRSA colonization by microalgal micro- and nanoparticles. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008; 21(2): 98–105.
- [189] Garg G, Thami GP. Micropigmentation: tattooing for medical purposes. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. AI* 2005; 31(8 Pt 1): 928–931; discussion 931.
- [190] Roberts TA, Ryan SA. Tattooing and high-risk behavior in adolescents. *Pediatrics* 2002; 110(6): 1058–1063.
- [191] van der Velden E m., Defrancq J, Ijsselmuiden O e., Baruchin A m., Hulsebosch H j. Dermatography: A Review of 15 Years of Clinical Applications in Surgery. *Int. J. Cosmet. Surg. Aesthetic Dermatol.* 2001; 3(2): 151–159.
- [192] Montagna W, Kligman AM, Carlisle KS. Atlas of Normal Human Skin. Auflage: New., Springer, Cambridge, Mass, 1992.
- [193] Vassileva S, Hristakieva E. Medical applications of tattooing. *Clin. Dermatol.* 2007; 25(4): 367–374.
- [194] Nutrition C for FS and A. Products - Tattoos & Permanent Makeup [Internet]. [zitiert 2014 Nov 13 ] Available from: [http://www.fda.gov/cosmetics/productsingredients/products/ucm107327.htm#Tattoos\\_Permanent\\_Makeup](http://www.fda.gov/cosmetics/productsingredients/products/ucm107327.htm#Tattoos_Permanent_Makeup)

- [195] Hayderi L El, Raty L, Failla V, Caucanas M, Paurobally D, Nikkels AF. Severe herpes simplex virus type-1 infections after dental procedures. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 2011; 16(1): e15–18.
- [196] Sarnoff DS. Treatment of Recurrent Herpes Labialis. *J. Drugs Dermatol. JDD* 2014; 13(9): 1016–1018.
- [197] Hyland PL, Coulter WA, Abu-Ruman I, Fulton CR, O'Neill HJ, Coyle PV, Lamey P-J. Asymptomatic shedding of HSV-1 in patients undergoing oral surgical procedures and attending for noninvasive treatment. *Oral Dis.* 2007; 13(4): 414–418.
- [198] Goodyear HM, Davies JA, McLeish P, Buchan A, Skinner GR, Winther M, Harper JI. Growth of herpes simplex type 1 on skin explants of atopic eczema. *Clin. Exp. Dermatol.* 1996; 21(3): 185–189.
- [199] Boguniewicz M, Leung DYM. Recent Insights into Atopic Dermatitis and Implications for Management of Infectious Complications. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125(1): 4.
- [200] Wollenberg A, Wetzel S, Burgdorf WHC, Haas J. Viral infections in atopic dermatitis: pathogenic aspects and clinical management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112(4): 667–674.
- [201] Peng WM, Jenneck C, Bussmann C, Bogdanow M, Hart J, Leung DYM, Bieber T, Eis-Hübinger A-M, Novak N. Risk factors of atopic dermatitis patients for eczema herpeticum. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127(5): 1261–1263.
- [202] Gibson JR, Klaber MR, Harvey SG, Tosti A, Jones D, Yeo JM. Prophylaxis against herpes labialis with acyclovir cream--a placebo-controlled study. *Dermatologica* 1986; 172(2): 104–107.
- [203] Schnitzler P, Reichling J. [Efficacy of plant products against herpetic infections.] [Internet]. Hno 2011; [zitiert 2011 Okt 31 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607799>
- [204] Schnitzler P, Nolkemper S, Stintzing FC, Reichling J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 2008; 15(1-2): 62–70.
- [205] Hernández-Corona A, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res.* 2002; 56(3): 279–285.
- [206] Huber MT, Wisner TW, Hegde NR, Goldsmith KA, Rauch DA, Roller RJ, Krummenacher C, Eisenberg RJ, Cohen GH, Johnson DC. Herpes simplex virus with highly reduced gD levels can efficiently enter and spread between human keratinocytes. *J. Virol.* 2001; 75(21): 10309–10318.
- [207] Bodsworth NJ, Bloch M, Bower M, Donnell D, Yocum R, International Panretin Gel KS Study Group. Phase III vehicle-controlled, multi-centered study of topical alitretinoin gel 0.1% in cutaneous AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2001; 2(2): 77–87.
- [208] Brulois KF, Chang H, Lee AS-Y, Ensser A, Wong L-Y, Toth Z, Lee SH, Lee H-R, Myoung J, Ganem D, Oh T-K, Kim JF, Gao S-J, Jung JU. Construction and manipulation of a new Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus bacterial artificial chromosome clone. *J. Virol.* 2012; 86(18): 9708–9720.

- [209] Hellenbrand W, Thierfelder W, Müller-Pebody B, Hamouda O, Breuer T. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 2005; 24(2): 131–135.
- [210] Mahy BWJ, Kangro HO. *Virology methods manual*. Academic Press, New York, 1996.
- [211] Killington RA, Stokes A, Hierholzer JC. 4 - Virus purification. In: Mahy BW, Kangro HO. *Virology Methods Manual*. Academic Press, London, 1996, 71–89.
- [212] Schmidtke M, Schnittler U, Jahn B, Dahse H, Stelzner A. A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and herpes simplex virus type 1. *J. Virol. Methods* 2001; 95(1-2): 133–143.
- [213] Safrin S, Phan L, Elbeik T. A comparative evaluation of three methods of antiviral susceptibility testing of clinical herpes simplex virus isolates. *Clin. Diagn. Virol.* 1995; 4(1): 81–91.
- [214] Souza TML, De Souza MCBV, Ferreira VF, Canuto CVBS, Marques IP, Fontes CFL, Frugulhetti ICPP. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. *Antiviral Res.* 2008; 77(1): 20–27.
- [215] Allaudeen HS, Descamps J, Sehgal RK. Mode of action of acyclovir triphosphate on herpesviral and cellular DNA polymerases. *Antiviral Res.* 1982; 2(3): 123–133.
- [216] Hung SL, Wang YH, Chen HW, Lee PL, Chen YT. Analysis of herpes simplex virus entering into cells of oral origin. *Virus Res.* 2002; 86(1-2): 59–69.
- [217] Donalisio M, Rusnati M, Cagno V, Civra A, Bugatti A, Giuliani A, Pirri G, Volante M, Papotti M, Landolfo S, Lembo D. Inhibition of human respiratory syncytial virus infectivity by a dendrimeric heparan sulfate-binding peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(10): 5278–5288.
- [218] Hayashi K, Hayashi T, Morita N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(9): 1890–1893.
- [219] Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 1971; 246(1): 174–181.
- [220] Macfarlane DE, Sommerville RG. VERO cells (*Cercopithecus aethiops* kidney)--growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. (Brief report). *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* 1969; 27(2): 379–385.
- [221] Daelemans D, Pauwels R, De Clercq E, Pannecouque C. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nat. Protoc.* 2011; 6(6): 925–933.
- [222] Wald A, Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- [223] Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. *J. Dermatol. Sci.* 2010; 57(2): 75–82.

