

**Antivirale *in vitro* Wirksamkeit verschiedener Senföle aus der
Behandlung von akuten, entzündlichen Erkrankungen der Atemwege
auf die Vermehrung von humanpathogenen, respiratorischen Viren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lenz-Nebeling, Eva Ulrike, geb. Lenz
aus Gießen

Gießen, 2021

**Antivirale *in vitro* Wirksamkeit verschiedener Senföle aus der
Behandlung von akuten, entzündlichen Erkrankungen der Atemwege
auf die Vermehrung von humanpathogenen, respiratorischen Viren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lenz-Nebeling, Eva Ulrike, geb. Lenz
aus Gießen

Gießen, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Medizinische Virologie

Gutachter: Prof. Dr. Pleschka

Gutachterin: Prof. Dr. Herold, Ph.D

Tag der Disputation: 28.02.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Respiratorische Infektionen	1
1.2	Influzaviren	1
1.2.1	Das Influzavirus.....	1
1.2.2	Struktur und Morphologie des Influzenza A Virus.....	3
1.2.3	Der Replikationszyklus des Influzenza A Virus	5
1.2.4	Antivirale Strategien gegen Influzaviren.....	7
1.3	Rhinoviren	10
1.3.1	Das Rhinovirus	10
1.3.2	Struktur und Morphologie des HRV	11
1.3.3	Der Replikationszyklus der Rhinoviren	11
1.4	Coronaviren	13
1.4.1	Das Coronavirus	13
1.4.2	Struktur und Morphologie des Coronavirus	15
1.4.3	Der Replikationszyklus von Coronaviren	16
1.5	Antibiotikaeinsatz bei der Behandlung von respiratorischen Infekten.....	18
1.6	Pflanzliche Arzneimittel zur Behandlung viraler Infekte	20
1.6.1	Senföle – Isothiocyanate (ITCs).....	21
1.6.2	Angocin ® Anti-Infekt N	25
1.7	Zielsetzung.....	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Reagenzien und Chemikalien.....	29
2.1.3	Medien und Medienbestandteile	30

Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Isothiocyanate.....	30
2.1.5	Puffer und Lösungen	30
2.1.6	Zellkulturmedien	32
2.1.7	Zelllinien	32
2.1.8	Virusstämme.....	33
2.1.9	Antikörper	34
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Zellkultur.....	35
2.2.2	Virustiterbestimmung.....	37
2.2.3	Antivirale Testung.....	39
2.2.4	Software-Programme und Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Testung der antiviralen Wirksamkeit der einzelnen Isothiocyanate gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/01/09 (H1N1pdm09)	44
3.1.1	Testung der Zytotoxizität der einzelnen ITCs und des LM auf MDCK-II und A549 Zellen	44
3.1.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit der einzelnen Senföle gegen das Influenzavirus A/Hamburg/01/09 [H1N1pdm09] auf MDCK-II und A549 Zellen	47
3.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/01/09 [H1N1pdm09]	53
3.2.1	Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf MDCK-II und A549 Zellen	53
3.2.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung von H1N1pdm09	55
3.3	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen das humane Coronavirus HCoV-229E	57
3.3.1	Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf HuH7 Zellen	57

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung des HCoV-229E.....	59
3.4	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen die humanen Rhinoviren HRV1A und HRV16	62
3.4.1	Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf HeLa Ohio Zellen	62
3.4.2	Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung des HRV1A und des HRV16.....	64
3.5	Untersuchungen zum Angriffspunkt des Substanzgemischs im Vermehrungszyklus von H1N1pdm09	67
3.5.1	Zugabe von LM/SG zu unterschiedlichen Zeitpunkten der H1N1pdm09-Infektion.....	67
3.5.2	Hämagglutinations-Inhibitions-Assay (HAI-Assay).....	76
3.5.3	Effekt von LM/SG auf die Bildung des viralen NP	79
4.	Diskussion	82
4.1	Die einzelnen Senföle sind in der Lage konzentrationsabhängig den infektiösen Virustiter sowie die Gesamtmenge der Viruspartikel nach Infektion mit dem H1N1pdm09 unterschiedlich stark zu hemmen.....	83
4.2	Im Vergleich zu den einzeln verwendeten ITCs führt die Kombination der Senföle (als SG) zu einer stärkeren Reduktion des H1N1pdm09-Titers.....	84
4.3	Die hemmende Wirkung der ITCs scheint bezogen auf H1N1pdm09 nicht zell- oder wirtsspezifisch zu sein.....	84
4.4	Das Substanzgemisch hat keinen Einfluss auf die Adsorption/ den Eintritt des IAV in die Zelle.....	85
4.5	Die intra-zelluläre NP Produktion von H1N1pdm09 wird gehemmt	85
4.6	Permanente Anwesenheit des SG vor, während und nach der Infektion führt zur stärksten Hemmung der intra-zelluläre H1N1pdm09 Vermehrung	86
4.7	Das SG hemmt den infektiösen Virustiter von HRV, nicht aber von HCoV ...	87
5.	Zusammenfassung	90
6.	Summary	92

Inhaltsverzeichnis

7.	Abkürzungsverzeichnis	93
8.	Abbildungsverzeichnis	96
9.	Tabellenverzeichnis.....	98
10.	Literaturverzeichnis.....	100
11.	Publikationsverzeichnis.....	111
12.	Ehrenwörtliche Erklärung	112
13.	Danksagung.....	113

1. Einleitung

1.1 Respiratorische Infektionen

Erwachsene erkranken im Schnitt ca. 2-3mal im Jahr und Kinder sogar doppelt so häufig an grippalen Infekten. Als Auslöser spielen virale Erreger eine übergeordnete Rolle (33). Zu den über 200 mit Erkältungserkrankungen im Kontext stehenden Virussubtypen gehören Rhinoviren (20-30% geschätzte Häufigkeit), „normale“ Coronaviren (OC43, HCoV-229E u.a., 10-15% geschätzte Häufigkeit) und Influenzaviren (5-15% geschätzte Häufigkeit). Eine eher untergeordnete Rolle spielen dabei Parainfluenzaviren, Adenoviren, Enteroviren oder das „*Respiratory Syncytical Virus*“ (33, 82). Die Inkubationszeit von respiratorischen Infektionen beträgt in der Regel 24-72 Stunden; die Erkrankung ist meist selbstlimitierend und dauert im Schnitt ca. 4-10 Tage. Rhinitiden, Pharyngitiden, Husten, Heiserkeit, Konjunktivitiden, allgemeine Schwäche und Abgeschlagenheit gehören zu den häufigeren Symptomen (82). Je nach Immunstatus und Vorerkrankung kann es zu schwereren Verläufen und Komplikationen kommen. Ko-Infektionen von Corona-, Influenza- und Rhinoviren treten häufig auf und erschweren das Krankheitsbild (166). So konnte in einer 2018 veröffentlichten Studie aus China eine Ko-Infektion bei 47,2% von 489 mit Coronavirus infizierten und hospitalisierten Kindern mit Rhinovirus (5,6%) und Influenza A Virus (21,6%) nachgewiesen werden (164).

1.2 Influenzaviren

1.2.1 Das Influenzavirus

Influenzaviren (IV) gehören zu der Familie der *Orthomyxoviridae*. Letztere können in 7 Genera unterteilt werden: das Influenza A Virus (IAV), das Influenza B Virus (IBV), das Influenza C Virus (ICV), das Influenza D Virus (IDV), das Thogotovirus, das Isavirus (ISAV) und das Quaranfilvirus.

Alle human pathogenen IAV sind aviären Ursprungs und können gelegentlich auf andere Vögel oder Säuger übertragen werden – beispielsweise auf Menschen, marine Säuger, Schweine oder Pferde – und dabei zu Zoonosen führen (156).

Bei den durch IV verursachten Infektionen des Menschen haben nur das IAV und das IBV klinische Relevanz. ICV führen hingegen zu eher milden Verläufen (25, 35). IDV

Einleitung

infizieren hauptsächlich Schweine und Rinder (133). Die Übertragung von IV erfolgt über Tröpfcheninfektion und reicht je nach Virulenz und Immunität des Wirts von milderen Infektionen der oberen Atemwege bis hin zur schweren Pneumonien. Da sich die Mehrheit ihrer Zielrezeptoren im oberen Respirationstrakt befindet, kommt es auch dort vermehrt zu Infektionen und Symptomen. Charakteristisch für eine Infektion mit IAV ist das nach einer Inkubationszeit von ca. 48-72 Stunden einsetzende, hohe Fieber mit Temperaturen bis 40°C sowie respiratorische und systemische Symptome wie Husten, Schnupfen, Kopf- und Gliederschmerzen (43). In der Regel klingen die Symptome nach einigen Tagen, spätestens nach 2 Wochen wieder ab (126).

Anhand der unterschiedlichen Antigenität der IAV-Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase ((NA), s.a. 1.2.2.) können aviäre IAV in 16 HA- und 9 NA-Subtypen unterteilt werden (32). Aufgrund des segmentierten Genoms von IAV, IBV, ICV und IDV können diese bei Ko-infektionen ihre Genomsegmente und damit ihre genetischen Informationen untereinander austauschen (*Reassortment*) (32). So kann es beim Befall einer Wirtszelle mit zwei unterschiedlichen IAV-Subtypen zur Neukombination von HA- und NA-Antigenen und somit wiederum zur Entstehung von IAV-Subtypen mit neuen Antigeneigenschaften kommen. Dieser Vorgang wird als *Antigen Shift* bezeichnet und spielt bei der Entstehung der im Zeitraum von ca. 10-20 Jahren rezidivierenden Influenzapandemien eine tragende Rolle (58, 88), da die neue Antigenvariante dem Immunsystem der menschlichen Bevölkerung völlig unbekannt ist. Die bisher aufgetretenen Influenza-Pandemien wurden ausschließlich durch IAV verursacht (32, 88). Da die Viruspolymerase der IV eine sehr hohe Fehlerrate aufweist, kann es während der Replikation zu Punktmutationen im Genom und damit auch zur Veränderung der Aminosäuresequenz kommen. Dieser Vorgang kann ebenfalls zur Entstehung neuer Subtypen mit veränderten (antigenen) Eigenschaften führen, Epidemien auslösen und wird als *Antigen Drift* bezeichnet (148). Dabei können die Veränderungen so stark sein, dass innerhalb eines Jahres IV mit neuen (antigenen) Eigenschaften entstehen können (115).

Die in der Vergangenheit aufgetretenen Epidemien und Pandemien wie die „Spanische Grippe“, 1918, die „Asiatische Grippe“, 1957, die „Hong Kong Grippe“, 1968 und die „Mexikogrippe“ („Schweinegrippe“), 2009 sind u.a. durch diese Mechanismen zustande gekommen (88). Auch die Notwendigkeit der jährlichen Grippeschutzimpfung ist hierauf zurückzuführen. In der Grippewelle des Jahres 2011 wurden mit insgesamt 334.750

Einleitung

labordiagnostisch bestätigten Fällen, die meisten infizierten Personen seit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes, gemeldet (13, 90).

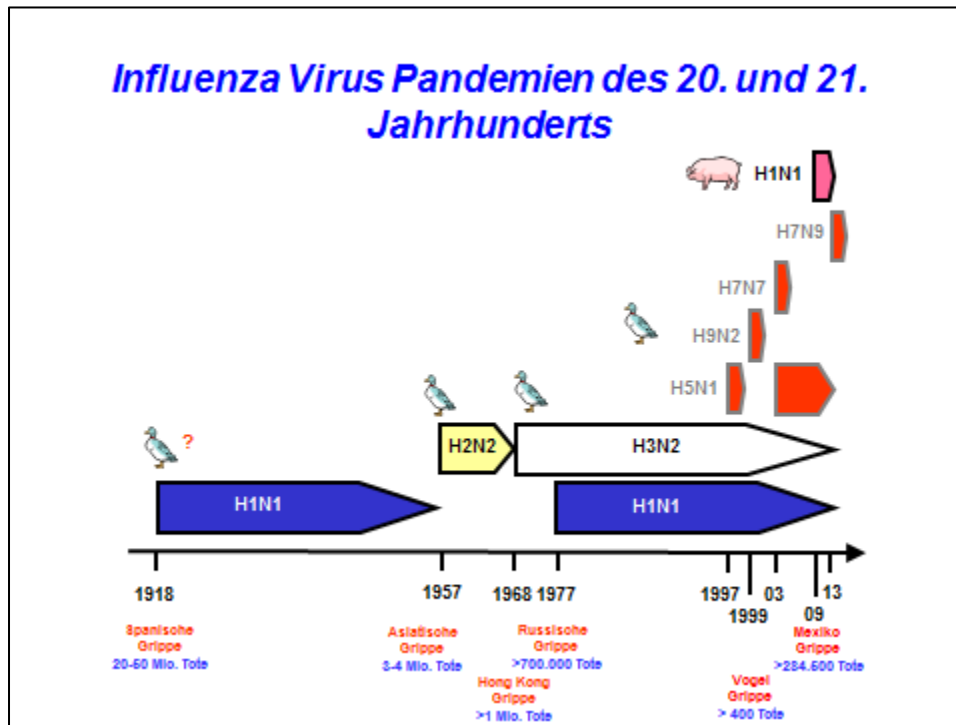


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Influenza Pandemien des 20. und 21. Jahrhunderts. Durch den Austausch von Genomsegmenten untereinander, kann es bei Befall zweier IAV-Subtypen in einer Wirtszelle zur Entstehung neuer Subtypen kommen (*Antigen Shift*), welche vom Vogel auf den Menschen übertragen werden können und dadurch Pandemien auslösen können (88, 148). Grau-umrandet: sporadische direkt Übertragungen von Vogelviren auf den Menschen; Abbildung wurde von Prof. Dr. S. Pleschka erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt und modifiziert.

1.2.2 Struktur und Morphologie des Influenza A Virus

IAV haben eine komplexe Struktur. Sie sind Einzelstrang-RNA-Viren mit linear segmentiertem, negativ orientiertem Genom und replizieren im Kern der Wirtszelle (32, 141). Die Viruspartikel sind mit einer von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran umhüllt, können eine ellipsoide, sphärische oder auch filamentöse Form haben und eine Größenvarianz von 80-120µm aufweisen. Sie enthalten insgesamt 8 Einzelstrang-RNA-Segmente, die für mind. 10 virale Proteine kodieren: PB1, PB2, PA, NP, HA, NA, M1, M2, NS1 und NS2/NEP (32, 59, 156).

In die Lipidhülle des Viruspartikels eingebettet findet sich das als trimere Komplex vorliegende Hämagglutinin (HA), die in aktiver Form als Homotetramer vorliegende

Einleitung

Neuraminidase (NA) sowie das ebenfalls als Homotetramer vorliegende Matrix Protein 2 (M2) (110, 128)

Das HA vermittelt zum einen die Adsorption des Viruspartikels an die Rezeptordeterminante N-Acetyl-Neuraminsäure auf der Oberfläche von Wirtszellen und zum anderen die Fusion der Virushülle mit Zellmembranen, damit das virale Genom in die Zelle gelangt (131). Hierfür muss das Vorläufer-HA (HA₀) post-translational proteolytisch in seine beiden Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten werden (135). Der neue N-Terminus des HA₂ beinhaltet das Fusionspeptid, welches zur Membranfusion benötigt wird (122). NA kann in seiner Enzymfunktion Neuraminsäurereste von Kohlenhydraten spalten und gewährleistet damit die Freisetzung neugebildeter Viruspartikel, die noch an den Rezeptoren auf der Zelloberfläche der infizierten Zellen gebunden sind (88). HA und NA bilden zusammen die charakteristische stachelähnliche Oberfläche des IAV (148).

Das Matrixprotein M1 befindet sich unterhalb der Lipidmembran des Viruspartikels und ist in dieser verankert. Es formt dort eine Matrixschicht, trägt so zum Strukturerehalt des Virus bei (56, 74, 88) und interagiert mit anderen viralen Proteinen und Hüllproteinen (56). Seine vollständige Funktionsweise ist noch Bestandteil aktueller Forschung (74). Das als Ionenkanal funktionierende M2 ist für die Freisetzung der Genomsegmente (RNPs, s.u.) aus dem Viruspartikel in das Zytoplasma zuständig (110).

Die basischen Polymeraseproteine 1 (*polymerase basic 1*, PB1), 2 (*polymerase basic 2*, PB2) und das saure Polymeraseprotein (*polymerase acid*, PA) bilden die drei Untereinheiten der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Zusammen mit den einzelnen viralen Genomsegmenten (vRNA) und dem Nukleoprotein (NP) bilden sie die Ribonukleinproteinkomplexe (RNPs) (32, 88). NP spielt eine zentrale Rolle bei der Virusreplikation und ist das nachweislich am meisten vorkommende virale Protein in infizierten Zellen (26). Neben seiner Rolle bei der Organisation der vRNA-Verpackung, vermittelt es als Bestandteil des RNPs mit Hilfe seiner Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) und seines Kernexportsignals (*nuclear export signal* NES) den bidirektionalen Transport der RNPs zwischen Kern und Zytoplasma (26, 59, 97).

Die beiden Nichtstrukturproteine 1 (NS1) und 2 (NS2/NEP) sind auf dem NS Gen kodiert. Während das NS1 Protein nur in infizierten Zellen zu finden ist und dort zur Unterdrückung der Immunantwort führt, spielt das NS2 Protein eine große Rolle bei der Freisetzung der viralen RNPs aus dem Kern in das Zytoplasma der Zelle und wird deshalb auch als nukleäres Export-Protein (NEP) bezeichnet (88).

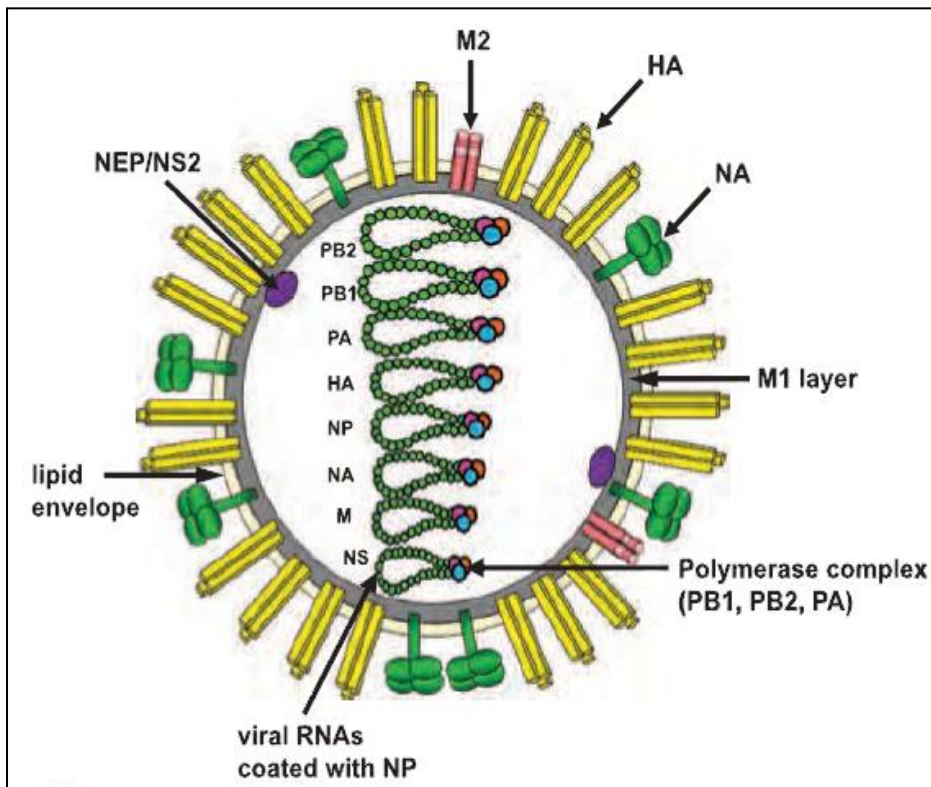


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza A Virus. Die 8 negativ polarisierten Einzelstrang RNS Segmente (ss(-)RNS Segmente) des IAV kodieren für mindestens 10 Proteine. Das Hämagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und das Matrix Protein 1 (M1) sind Bestandteile der von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran. Das nukleäre Exportprotein (NEP) wird auch als Nichtstrukturprotein 2 (NS2) bezeichnet. Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) findet man nur in infizierten Zellen. PA, PB1, PB2 sind die Polymeraseeinheiten und bilden zusammen mit dem Nukleoprotein (NP) und der viralen RNA (vRNA) den Ribonukleoproteinkomplex (RNP). (Abbildung modifiziert nach Fields Virology, 2013, Chapter 20, Orthomyxoviridae, S. 1153.).