- [224] Bidle KD. Elucidating marine virus ecology through a unified heartbeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111(44): 15606–15607.
- [225] Meltzer SM, Monk BJ, Tewari KS. Green tea catechins for treatment of external genital warts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009; 200(3): 233.e1–7.
- [226] Laurienzo P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar. Drugs* 2010; 8(9): 2435–2465.
- [227] McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 2007; 68(14): 2015–2022.
- [228] Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Twelfth Edition. 12 edition., McGraw-Hill Professional, New York, 2011.
- [229] Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(11): 14002–14015.
- [230] Stranska R, Schuurman R, Scholl DR, Jollick JA, Shaw CJ, Loef C, Polman M, van Loon AM. ELVIRA HSV, a Yield Reduction Assay for Rapid Herpes Simplex Virus Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(6): 2331–2333.
- [231] Gong Y, Matthews B, Cheung D, Tam T, Gadawski I, Leung D, Holan G, Raff J, Sacks S. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 2002; 55(2): 319–329.
- [232] Boulware SL, Bronstein JC, Nordby EC, Weber PC. Identification and characterization of a benzothioephene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. *Antiviral Res.* 2001; 51(2): 111–125.
- [233] Amit R, Morag A, Ravid Z, Hochman N, Ehrlich J, Zakay-Rones Z. Detection of herpes simplex virus in gingival tissue. *J. Periodontol.* 1992; 63(6): 502–506.
- [234] Porter SR, Mutlu S, Scully CM. Viral infections affecting periodontal health. *Periodontal Clin. Investig. Off. Publ. Northeast. Soc. Periodontists* 1993; 15(1): 17–24.
- [235] Morrison EE, Stevenson AJ, Wang YF, Meredith DM. Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 ( Pt 10):2517–2528.
- [236] Bultmann H, Teuton J, Brandt CR. Addition of a C-terminal cysteine improves the anti-herpes simplex virus activity of a peptide containing the human immunodeficiency virus type 1 TAT protein transduction domain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(5): 1596–1607.
- [237] La Boissiere S, Izeta A, Malcomber S, O'Hare P. Compartmentalization of VP16 in Cells Infected with Recombinant Herpes Simplex Virus Expressing VP16-Green Fluorescent Protein Fusion Proteins. *J. Virol.* 2004; 78(15): 8002–8014.
- [238] Yamauchi Y, Kiriya K, Kubota N, Kimura H, Usukura J, Nishiyama Y. The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 is required for efficient nuclear transport of the alpha transinducing factor VP16 and viral capsids. *J. Virol.* 2008; 82(3): 1094–1106.

- [239] Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011; 2011.
- [240] Marles RJ, Barrett ML, Barnes J, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, Mahady GB, Low Dog T, Sarma ND, Giancaspro GI, Sharaf M, Griffiths J. United States pharmacopeia safety evaluation of spirulina. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011; 51(7): 593–604.
- [241] Vere Hodge RA, Field HJ. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 2013; 671–38.
- [242] Kiken DA, Cohen DE. Contact dermatitis to botanical extracts. *Am. J. Contact Dermat. Off. J. Am. Contact Dermat. Soc.* 2002; 13(3): 148–152.
- [243] Kempf W, Lautenschläger S. *Medicos.* 2003.
- [244] De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2004; 30(2): 115–133.
- [245] Johnson GL, Limon L, Trikha G, Wall H. Acute renal failure and neurotoxicity following oral acyclovir. *Ann. Pharmacother.* 1994; 28(4): 460–463.
- [246] Ernst ME, Franey RJ. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann. Pharmacother.* 1998; 32(1): 111–113.
- [247] Sanna PP, De Logu A, Williamson RA, Hom YL, Straus SE, Bloom FE, Burton DR. Protection of nude mice by passive immunization with a type-common human recombinant monoclonal antibody against HSV. *Virology* 1996; 215(1): 101–106.
- [248] Logu AD, Williamson RA, Rozenshteyn R, Ramiro-Ibañez F, Simpson CD, Burton DR, Sanna PP. Characterization of a Type-Common Human Recombinant Monoclonal Antibody to Herpes Simplex Virus with High Therapeutic Potential. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11): 3198–3204.
- [249] Semple SJ, Reynolds GD, O'Leary MC, Flower RL. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 60(2): 163–172.
- [250] Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 65(1): 71–77.
- [251] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 65(6): 635–648.
- [252] Molin S, Ruzicka T. [Alitretinoin: a new treatment option for chronic refractory hand eczema]. *Hautarzt Z. Für Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* 2008; 59(9): 703–704, 706–709.
- [253] Sergerie Y, Boivin G. Evaluation of Susceptibility of Human Herpesvirus 8 to Antiviral Drugs by Quantitative Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(8): 3897–3900.
- [254] Rosello Sastre R, Posten C. Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chem. Ing. Tech.* 2010; 82(11): 1925–1939.
- [255] van Velzen M, van de Vijver DAMC, van Loenen FB, Osterhaus ADME, Remeijer L, Verjans GMGM. Acyclovir prophylaxis predisposes to antiviral-resistant recurrent herpetic keratitis. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(9): 1359–1365.

## 7.ANLAGEN

### 7.1. Anlage 1 – Schriftstücke zur klinischen Untersuchung

#### 7.1.1. Projektinformation Permanent Make-up Institute

### – Projektinformation –

Sehr geehrtes Institut, sehr geehrte Pigmentiererin,

Sie haben sich liebenswürdigerweise dazu bereit erklärt, mich bei diesem Projekt mit 4 oder mehr Kunden in Ihrem Institut im Rahmen meiner Doktorarbeit zu unterstützen. Hierfür bedanke ich mich recht herzlich!

Um die Projektdurchführung so angenehm und effizient wie möglich in Ihren Arbeitsablauf zu integrieren, finden Sie im Anhang alle wichtigen Informationen. Sollten Sie Fragen haben oder noch Unterlagen und Testprodukte benötigen, scheuen Sie sich bitte nicht, mich jederzeit zu kontaktieren unter:

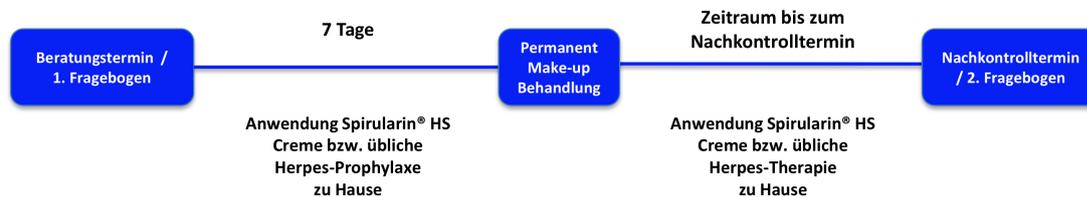
---

#### **Inhalt:**

Kurzinformation über das Projekt	2
Hintergrundinformationen	3
Präparat	4
Inhaltstoffe des Produktes gemäß INCI	5
Gesuchte Personen	5
Ablauf des Projektes	5
Datenschutz	8
Kontaktinformationen	8

## Kurzinformation über das Projekt

Die folgende Graphik zeigt Ihnen den Ablauf des Projektes auf einen Blick, um Sie schnell über das Wesentliche zu informieren.



Am ersten Tag, wenn Ihre Kundin mit dem Wunsch der Lippenpigmentierung zu Ihnen zur Beratung kommt, kann sie bei Interesse an dem Projekt teilnehmen, sofern sie bereits einmal in der Vergangenheit Lippenherpes hatte. Nach dem sie die Kundeninformation gelesen und die Datenschutzerklärung unterschrieben hat, füllt sie den 1. Fragebogen zur Erfassung der Vorgeschichte aus. Von diesem Tag bis zum Nachkontrolltermin wird sie zu Hause 2mal täglich morgens und abends dünn die Spirularin® HS Creme auf die Lippen auftragen. Die Kundinnen, die sich für die in Ihrem Institut übliche Herpes-Prophylaxe entschieden haben, verwenden diese nach Ihrer Empfehlung. Nach ca. 7 Tagen erfolgt die Permanent Make-up Behandlung in Ihrem Institut. Die Kundinnen, die die Spirularin® HS Creme verwenden, tragen diese wie gewohnt bis zum Nachkontrolltermin zu Hause auf. Die Kundinnen, die die übliche Herpes-Therapie verwenden, richten sich bitte nach Ihren Empfehlungen. Beim Nachkontrolltermin füllt Ihre Kundin den 2. Fragebogen zur Erfassung der Behandlung aus. Diesen verwahren Sie bitte mit dem anderen Fragebogen, der Checkliste sowie der unterschriebenen Datenschutzerklärung bis zum Ende des Projektes in Ihrem Institut auf.

Weiterführende Informationen zum Projekt und Produkt finden Sie nachfolgend in dieser Projektinformation.

## Hintergrundinformationen

Sie werden diese Problematik sicherlich kennen: eine Kundin wünscht sich von Ihnen ein Permanent Make-up an den Lippen. Das von Ihnen erzielte Ergebnis ist wunderschön geworden, aber in der Abheilungsphase bekommt die Kundin eine Herpes-Infektion mit unschönen, juckenden Bläschen. Von Nachteil ist nicht nur, dass diese Kundin neben der Abheilung des Permanent Make-ups nun noch eventuell Schmerzen und vor allem eine zusätzliche ästhetische Beeinträchtigung hat, die zwar vorübergehend ist, aber die Kundin von dem gewollten, schönen Ergebnis der Pigmentierung ablenkt. Des Weiteren kann das Verblässen der Farbe in den obersten Hautschichten ein viel größeres Problem darstellen, welches weitere zeit- und kostenintensiven Nachbehandlungen mit sich ziehen kann.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit führe ich nun ein Projekt durch, welches sich genau mit dieser Problematik befasst und Ihnen eine wirksame, innovative Alternative zu den herkömmlichen Herpes-Therapien bietet, um Ihnen und Ihren Kunden eine Permanent Make-up Behandlung mit einem deutlich reduzierten Herpesrisiko in Zukunft zu ermöglichen.

Ziel dieses Projektes soll es sein, die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Spirularin® HS Creme bei der Prophylaxe von Lippenherpes in Zusammenhang mit einer Permanent Make-up Behandlung im Bereich der Lippen zu bestätigen. Hierzu vergleiche ich die Spirularin® HS Creme mit der herkömmlichen Herpes-Prophylaxe und Therapie. Neben der Anwendung der Spirularin® HS Creme bzw. der Verwendung der herkömmlichen Herpes-Therapien werden mit Hilfe von 2 Fragebögen die ganz individuellen Erfahrungen Ihrer Kunden in Bezug auf eine mögliche Herpes-Infektion nach der Permanent Make-up Behandlung erfasst. Die Anwendung des Produktes ist für Ihre Kunden risikofrei, leicht anzuwenden und dient dazu, Ihren Kunden das perfekte Aussehen ohne bitteren Beigeschmack zu ermöglichen.

## **Präparat**

Das Produkt Spirularin® HS Creme der Firma Ocean Pharma GmbH in Reinbek ist eine kosmetische Pflegecreme zum Schutz von herpesempfindlichen Lippen, welche mit dem natürlichen Inhaltsstoff der Mikroalge Spirulina Platensis besonders bei herpesempfindlichen Lippen einen ausgeprägten Schutz bietet. Spirularin® HS Creme kann bereits prophylaktisch verwendet werden, um das Risiko einer Herpes-Infektion im Vorfeld zu minimieren. Sollten Ihre Kunden doch einmal einen Lippenherpes bekommen haben, so reduziert Spirularin® HS Creme die Dauer der Infektion und minimiert die unschöne Krustenbildung in der Abheilungsphase. Neben der Prophylaxe vor Herpes-Infektionen schützt die Spirularin® HS Creme die gesunden Zellen und beschleunigt die Zellregeneration. Die Wirkung des Spirulina Mikroalgen-Extraktes konnte bereits in experimentellen Studien nachgewiesen werden. Neben der antiviralen Wirkung des Spirulina Mikroalgen-Extraktes gegenüber Herpes-Simplex-Viren konnte eine antibakterielle Wirkung vor allem auf das Bakterium staphylococcus aureus (Staphylokokken), welches unter anderem für eine Superinfektion beim Lippenherpes verantwortlich ist, ebenfalls nachgewiesen werden.