1.2.3 Der Replikationszyklus des Influenza A Virus

Die Adsorption der IAV an die Zelle und die anschließende Penetration erfolgt HA-vermittelt (72). So binden sich die Viren durch das HA an Sialinsäure-haltige Rezeptoren auf der Wirtszelle (32). Aviäre IAV bevorzugen Sialinsäurereste, die über eine α 2,3-Bindung mit Galaktoseresten von Oberflächenproteinen auf der Zielzelle verknüpft sind, humane IAV bevorzugen Sialinsäurereste, die über eine α 2,6-Bindung mit Galaktoseresten verknüpft sind (148). Durch rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt die Aufnahme des Virus in Vesikeln in die Wirtszelle. Anschließend kommt es zur zellulär gesteuerten Ansäuerung des so entstandenen endosomalen Vesikels. Dies hat zur Folge, dass (i) sich die Konformation des HAs so ändert, dass sich das Fusionspeptid des HA₂ in die Vesikelmembran einlagert und die Membranfusion auslöst und dass (ii) Protonen dem Gradienten folgend durch den Kanal des M2 in das Viruspartikel einwandern. Die

Einleitung

RNPs lösen sich vom M1 und können später ins Zytoplasma entlassen werden (88, 131). ATP-abhängig werden die RNPs dann aktiv aus dem Zytoplasma durch die Kernporen in den Zellkern transportiert (88).

Dort wird zunächst mit Hilfe des aus PB1, PB2 und PA bestehenden Polymerasekomplexes, der die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) bildet, die negativ-orientierte Virus RNA (vRNA) in eine positiv-orientierte messenger RNA (mRNA) transkribiert. Die vRNA dient nicht nur als Vorlage zur Entstehung einer mRNA sondern auch als Vorlage einer weiteren RNA Spezies: der komplementären RNA (cRNA) (72). Die cRNA, eine komplette Gegenstrang-Kopie der vRNA, dient nun wiederum als Matrize für neue vRNA Tochterstränge (148).

Da die virale RdRp die Transkription nicht selbstständig initiieren kann, haben Orthomyxoviren einen Mechanismus entwickelt, der es ihnen ermöglicht kurze mRNA-Stücke mit 5'CAP Strukturen von zellulären mRNA Molekülen abzuspalten und als „Primer“ zu nutzen (88) und so die Transkription zu starten. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Bindung des PB2 an die CAP-Struktur der zellulären mRNA und die Endonukleaseaktivität des PA. Dieser Vorgang wird als „*cap snatching*“ bezeichnet und hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Transkription sowie Translation zellulärer mRNAs gehemmt wird und sich der Stoffwechsel des Wirtes komplett auf die Produktion der viralen Proteine umstellt (88, 148). Die neu entstandenen mRNA-Stränge werden in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert und dort in Proteine translatiert (88). Die Translation von NP, PB1, PB2 und PA erfolgt an freien Polysomen (72). Die dabei neu entstandenen Proteine lagern sich nach Rücktransport in den Zellkern zusammen mit neugebildeter vRNA zu neuen RNPs zusammen, bilden mit M1 und NS2/NEP einen Komplex und werden letztendlich über die Kernporen aus dem Kern an die Zelloberfläche transportiert (32, 88). M1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Bindung der bereits in die Zellmembran eingelagerten Oberflächenproteine (s.u.) mit den RNPs (46). Diese Interaktion verhindert zusätzlich den Rücktransport der RNPs in den Zellkern (148).

Die Synthese der viralen Hüllproteine HA, NA und M2 beginnt im Zytosol. Bereits während der Synthese werden sie in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo die Proteine gefaltet werden. Zur weiteren Modifizierung werden die Proteine durch den Golgi Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert und gelangen schließlich zur Plasmamembran der Zelle (23).

Nachdem durch die Interaktion von M1 mit der Zellmembran die Bildung von Viruspartikeln induziert wurde, werden mit Hilfe der Enzymfunktion der Neuraminidase

Einleitung

die neuen Viren an ihrem apikalen Ende der polarisierten Zellen von, den sie an der Zelloberfläche bindenden, Sialinsäuren abgeschnitten und freigesetzt (42, 123).

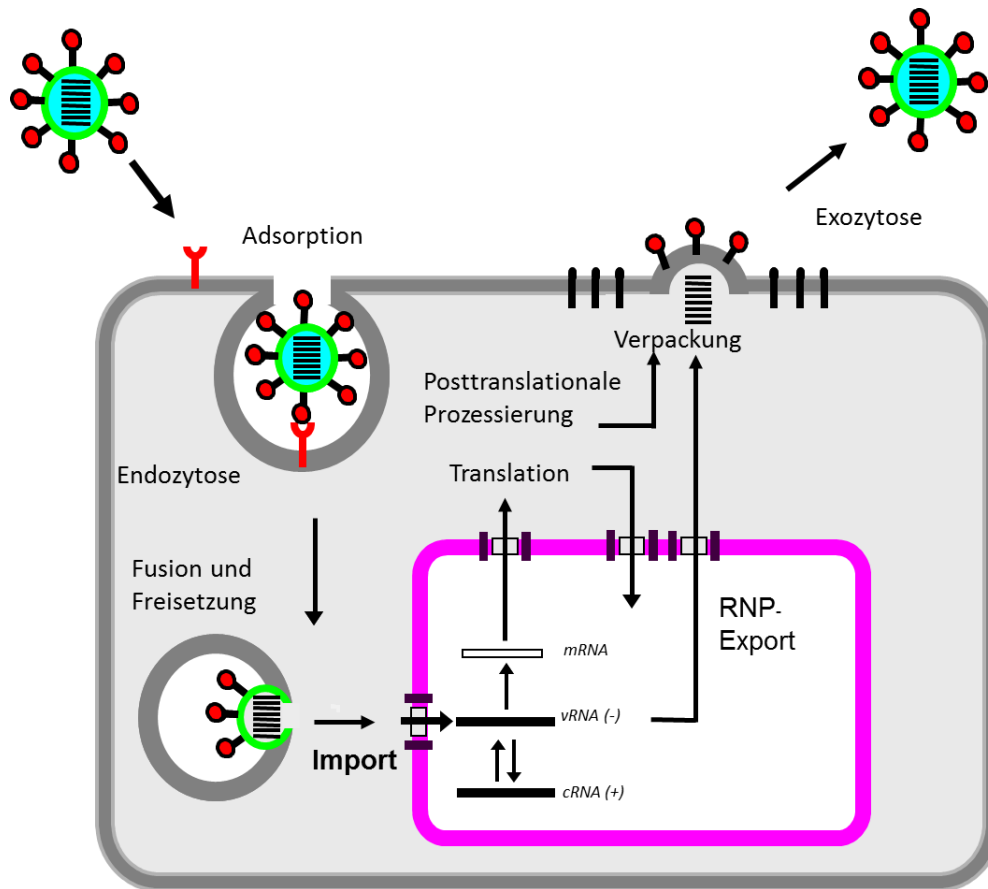


Abbildung 3: Replikationszyklus von Influenzaviren. Nach HA vermittelter Adsorption und Penetration des IV an die Wirtszelle erfolgt die Aufnahme in die Zelle über Endozytose. Nach Fusion der viralen und endosomalen Membran, erfolgt die Freisetzung der RNPs in das Zytoplasma und der Transport in den Zellkern, wo die Transkription der vRNA in mRNA und die Replikation von vRNA über cRNA stattfindet. Die mRNA wird über die Kernporen in das Zytoplasma transportiert und dort in die viralen Proteine translatiert. Die Polymeraseproteine und das NP werden in den Zellkern zurücktransportiert. Nach post-translationaler Modifikation werden die Oberflächenproteine und die RNPs an die Zelloberfläche transportiert, dort zu Viruspartikeln verpackt und via Exozytose freigesetzt. (Abbildung wurde von Prof. Dr. S. Pleschka erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt und modifiziert.)

1.2.4 Antivirale Strategien gegen Influenzaviren

Zu den antiviralen Strategien zur Bekämpfung von Influenzavirusinfektionen gehört die Prävention mittels der jährlich zur Verfügung stehenden Gripeschutzimpfung. Zwar empfiehlt die WHO jedes Jahr vor Beginn der Grippezeit eine neue Zusammensetzung des Impfstoffes, das Grippevirus ist jedoch derart wandlungsfähig, dass sich selbst nach Bestimmung der zukünftigen Impfkomponeenten die epidemiologische Situation verändern kann (89, 90, 109) und die benötigten Impfstoffe nicht immer zeitgerecht erhältlich sind (111). Bei mildereren Verläufen steht eine symptomatische Therapie im

Einleitung

Vordergrund (25). Bei schwereren Verläufen, Risikopatienten mit pulmonalen Vorerkrankungen wie z.B. COPD, Asthma Bronchiale oder anderen zur Immunschwäche führenden Erkrankungen, stehen einige zielgerichtete Therapien bzw. Medikamente zur Verfügung.

Die Angriffspunkte antiviraler Wirkmechanismen liegen einerseits auf viraler Ebene, also in der Blockierung oder Inhibierung des Virus und der Funktion seiner Proteine selbst und andererseits auf zellulärer Ebene durch die Blockade spezifischer vom Virus genutzter zellulärer Mechanismen oder Proteine zur Beeinflussung der Virusreplikation/-vermehrung. Um überhaupt pathogene Eigenschaften zu besitzen und letztendlich zur Infektion des Wirts bzw. der Wirtszelle zu führen, müssen IV die angeborene Immunabwehr des Wirtes umgehen können. Daher sind die dafür verantwortlichen viralen Proteine sowie die molekularen Wege auf Wirtszellebene gute Ansatzpunkte zur Erforschung neuer Therapien und Medikamente (35). Eine Übersicht hierzu zeigt Abbildung 4.

Aktuell gibt es 3 Klassen von zugelassenen Medikamenten zur zielgerichteten Therapie der Influenza: die Klasse der M2-Ionenkanalblocker, die Klasse der Neuraminidaseinhibitoren sowie den seit Oktober 2018 in den USA zugelassenen Endonukleaseinhibitor Baloxavir® (24, 35, 50, 54, 68). Als Ionenkanalblocker verhindern die M2-Blocker in erster Linie die Freisetzung des Virusgenoms in der Wirtszelle. Sie sind nur gegen IAV effektiv und mit diversen, das Nervensystem und den Verdauungstrakt betreffenden, toxischen Nebenwirkungen assoziiert (55). Die Neuraminidaseinhibitoren haben den Vorteil, dass sie eine gute antivirale Wirksamkeit erzielen, ihre Bioverfügbarkeit ist jedoch geringer als die der M2-Ionenkanalblocker. Sie sind mit Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen assoziiert (71).

Bereits 1960 wurde der M2-Ionenkanalblocker Amantadin® auf dem US-amerikanischen Markt zugelassen, 1993 folgte Rimantadin® – ebenfalls ein M2-Ionenkanalblocker. Mit dem besseren Verständnis des Replikationszyklus von IV, folgte 1999 die Zulassung der Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relanza®) auf dem US-amerikanischen Markt (43).

Die Therapie mit Amantadin spielt wegen der hohen Resistenz der humanpathogenen Influenza A Viren (H1N1)pdm09 und (H3N2) keine große Rolle mehr (53). In mehreren Studien haben sich ebenfalls Resistenzen gegen Oseltamivir gezeigt (15, 78, 109). Diese Resistenzbildungen lassen sich u.a. auf den Einsatz von Neuraminidase-Inhibitoren und

Einleitung

Amantadin als Monotherapeutikum beim Menschen bzw. die unkontrollierte Behandlung von Nutztieren zurückführen (43).

Mit dem in Japan und in den USA bereits zugelassenen Endonukleaseinhibitor Baloxavir® ist ein neuer Ansatz zur Behandlung der Influenza gefunden worden. In Studien zeigt es im Vergleich zur Behandlung mit Neuraminidaseinhibitoren frühere antivirale Effekte im Menschen (162). Im Vergleich zu letzteren hat Baloxavir den Vorteil, dass aufgrund seiner langen Plasmahalbwertszeit die Einnahme nur einmalig erfolgen muss(1, 41). Jedoch zeigen klinische Studien auch hier nach einer Behandlung mit Baloxavir eine geringere Ansprechrate des Virus auf eine erneute Behandlung (41, 134, 162)

Wie schnell und wie weit sich die Viren und Resistenzen generell verbreiten können, hat sich anhand der Influenzapandemien in der Vergangenheit gezeigt (55, 88). Die eingeschränkte Verfügbarkeit von antiviralen Medikamenten und die Zunahme der Resistenzen verdeutlicht, wie wichtig die Erforschung und Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten und -ansätze ist (35, 109). Daher sind die Erforschung neuer

Einleitung

antiviraler Strategien gegen Influenzaviren Bestandteil intensiver Forschung (52, 127, 144).

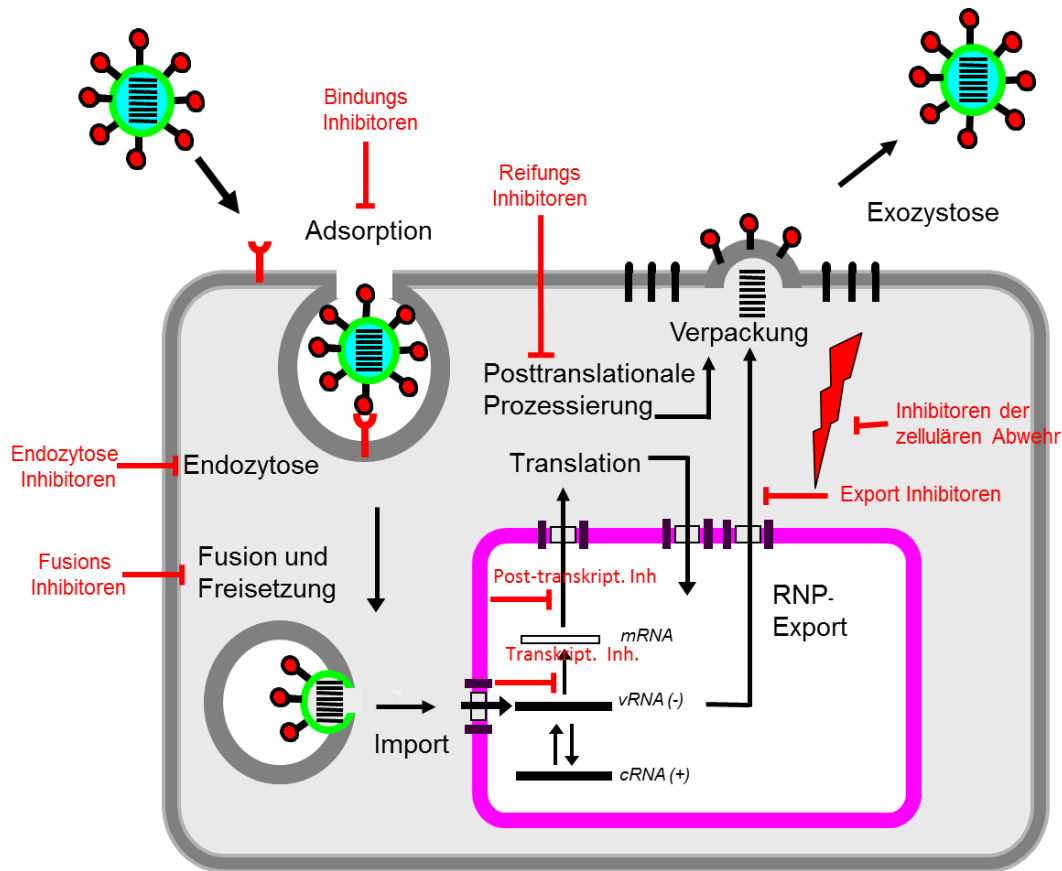


Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher antiviraler Angriffspunkte. (Abbildung wurde von Prof. Dr. S. Pleschka erstellt, freundlicherweise zur Verfügung gestellt und modifiziert.)

1.3 Rhinoviren

1.3.1 Das Rhinovirus

Humane Rhinoviren (HRV), erstmals beschrieben in den 1950er Jahren (64), werden durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Sie sind die Erreger des ‚banalen Schnupfens‘ und zählen mit einer geschätzten Häufigkeit von 20-50% zu den häufigsten Verursachern von Erkältungskrankheiten mit Häufigkeitsgipfeln im Spätsommer und Frühjahr (82). Pro Jahr erkrankt ein Mensch 1-3mal an Rhinovirusinfektionen, Kinder im Vorschulalter 8-12mal (9, 139). Dies liegt v.a. an den vielen verschiedenen Subtypen des Virus (149). Zudem sind Infektionen mit dem Rhinovirus in 60-90% der Fälle für Asthma-Exazerbationen im Kindesalter und in 50-80% der Fälle im Erwachsenenalter verantwortlich (8, 99, 107). Die Erkrankungshäufigkeit nimmt wie o.g. mit zunehmendem Lebensalter ab (88).

Einleitung

Rhinoviren gehören zur Gruppe der Picornaviren, befallen bevorzugt Zellen des oberen Respirationstraktes und führen nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden zu meist nicht länger als sieben Tage andauernden, charakteristischen Symptomen wie Schnupfen und Husten mit Heiserkeit (149).

Durch die von ihnen benutzten Rezeptoren werden HRV in eine „Major“ Gruppe und eine „Minor“ Gruppe unterteilt. Zur Majorgruppe gehören 90 Serotypen, die ICAM-1 als Rezeptor (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) verwenden, darunter das HRV16 (124). Der von der Minorgruppe am häufigsten benutzte Rezeptor ist der *Low Density Lipoproteinrezeptor* (LDLR) (149). Zu einem Vertreter der Minorgruppe gehört das HRV1A (124). Da es aktuell noch keine gezielte antivirale Therapie oder Impfung gegen HRV-Infektionen gibt und es in den häufigsten Fällen nur zu milden Verläufen kommt, wird meist rein symptomatisch behandelt (9, 98). Bei vorliegenden Grunderkrankungen wie COPD, Asthma Bronchiale, Cystischer Fibrose (CF) oder anderen Immunerkrankungen, kann es zu schweren Verläufen mit bakteriellen Überinfektionen und der Notwendigkeit der Hospitalisierung kommen (9, 107). Des Weiteren entstehen durch die zahlreichen Krankschreibungen und Krankheitstage enorme volkswirtschaftliche Schäden (149), was die Notwendigkeit der Entwicklung einer präventiven oder zielgerichteten Therapie mit guter Verträglichkeit verdeutlicht.