Des Weiteren bietet die Spirularin® HS Creme einen hohen UV-Schutz (UVA & UVB) sowie pflegende Inhaltsstoffe, so dass Ihre Kunden immer gut geschützt und gepflegt durch den Alltag gehen können. Die Spirularin® HS Creme stellt mit diesen umfassenden Schutz- und Pflegeeigenschaften ein innovatives Produkt für herpesempfindliche Lippen dar. Bereits in kleineren Projekten im Rahmen von Permanent Make-up Behandlungen und Hyaluronsäure-Unterspritzungen konnte die Wirkweise der Spirularin® HS Creme gegen Lippenherpes bestätigt werden und die Teilnehmer gänzlich

überzeugen. Ein Teil Ihrer Kunden wird das Testprodukt Spirularin® HS Creme verwenden, dass folgende Inhaltsstoffe enthält:

### **Inhaltsstoffe des Produktes gemäß INCI:**

Aqua (gereinigtes Wasser), Carthamus Tinctorius Seed Oil\* (Distelöl), Ricinus Communis Seed Oil\* (Rizinusöl), Butyrospermum Parkii Butter (Sheabutter), Simmondsia Chinensis Seed Oil\* (Jojobaöl), Glycerin, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexylbenzoate, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, Ethylhexyl Triazone, Polyglyceryl-2-Dihydroxystearate, Spirulina Platensis Extract (Algenextrakt), Glycerol Oleate, Cera Flava\* (Bienenwachs), Zinc Sulfate (Zinksulfat), Alcohol, Tocopherol (Vitamin E), Helianthus Annuus Seed Oil\* (Sonnenblumenöl), Ascorbyl Palmitat (Vitamin C Palmitat), Glycerol Caprylate.

\* aus kontrolliert biologischem Anbau

### **Gesuchte Personen**

Wir suchen Personen, die mindestens einmal in ihrem Leben einen Lippenherpes hatten und nun beabsichtigen, eine Permanent Make-up Behandlung an den Lippen durchführen zu lassen.

### **Ablauf des Projektes**

Das Projekt wird im Rahmen der Permanent Make-up Behandlung mit 4 oder mehr Kunden in Ihrem Institut durchgeführt.

### **Erster Besuch im Permanent Make-up Institut (Fragebogentag):**

Am diesem Tag stellen Sie bitte Ihren Kunden das geplante Projekt vor, so fern diese eine Permanent Make-up Behandlung an den Lippen beabsichtigen. Zeigt Ihre Kundin Interesse an der Teilnahme an diesem Projekt, so erfragen Sie bitte, ob sie bereits in der Vergangenheit einmal einen Lippenherpes gehabt hat. Nur die Kunden können an dem Projekt teilnehmen, die mindestens einmal eine Herpes-Infektion im Bereich der Lippen hatten. Diese darf auch bereits längere Zeit zurück liegen. Trifft dies auf Ihre Kundin zu, so händigen Sie ihr bitte die Kundeninformation aus. Nachdem ihre Kundin diese Information eingehend gelesen hat und alle Fragen geklärt wurden, lassen Sie sie bitte die Erklärung zum Datenschutz unterschreiben und behalten dieses Exemplar in Ihrem Institut. Eine Kopie erhält die Kundin automatisch mit der Kundeninformation, die sie selbstverständlich mit nach Hause nehmen darf. Als nächstes bitten Sie Ihre Kundin, den ersten Fragebogen zur Erhebung der Vorgeschichte auszufüllen. Sie müssten bitte nur das Datum sowie das Kürzel für ihre Kundin, bestehend aus den jeweiligen Initialen, eintragen. Den ausgefüllten Fragebogen verwahren Sie bitte mit der unterschriebenen Datenschutzerklärung in Ihrem Institut bis zum Ende des Projektes. Nun müssten Sie

bitte in Absprache mit ihren Kunden noch festlegen, welche Kundin das Testprodukt Spirularin® HS Creme verwenden soll und welche die übliche prophylaktische Herpes-Therapie. Die Einteilung in die jeweilige Gruppe sollte immer abwechselnd erfolgen, so dass am Ende des Projektes 50% der Kunden das Testprodukt und 50% die herkömmliche Herpes-Therapie verwenden. Die Kundinnen, die die herkömmliche Therapie verwenden, wenden diese bitte wie gewohnt an und folgen Ihren Pflegeanweisungen. Die Kundinnen, die die Spirularin® HS Creme verwenden, tragen sie wie folgt auf: die Anwendung der Spirularin® HS Creme beginnt 7 Tage vor der Permanent Make-up Behandlung und wird fortwährend bis zum Nachkontrolltermin nach der Permanent Make-up Behandlung verwendet. Die Anwendung erfolgt 2mal täglich morgens und abends, wobei die Spirularin® HS Creme dünn auf die Lippen aufgetragen wird.

### **Zeitraum zwischen der Terminvereinbarung und der Permanent Make-up Behandlung (1 Woche):**

Das Testprodukt wird wie oben beschrieben verwendet. Sollten die Kundinnen ein Sonnenbad beabsichtigen, sollten Sie bitte 20 Minuten vorher die Lippen eincremen, da der UV-Schutz 20 Minuten nach dem Auftragen vollständig wirksam ist.

### **Durchführung der Permanent Make-up Behandlung:**

Heute erfolgt der Termin zur Permanent Make-up Behandlung. Das Testprodukt wird wie oben beschrieben verwendet. Neben dem Testprodukt sollen zur Nachbehandlung keine weiteren Produkte von den jeweiligen Kundinnen verwendet werden. Bitte prüfen Sie, ob ihre Kundin ausreichend Spirularin® HS Creme für die Anwendung zu Hause hat. Ansonsten geben Sie ihr bitte eine neue Tube mit.

Es muss zu jedem Zeitpunkt gewährleistet sein, dass die Kundin 2mal täglich über den vorgesehenen Zeitraum das Produkt verwenden kann. Die Kunden, die die herkömmliche Herpes-Therapie verwenden, werden von Ihnen entsprechend der in ihrem Institut üblichen Pflegeanleitung beraten.