1.3.2 Struktur und Morphologie des HRV

Das unbehüllte Humane Rhinovirus besitzt ein Plus-Strang-RNA Genom und umfasst mindestens 100 bekannte Serotypen (Typ 1A, 1B, 2-100) (149). Sein Genom hat eine Größe von ca. 7.200 Basenpaaren, besteht aus einem einzigen Gen dessen Genprodukt (Polyprotein) durch virale Proteasen in 11 Proteine gespalten wird (64, 103).

Vier der 11 Proteine bilden als Strukturproteine das virale Kapsid, welches das Genom beinhaltet: virales Protein 1-4 (VP 1-4). Während das VP 4 die virale RNA im Viruspartikel verankert, spielen VP 1-3 bezüglich der genetischen Vielfalt des Virus eine Rolle. Jedes der VP 1-4 liegt in einer Anzahl von 60 Kopien vor und bildet so zusammen die ikosaedrische Hülle des Virus. Eine Vertiefung im VP 1 dient als Bindungsstelle für Oberflächenrezeptoren. Die übrigen Nichtstrukturproteine VP 5-11 sind an der Replikation und dem Zusammensetzen der Viruspartikel beteiligt (64).

1.3.3 Der Replikationszyklus der Rhinoviren

Durch die von HRV herbeigeführte Immunreaktion kommt es zur vermehrten Expression von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) an der apikalen Zellmembran der

Einleitung

Wirtszelle (153). Dieses Adhäsionsmolekül verwendet die Majorgruppe der Rhinoviren als Zielrezeptor, der v.a. auf Epithelzellen, Endothelzellen, Mukosazellen, Fibroblasten, Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen vorkommt. Außerdem bindet es an das auf der Oberfläche von Lymphozyten vorkommende Integrin LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1). Durch Bindung des Virus an die Wirtszelle, kommt es je nach Rezeptor durch Makropinozytose (LDL-Rezeptor) oder Endozytose (ICAM-1) zur Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle. Aufgrund des sauren pH-Werts im Inneren des Endosomenkomplexes, kommt es zur Umstrukturierung und zur Freisetzung des Virusgenoms. Die Replikation erfolgt im Zytoplasma der Zelle. An den Ribosomen der Wirtszelle wird die virale RNA repliziert, in ein Polyprotein translatiert und in die Struktur- und Nichtstrukturproteine umgewandelt (40, 64). Da die virale Polymerase keine *Proof-Reading*-Kapazität besitzt, kommt es während der Replikation zu einer hohen Mutationsrate mit Entstehung von Quasispezies (103), was wiederum eine Erklärung für das Vorhandensein der vielen Subspezies der Rhinoviren ist. Nach

Einleitung

Verpackung der neuen Viruspartikel erfolgt die Ausschleusung via Zellyse, sodass die Viren für einen erneuten Infektionszyklus zur Verfügung stehen (9, 64).

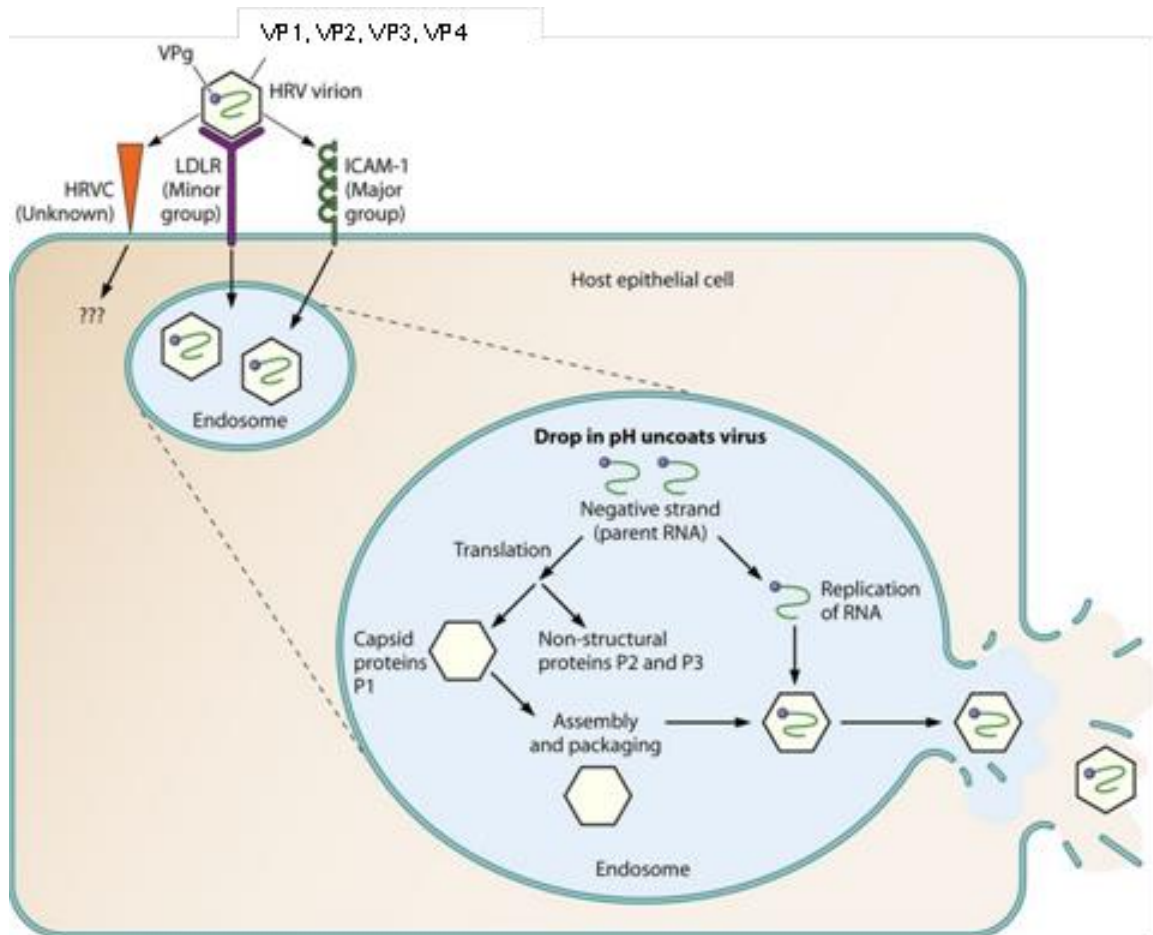


Abbildung 5: Replikationszyklus von Rhinoviren. Nach Bindung an den jeweiligen Rezeptor der Epithelzelle kommt es mittels Endozytose (ICAM-1) oder Makropinozytose (LDL Rezeptor) zur Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle. Durch die pH-Wert Senkung kommt es über Umstrukturierungsprozesse zur Freisetzung des Virusgenoms. Die Virus RNA wird repliziert und in Struktur- und Nichtstruktur-Proteine translatiert. Es folgt die Verpackung der neuen Viruspartikel sowie die Ausschleusung und Freisetzung der Viren via Zellyse (64). (Abbildung modifiziert nach Samantha E. Jacobs et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013; doi:10.1128/CMR.00077-12)

1.4 Coronaviren

1.4.1 Das Coronavirus

Mit einer geschätzten Häufigkeit von 10-15% gehören Coronaviren (CoV) ebenfalls zu den häufigeren Erregern für Erkrankungen des oberen, seltener des unteren Respirationstrakts des Menschen (82, 166). Ihre Übertragung erfolgt über

Einleitung

Tröpfcheninfektion. 1965 wurden sie erstmals entdeckt und 1968 aufgrund ihrer Morphologie als eigene Familie definiert (88). Einer der ersten, auf humanen Nierenzellen kultivierbaren Stämme war das Humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) (166).

Neben Menschen können Coronaviren auch Infektionen bei Hunden, Katzen, Rindern und Schweinen verursachen. Hier können sie zu Gastroenteritiden, Hepatitiden, respiratorischen Erkrankungen oder Enzephalitiden mit schweren Verläufen führen (31, 88, 166).

Im Jahr 2003 kam es erstmals zu einer durch ein Coronavirus-verursachten Epidemie, der SARS-Epidemie (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, schweres akutes Atemnotsyndrom). Ausgehend von der chinesischen Stadt Guangdong verbreitete sich der zoonotische Erreger, der wahrscheinlich aus Fledermäusen stammt, in insgesamt 30 Ländern auf allen 5 Kontinenten der Erde und infizierte 8.439 Menschen. In 812 Fällen führte es zum Tod (34) wodurch sich eine Letalität von ca. 10% ergibt (20).

2012 kam es auf der arabischen Halbinsel zu einem erneuten Ausbruch eines neuen Coronavirus-Stammes: dem MERS-CoV (engl. *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*). Bis März 2021 wurden weltweit 2.574 Fälle von MERS-CoV Infektionen beim Menschen im Labor bestätigt und davon 885 Todesfälle mit der Infektion in Verbindung gebracht (49, 147). Es handelt sich ebenfalls um einen zoonotischen Erreger, dessen wahrscheinlichstes Reservoir Dromedare sind. Nach einer Inkubationszeit von ca. 7-14 Tagen kommt es zu grippeähnlichen Symptomen und kann in schwereren Fällen zu Pneumonien mit akutem Atemnotsyndrom, Diarrhoe und Nierenversagen führen. Eine spezifische Behandlung ist bis heute nicht verfügbar (92, 120).

Im Dezember 2019 kam es in der chinesischen Stadt Wuhan innerhalb der dortigen Bevölkerung zu einem vermehrten Auftreten von schwer verlaufenden Lungenentzündungen unklarer Ätiologie (4). Aus dem unteren Respirationstrakt von erkrankten Personen ließ sich ein neues Coronavirus isolieren: SARS-COV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus -2*) und die von ihm ausgelöste Krankheit wurde von der WHO später in der Kurzform als COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) bezeichnet (106). Am 11. März 2020 erklärte die WHO den COVID-19 Ausbruch zur Pandemie (146). Bis heute (Stand 10.04.2021) wurden weltweit insgesamt 134.308.070 SARS-COV-2 Infektionen und 2.907.944 damit in Zusammenhang stehende Todesfälle offiziell bestätigt. Aktuell ist noch keine zielgerichtete Therapie zur Behandlung von Coronavirusinfektionen verfügbar (14, 31, 93, 98, 101). Diesbezüglich wird von

Einleitung

Therapieversuchen mit verschiedenen antiviralen, anti-malarialen, anti-inflammatorischen Medikamenten, Antikörpertherapien und pflanzlichen Mitteln berichtet (93). Seit Dezember 2020 sind erstmals Vakzine zugelassen (2). Gemäß der ständigen Impfkommission (STIKO) liegt aktuell eine COVID-19 Impfeempfehlung mit einem der beiden zugelassenen mRNA-Impfstoffe (BioNTech/Pfizer, Moderna) oder einem der beiden zugelassenen Vektor-basierten Impfstoffe der Firmen AstraZeneca oder Janssen vor (Stand 08.04.2021)(119).

1.4.2 Struktur und Morphologie des Coronavirus

Coronaviren gehören mit den Toroviren zur Familie der *Coronaviridae* und werden in 4 genetische Gruppen (α , β , γ und δ) unterteilt (31, 61).

Coronaviren haben ein nicht-segmentiertes, Einzelstrang-RNA-Genom mit positiver Polarität, sind von einer Membran umhüllt und können in ihrer kugelförmigen Gestalt einen Durchmesser zwischen 80-160nm aufweisen (38, 88). In der Elektronenmikroskopie stellen sich die in der Virusoberfläche verankerten und nach Außen hervorragenden Spikeproteine (S-Proteine) wie ein Kranz oder eine Krone dar (lat. *corona*). Dies führte zur Namensgebung des Virus (18). Mit einer Länge von 27.000-32.000 Basen haben Coronaviren das größte Genom aller bekannten RNA-Viren (88, 100). In ihrer Lipidhülle enthalten sie 3 der insgesamt 20 viralen Proteine, die dementsprechend als Strukturproteine bezeichnet werden: das Spikeprotein (S-Protein), das Membranprotein (M-Protein) und das Hüllprotein (engl. *Envelope*, E-Protein) (95, 159). Die meisten der übrigen 16 nicht strukturgebenden Proteine sind direkt oder indirekt an der viralen RNA-Synthese beteiligt (100, 166).

Das S-Protein hat zwei wichtige Funktionen: zum einen vermittelt es die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle, zum anderen spielt es eine Rolle bei der Fusion von viraler und zellulärer Membran und somit bei der Einschleusung des viralen Genoms in die Wirtszelle (166).

Das M-Protein hat den größten Molekülanteil an der Virushülle, durchspannt die Membran mehrfach und interagiert mit seiner Transmembran- und Endomembrandomäne mit anderen Strukturproteinen. Beispielsweise interagiert das M-Protein mit bestimmten Aminosäureresten des N-Proteins, sodass das Nukleokapsid mit der Membraninnenseite assoziiert ist (19).

Einleitung

Das N-Protein welches zusammen mit der viralen RNA das Nukleokapsid bildet, ist an der RNA-Transkription und Replikation beteiligt (170). Man findet es im Zytoplasma und im Nucleolus von infizierten Zellen (88).

Das E-Protein ist ein kleines Membranprotein und spielt eine noch nicht genau erforschte Rolle in der Viruspartikelbildung und -freisetzung (160). Außerdem scheint es als Viroporin eine Funktion als Ionenkanal zu haben und als solches einen Einfluss auf die Membranpermeabilität zu besitzen (88, 121). DeDiego et al. konnten 2014 in einer Studie zeigen, dass die Abwesenheit des E-Proteins während der Infektion mit SARS-CoV zu einer verminderten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und einer reduzierten Zahl an Neutrophilen in Lungeninfiltraten führt, was wiederum *in vivo* im Mausmodell zu einem Überlebensvorteil führte (20).

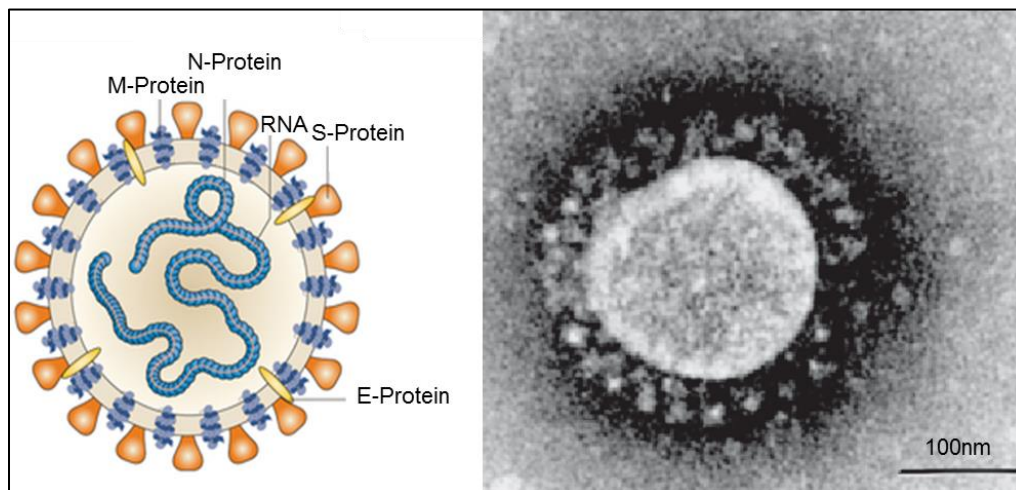


Abbildung 6: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung eines Coronavirus. Nähere Informationen siehe 1.4.2 (Abbildung links modifiziert nach <https://microbenotes.com/coronavirus/>, Abbildung rechts modifiziert nach https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-coronaviruses-electron-microscopic-appearance-a-bar-100-nm-and_fig1_243457712).

1.4.3 Der Replikationszyklus von Coronaviren

In seiner Funktion als Bindungsvermittler zwischen Virus und Wirtszelle, leitet das S-Protein den coronaviralen Vermehrungszyklus ein (10, 165). Je nach Virus erfolgt die Bindung über die Aminopeptidase N (Rezeptor für die meisten Gruppe 1 CoV wie HCoV-229E) (161), über das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2; z.B. SARS-CoV und SARS-CoV-2) (11, 158) oder über die Dipeptidylpeptidase 4 (z.B. MERS-CoV) (31, 142). Es wurde festgestellt, dass das S-Protein des SARS-CoV-2 gegenüber dem SARS-CoV eine 10-20fach größere Bindungsaffinität gegenüber dem ACE2 Rezeptor hat.

Einleitung

Zumindest teilweise liefert dies eine Erklärung für die stärkere Pathogenität des SARS-CoV-2 (11).

Die Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt nach Endozytose durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran der Wirtszelle (116, 165). Dies erfolgt je nach Virus pH-abhängig oder -unabhängig, indem es zu Konformitätsveränderungen im S-Protein kommt (77, 166). Aufgrund seiner positiven Polarität kann das virale Genom in Membran-assoziierten Replikationszentren direkt translatiert werden (12, 129). Während der Translation entstehen zwei Polyproteine, das Polyprotein 1a (pp1a) und das Polyprotein 1b (pp1b). Diese Polyproteine werden durch virale Proteasen in 16 reife Nichtstrukturproteine (nsp) gespalten (100) und bilden einen Multiproteinkomplex, der auch als Replikations- und Transkriptionskomplex (RTC) bezeichnet wird (114, 168). Durch seine Transmembranregionen wird er im ER verankert und enthält verschiedene, für die RNA-Synthese erforderliche Enzyme und Hilfsproteine (6, 100). Im ersten Schritt der Replikation wird von der positiv-orientierten viralen RNA eine Negativstrang-RNA-Kopie gebildet, die wiederum als Vorlage für die Bildung neuer, positiv polarisierter genomischer RNAs dient. Diese können entweder in neue Virionen eingebaut werden oder in ihrer Funktion als mRNA zur Vorlage für die Synthese neuer RTCs dienen (167). Bei der Transkription der mRNA entstehen zunächst negativsträngige RNAs die als Intermediate für positivsträngige, unterschiedlich lange RNAs dienen. Sie werden auch als subgenomische RNAs (sgRNAs) bezeichnet und kodieren u.a. für die viralen Strukturproteine (31, 166). Die Strukturproteine werden im nächsten Schritt zum endoplasmatischen Retikulum-Golgi-intermediären Kompartiment (ERGIC) transportiert, dort zusammen mit der genomischen RNA und dem N-Protein zu Viruspartikeln verpackt, in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und mittels Exozytose aus der Zelle ausgeschleust (121).

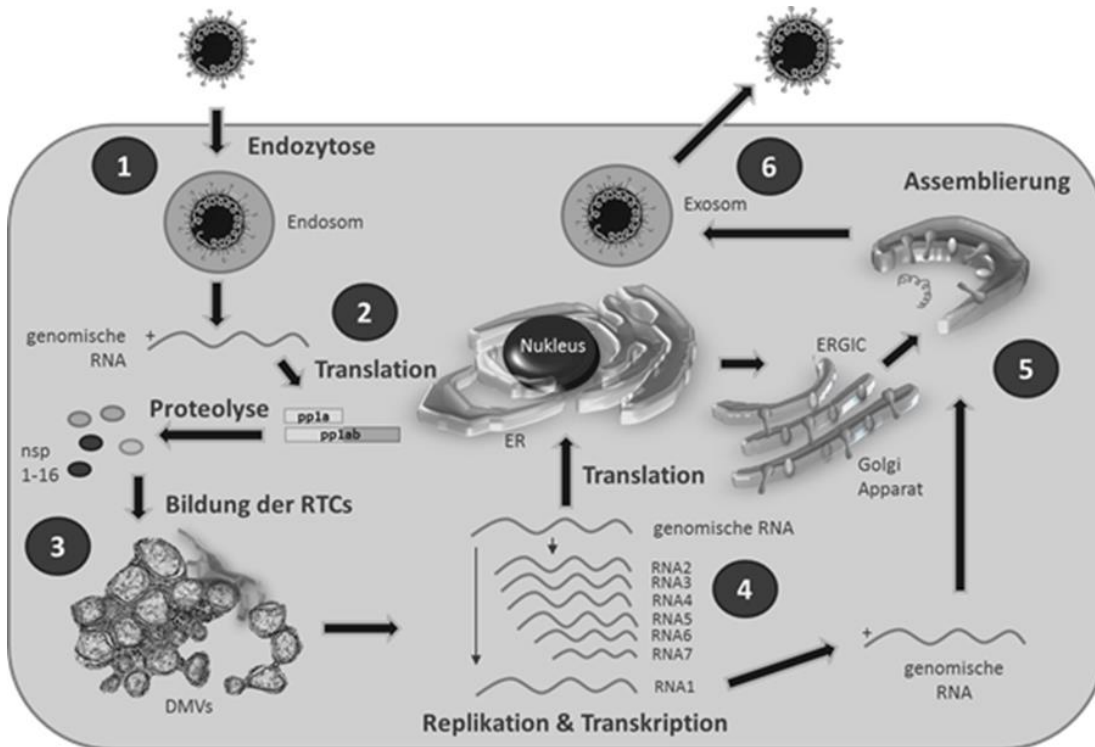


Abbildung 7: Replikationszyklus von Coronaviren. Durch rezeptorvermittelte Endozytose wird das CoV in die Wirtszelle aufgenommen (1). Nach Freisetzung des Virusgenoms, wird die positiv polarisierte genomische Virus-RNA in 2 Polypeptide translatiert: das pp1a und das pp1ab. Durch Proteolyse werden diese in 16 Nichtstrukturproteine (nsp) gespalten (2). Die nsp bilden den Replikations/Transkriptions-Komplex (RTC), der in Doppelmembran-Vesikeln (DMVs) verankert ist und verschiedene, für die RNA Synthese erforderliche Proteine und Hilfsproteine enthält (3). In den DMVs erfolgt zunächst die Bildung einer Negativstrang RNA, die zum einen als mRNA zur Vorlage für die Bildung neuer RTCs (subgenomische RNAs, sgRNAs) dient und zum anderen in neue Virionen eingebaut werden kann (genomische RNA)(4). Die subgenomischen RNAs (sgRNAs) kodieren u.a. für die viralen Strukturproteine, werden nach dem Transport in das ERGIC zusammen mit der genomischen RNA zu Viruspartikeln verpackt (5) und mittels Exozytose aus der Zelle ausgeschleust (6). (Abbildung erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Christin Müller)

1.5 Antibiotikaeinsatz bei der Behandlung von respiratorischen Infekten

Im Gegensatz zu Viren, die keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und zur Vermehrung immer einen Wirt bzw. eine Wirtszelle benötigen, besitzen Bakterien einen eigenen Stoffwechsel. In diesen bakterieneigenen Stoffwechsel können Antibiotika selektiv eingreifen, therapeutische Ansatzpunkte sind dabei z.B. die bakterielle Zellwand, die Ribosomen und die bakterielle DNA. Da Viren den Wirtsstoffwechsel nutzen, bieten sie selbst wenige geeignete Angriffspunkte, um sie an der Vermehrung zu hindern, ohne dabei den Wirt zu schädigen (58). Da bis zu 90% der Atemwegsinfektionen viraler

Einleitung

Genese sind (30), ist eine Antibiotikatherapie, obwohl sie gerade bei Kindern mit Atemwegsinfektionen häufig verschrieben wird, in den meisten Fällen nicht indiziert.

Ein großes Problem bei der Infektion mit viralen Erregern, wie der Influenzavirusinfektion, stellen bakterielle Superinfektionen dar. Sie können zu einem Übermaß an Morbidität und Mortalität führen (102). In der Praxis können Patienten mit Atemwegsinfektionen viraler Genese und bakterieller Superinfektion je nach Erkrankungsverlauf und zu Grunde liegenden Vorerkrankungen in Risikoklassen eingeteilt werden. So lässt sich eine Aussage über das der Superinfektion am Wahrscheinlichsten zu Grunde liegende Bakterium treffen. Dies spielt wiederum eine große Rolle in der Entscheidung, ob und welches Antibiotikum eingesetzt werden sollte (57). Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Risikoklassen. Eine sorgfältige Nutzen/Risiko-Abwägung vor dem Einsatz von Antibiotika sollte bei der Therapie immer im Vordergrund stehen (58, 65).

Einleitung

Tabelle 1: Überblick über die Einteilung der Risikoklassen von Patienten mit Superinfektionen. Bei 70% der Patienten mit viralen respiratorischen Infekten lassen sich bakterielle Erreger im Sputum nachweisen. Die Einteilung in Risikoklassen hilft in der Praxis bei der Entscheidung ob und mit welchem Antibiotikum behandelt werden sollte (57).

Risikoklasse	Vorliegende Grunderkrankung (GE)	Haupterreger der Superinfektion
1	immunkompetente Patienten, keine GE	Streptococcus pneumoniae, Chlamydien, Mykoplasmen, Legionellen
2	immunkompetente Patienten mit pulmonaler GE wie COPD oder Asthma	Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae
3	multimorbide, immungeschwächte Patienten, fortgeschrittene pulmonale GE	v.a. gramnegative Erreger, z.B. Haemophilus influenzae, Enterobacteriaceae

1.6 Pflanzliche Arzneimittel zur Behandlung viraler Infekte

Da die meisten respiratorisch pathogenen Viren zu eher mild verlaufenden Infektionen führen, werden unkomplizierte, virale Infekte hauptsächlich mit nicht-verschreibungspflichtigen und freiverkäuflichen Arzneimitteln behandelt (80, 108, 152). Phytopharmaka spielen bei der medikamentösen Therapie eine immer größere Rolle (21) und stellen eine primäre Quelle für die Erforschung und Entwicklung neuer antiviraler Medikamente dar (51). Dabei handelt es sich um Arzneimittel, die pflanzlichen Ursprungs sind und um Substanzen, die aus pflanzlichen Bestandteilen gewonnen werden können und die zur Behandlung von verschiedenen Krankheitsbildern dienen (66). Patienten legen immer mehr Wert auf die Nachhaltigkeit und die Verträglichkeit des verwendeten Medikaments oder Arzneimittels (76) und die Bereitschaft zur aktiven Mitwirkung an der eigenen Therapie (Compliance) hängt sehr stark von der eigenen Einstellung zur jeweiligen Therapie ab, sodass die Nachfrage nach pflanzlichen/natürlichen Arzneimitteln immer größer wird (113, 169).

Viele heute chemisch hergestellte Medikamente haben pflanzliche Vorläufer. Der Wirkstoff des Medikaments ASS (Acetylsalicylsäure), die Salicylsäure, ist Bestandteil der Weidenrinde und ist heute das weltweit am häufigsten verwendete Medikament (22). Bereits Hippocrates erwähnte in seinen Schriften die anti-inflammatorische Wirkung der

Einleitung

Weidenrinde. Der Wirkstoff wird heute komplett synthetisch hergestellt und findet u.a. Einsatz in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und bei der Behandlung von Entzündungen (155). 1785 veröffentlichte William Withering eine Studie zur Wirkung des Fingerhuts bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Seine aktive Komponente, das Digitalis, findet auch heute noch Anwendung in der Behandlung der Herzinsuffizienz und des tachykarden Vorhofflimmerns (145).

Die aus Mahagoniegewächsen isolierten Rocaglate wie z.B. Silvestrol haben als potente Inhibitoren der Virustranslation in Studien ebenfalls gute antivirale Effekte bei der Behandlung verschiedener Viren u.a. Zikavirus (27), Ebolavirus (7), Hepatitis E Virus (138) und Coronavirus (91) gezeigt.

In der Vergangenheit haben sich ebenfalls gute antivirale Wirksamkeiten bei Pflanzenextrakten wie beispielsweise Thymian, Echinacea, Holunder und Senfölen gezeigt (75, 80, 111). Seit dem 19. Jahrhundert wird über die klinische Wirksamkeit von Letzteren bei der Behandlung von Harnwegsinfekten und oberen Atemwegsinfekten geforscht und berichtet (84, 136).

Die Entwicklung eines neuen Medikaments dauert in der Regel 10-15 Jahre und kostet mehrere Millionen Euro, um überhaupt in die klinische Erprobung zu gelangen und dann ggf. an der zuständigen Arzneimittelbehörde zu scheitern. Die Verwendung von bereits zugelassenen Medikamenten bzw. Arzneimitteln hat den Vorteil, dass man die ersten Studienphasen überspringen und direkt mit der klinischen Erprobung des jeweiligen Medikaments/ Arzneimittels beginnen kann. Hierdurch kann es zu Kosteneinsparungen von über 40% kommen (109). Diese Wiederverwendung von Medikamenten spielt auch eine entscheidende Rolle in der Therapiefindung für das aktuell weltweit zirkulierende SARS-CoV-2. Beispielsweise hat die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (*food and drug association*) hierfür am 01.05.2020 eine Notfallzulassung für den eigentlich für EBOLA zugelassenen Nukleaseinhibitor Remdesivir erwirkt (87). Im November 2020 erfolgte eine weitere Eilzulassung der FDA: Kombinationstherapie von Remdesivir mit dem Janus-Kinase-Inhibitor Baricitinib.

1.6.1 Senföle – Isothiocyanate (ITCs)

Senföle gehören zu den heute mit am besten untersuchten arzneilich wirksamen Pflanzenextrakten (5, 29). Senföle sind Isothiocyanate (ITCs), die als Spaltprodukt in Anwesenheit von Wasser und durch die Enzymaktivität der Myrosinase aus ihrer inaktiven Vorstufe, den Glucosiden oder Glucosinolaten entstehen (3, 105). Bisher

Einleitung

konnten über 120 verschiedene Glucosinolate aus Pflanzen isoliert werden (140, 154). In der Pflanze selbst werden die Glucosinolate und die Myrosinase getrennt voneinander in verschiedenen Zellen synthetisiert. Kommt es durch die Schädigung des Pflanzengewebes zur Aufhebung dieser Kompartimentierung der Myrosinase und der Glucosinolate, entstehen durch Hydrolyse die ITCs als Spaltprodukte (70, 154). Dieser Vorgang wird auch als „Senfölbombe“ bezeichnet (117). Abbildung 7 zeigt die Spaltung der Glucosinolate.

Durch ihren stechenden Geruch und scharfen Geschmack dienen sie als Schutz vor Fressfeinden, Insekten, Bakterien und Pilzen. ITCs kommen in der freien Natur u.a. in der Kapuzinerkresse (*Tropaeoli majoris herba*) und in der Meerrettichwurzel (*Armoraciae rusitcanae radix*) vor. Die Meerrettichwurzel bildet Benzyl-Isothiocyanate (B-ITCs), die Kapuzinerkresse Allyl-Isothiocyanate (A-ITCs) und Phenylethyl-/ Phenyl-Isothiocyanate (P-ITCs) (3, 154).

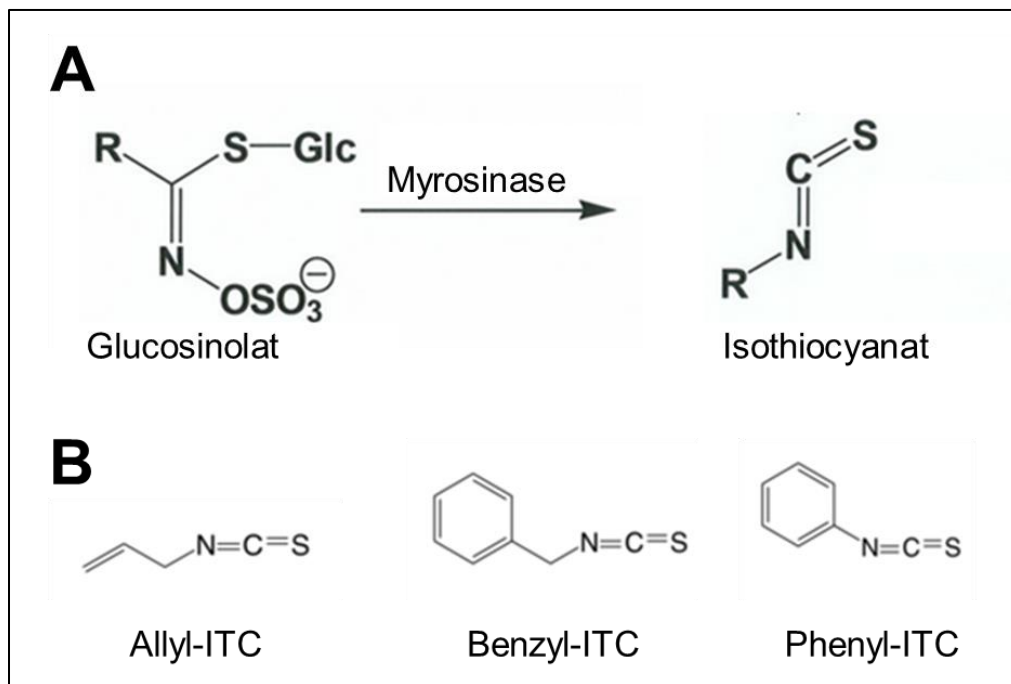


Abbildung 8: Spaltung von Glucosinolat und Entstehung von Isothiocyanaten (ITCs), vereinfachte Darstellung.

[A] Die Myrosinase hydrolisiert die glycosidische Bindung zwischen Glucose (Glc) und reduziertem Schwefel (S) in dem Glucosinolatmolekül. Über ein Intermediat entsteht das ITC, das auch als Senföl bezeichnet wird (140). [B] Der an dem ITC hängende Rest (R) bestimmt, um welches ITC es sich handelt. (Abbildungen [A] modifiziert nach <https://www.mpg.de/869312/forschungsSchwerpunkt1>, [B] modifiziert nach https://cdn.iopscience.com/images/1752-7163/7/2/026001/Full/jbr446119f2_online.jpg)

In vitro und *in vivo* konnte die menschliche Verträglichkeit und anti-bakterielle Wirksamkeit von Senfölen (wie Allyl-ITC, Benzyl-ITC und Phenyl-ITC) bereits in

Einleitung

mehreren Studien belegt werden: es zeigte sich, dass die einzelnen Senföle eine breite bakteriostatische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen bakteriellen grampositiven und -negativen Erregern von Harnwegs- und Atemwegsinfekten haben (3, 48). Die Kombination verschiedener Senföle konnte sogar eine noch bessere Wirksamkeit zeigen (33) und ergänzte das bis dahin gezeigte Wirkspektrum um das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (17, 33, 48). Bei Letzterem handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, das neben Harnwegs- und Atemwegsinfekten auch Pneumonien verursacht und bis hin zum akuten Atemnotsyndrom, dem ARDS (*acute respiratory distress syndrome*), führen kann (81, 104). Auch gegenüber antibiotikaresistenten Bakterienstämmen (z.B. MRSA – Methicillin Resistenter *Staphylococcus Aureus* und ESBL (*Extended-Spectrum Betalactamase*) positive *E.Coli* – Stämme) konnte eine gute antibakterielle Wirksamkeit der Senföle nachgewiesen werden (17).

Bereits 1957 wird der Einfluss von ITCs auf deren antivirale Wirkung erforscht. Winter et al. veröffentlichten eine Studie zur antiviralen Wirksamkeit von Senfölen gegenüber Influenzaviren im embryonierten Hühnerei (151). Hierbei zeigte sich, dass die untersuchten Senföle (A-ITC, B-ITC, P-ITC) einen virustatischen, nicht jedoch viruziden Effekt haben. Weiterhin ließ sich feststellen, dass es (i) nach Behandlung von Zellen mit B-ITC zu einer verminderten Virusreplikation von IAV kommt und dass es (ii) nach Behandlung mit B-ITC zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs der Zellen (Chorioallantoiszellen) kommt (im Vergleich zu unbehandelten Zellen von 50mm³O₂ auf 10mm³O₂). A-ITC führte in höherer Konzentration eher zu einer Atmungsstimulation (84, 150). Eine anti-kanzerogene Wirkung wird den ITCs ebenfalls nachgesagt: in Leukämiezellen (P-ITC) und in verschiedenen Karzinomzelllinien (P-ITC und B-ITC) induzieren ITCs nachweislich die Apoptose, indem sie durch ihren inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung der *cell survival signaling molecules* AKT und NF-κB der in Krebszellen überschießenden NF-κB Aktivierung entgegenwirken (130). Dadurch können Krebszellen in ihrer Vermehrung theoretisch gehemmt werden, in exzessiv hohen Konzentrationen führt B-ITC sogar zum nekrotischen Zelltod (94, 157).

Diese Erkenntnisse stellen neben der antiviralen Therapie nicht nur einen möglichen Ansatz für eine Ko-Therapie verschiedener Krebserkrankungen dar, sondern sind auch ein möglicher Ansatzpunkt in der Therapie des metabolischen Syndroms (Arterielle Hypertonie, Adipositas, Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörung) von dem man bereits weiß, dass es durch eine Fehlregulation von verschiedenen Signalwegen (z.B.

Einleitung

PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK/JNK, Nrf2, NF-κB) zu chronischen Entzündungsreaktionen und Entstehung der o.g. Erkrankungen kommt (28).

2012 veröffentlichten Fintelman et al. die Ergebnisse einer Placebo-kontrollierten, prospektiven, doppelblinden, randomisierten Kohortenstudie zur prophylaktischen Behandlung von Atemwegsinfekten. Hierbei kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Kombination der drei ITCs als Mittel der Wahl zur prophylaktischen Behandlung von oberen Atemwegsinfekten eingesetzt werden kann (33). Ein Expertengremium, bestehend aus deutschen Ärzten und Wissenschaftlern, zog in einer interdisziplinären Diskussionsrunde zur Behandlung von unkomplizierten oberen Atemwegsinfektionen 2015 das Fazit, Senföle dabei als *First-Line*-Therapie einzusetzen (5). Die Tatsache, dass bisher keine bakteriellen Resistenzen gegenüber Senfölen nachweisbar sind, ist vielversprechend auch in Bezug auf die Langzeitanwendung und die prophylaktische Einnahme (33, 36, 48, 125).