### **Zeitraum zwischen der Permanent Make-up Behandlung und dem ersten Nachbehandlungstermin:**

Die Spirularin® HS Creme wird weiterhin wie oben beschrieben verwendet. Sollte die Kundin nach dem Permanent Make-up eine Herpes-Infektion an den Lippen bekommen haben, ist es sehr wichtig, dass sie die Spirularin® HS Creme vor allem auf den Herpes sowie auf die Lippen dünn aufträgt und Sonnenbäder meidet. Die Kundinnen, die die übliche Pflege und Therapie verwenden, folgen Ihren Pflegeanweisungen.

**Nachbehandlungstermin nach der Permanent Make-up Behandlung (Fragebogentag):**

An diesem Tag erfolgt der Nachbehandlungstermin in Ihrem Permanent Make-up Institut. Neben der Kontrolle des Pigmentierungsergebnisses füllen die Kundinnen bitte an diesem Tag den zweiten Fragebogen zur Behandlung aus. In diesem Fragebogen werden neben dem Verlauf der Behandlung und der Verwendung der vorbeugenden Pflege auch Fragen zu einer eventuellen Herpes-Infektion gestellt. Auch bei diesem Fragebogen müssten Sie bitte das Datum sowie die Initialen ihrer Kundin eintragen. Den ausgefüllten Fragebogen sammeln Sie bitte ein und verwahren ihn, bis Sie alle Fragebögen von Ihren Kunden vollständig haben.

Sollten die Termine von den vorgegebenen Projekttagen abweichen, achten Sie bitte darauf, dass die Kundinnen, die die Spirularin® HS Creme verwenden, 7 Tage vor der Behandlung mit der Anwendung beginnen und diese bis zum Nachkontrolltermin

2 mal täglich morgens und abends dünn anwenden. Verwendet die Kundin anstatt der Spirularin® HS Creme die übliche Herpes-Therapie zur Nachbehandlung, wird diese nach Ihren Empfehlungen angewendet. Wenn das Testprodukt Spirularin® HS Creme nicht über den gesamten Projektzeitraum ausreicht, geben Sie bitte den Kundinnen ausreichend von dem Produkt mit nach Hause. Es soll gewährleistet sein, dass die Kundinnen zu jedem Zeitpunkt der Projektteilnahme über ausreichend Spirularin® HS Creme zur Anwendung verfügen.

Wenn Sie alle Kundinnen (4 oder mehr) behandelt und die Fragebögen entsprechend bei der Nachkontrolle eingesammelt haben, schicken Sie mir bitte den frankierten Rückumschlag mit allen Fragebögen und unterschriebenen Datenschutzerklärungen an die angegebene Adresse zurück.

**Datenschutz**

Die im Rahmen dieses Projektes erhobenen persönlichen Daten der Kundinnen werden anonymisiert gespeichert und vertraulich behandelt. Sie werden zu keinem Zeitpunkt an Dritte weitergegeben. Bitte schreiben Sie auf die Fragebögen keinerlei Kundendaten oder -namen, sondern lediglich die jeweilige Kundennummer. Die Kundendaten, die Sie im Rahmen Ihrer Behandlungen in Ihrem Institut festhalten, unterliegen dem persönlichen Datenschutz und Ihren Unterlagen.

**Kontaktinformationen**

Für weitere Informationen, die mit diesem Projekt zusammen hängen, können Sie sich jederzeit an die Verantwortlichen des Projektes wenden. Wenn Sie Fragen zu dem Projekt oder dem Testprodukt haben, wenden Sie sich bitte jederzeit an mich, Frau Julia Mader.

**7.1.2. Fragebogen 1**

Kundennr \_\_\_\_\_ Institutsnr \_\_\_\_\_

**DATUM DES BESUCHS**\_\_ - \_\_ - 20\_\_  
DD MMM YY**DEMOGRAPHIE**

Kundeninitialen: \_\_ \_\_

Alter: \_\_ \_\_ Jahre

Geschlecht: \_ 1 männlich \_ 2 weiblich

**Vorgeschichte**

1.	Haben Sie bereits einmal Herpes labialis (Lippenherpes) gehabt?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
2.	Wenn ja, wie oft hatten Sie Herpes-Infektionen in den vergangenen 5 Jahren?	_____ mal		
3.	Leiden Sie unter Neurodermitis (Atopischer Dermatitis)?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Seit dem _____ Lebensjahr
4.	Haben Sie bereits eine Therapie gegen Lippenherpes erhalten?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Art der Behandlung (bitte Produktnamen & Therapiebeschreibung) _____ _____
5.	Haben Sie in der Vergangenheit bereits Permanent Make-up im Bereich der Lippen angewendet?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Häufigkeit _____ mal Jahr der letzten Anwendung _____
6.	Wenn ja, wurde dabei eine vorbeugende Behandlung gegen Lippenherpes eingesetzt?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Art der Behandlung (bitte Produktnamen & Therapiebeschreibung) _____ _____
7.	Kam es bei früheren Anwendungen von Permanent Make-up zu Herpes-Ausbrüchen?  - <b>mit</b> prophylaktischer Behandlung  - <b>ohne</b> prophylaktische Behandlung	Ja _____ _____	Nein _____ _____	
8.	Wenn ja, wie lange dauerte die letzte Herpes-Infektion?	_____ Tage		
9.	Heilte die letzte Herpes-Infektion mit einer Kruste ab?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
10.	Leiden Sie nach einem Permanent Make-up an trockenen Lippen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

**7.1.3. Fragebogen 2**

Kundennr \_\_\_\_\_ Institutsnr \_\_\_\_\_

**DATUM DES BESUCHS**
 \_\_ - \_\_ - 20\_\_ Kundeninitialen: \_\_  
 DD MMM YY
**BEHANDLUNG**

1.	Tragen Sie aktuell Permanent Make-up?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
2.	Wenn ja, vor wie vielen Tagen erfolgte das Permanent Make-up?	Vor _____ Tagen		
3.	Haben Sie eine vorbeugende Behandlung gegen Herpes labialis (Lippenherpes) angewandt?  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <input type="checkbox"/> Ja         <input type="checkbox"/> Nein       </div> <p style="text-align: center;">Art der Behandlung (bitte geben Sie den Produktnamen &amp; die Therapiebeschreibung an)</p> <p><b>A: Kosmetikprodukte zum Auftragen</b> (mit Aciclovir, Penciclovir, Docosanol- oder Foscarnet)</p> <hr/> <p><b>B: Virustatika zum Einnehmen</b> (mit Aciclovir, Valaciclovir, Fanciclovir, Foscarnet-Natrium)</p> <hr/> <p><b>C: Hausmittel</b> (Zahnpasta, Essig, Alkohole, ätherische Öle z.B. Teebaumöl, Melisse, Eukalyptus):</p> <hr/> <p><b>D: Sonstiges</b> (hier nicht aufgeführte Therapien)</p> <hr/> <p style="text-align: center;">(bitte geben Sie den Produktnamen &amp; die Therapiebeschreibung an)</p>			
4.	Haben Sie Spirularin® HS Creme vorbeugend angewandt?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Wenn Nein, bitte weiter mit Frage 11				
5.	Wenn ja, insgesamt mehr als 20 Tage?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
6.	Wie oft haben Sie Spirularin® HS Creme pro Tag durchschnittlich angewandt?	_____ mal täglich		