Seit 2017 sind ITCs Bestandteil der von der Deutschen Gesellschaft für Urologie verfassten S3-Leitlinie (Stufenklassifikation zur Handlungsempfehlung, Evidenz- und konsensbasierte Leitlinie) zur Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfekten (79). Die umfangreiche, allgemeine Studienlage zur anti-bakteriellen und antiviralen Aktivität von Pflanzenextrakten zeigt das große Interesse an alternativen pflanzlichen Behandlungsmöglichkeiten (96).



Abbildung 9: Kapuzinerkresse (*Tropaeoli majoris herba*, links) und Meerrettichwurzel (*Armoraciae rusticanae radix*, rechts). Kapuzinerkresse enthält Benzyl-ITC. Meerrettichwurzel enthält Allyl-ITC und Phenyl-ITC (Abbildungen modifiziert nach https://www.mein-schoener-garten.de/sites/default/files/styles/achor_navigation_1/public/kapuzinerkresse-trapaeolum-majus-01269382-florapress.jpg?h=c029297a&itok=usP6mLDp und https://www.amazon.de/Lexa-Meerrettichwurzel-1-kg/dp/B01NCEZ7VH/ref=sr_1_1?__mk_de_DE=%C3%85M%C3%85C5%BD%C3%95%C3%91&dchild=1&keywords=Meerrettichwurzel+lexa&qid=1607177941&sr=8-1).

1.6.2 Angocin® Anti-Infekt N

Angocin® Anti-Infekt N ist ein von der Firma REPHA GmbH hergestelltes, frei verkäufliches, apothekenpflichtiges Arzneimittel und beinhaltet die Vorstufen der in Meerrettichwurzel und Kapuzinerkresse enthaltenen Allyl-ITCs, Benzyl-ITCs und Phenyl-ITCs. Das Arzneimittel ist seit 1958 im Handel und wurde zuletzt 1994 in seiner Rezeptur verändert (33). 2005 erhielt es die Nachzulassung zur Behandlung von Atemwegs- und Harnwegsinfektionen (37, 47).

Eine Filmpille enthält 200mg Kapuzinerkressenkrautpulver und 80mg Meerrettichwurzelpulver (3). Dabei handelt es sich um bis auf Trocknung und Zerkleinerung unbehandelte und unveränderte Nativpräparate, sogenannte *genuine* (17). Die Dosierung richtet sich nach dem Alter des Anwenders: Erwachsene können 3-5mal täglich 4-5 Filmpillen einnehmen, Kinder von 6-12 Jahren 3-4mal täglich 2-4 Filmpillen. Die Dauer der Anwendung ist nicht begrenzt und kann auch zur Vorbeugung von Infekten des Respirations- und Harntraktes eingenommen werden.

Nach oraler Aufnahme werden die in Angocin® Anti-Infekt N enthaltenen Glucosinolate im Darm (v.a. im Duodenum) enzymatisch in die reaktiven ITCs gespalten, aufgenommen und an Erythrozyten und Serumproteinen gebunden über den Blutweg im

Harn- oder Respirationstrakt freigesetzt wo sie ihre antimikrobielle Wirkung entfalten können. Ihre Eliminierung erfolgt größtenteils renal, aber auch über den Atemweg und den Speichel (45, 86, 150). Da die Resorption der Senföle bereits im oberen Darmtrakt erfolgt, wird die körpereigene Darmflora im Vergleich zu manchen Antibiotika, geschont (29).

1.7 Zielsetzung

Respiratorische Infektionen führen jedes Jahr durch die zahlreichen Krankheitstage zu enormen volkswirtschaftlichen Einbußen. Zu den besonders häufigen Krankheitserregern zählen Influenzaviren, Rhinoviren und Coronaviren (s.a. die aktuelle SARS-CoV-2-Pandemie). Bei immunkompetenten Menschen führen die durch sie verursachten Infektionen in der Regel zu eher milden Verläufen, sodass meist eine rein symptomatische Therapie ausreicht. Bei immungeschwächten Patienten mit entsprechenden Ko-Morbiditäten, älteren Menschen und Kindern können sie jedoch zu gravierenden Verläufen führen. Virale Ko-Infektionen sind ebenfalls möglich und aggravieren den Verlauf der Erkrankung. Eine Antibiotikatherapie ist meist nur nach entsprechender Risikoabschätzung und bei bakteriellen Superinfektionen indiziert. Zielgerichtete antivirale Therapien oder Impfungen stehen nach dem aktuellen Stand nur bedingt zur Verfügung und führen häufig zu Resistenzbildungen der Viren. In früheren Forschungsarbeiten und Veröffentlichungen konnten bereits gute anti-bakterielle Effekte von Senfölen gezeigt werden. Dies spiegelt sich in der von der Deutschen Gesellschaft für Urologie verfassten S3-Leitlinie zur Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfekten wieder (79).

Ziel dieser Arbeit war es, die antivirale Wirksamkeit der in Angocin® Anti-Infekt N enthaltenen verschiedenen ITC-Komponenten, deren Kombination miteinander und entsprechend ihrer Anteile in dem Präparat Angocin® Anti-Infekt N selbst auf die Vermehrung von respiratorisch relevanten pathogenen Viren *in vitro* auf Zellkulturebene mit aktuellen virologischen Methoden zu testen und somit ein näheres Verständnis des für die Verwendung relevanten möglichen Wirkmechanismus zu erlangen.

Die experimentelle Untersuchung erfolgte in insgesamt 5 Abschnitten. Zunächst wurde die antivirale Wirksamkeit der einzelnen Senföle und dann die des kombinierten Substanzgemischs auf die Vermehrung des Influenzavirus A/Hamburg/01/09 (H1N1), einem Vertreter des pandemischen Influenzavirus von 2009, durchgeführt. Im dritten

Einleitung

bzw. vierten Schritt erfolgten die Testungen der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung des humanen Coronavirus HCoV-229E, dem humanen Coronavirus Prototyp, bzw. auf die Vermehrung der humanen Prototyp-Rhinoviren HRV1A und HRV16. Im letzten Schritt wurde in weiteren 3 Experimenten der Wirkmechanismus (MoA, *Mode of Action*) des Substanzgemischs auf die Vermehrung des IAV analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Deckgläschen/ Coverslips	Sigma Aldrich
ELISA-Reader EL808	BioTek
Inkubator	Panasonic
Glaswaren (Zylinder, Kolben, Flaschen)	Schott
Konfokales <i>Lascanning</i> -Mikroskop, TCS SP05	Leica
Kryogefäß	Sarstedt
Magnetrührer JKAMAG RCT	Janke & Kunkel
Mikrotiterplatte 96-well (U-/V-förmiger Boden)	Greiner Bio-One
Objektträger	Fisher Scientific
pH-Meter	Metrohm
Pipetten	Gilson
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Scanner Canonscan 9900F	Canon
Sterilbank	Thermo Scientific
Sterile Plastikpipetten	Greiner Bio-One
Tischzentrifuge	VWR
Untertischzentrifuge	Heraeus
Vortex	Janke & Kunkel
Waage PM460	Mettler
Wasserbad	Julabo
Zellkulturflaschen T-75	Greiner Bio-One
Zellkulturmikroskop	Olympus
Zellkulturplatte 6-well	BD Falcon
Zellkulturplatte 24-well	BD Falcon
Zellkulturplatte 96-well	Greiner Bio-One

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzie/ Chemikalie	Hersteller
3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	PAA
Ammoniumacetat	Merck
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Roth
Calciumchlorid CaCl ₂	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Kristallviolett	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd 37% (PFA)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin-EDTA	Life Technologies
TPCK-Trypsin	Sigma Aldrich
Tween-20	Roth
Tween-80	Roth

2.1.3 Medien und Medienbestandteile

Medium/ Medienbestandteil	Hersteller
Avicel Pulver (Avicel microcrystalline cellulose NF,	IMCD Germany
Bovines Serumalbumin 30% (BSA)	Life Technologies
DEAE-Dextran	Pharmacia Biotech
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies
Einbettmedium Prolong Gold	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
L-Glutamin	Invitrogen
Minimal Essential Medium (MEM)	c-c-pro
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Penicillin(100U/ml)/ Streptomycin (100µ/ml)	PAN
TPCK-Trypsin	Sigma Aldrich

2.1.4 Isothiocyanate

Isothiocyanat	Firma
Allyl isothiocyanat (Pestanal ®) (Allyl-ITC)	Sigma Aldrich
Benzyl isothiocyanat (Benzyl-ITC)	Sigma Aldrich
2-Phenylethyl isothiocyanat (Phenyl-ITC)	Sigma Aldrich

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Acetatpuffer pH 5,0

50mM Ammoniumacetat
 8mM H₂O₂
 in ddH₂O

2.1.5.2 20x AEC Substrat

1% (w/v) 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)
 in Dimethylformamid

2.1.5.3 1x PBS („Phosphate Buffered Saline“) pH 7,4

137mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10mM Na₂HPO₄

2mM KH_2PO_4
 in ddH₂O

2.1.5.4 PBS⁺⁺

0,9mM CaCl_2
1mM MgCl_2
 in 1x PBS

2.1.5.5 Virusverdünnungslösung/ PBS⁺⁺/Pen/Strep/BSA

0,2% (v/v) BSA (sterilfiltriert für Zellkulturen)
100U/ml Penicillin
0,1mg/ml Streptomycin
 in PBS⁺⁺

2.1.5.6 Fixierlösung

3,7% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)
 in 1x PBS

2.1.5.7 Tritonhaltige Fixierlösung

3,7% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)
1% (v/v) Triton X-100
 in 1x PBS

2.1.5.8 Antikörperverdünnungslösung

3% (w/v) BSA
 in 1x PBS

2.1.5.9 Tween-haltige Waschlösung

0,05% (v/v) Tween-20
 in 1x PBS

2.1.5.10 Kristallviolettlösung (Plaque-Assay)

0,15% (w/v) Kristallviolett
20% (v/v) Ethanol

2.1.6 Zellkulturmedien

2.1.6.1 Medium zur Kultivierung und Passagierung von MDCK-II, A549, HeLa und HuH-7 Zellen

Zur Kultivierung und Passage der verwendeten Zelllinien wurde "Dulbeccos Modified Eagle's Medium" (DMEM, Gibco) mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, Gibco), 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin (Gibco) versetzt

2.1.6.2 Infektionsmedium

DMEM wurde mit 0,2% Bovinem Serum Albumin (BSA, Life Technologies), 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin versetzt. Bei Infektion mit Influenzavirus (s. 2.1.8) wurde zusätzlich 1mg/ml TPCK-Trypsin (Sigma Aldrich) hinzugegeben.

2.1.6.3 Avicel-Medium

Zur Herstellung des Avicel-Mediums wurde MEM (Minimum Essential Medium, c-c-pro) mit 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,35% (v/v) BSA, 1,25% (v/v) Avicel (FMC Bio Polymer), 0,01% (v/v) DEAE-Dextran (Pharmacia Biotech) und 0,3% (v/v) Natriumhydrogencarbonat (Merck) versetzt. Zur Infektion von Influenzaviren wurde zusätzlich 1mg/ml TPCK-Trypsin hinzugefügt.

2.1.7 Zelllinien

2.1.7.1 MDCK-II Zellen

Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK) Zellen sind Hundenieren-Epithelzellen, die als Zelllinie zur Anzucht von Influenzaviren dienen (137). Als Quelle diente die Zellsammlung des Instituts für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen.

2.1.7.2 A549 Zellen

A549 Zellen sind menschlichen Adonokarzinomzellen der Lunge. Sie wurden 1972 isoliert und dienen u.a. der Anzucht von Influenzaviren (44). Als Quelle diente die Zellsammlung des Instituts für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

2.1.7.3 HuH-7 Zellen

HuH-7 Zellen sind humane Leberkarzinomzellen und wurden 1982 aus einem gut differenzierten Leberzellkarzinom isoliert, sie dienen der Anzucht von Coronaviren (39).

Als Quelle diente die Zellsammlung des Instituts für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

2.1.7.4 HeLa Ohio Zellen

HeLa Ohio Zellen sind humane Zervixkarzinomzellen und dienen der Anzucht von Rhinoviren (132). Als Quelle diente die Zellsammlung des Instituts für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

2.1.8 Virusstämme

Tabelle 2: Tabellarische Ansicht der in dieser Arbeit verwendeten Viren und deren Zelllinie(n).

Virus	Genom	Familie	Bio-Sicherheit	verwendete Zelllinie
Influenzavirus A/Hamburg/01/09 (H1N1pdm09)	- RNA	Orthomyxoviridae	BSL-2	MDCK-II A549
Humanes Rhinovirus 1A (HRV1A)	+ RNA	Picornaviridae	BSL-2	HeLa
Humanes Rhinovirus 16 (HRV16)	+ RNA	Picornaviridae	BSL-2	HeLa
Humanes Coronavirus-229E (HCoV-229E)	+ RNA	Coronaviridae	BSL-2	HuH-7

2.1.9 Antikörper

Tabelle 3: Tabellarische Ansicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnun	Herkunft	Verwendung
Maus anti- IAV NP	1:100	S. Ludwig, Münster	Primärantikörper, FFU- Assay
Ziege anti- Maus IgG HRP	1:1000	Santa Cruz	Sekundärantikörper, FFU- Assay
Maus anti-IAV NP	1:1000	Biozol	Primärantikörper, Immunfluoreszenz
Ziege anti-Maus IgG ALEXA Fluor 425	1:500	Invitrogen	Sekundärantikörper, Immunfluoreszenz

2.1.9.1 Herstellung der Isothiocyanat-Lösungen und –Verdünnungen

Zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit wurden synthetisch erstellte Senföle mit möglichst hohem Reinheitsgehalt im gleichen Verhältnis wie im Nativpräparat (Angocin® Anti-Infekt N) vorliegend eingesetzt: 37,9% (v/v) Allyl-ITC, 50% (v/v) Benzyl-ITC und 12,1% (v/v) Phenyl-ITC. Da es sich bei den einzelnen Substanzen um wasserunlösliche Stoffe handelt, wurden diese zunächst mit 8%igem Tween-80 in Lösung gebracht und im Anschluss die jeweiligen Verdünnungen erstellt. Zur Herstellung der Verdünnung des Substanzgemisches, wurden die Senföle zunächst wie oben angegeben miteinander vermischt und dann im Verhältnis 1:10 mit dem Lösungsmittel (8% Tween-80) verdünnt und gelöst.

Die Angaben zur Herstellung der Lösungen wurden von Conrad et al. (16, 17) übernommen und von der Firma Repha GmbH vorgegeben.

2.1.9.2 Allyl-Isothiocyanat (Allyl-ITC)

37,9% (v/v) Allyl-ITC
in 8% Tween-80

2.1.9.3 Benzyl-Isothiocyanat (Benzyl-ITC)

50,0% (v/v) Benzyl-ITC
in 8% Tween-80

2.1.9.4 Phenyl-Isothiocyanat (Phenyl-ITC)

12,1% (v/v) Phenyl-ITC

in 8% Tween-80

2.1.9.5 Substanzgemisch (SG)

37,9% (v/v) Allyl-ITC

50,0% (v/v) Benzyl-ITC

12,1% (v/v) Phenyl-ITC

2.1.9.6 Lösungsmittel (LM)

8% (v/v) Tween-80

in Infektionsmedium

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung im flüssigen Stickstoff wurde nach dem Erreichen der Zellkonfluenz das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und mit 5ml einer 1:10 in 1x PBS verdünnten Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen des Zellrasens, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und bei 1200rpm für 10min abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1ml 10% DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und in einem Kryo-Röhrchen bei -80°C über Nacht schonend eingefroren. Anschließend erfolgte der Transfer in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Flüssigstickstoff-Behälter, wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C für ca. 5min aufgetaut und im Anschluss in 19ml des entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert. Im Anschluss wurden sie für etwa 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in T-75 Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 100% inkubiert.

2.2.1.3 Kultivieren und Passagieren von Zellen

MDCK-II, A549, HeLa und HuH7 Zellen wurden in dem unter Punkt 2.1.6.1 beschriebenen Zellkulturmedium in T-75 Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (MDCK-II, A549, HuH7) oder

37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 0% CO₂ (HeLa) bis zu einer Konfluenz von ca. 100% inkubiert und je nach Bedarf passagiert und ausgesät. Hierzu wurde nach dem Erreichen der Konfluenz das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und mit 5ml einer 1:10 in 1xPBS verdünnten Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen des Zellrasens, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach Experiment wurden die Zellen in entsprechender Menge in die jeweiligen Zellkulturschalen oder -flaschen ausgesät.

2.2.1.4 Infektion von Zellen

Die zu ca. 90% konfluent gewachsenen Zellen wurden einmalig mit PBS⁺⁺ gewaschen und im Anschluss lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mit der entsprechenden Virusverdünnung inkubiert. Die Virusverdünnung wurde zuvor nach Berechnung der MOI (engl. *multiplicity of infection*) hergestellt. Dabei handelt es sich um das Verhältnis der infektiösen Viruspartikel zu der Zahl an Zellen, so entspricht beispielsweise eine MOI von 1 dem Verhältnis von einem Viruspartikel pro Zelle und eine MOI von 0,01 einem Viruspartikel pro 100 Zellen. Als Verdünnungsmedium diente die unter 2.1.5.5 beschriebene, mit BSA und Antibiotika versetzte PBS⁺⁺ Lösung. Nach der einstündigen Inkubation wurde der Virusüberstand abgesaugt und durch das in 2.1.6.2 beschriebene Infektionsmedium ersetzt. Die Dauer der Infektion richtete sich nach dem jeweiligen Experiment und Virus.

2.2.1.5 Bestimmung der Zelltoxizität und des CC₅₀-Werts mittels MTT-Test

Die Bestimmung der Zelltoxizität der Isothiocyanate, deren Lösungsmittel (Tween-80) und des Substanzgemischs erfolgte mit dem MTT-Test. Dazu wurden die jeweiligen Zellen auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und nach dem Erreichen der Konfluenz mit der jeweiligen Substanz in verschiedenen Verdünnungen für unterschiedliche Zeitspannen behandelt. Nach der Behandlung wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Zellen für 90 Minuten mit dem in Zellkulturmedium gelösten MTT-Reagenz inkubiert. Die zu Grunde liegende chemische Reaktion beruht auf der Reduktion des gelben und wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in den wasserunlöslichen und violetten Farbstoff Formazan. Diese Reaktion zeigt die Rate der Glykolyse während der Zellatmung in den Mitochondrien und somit die Zellviabilität an. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen mit 3% PFA in PBS fixiert,

getrocknet und der Farbstoff mit 100µl Isopropanol gelöst. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 490nm mit dem ELISA-Reader EL808. Zur Berechnung der CC_{50} Werte wurden die gewonnenen Daten in Relation mit unbehandelten Zellen gesetzt und mit dem Programm GraphPad-Prism ausgewertet. Der so ermittelte CC_{50} -Wert (Zytotoxische Konzentration 50%) ist ein Maß für die halbmaximale Zelltoxizität.

2.2.2 Virustiterbestimmung

Die Methode zur quantitativen Bestimmung des Virustiters hängt von den Eigenschaften des jeweiligen Virus ab. So kann in einem immunhistochemischen Verfahren mittels FFU-Assay die Anzahl replikations- und infektiöser Viruspartikel des Influenzavirus indirekt durch den Nachweis des Nukleoproteins (NP) bestimmt werden. Im Hämagglutinationstest (HA-Assay) wird sich die agglutinierende Fähigkeit des IAV bzw. seines Oberflächenproteins Hämagglutinin zu Nutze gemacht. Im Gegensatz zum FFU-Assay werden im HA-Assay infektiöse und nicht-infektiöse Partikel nachgewiesen. Es kann also hier keine Aussage über die Infektiosität des Virus machen.

Zur quantitativen Bestimmung des infektiösen Titers des Coronavirus wurde der Plaque-Assay verwendet. Die Bestimmung des Rhinovirustiters erfolgte mittels Endpunkttitration.

2.2.2.1 Focus-Forming Unit Assay (FFU-Assay)

Zur Bestimmung des infektiösen Virustiters des IV (A/Hamburg/01/09), wurden MDCK-II Zellen auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 90% inkubiert. Parallel erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Virusüberstandes von 10^{-1} – 10^{-8} in einer U-förmigen Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen. Bei dem hier verwendeten Verdünnungsmedium handelte es sich um PBS⁺⁺/Pen/Strep/BSA. Die ausgesäten Zellen wurden mit 50µl PBS⁺⁺ gewaschen und zur Infektion nach Absaugen des Überstandes mit je 50µl der jeweiligen Virusvorverdünnung für 1h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die Virusverdünnung abgesaugt und die Zellen mit je 150µl Avicel-Medium + 1µg/ml TPCK-Trypsin überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurde das Avicel-Medium abgesaugt, die Zellen 2-3mal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 50µl tritonhaltiger Fixierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Nach 2-3maligem Waschen mit tweenhaltiger Waschlösung wurden die fixierten Zellen zuerst mit 50µl Primärantikörper

für 1h und im Anschluss nach erneutem Waschen mit der Waschlösung mit 50µl Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Darstellung der Foci wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit 40µl 1x AEC- Substrat in Acetatpuffer für ca. 1h lichtgeschützt inkubiert und angefärbt. Dabei kommt es durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP – *horseradish peroxidase*) zur Umsetzung des AEC-Substrates in einen wasserunlöslichen, roten Farbstoff und somit zur Anfärbung und Darstellung der infizierten Zellen in Form eines rötlichen Focus. Zur Berechnung des Virustiters wurden die Platten eingescannt und die Foci der jeweiligen Verdünnungsstufe(n) ausgezählt. Nach Bezugnahme auf das eingesetzte Volumen ließ sich so der Virustiter berechnen:

$$\text{Virustiter [FFU/ml]} = \text{Anzahl der gezählten Foci} * \text{Volumenfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2.2 Plaque-Forming Unit-Assay (Plaque-Assay)

Die Bestimmung des infektiösen Titers des Coronavirus erfolgte mit Hilfe des Plaque-Assays. Dieser beruht auf der Eigenschaft des Virus die Wirtszelle nach Infektion zu lysieren und somit sogenannte Plaques (Fleck, Loch) im Zellrasen zu verursachen.

Hierzu wurden HuH7 Zellen auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 95-100% inkubiert. Nach dem Erstellen einer Verdünnungsreihe mit PBS++/Pen/Strep/BSA von 10^{-1} - 10^{-6} aus den zu untersuchenden Virusüberständen, wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS++ mit je 1ml Virusverdünnung pro Vertiefung infiziert und bei 33°C für 1h inkubiert. Im Anschluss wurde das Inoculum abgesaugt, der Zellrasen mit Avicel-Medium überschichtet und für 4 Tage bei 33°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mehrfach mit 1x PBS gewaschen und mit Fixierlösung für ca. 30min fixiert. Der Zellrasen wurde mit einer Kristallviolettlösung angefärbt und die Plaques (Löcher) im Zellrasen der jeweiligen Verdünnungsstufe ausgezählt. Der Virustiter wurde durch Multiplikation der Anzahl der Plaques mit dem Volumenfaktor und dem Verdünnungsfaktor berechnet (s.o.) und in *Plaque Forming Units* pro ml [PFU/ml] angegeben.

2.2.2.3 Hämagglutinations-Assay (HA-Assay)

Die Bestimmung der relativen Menge an infektiösen und nicht-infektiösen Influenzaviruspartikeln erfolgte mittels HA-Assay. Hierzu wird eine 0,5%ige (v/v), gewaschene, pathogenfreie Hühnererythrozyten-Suspension benötigt.

Das aus Hühnern entnommene Vollblut wurde zunächst 1min bei 5000rpm zentrifugiert um die Erythrozyten zu Sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das

Material und Methoden

Erythrozytenpellet mit 1x PBS vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde bis zum Erhalt eines klaren Überstandes wiederholt und die Erythrozyten im letzten Schritt mit 1x PBS zu einer 0,5%igen (v/v) Suspension verdünnt.

Zur Bestimmung des HA-Titers wurden jeweils 50µl PBS++ in die 12 Vertiefungen einer Reihe in einer V-förmigen Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen vorgelegt und anschließend 50µl einer zu analysierenden Virusprobe, sukzessiv (von Vertiefung #1 - #12) im Verhältnis 1:2 darin verdünnt. Im Anschluss wurden 50µl der 0,5%igen Hühnererythrozyten-Suspension zu jeder Vertiefung zugefügt und für ca. 1h bei 4°C inkubiert. Die hämagglutinierenden Einheiten (HAU) wurden als größte Verdünnung bei der noch keine Präzipitation bzw. Knöpfchenbildung der Erythrozyten auftritt festgelegt ($2^n * 20 = \text{HAU/ml}$). Als Positivkontrolle diente Virus mit bekanntem HA-Titer und als Negativkontrolle 1x PBS ohne Virus.

2.2.2.4 Endpunkttitration

Die Bestimmung des Rhinovirustiters erfolgte mittels Endpunkttitration. Wie auch bei dem Plaque-Assay, wird sich hierbei die zytolytische Eigenschaft des Virus zunutze gemacht. Dazu wurden HeLa-Ohio Zellen in Zellkulturplatten mit jeweils 96 Vertiefungen ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 95-100% bei 37°C, 0% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS++, wurden die Zellen in 12 Vertiefungen einer Reihe mit einer zuvor im Verhältnis 1:2 erstellten, sukzessiven (von Vertiefung #1 - #12) Virusverdünnung in Infektionsmedium überschichtet. Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 33°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 0% CO₂, wurden die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen, mit Fixierlösung für 30min fixiert und für weitere 30min mit Kristallviolettlösung angefärbt. Durch den zytopathogenen Effekt des Rhinovirus und der nach Reed und Muench (118) formulierten Gleichung (s. Abb. 10) konnte so die Infektionsdosis, bei der 50% der Zellen infiziert sind (TCID₅₀/ml), ermittelt werden.

$\log_{10} 50\% \text{ end point dilution} = \log_{10} \text{ of dilution showing a mortality next above } 50\% - (\text{difference of logarithms} \times \text{logarithm of dilution factor}).$

Abbildung 10: Formel nach L.J. Reed und H. Muench zur Bestimmung der TCID₅₀. (118)

2.2.3 Antivirale Testung

Zur Testung der maximal möglichen Wirkung der einzelnen Senföle und der Kombination der Einzelsubstanzen als Substanzgemisch, wurden im ersten Schritt die

jeweiligen Viren und die Zellen mit den Einzelsubstanzen, dem Substanzgemisch oder dem Lösungsmittel in verschiedenen, nicht zytotoxischen Konzentrationen ($\leq CC_{50}$) für jeweils eine Stunde vorbehandelt, in der jeweiligen Verdünnung im Anschluss dem Infektionsmedium zugegeben und die Zellen damit infiziert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Überstände gewonnen und je nach Virus mit der entsprechenden Methode zur Bestimmung des Virustiters titriert. Die Testung der Einzelsubstanzen gegen das IAV erfolgte auf A549 und MDCK-II Zellen. Die Testung des Substanzgemischs erfolgte gegen IAV, Coronavirus und Rhinovirus mit einer MOI von 0,01, falls nicht anders beschrieben.

2.2.3.1 Zugabe des Substanzgemischs (SG) zu unterschiedlichen Zeiten

Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt im IAV-Vermehrungszyklus das Substanzgemisch (SG) bzw. das Lösungsmittel (LM) die Virusvermehrung am stärksten beeinträchtigt, erfolgte die zeitliche Zugabe des LM/SG wie in Tabelle 4 beschrieben. So wurde entweder (i) das Virus vorinkubiert und dadurch auch die Zellen während der Infektion inkubiert (A), (ii) nur die Zellen vor der Infektion vorinkubiert (B) oder (iii) das LM/SG lediglich dem Infektionsmedium p.i. zugefügt (C). Die unterschiedlichen Zugaben wurden einzeln und in Kombination angewendet. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Überstände abgenommen und bis zur Bestimmung des Virustiters bei -70°C gelagert.

Tabelle 4: Tabellarische Ansicht der unterschiedlichen Behandlung der Zellen/ des Virus.

	Behandlung	1	2	3	4	5	6
A	Inkubation der Zellen und des Virus während der Infektion mit LM/SG	-	-	+	-	+	-
B	Vorinkubation der Zellen mit LM/SG	-	-	+	+	-	+
C	Inkubation der Zellen mit LM/SG p.i.	-	+	+	+	-	-

2.2.3.2 Hämagglutinations-Inhibitions-Test (HAI-Assay)

Der erste Schritt des Eindringens des Virus in die Wirtszelle wird durch die Interaktion des IAV Proteins HA mit dem zellspezifischen Sialinsäurerezeptor vermittelt. Substanzen oder Antikörper welche diese Interaktion hemmen, inhibieren die Hämagglutinationseigenschaften von IAV. Mit Hilfe des HAI-Assays lässt sich also bestimmen, ob das SG oder das LM die Bindung des HAs an seinen Rezeptor beeinflusst bzw. einen inhibitorischen Effekt hat. Hierzu wurde das IAV mit definiertem HA-Titer zusammen mit dem SG oder dem LM in verschiedenen Verdünnungen für 1h und 4h bei 4°C vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit dem unter Abschnitt 2.2.2.3 beschriebenen HA-Assay nach 1h und 20h Inkubationszeit bei 4°C. Um auszuschließen, dass das SG oder das LM allein zu einer Agglutination bei der Durchführung des HA-Assays führen, wurde der HAI-Assay zusätzlich unter gleichen Bedingungen, nur ohne die Zugabe von Virus, durchgeführt (Kontrolle).

2.2.3.3 Bestimmung der intrazellulären RNP Lokalisation mittels Immunfluoreszenz

Da das IAV Protein NP quantitativ die Hauptkomponente der RNPs ist, lässt sich die intrazelluläre Lokalisation der viralen RNPs mittels Immunfluoreszenz darstellen. Hierzu wurden MDCK-II Zellen auf sterilen Deckgläschen (*Coverslips*) in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät. Nach dem Erreichen der Konfluenz, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit IAV mit einer MOI von 1 infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde das Inoculum abgesaugt und die Zellen mit SG- oder LM-haltigem Infektionsmedium in der nicht-zytotoxischen Konzentration von 10⁻³% (v/v) + 1µg/ml TPCK-Trypsin für weitere 8h bei 37°C, 5%CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit tritonhaltiger Fixierlösung für 1h fixiert und permeabilisiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen

Material und Methoden

gewaschen, für eine Stunde mit einem monoklonalen Maus anti-NP Primärantikörper (in Antikörperverdünnungslösung) inkubiert, erneut gewaschen und dann mit einem Ziege anti-Maus ALEXA Fluor 594-markierten Sekundärantikörper für eine weitere Stunde lichtgeschützt inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen 3x mit 1x PBS und 1x mit ddH₂O gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen 10min mit DAPI in 3% BSA in 1x PBS lichtgeschützt bei Raumtemperatur gefärbt, erneut mit 1x PBS gewaschen und die Deckgläschen mit ProLong Gold *antifade* auf Objektträgern aufgezogen. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen *laserscanning*-Mikroskops.

2.2.4 Software-Programme und Statistik

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Version 2010) und mit GraphPad Prism Version 5.0. Die Signifikanzen wurden unter Verwendung des t-tests analysiert und die Mittelwerte +/- Standardabweichung in Graphiken präsentiert. Ab einem p-Wert <0,05 wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die anti-mikrobielle Wirkung von Senfölen in Studien immer wieder gezeigt und veröffentlicht. So zeigten sich vielversprechende Ergebnisse, v.a. in Bezug auf die anti-bakterielle Wirkung (17, 29, 37, 105, 150). Conrad et al. konnten eine gute Wirksamkeit der einzelnen Isothiocyanate gegenüber verschiedenen Bakterien, darunter auch sogenannte multiresistente Erreger wie MRSA und ESBL zeigen (17). Über die antivirale Wirkung und den Wirkmechanismus von Senfölen oder deren Kombination(en) miteinander gegenüber humanpathogenen, respiratorischen Viren, insbesondere Influenzaviren, Coronaviren und Rhinoviren, war bisher noch wenig bekannt, sodass zur weiteren Klärung dieser Fragestellung die nachfolgenden Experimente erfolgten:

Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Experimente.

Abschnitt	Experiment	Zelllinie	Testsubstanz	Virus	MOI	N	Zeitpunkt	Auswertung
3.1.1	MTT	MDCK-II, A549	Allyl-ITC, Benzyl-ITC, Phenyl-ITC, LM	-	-	8	36h p.t.	MTT-Assay
3.1.2	AA	MDCK-II, A549	Allyl-ITC, Benzyl-ITC, Phenyl-ITC, LM	IAV	0,01	2	36h p.i.	FFU-Assay, HA-Assay
3.2.1	MTT	MDCK-II, A549	SG, LM	-	-	8	36h p.t.	MTT-Assay
3.2.2	AA	MDCK-II, A549	SG, LM	IAV	0,01	2	36h p.i.	FFU-Assay, HA-Assay
3.3.1	MTT	HuH7	SG, LM	-	-	8	36h p.t.	MTT-Assay
3.3.2	AA	HuH7	SG, LM	HCoV	1	3	36h p.i.	Plaque-Assay
3.4.1	MTT	HeLa Ohio	SG, LM	-	-	8	48h p.t.	MTT-Assay
3.4.2	AA	HeLa Ohio	SG, LM	HRV1, HRV16	-	3	48h p.i.	EPT
3.5.1	diff. Zugabe	MDCK-II	SG, LM	IAV	0,01	2	24h p.i.	FFU-Assay
3.5.2	HAI	-	SG, LM	IAV	-	4	1h, 4h; 1h, 20h	HA-Assay
3.5.3	RNP-Lokalisation	MDCK-II	SG, LM	IAV	1	-	8h p.i.	Immunfluoreszenz

3.1 Testung der antiviralen Wirksamkeit der einzelnen Isothiocyanate gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/01/09 (H1N1pdm09)

Im ersten Schritt der Arbeit wurde die Testung der antiviralen Wirksamkeit der in dem Arzneimittel Angocin® Anti-Infekt N enthaltenen Isothiocyanate Allyl-ITC, Benzyl-ITC und Phenyl-ITC sowie des Lösungsmittels Tween-80 (LM) untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Viabilitäts-/MTT-Test mit den o.g. Substanzen zur Bestimmung der zytotoxischen Konzentration 50% (CC₅₀), bei der die Viabilität der verwendeten Zelllinien nur noch 50% beträgt, durchgeführt. Um auszuschließen, dass die antivirale Wirksamkeit auf einem zelltoxischen Effekt beruht, wurde so die Zytotoxizitätsgrenze bestimmt. Dadurch konnten Konzentrationen der Testsubstanzen (unterhalb des CC₅₀ Wertes) für die Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit im jeweiligen Testmodell festgelegt werden.

3.1.1 Testung der Zytotoxizität der einzelnen ITCs und des LM auf MDCK-II und A549 Zellen

Zur Ermittlung der CC₅₀ Werte der verschiedenen ITCs und des Lösungsmittels wurde deren Effekt auf die Zellviabilität mittels MTT-Tests bestimmt. Hierfür wurden sowohl MDCK-II, als auch A549-Zellen ausgewählt, da diese zum einen die effiziente Virusvermehrung erlauben (MDCK-II) und zum anderen ein weitverbreitetes humanes Lungenepithelzellmodell (A549) darstellen. Anhand der durch den MTT-Test bestimmten jeweiligen CC₅₀ Werte konnten für die nachfolgende Testung der antiviralen Wirksamkeit der Substanzen gegen H1N1pdm09 Konzentrationen der verschiedenen ITCs gewählt werden, die in diesen Zelllinien keinen zytotoxischen Effekt aufweisen und somit gewährleisten, dass in den nachfolgenden Experimenten die Inhibition der Virusreplikation spezifisch auf die Substanz selbst zurückzuführen ist und nicht auf eine Schädigung der Zellen. Dafür wurde jede Zelllinie mit 9 Verdünnungen (10⁻² bis 10⁻¹⁰, s. Tab. 6) der Substanzen für 36h behandelt und anschließend die Viabilität untersucht (s. Abb. 11).

Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs. Getestet wurden Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-10} (Spalte 1). In den Spalten 2-5 sind die in der jeweiligen Verdünnung enthaltenen Konzentrationen [%] aufgelistet. (LM: Lösungsmittel)

Verdünnung	LM [%]	Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
10^{-2}	8×10^{-1}	$3,79 \times 10^{-1}$	5×10^{-1}	$1,21 \times 10^{-1}$
10^{-3}	8×10^{-2}	$3,79 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$1,21 \times 10^{-2}$
10^{-4}	8×10^{-3}	$3,79 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$1,21 \times 10^{-3}$
10^{-5}	8×10^{-4}	$3,79 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}	$1,21 \times 10^{-4}$
10^{-6}	8×10^{-5}	$3,79 \times 10^{-5}$	5×10^{-5}	$1,21 \times 10^{-5}$
10^{-7}	8×10^{-6}	$3,79 \times 10^{-6}$	5×10^{-6}	$1,21 \times 10^{-6}$
10^{-8}	8×10^{-7}	$3,79 \times 10^{-7}$	5×10^{-7}	$1,21 \times 10^{-7}$
10^{-9}	8×10^{-8}	$3,79 \times 10^{-8}$	5×10^{-8}	$1,21 \times 10^{-8}$
10^{-10}	8×10^{-9}	$3,79 \times 10^{-9}$	5×10^{-9}	$1,21 \times 10^{-9}$

Ergebnisse

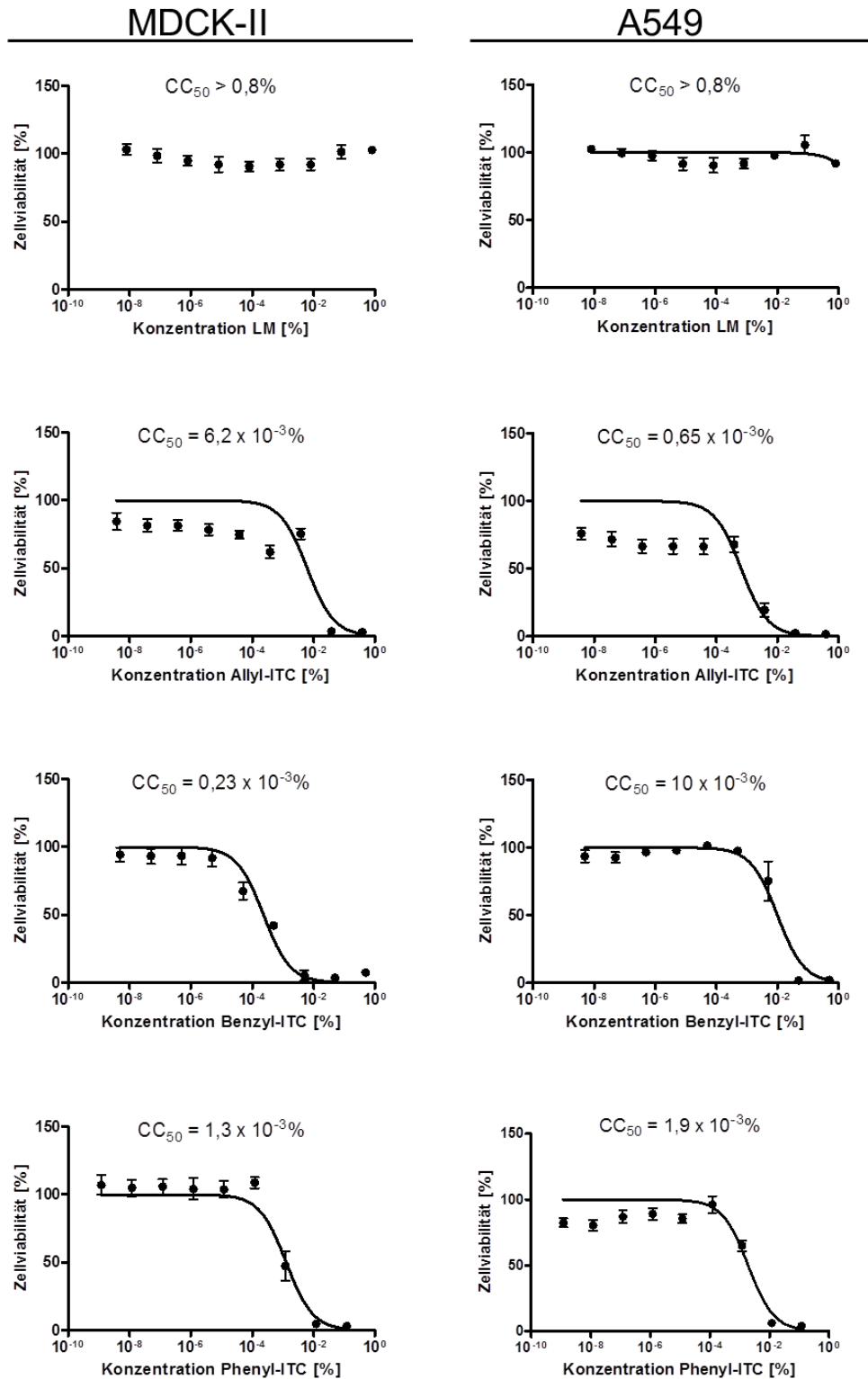


Abbildung 11: Bestimmung des zytotoxischen Effekts der ITCs und des LM auf die Viabilität von MDCK-II und A549 Zellen Nach einer Behandlung von MDCK-II Zellen (linke Seite) und A549 Zellen (rechte Seite) mit den verschiedenen ITCs und deren LM in den angegebenen Konzentrationen, wurde die zytotoxische Wirkung mittels MTT-Test nach einer Inkubationszeit von 36 h ausgewertet. Aus den Messwerten (n=8) der behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet und in Prozent dargestellt. Die CC₅₀-Werte wurden via nicht-linearer Regression berechnet.

Ergebnisse

Da sich bei der Behandlung mit dem Lösungsmittel (LM) auch mit der höchsten Konzentration weder auf MDCK-II Zellen, noch auf A549 Zellen eine zytotoxische Wirkung zeigte, wurde der CC_{50} -Wert für LM größer als die am höchsten eingesetzte Konzentration (0,8%) angenommen.

Für Allyl-ITC zeigte sich auf MDCK-II Zellen eine 10-fach höherer CC_{50} -Wert als auf A549 Zellen. Für Benzyl-ITC zeigte sich hingegen auf A549 Zellen ein 40-fach höherer CC_{50} -Wert als auf MDCK-II Zellen. Für Phenyl-ITC zeigten sich auf beiden Zelllinien in etwa gleiche CC_{50} -Werte. Zusammenfassend kann man feststellen, dass MDCK-II Zellen Allyl-ITC besser als Phenyl-ITC und dies besser als Benzyl-ITC vertragen. Wohingegen die A549 Zellen Benzyl-ITC besser als Phenyl-ITC und dies besser als Allyl-ITC vertragen.

3.1.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit der einzelnen Senföle gegen das Influenzavirus A/Hamburg/01/09 [H1N1pdm09] auf MDCK-II und A549 Zellen

Nachdem die CC_{50} Werte der Einzelsubstanzen und des Lösungsmittels (LM) für die beiden Zelllinien bestimmt wurden, wurde im Anschluss die antivirale Wirksamkeit der Substanzen gegen H1N1pdm09 analysiert. Im Hinblick auf die noch folgenden Experimente zur Testung des Substanzgemischs (SG), wurden für die Testung der antiviralen Wirksamkeit der Einzelsubstanzen und des LM die Ausgangskonzentrationen entsprechend ihrem Vorkommen in dem SG gewählt. Damit ein wie oben beschriebenen zytotoxischer Effekt der ITCs ausgeschlossen werden konnte, wurden für die Testungen der antiviralen Wirksamkeit für alle ITCs bzw. LM je 2 Konzentrationen unterhalb des CC_{50} -Wertes gewählt. Diese lagen somit im nicht-toxischen Bereich und wurden auf beiden Zelllinien eingesetzt. Tabelle 7 zeigt einen Überblick über die im Experiment eingesetzten Substanzen und deren Konzentrationen.

Tabelle 7: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des LMs und der einzelnen ITCs. Getestet wurden die Konzentrationen 10^{-4} und $10^{-5}\%$.

Konzentration des Substanzgemischs [%]	Komponenten des Substanzgemischs				
	LM [%]	LM [%]	Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC* [%]	Phenyl-ITC [%]
100	-	-	37,9	50	12,1
10^{-4}	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$3,79 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$
10^{-5}	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$

Ergebnisse

Damit eine maximal antivirale Wirkung erzielt werden konnte, wurden zunächst die Zellen und das Virus (parallel) für 1h mit dem LM oder dem jeweiligen ITC in den entsprechenden Konzentrationen vorbehandelt (s.a. Abschnitt 2.2.3). Im Anschluss wurden die vorbehandelten Zellen mit dem vorbehandelten Virus infiziert und für 1h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen des Inoculums wurde trypsinhaltiges Infektionsmedium mit dem LM oder dem ITC in den entsprechenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 36h p.i. wurden die Überstände gewonnen und der infektiöse Virustiter mit Hilfe des FFU-Assays (Abb. 12 [A] und 13 [A]) und die Viruspartikelproduktion repräsentativ durch die Bestimmung der HAU/ml mit Hilfe des HA-Assays (Abb. 12 [B] und 13 [B]) bestimmt. Die Versuche wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei internen Wiederholungen (n=2) durchgeführt und statistisch ausgewertet. Als Positivkontrolle diente von unbehandeltem Virus und Zellen gewonnener infektiöser Überstand.

Ergebnisse

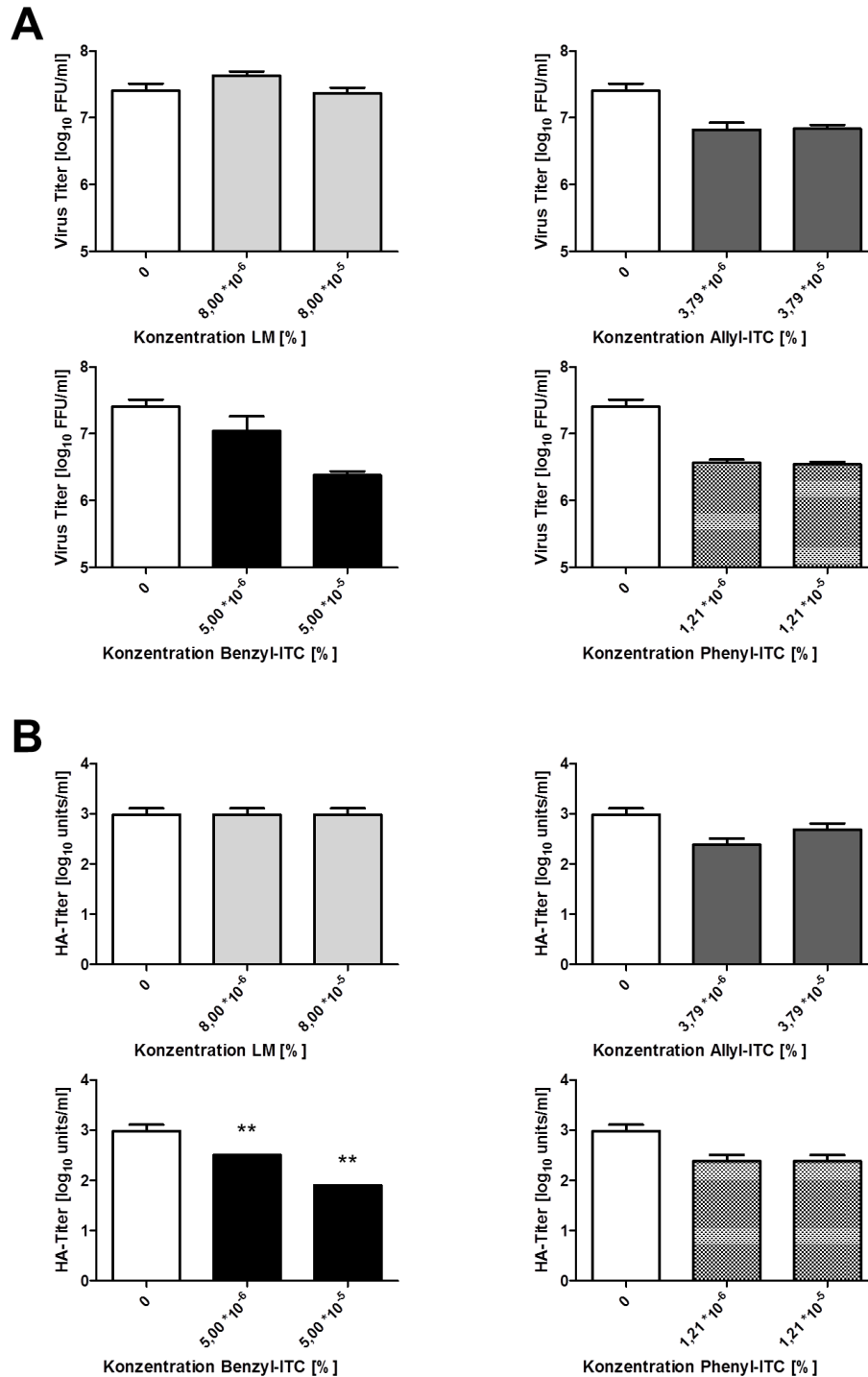


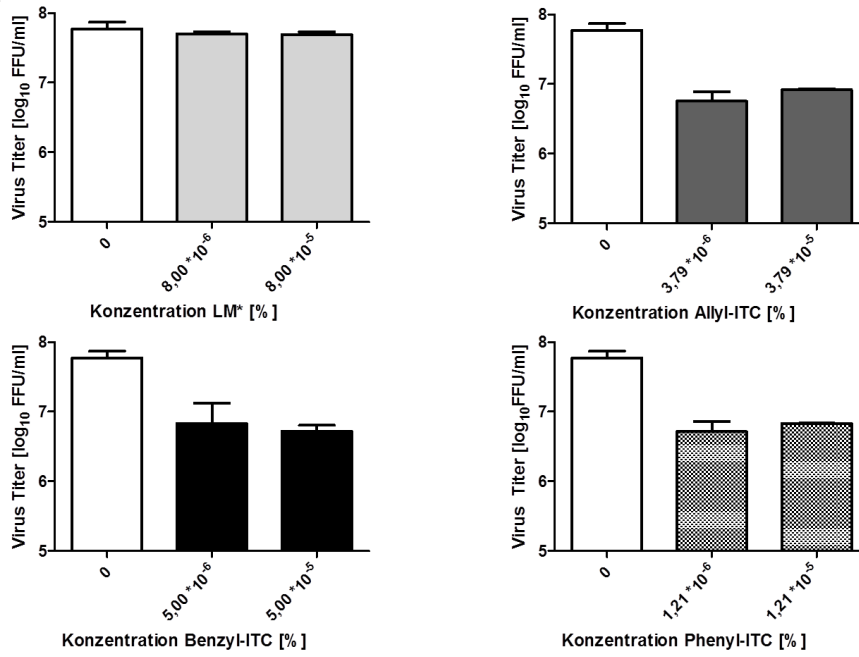
Abbildung 12: Antivirale Wirksamkeit der einzelnen ITCs und des LMs gegen die IAV-Vermehrung in MDCK-II Zellen. MDCK-II Zellen wurden mit dem IAV (MOI=0,01) infiziert. Um die maximal mögliche Wirkung zu erzielen, wurden das Virus und die Zellen parallel für 1h mit den ITCs oder dem LM vorinkubiert, die vorbehandelten Zellen wurden im Anschluss mit dem vorbehandelten Virus für 1h infiziert. Danach wurde die Virussuspension abgesaugt und die Zellen mit Infektionsmedium mit der entsprechenden Substanz für 36h p.i. inkubiert. Die Virustiter wurden mit dem FFU-Assay [A] und dem HA-Assay [B] bestimmt und die gewonnenen Daten logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (**P<0,005) (n=2). Als Kontrolle (weißer Balken) diente das unbehandelte

Ergebnisse

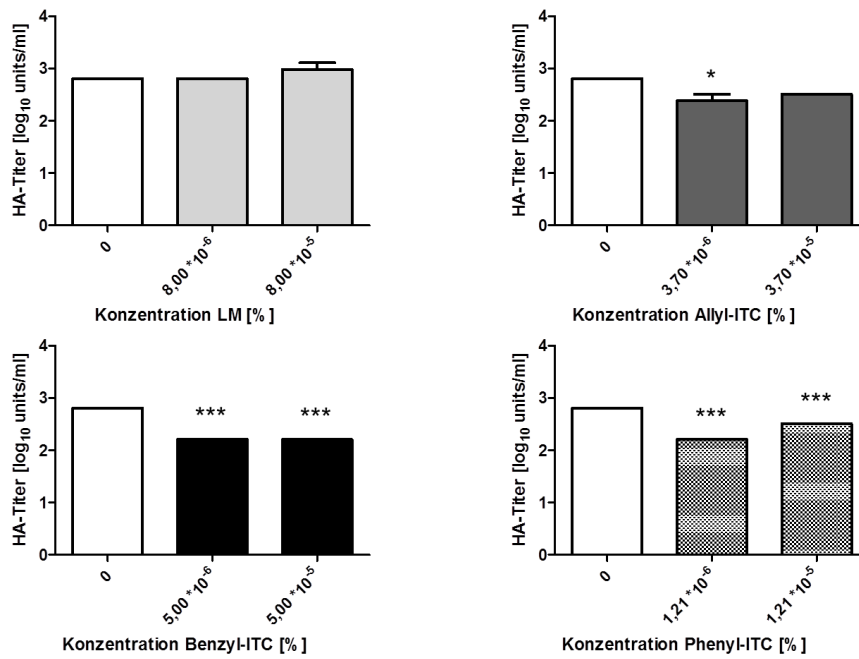
Virus auf unbehandelten Zellen. Wie in der Abbildung gezeigt, wurden dem Lösungsmittel und den ITCs verschiedene Farben bzw. Schattierungen zugeordnet.

Ergebnisse

A



B



Ergebnisse

Abbildung 13: Antivirale Wirksamkeit der einzelnen ITCs und des LMs gegen die IAV-Vermehrung in A549 Zellen. A549 Zellen wurden mit dem IAV (MOI=0,01) infiziert. Um die maximal mögliche Wirkung zu erzielen, wurden das Virus und die Zellen für 1h mit den ITCs oder dem LM vorinkubiert, die vorbehandelten Zellen wurden im Anschluss mit dem vorbehandelten Virus parallel für 1h infiziert. Danach wurde die Virussuspension abgesaugt und die Zellen mit trypsinhaltigem Infektionsmedium mit der entsprechenden Substanz für 36h p.i. inkubiert. Die Virustiter wurden mit dem FFU-Assay [A] und dem HA-Assay [B] bestimmt und die gewonnenen Daten logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (*P<0,05; ***P<0,0005) (n=2). Als Kontrolle (weißer Balken) diente das unbehandelte Virus auf unbehandelten Zellen. Wie in der Abbildung gezeigt, wurden dem Lösungsmittel und den ITCs verschiedene Farben bzw. Schattierungen zugeordnet.

Tabelle 8: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder den ITCs auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach Behandlung mit dem ITC/ LM wurde der infektiöse Virustiter (FFU/ml) im Verhältnis zu der unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert.

Konzentration	Reduktion des Virus Titers [%] nach Behandlung mit:								
	Viruskontrolle	LM [%]		Allyl-ITC [%]		Benzyl-ITC [%]		Phenyl-ITC [%]	
	-	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$
MDCK-II	0	-67,5	8,4	73,8	73,0	56,8	90,5	85,5	86,3
A549	0	15,0	18,0	90,0	86,0	88,0	91,0	91,0	88,0

Die in Abbildung 12 und 13 dargestellten Graphiken zeigen die antivirale Wirksamkeit der einzelnen Senföle und des Lösungsmittels auf die Vermehrung des H1N1pdm09 auf MDCK-II (Abb. 12) und A549 Zellen (Abb. 13). Zur Vereinfachung, sind in Tabelle 8 die mit dem FFU-Assay ermittelten infektiösen Virustiterreduktionen in Prozent bezogen auf die Kontrolle (unbehandeltes Virus und unbehandelte Zellen) dargestellt. Wie auch in früheren Veröffentlichungen beschrieben (150), zeigt die Behandlung mit dem LM einen schwachen antiviralen Effekt, sowohl auf MDCK-II als auch auf A549 Zellen (max. 8,4% bzw. 18,0%). Dieser Effekt ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den einzelnen ITCs. Diese zeigen Titerreduktionen von bis zu 91%, wobei die Wirkung auf A549 Zellen v.a. nach Behandlung mit Allyl-ITC ausgeprägter als auf MDCK-II Zellen ist. Generell scheint das Phenyl-ITC im Durchschnitt auf beiden Zelllinien die beste Wirkung zu entfalten.

Ergebnisse

Tabelle 9: Reduktion der Gesamtmenge der Viruspartikel [%] nach Behandlung mit dem LM oder den ITCs auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach Behandlung mit dem LM bzw. den ITCs wurde der HA-Titer (HAU/ml) im Verhältnis zu der unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert.