7.	Wie empfanden Sie Spirularin® HS Creme? 0 _____ 10 sehr unangenehm _____ sehr angenehm			
8.	Wenn Sie eine Eigenschaft als unangenehm empfunden haben, wie würden Sie diese beschreiben?	_____ _____		
9.	Würden Sie Spirularin® HS Creme wieder benutzen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Weiß nicht <input type="checkbox"/>
10.	Wenn ja, - im Zusammenhang mit einer Permanent Make-up Behandlung?  - unabhängig von einer Permanent Make-up Behandlung zur Vorbeugung / Behandlung von Lippenherpes?	Ja _____ _____	Nein _____ _____	Weiß nicht _____ _____
11.	Haben Sie nach der letzten Permanent Make-up Behandlung einen Lippenherpes bekommen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
12.	Wenn ja, wie lange dauerte die Herpes-Infektion?	_____ Tage		
13.	Heilte die letzte Herpes-Infektion mit einer Kruste ab?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
14.	Leiden Sie nach dem letzten Permanent Make-up an trockenen Lippen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

#### **7.1.4. Kundeninformation**

### **Projekt zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Spirularin® HS Creme bei der Prophylaxe von Lippenherpes nach Permanent Make-up**

Liebe Kundin,

Sie haben sich für ein Permanent Make-up im Bereich der Lippen entschieden. Wenn Sie bereits in der Vergangenheit einmal einen Lippenherpes hatten, ist das Risiko eines erneuten Lippenherpes nach einer Permanent Make-up Behandlung deutlich erhöht.

#### **Was kann Ihnen helfen, dieses Herpes-Risiko zu minimieren?**

Die Spirularin® HS Creme ist ein neues, bereits am Markt befindliches Kosmetikprodukt, welches mit seinem natürlichen Inhaltsstoff, dem Spirulina Mikroalgenextrakt, das Herpes-Risiko mindert. Wissenschaftliche Untersuchungen konnten den antiviralen Effekt des Spirulina Mikroalgenextrakt bereits bestätigen.

#### **Was ist das Ziel dieses Projektes?**

Ziel dieses Projektes ist es, den prophylaktischen Effekt dieser Lippenherpes-Creme auf eine Herpes-Infektion nach Permanent Make-up zu untersuchen. Im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Julia Mader (Universität Hamburg, Fachbereich Chemie / Kosmetikwissenschaft) wird die Wirkung der Spirularin® HS Creme bei Herpes empfindlichen Lippen nun ausschließlich bei Permanent Make-up Behandlungen in über 50 Permanent Make-up Instituten in ganz Deutschland untersucht.

#### **Wer kann an diesem Projekt teilnehmen?**

Wenn Sie eine Permanent Make-up Behandlung an den Lippen wünschen und in der Vergangenheit bereits einmal einen Lippenherpes hatten, sind Sie für die Teilnahme an diesem Projekt prädestiniert.

**Was kommt im Rahmen dieses Projektes auf Sie zu?**

Das Projekt umfasst zwei Fragebögen sowie die Anwendung des Testproduktes bzw. der in Ihrem Institut üblichen Herpes-Prophylaxe zu Hause.

Im Rahmen dieses Projektes haben Sie die Möglichkeit zu wählen, ob Sie die Spirularin® HS Creme als Herpes-Prophylaxe und als Pflege nach dem Permanent Make-up verwenden möchten oder die in Ihrem Institut üblicherweise angewendete Herpes-Prophylaxe und Therapie. Vor Beginn der Produktanwendung wird ein Fragebogen zur Erhebung Ihrer Vorgeschichte im Institut an Sie ausgeteilt.

Wenn Sie sich für die Verwendung der Spirularin® HS Creme entscheiden, verwenden Sie bitte ausschließlich die Spirularin® HS Creme 2mal täglich morgens und abends dünn bis zu Ihrem Nachkontrolltermin nach der Permanent Make-up Behandlung.

Sollten Sie sich für die übliche Herpes-Therapie entscheiden, verwenden Sie diese bitte nach Anweisung Ihrer Pigmentiererin.

Am Nachkontrolltermin wird Ihnen der 2. Fragebogen zur Erhebung der Behandlung ausgehändigt. Diesen geben Sie bitte ausgefüllt bei Ihrer Pigmentiererin ab.

**Was geschieht mit Ihren persönlichen Daten?**

Ihre im Rahmen dieses Projektes erhobenen persönlichen Daten werden pseudonymisiert gespeichert und vertraulich behandelt. Sie werden zu keinem Zeitpunkt an Dritte weitergegeben.

**Haben Sie weitere Fragen?**

Bei Fragen oder Unklarheiten wenden Sie sich bitte an das Personal Ihres Permanent Make-up Institutes bzw. an die Projektverantwortliche Frau Julia Mader unter der angegebenen Telefonnummer. Ihre Teilnahme an diesem Projekt ist vollkommen freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen beendet werden.

**7.1.5. Erklärung zum Datenschutz****Original zum Verbleib im Institut****Kunden-Nr.:** \_\_\_\_\_**Erklärung der Kunden zum Datenschutz**

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine persönlichen Daten, die in diesem Projekt im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Julia Mader erhoben werden, in anonymisierter Form gespeichert werden.

Name in Druckschrift (bitte leserlich): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Datum\_\_\_\_\_  
Unterschrift Kunde  
(Vor- und Nachname)

**7.2. Anlage 2 – Verzeichnis der verwendeten Abbildungen**

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus eines typischen Herpesvirions (HSV-1).</i>	2
<i>Abbildung 2: Herpes labialis Infektion.</i>	5
<i>Abbildung 3: Virale Glykoproteine von HSV-1 und essentielle zelluläre Rezeptoren bei der Virus-Zell Interaktion.</i>	6
<i>Abbildung 4: Schematischer Überblick über den Replikationszyklus von HSV-1.</i>	9
<i>Abbildung 5: kutanes Kaposi-Sarkom.</i>	11
<i>Abbildung 6: Röntgenaufnahme der Brust bei einem Patienten mit primärem Effusionslymphom.</i>	11
<i>Abbildung 7: Darstellung des Aufbaus eines Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirions (KSHV/HHV-8, 3-D Modell).</i>	12
<i>Abbildung 8: Strukturformel von Aciclovir (links) und Guanosin (rechts) im Vergleich.</i>	16
<i>Abbildung 9: Wirkmechanismus von Aciclovir bei HSV-1 Infektion.</i>	17
<i>Abbildung 10: Wirkmechanismus von Heparin bei HSV-1 Infektion.</i>	17
<i>Abbildung 11: S. platensis Trichome.</i>	21
<i>Abbildung 12: S. platensis nach der Ernte.</i>	21
<i>Abbildung 13: Aufbau der Haut.</i>	26
<i>Abbildung 14: Protokoll A – Prä-Anheftungs-Experiment.</i>	49
<i>Abbildung 15: Protokoll B – Post-Anheftungs-Experiment.</i>	49
<i>Abbildung 16: Ablauf des kosmetischen Projektes.</i>	63
<i>Abbildung 17: Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität.</i>	65
<i>Abbildung 18: Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME gegen HSV-1-Infektion in Vero-Zellen 2 Stunden vor der Infektion (PRA).</i>	66
<i>Abbildung 19: Antivirale Wirkung von Ca-SP und SPME gegen HSV-1-Infektion in HaCaT-Zellen 2 Stunden vor der Infektion (PRA).</i>	67
<i>Abbildung 20: Verifizierung der antiviralen Wirkung der verschiedenen Substanzen gemessen mittels qPCR-Analyse in Vero-Zellen.</i>	70

<i>Abbildung 21: Inhibierung der frühen Phase der HSV-1-Infektion in humanen Keratinozyten durch Ca-SP.</i>	72
<i>Abbildung 22: Inhibition der Virus-Anheftung durch Ca-SP in humanen Keratinozyten.</i>	74
<i>Abbildung 23: Blockierung der Virus-Anheftung durch Ca-SP und Heparin mittels VP16 Detektion.</i>	76
<i>Abbildung 24: Quantifizierung von VP16 in HSV-1 infizierten HaCaT-Zellen mittels FACS-Analyse.</i>	77
<i>Abbildung 25: Testung verschiedener Ca-SP Chargen auf ihre Wirkungsstabilität.</i>	79
<i>Abbildung 26: Bestimmung der antiviralen Wirkung von Ca-SP mittels Virus yield-Reduktionsmethode.</i>	80
<i>Abbildung 27: Stabile Wirkung von Ca-SP unter Zugabe von SPME.</i>	82
<i>Abbildung 28: Verwendung der jeweiligen Herpes labialis-Prophylaxe und -Therapie im Rahmen der PMU-Behandlung.</i>	84
<i>Abbildung 29: Herpes labialis-Reaktivierung nach PMU-Behandlung bei Verwendung der topischen Formulierung im Vergleich zur herkömmlichen topischen oder systemischen Prophylaxe und Therapie.</i>	87
<i>Abbildung 30: Abheilung des Herpes-Rezidivs mit einer Kruste.</i>	88
<i>Abbildung 31: Trockene Lippen nach der Abheilung des Herpes-Rezidivs unter Verwendung der verschiedenen topischen und systemischen Therapien im Vergleich zur topischen Formulierung.</i>	89
<i>Abbildung 32: Zufriedenheit der Probanden - Beurteilung der topischen Formulierung.</i>	90
<i>Abbildung 33: Beurteilung einer erneuten Verwendung der topischen Formulierung (SPME+Ca-SP).</i>	91
<i>Abbildung 34: Einfluss der Substanzen und Lösemittel auf die Zellviabilität von RPE-1-Zellen.</i>	93
<i>Abbildung 35: KSHV/HHV-8-Inhibierung durch Ca-SP im Vergleich zu Foscarnet.</i>	94
<i>Abbildung 36: Bestätigung der antiviralen Wirksamkeit von Ca-SP gegen KSHV/HHV-8 im Vergleich zu Foscarnet detektiert mittels qPCR..</i>	95
<i>Abbildung 37: Quantifizierung von ORF45 in KSHV/HHV-8 infizierten RPE-1-Zellen mittels FACS-Analyse.</i>	97

**7.3. Anlage 3 – Verzeichnis der eingesetzten Tabellen**

<i>Tabelle 1: Bekannte Bestandteile von Ca-SP in %.</i>	23
<i>Tabelle 2: Zelllinien.</i>	31
<i>Tabelle 3: Viren.</i>	32
<i>Tabelle 4: Antibiotika.</i>	32
<i>Tabelle 5: Primer-Sequenzen.</i>	32
<i>Tabelle 6: verwendete Primärantikörper.</i>	33
<i>Tabelle 7: verwendete Sekundärantikörper.</i>	33
<i>Tabelle 8: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen.</i>	45
<i>Tabelle 9: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen (2 x IC<sub>50</sub>).</i>	47
<i>Tabelle 10: Übersicht über die Konzentrationen der Kombination SPME und Ca-SP bei der Testung eines möglichen synergistischen Effektes von SPME auf Ca-SP.</i>	52
<i>Tabelle 11: PCR-Programm für die DreamTaq Green DNA Polymerase.</i>	53
<i>Tabelle 12: qPCR-Programm für den SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix.</i>	54
<i>Tabelle 13: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen in der IF.</i>	57
<i>Tabelle 14: Übersicht über die Konzentrationen der verwendeten Substanzen in der FACS- Analyse.</i>	59
<i>Tabelle 15: Übersicht über die IC<sub>50</sub>-Werte gemessen in Vero- und HaCaT-Zellen mittels PRA und qPCR.</i>	71
<i>Tabelle 16: Basis-Charakteristika des Probandenkollektivs der klinischen Untersuchung.</i>	85
<i>Tabelle 17: Zusammenstellung der genutzten Gefahrenstoffe.</i>	150

## 7.4. Anlage 4 – Zusammenstellung der genutzten Gefahrenstoffe

Tabelle 17: Zusammenstellung der genutzten Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	H 301-310-330-315-318-410	P 26-36+37+39-45-61
Acrylamid	T	H 350-340-361f-301-372-332-312-319-315-317	P 201-280-301+310-305+351+338-308+313
Ammoniumpersulfat	O, Xn	H 272-302-315-319-335-334-317	P 280-305+351+338-302+352-304+341-342+311
Ampicillin	T	H 315-317-319-334-335	P 261-280-305+351+338-342+311
Bisacrylamid	Xn	H 302	P 264-301+312-330
Borsäure	Xn	H 360FD	P 201-308+313
CellTiter96 AQueous Solution (MTS)	Xi	H 315-319-335	-
Chloramphenicol	T	H 350	P 201-308+313
Dimethylsulfoxid	Xi	-	-
Draq5	Xi	H 315- 319- 335	P 280-264-305+351+338-312-332+313-362
EDTA	Xi	H 319	P 305+351+338
Essigsäure	F, C	H 226-314	P 280-301+330+331-307+310-305+351+338
Ethanol	F	H 225	P 210
Ethidiumbromid	T+	H 341-330-302	P 281-302+352-305+351+338-304+340-309-310
flüssiger Stickstoff	-	H 281	P 282-336+315-403
Isopropanol	F, Xi	H 225-319-336	P 210-233-305+351+338
Methanol	F, T	H 225-331-311-301-370	P 210-233-280-302+352
Natriumdodecylsulfat	F, Xn	H 228-311-302-335-315-319	P 210-280-304+340-305+351+338-309+310
Natriumhydroxid	C	H 314-290	P 280-301+330+331-309+310-305+351+338

<b>Paraformaldehyd</b>	F, Xn, Xi	H 228-302-332-351-335-315-319-317	P 281-302+352-305+351+338-308+313-304+340
<b>Penicillin</b>	Xi	H 317	P 280
<b>Salzsäure</b>	C, Xi	H 290-314-335	P 234-260-304+340-303+361+353-305+351+338-309+311-501
<b>Streptomycin</b>	Xi	H 302	-
<b>Tris</b>	Xi	H 315-319-335	P 261-305+351+338
<b>Triton-X-100</b>	Xi, C	H 318-302	P 262-305+351+338-313

## 7.5. Poster, Vorträge und Publikation

### Poster

- J. Mader, A. Gallo, K. Reich, W. Brune;  
**Antiviral activity of Spirulina platensis extract against HSV-1 and KSHV.**  
Evaluation Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für experimentelle Virologie,  
Hamburg, November 2013
- Julia Mader, Antonio Gallo, Tim Schommartz, Wiebke Handke, Claus-Henning Nagel,  
Patrick Günther, Wolfram Brune, Kristian Reich;  
**The *Spirulina platensis* Derived Polysaccharide Calcium Spirulan Inhibits HSV-1  
Attachment to Human Keratinocytes and Protects Against Herpes labialis when applied  
as topical therapy.**  
Jahrestagung des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF), Braunschweig,  
November 2014

### Vorträge

- Julia Mader  
**The *Spirulina platensis* derived Polysaccharide Calcium Spirulan inhibits  
HSV-1 infection of human keratinocytes and has prophylactic effects against herpes  
labialis.**  
3rd young scientist retreat, HPI PhD student and Postdoc Retreat, Hamburg,  
Oktober 2014
- Julia Mader  
**Calcium Spirulan derived from *Spirulina platensis* inhibits HSV-1 attachment to human  
keratinocytes and protects against herpes labialis.**  
Leibniz Wirkstofftage / Leibniz Meeting on Bioactive Compounds, Hamburg  
April 2015

### Publikation

- Julia Mader, Antonio Gallo, Tim Schommartz, Wiebke Handke, Claus-Henning Nagel,  
Patrick Günther, Wolfram Brune and Kristian Reich  
**Calcium Spirulan Derived from *Spirulina platensis* Inhibits HSV-1 Attachment to  
Human Keratinocytes and Protects against Herpes labialis.**  
akzeptiert zur Publikation bei J Allergy Clin Immunol., Juli 2015

## **7.6. Persönliche Informationen**

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## 7.7. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Kristian Reich möchte ich mich herzlichst für die Bereitstellung des Forschungsthemas sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, sein großes Interesse am Fortgang der Forschung sowie seine tatkräftige Unterstützung bezüglich der Überwindung von Hindernissen und die hervorragende Betreuung bedanken.

Gleichfalls gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Wolfram Brune für die überaus freundliche Aufnahme am Heinrich-Pette-Institut (HPI), Leibniz Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg und für die ausgezeichnete fachwissenschaftliche Betreuung während meiner Forschungsarbeit sowie für die umfassende Bereitstellung der erforderlichen Laborressourcen.

Ich möchte ausserdem Herrn Dr. rer. nat. Antonio Gallo vom HPI für die stets geduldige und beharrliche Betreuung sowie meinen ehemaligen KollegInnen für die Aufnahme im Labor und das gute Arbeitsklima sowie für all das Interesse gegenüber meiner Arbeit und die fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen danken. Ich habe mich bei euch sehr wohl gefühlt.

Des Weiteren möchte ich Patrick Günther und seinem Team für die Unterstützung und die aufmunternden Worte, die immer zum richtigen Zeitpunkt kamen, herzlichst danken.

Mein besonderer Dank von Herzen gilt meinen Eltern und Philipp. Ohne eure Geduld, grenzenlose Hilfe und Unterstützung sowie eure Liebe wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Abschließend danke ich Frau Dr. rer. nat. Eva Krause und Frau Dr. rer. nat. Wiebke Handke für ihre Zeit und Mühe, die sie in die Korrektur meiner Arbeit investiert haben. Danke an all meine Freunde für die letzten Jahre.

## 7.8. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Julia Heike Mader, geboren am 13.03.1980 in Detmold, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel: „Experimentelle und klinische Untersuchung zu antiviralen Effekten eines Spirulina Mikroalgen-Extrakts und dem daraus isolierten Polysaccharid Calcium Spirulan - Eine mögliche neue prophylaktische Therapie bei Herpes labialis“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht oder veröffentlicht wurde.

Hamburg, Juli 2015



---

Julia Mader