		Reduktion des Virus Titers [%] nach Behandlung mit:							
	Viruskontrolle	LM [%]		Allyl-ITC [%]		Benzyl-ITC [%]		Phenyl-ITC [%]	
Konzentration	-	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$
MDCK-II	0	0,0	0,0	75,0	50,0	66,7	91,7	75,0	75,0
A549	0	0,0	-50,0	62,5	50,0	75,0	75,0	75,0	50,0

Der HAU-Titer spiegelt das Ergebnis des FFU-Titers wider und ist in Abbildung 12 und 13 unter [B] dargestellt. Das bedeutet, dass es durch die Behandlung mit den einzelnen ITCs auf beiden Zelllinien zur Reduktion des infektiösen Virustiters und auch der Gesamtmenge der Viruspartikel kommt. Eine Übersicht über die Titerreduktion der Gesamtpartikelmenge (HAU) im Verhältnis zur unbehandelten Viruskontrolle zeigt Tabelle 9.

3.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen das pandemische Influenzavirus A/Hamburg/01/09 [H1N1pdm09]

Nach Testung der einzelnen in Angocin® Anti-Infekt N enthaltenen ITCs, folgte die Testung des SG der drei ITCs gemäß ihrem Verhältnis in Angocin® Anti-Infekt N. Die Verdünnungen bzw. Konzentrationen wurden wie in Tabelle 10 beschrieben gewählt und getestet. Bei der Berechnung der CC_{50} -Werte des SG, wurden die Konzentrationen der Verdünnungen des SG bzw. des LM verwendet und nicht die der einzelnen Komponenten. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die getesteten Konzentrationen des SG und der darin enthaltenen Konzentrationen der ITCs und des LM.

3.2.1 Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf MDCK-II und A549 Zellen

Zur Ermittlung der Zytotoxizität des SG und dessen LM wurde wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben zunächst ein MTT-Test durchgeführt. Auch hier wurden sowohl MDCK-II- sowie A549-Zellen verwendet. Insgesamt wurden pro Zelllinie für einen Zeitpunkt von 36 Stunden 9 Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-10} untersucht.

Ergebnisse

Tabelle 10: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs. In der ersten Zeile findet sich die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden Konzentrationen von 10^{-2} bis $10^{-10}\%$.

Konzentration des Substanzgemischs [%]		LM [%]	Konzentration der ITCs im Substanzgemisch [%]		
			Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	100	-	37,90%	50%	12,10%
0,01	10^{-2}	8×10^{-3}	$3,79 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,21 \times 10^{-3}$
0,001	10^{-3}	8×10^{-4}	$3,79 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
0,0001	10^{-4}	8×10^{-5}	$3,79 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-5}$
0,00001	10^{-5}	8×10^{-6}	$3,79 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-6}$
0,000001	10^{-6}	8×10^{-7}	$3,79 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-7}$
0,0000001	10^{-7}	8×10^{-8}	$3,79 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-8}$
0,00000001	10^{-8}	8×10^{-9}	$3,79 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-9}$	$1,21 \times 10^{-9}$
0,000000001	10^{-9}	8×10^{-10}	$3,79 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-10}$
0,0000000001	10^{-10}	8×10^{-11}	$3,79 \times 10^{-11}$	$5,0 \times 10^{-11}$	$1,21 \times 10^{-11}$

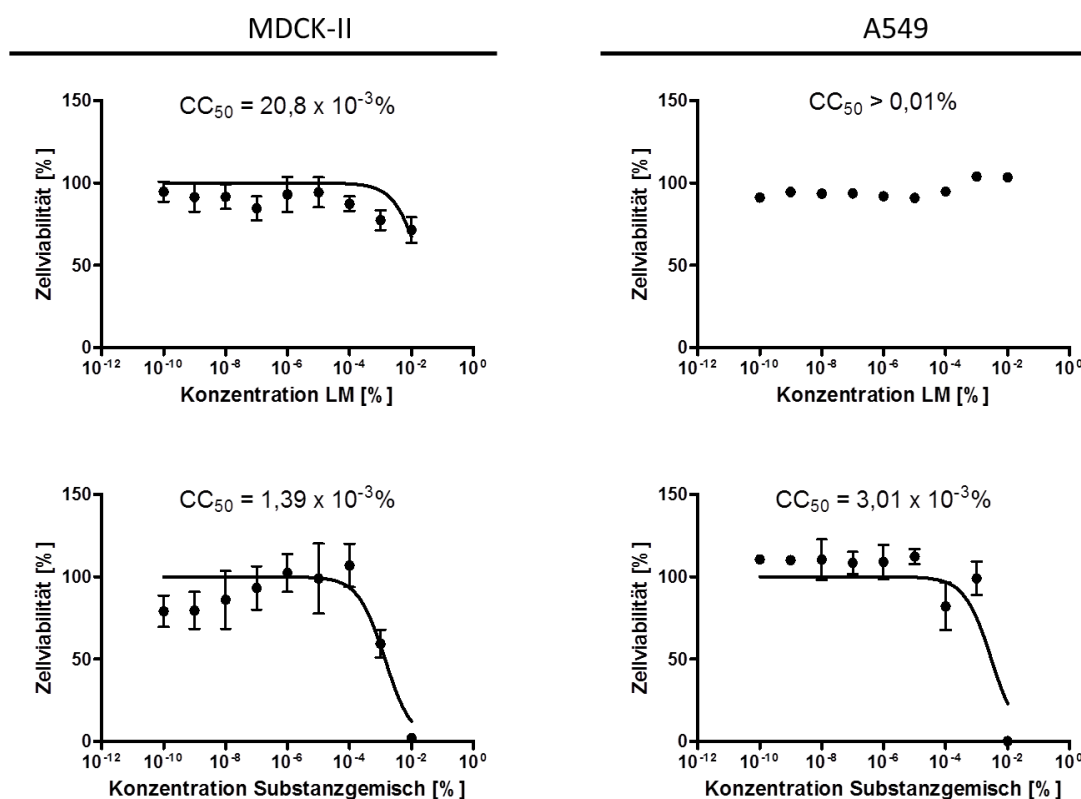


Abbildung 14: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von MDCK-II und A549 Zellen. Nach der Behandlung der MDCK-II Zellen (linke Seite) und A549 Zellen (rechte Seite) mit dem SG und dessen LM in den angegebenen Konzentrationen, wurde die zytotoxische Wirkung mittels MTT-Test nach 36h Inkubationszeit ausgewertet. Aus den Messwerten (n=8) der behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet und in Prozent dargestellt. Die CC_{50} -Werte wurden via nicht-linearer Regression berechnet.

Ergebnisse

Bei der Zytotoxizitätstestung zeigte sich eine bessere Verträglichkeit der Zellen gegenüber dem LM in den verschiedenen Konzentrationen als gegenüber dem SG bestehend aus den 3 ITCs. Auf A549 Zellen liegt der CC_{50} -Wert des LM sogar oberhalb der höchsten getesteten Konzentration (s. Abb. 14). Die Bestimmung der Zytotoxizität des SG und des LM zeigt generell ähnliche Ergebnisse wie die unter Punkt 3.1.1 getesteten Einzelsubstanzen. Die CC_{50} -Werte liegen in etwa zwischen 10^{-3} und $10^{-4}\%$. Der auf den MDCK-II und den A549 Zellen bestimmte CC_{50} -Wert des SG liegt in etwa in der Mitte der CC_{50} -Werte der Einzelsubstanzen. Generell gesehen scheinen die A549 Zellen das SG und das LM etwas besser zu vertragen.

3.2.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung von H1N1pdm09

Entsprechend der Ergebnisse des MTT-Tests unter Punkt 3.2.1 wurden für die Testung der antiviralen Aktivität des SG zwei nicht zytotoxische Konzentrationen gewählt (s. Tabelle 11). Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.2 bereits beschrieben.

Tabelle 11: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des SG und LM. Die erste Zeile zeigt die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden die Konzentrationen von 10^{-3} und $10^{-5}\%$.

Konzentration Substanzgemisch [%]	Komponenten des Substanzgemischs				
	LM [%]	LM [%]	Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	-	-	37,9	50	12,1
10^{-3}	$8,00 \cdot 10^{-4}$	$8,00 \cdot 10^{-4}$	$3,79 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-4}$	$1,21 \cdot 10^{-4}$
10^{-5}	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$

Ergebnisse

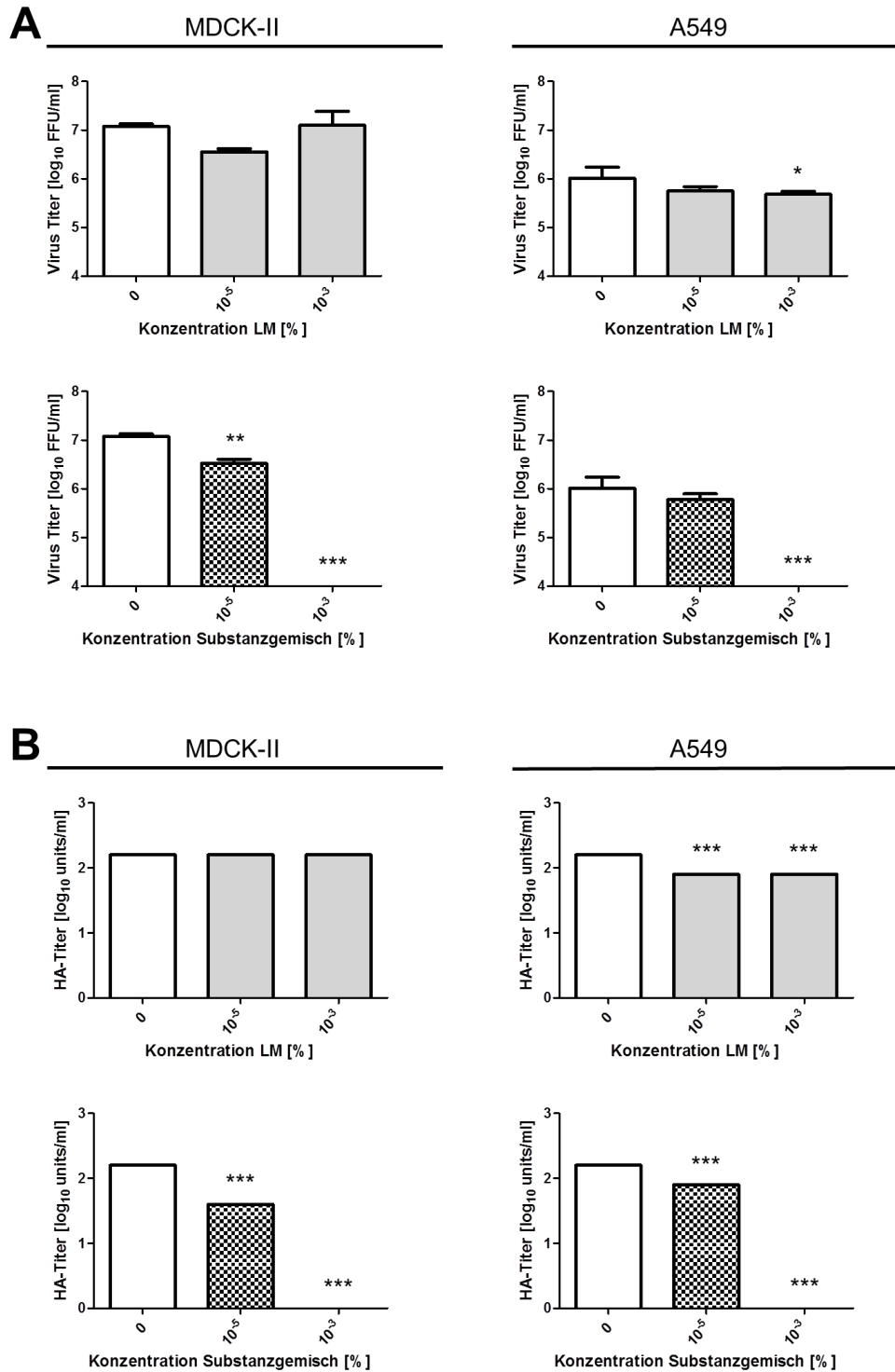


Abbildung 15: Antivirale Wirksamkeit des SG und des LM gegen die IAV-Vermehrung in MDCK-II und A549 Zellen. Die Zellen wurden mit dem H1N1pdm09 (MOI=0,01) infiziert. Um die maximal mögliche Wirkung zu erzielen, wurden das Virus und die Zellen parallel für 1h mit den ITCs oder dem LM vorinkubiert. Die vorbehandelten Zellen wurden im Anschluss mit dem vorbehandelten Virus für 1h infiziert. Danach wurde die Virussuspension abgesaugt und die Zellen mit trypsinhaltigem Infektionsmedium mit SG oder LM für 36h p.i. inkubiert. Die Virustiter wurden mit dem FFU-Assay [A] und dem HA-Assay [B] bestimmt und die gewonnenen Daten logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (*P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005). Als Kontrolle (weißer Balken) diente die Infektion von

Ergebnisse

unbehandelten Zellen mit unbehandeltem Virus. Wie in der Abbildung gezeigt, wurden dem SG und dem LM verschiedene Farben bzw. Schattierungen zugeordnet.

Tabelle 12: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder dem SG auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen nach Infektion mit IAV. Der Virustiter nach Behandlung mit dem LM/SG wurde im Verhältnis zu der unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert.

Konzentration bezogen auf das Substanzgemisch	Reduktion des Virustiters [%] nach Behandlung mit:				
	Viruskontrolle	LM [%]		Substanzgemisch [%]	
	-	10^{-5}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-3}
MDCK-II	0	70,0	-4,3	72,1	100,0
A549	0	45,3	53,1	41,6	100,0

Wie aus Abbildung 15 und der Tabelle 12 zu entnehmen ist, zeigte sich in diesem Experiment eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion des Virustiters nach Behandlung mit dem SG, wobei die Virustiterreduktion der niedrigeren Konzentration (10^{-5}) in der Größenordnung des LM liegt. In der höheren Konzentration (10^{-3}) zeigt sich für beide Zelllinien eine Reduktion des Virustiters um 100%. Es kam hier also durch die Behandlung mit dem SG zu einer vollständigen Inhibierung der Virusvermehrung. Die unter Abbildung 15 [B] dargestellten HAU-Titer spiegeln dies ebenfalls wider.

3.3 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen das humane Coronavirus HCoV-229E

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass das SG auf den beiden getesteten Zelllinien eine bessere antivirale Wirkung gegen H1N1pdm09 erzielte als die Einzelsubstanzen, wurde im Nachfolgenden nur die Wirkung des SG und nicht die der Einzelsubstanzen auf die Vermehrung des HCoV-229E getestet.

3.3.1 Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf HuH7 Zellen

Wie bereits unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, erfolgte zunächst die Testung der Zytotoxizität des SG und des LM auf HuH7 Zellen. Getestet wurden die unter Tabelle 13 aufgelisteten Konzentrationen.

Ergebnisse

Tabelle 13: Übersicht der im MTT-Test auf HuH7 verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs. In der ersten Zeile findet sich die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-11} %.

Konzentration des Substanzgemischs [%]		LM [%]	Konzentration der ITCs im Substanzgemisch [%]		
			Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	100	-	37,90%	50%	12,10%
0,1	10^{-1}	8×10^{-2}	$3,79 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-2}$	$1,21 \times 10^{-2}$
0,01	10^{-2}	8×10^{-3}	$3,79 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,21 \times 10^{-3}$
0,001	10^{-3}	8×10^{-4}	$3,79 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
0,0001	10^{-4}	8×10^{-5}	$3,79 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-5}$
0,00001	10^{-5}	8×10^{-6}	$3,79 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-6}$
0,000001	10^{-6}	8×10^{-7}	$3,79 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-7}$
0,0000001	10^{-7}	8×10^{-8}	$3,79 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-8}$
0,00000001	10^{-8}	8×10^{-9}	$3,79 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-9}$	$1,21 \times 10^{-9}$
0,000000001	10^{-9}	8×10^{-10}	$3,79 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-10}$
0,0000000001	10^{-10}	8×10^{-11}	$3,79 \times 10^{-11}$	$5,0 \times 10^{-11}$	$1,21 \times 10^{-11}$
0,00000000001	10^{-11}	8×10^{-12}	$3,79 \times 10^{-12}$	$5,0 \times 10^{-12}$	$1,21 \times 10^{-12}$

Ergebnisse

HuH7 Zellen

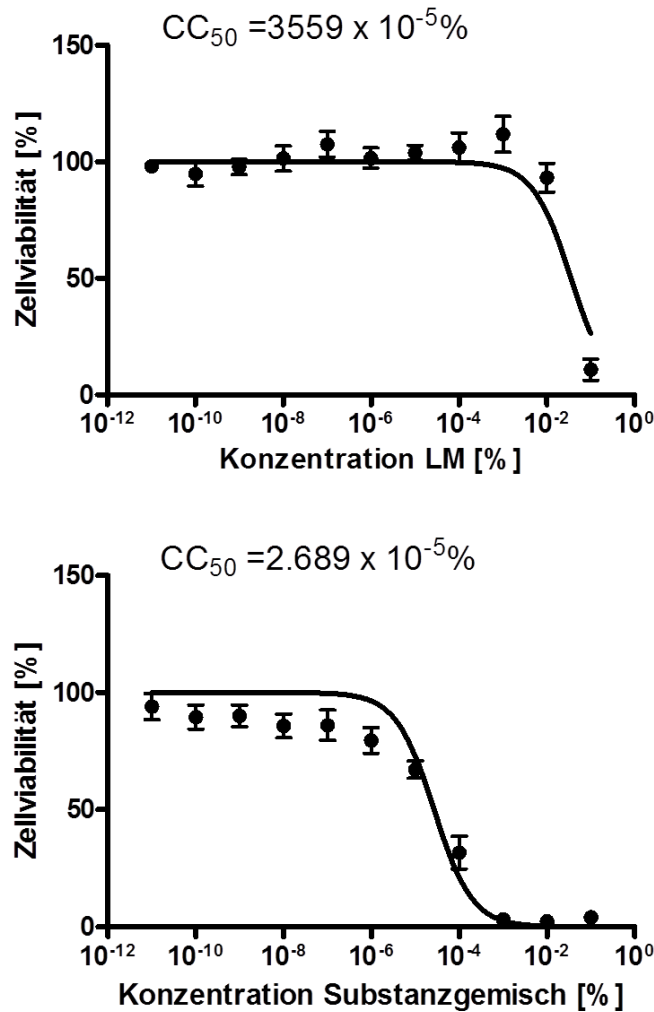


Abbildung 16: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von HuH7 Zellen. Nach einer Behandlung von HuH7 Zellen mit dem SG und dessen LM in den angegebenen Konzentrationen, wurde die zytotoxische Wirkung mittels MTT-Test nach 24h Inkubation ausgewertet. Aus den Messwerten (n=8) der behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet und in Prozent dargestellt. Die CC₅₀-Werte wurden via nicht-linearer Regression berechnet.

Abbildung 16 stellt die Ergebnisse des MTT Tests auf HuH7 Zellen dar. Vergleichend zu den Experimenten aus Abschnitt 3.3.1 (MDCK-II- und A549-Zellen) zeigte sich nach Behandlung mit den HuH7 Zellen eine schlechtere Verträglichkeit des SG.

3.3.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung des HCoV-229E

Zur Testung der antiviralen Wirksamkeit des SG gegen HCoV-229E wurden drei Konzentrationen gewählt. Um einen zytotoxischen Effekt des SG auszuschließen wurden aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Experiments Konzentrationen von 10⁻⁶-

Ergebnisse

10^{-8} gewählt (s. Tabelle 14). Das Experiment wurde äquivalent zu den unter Abschnitt 3.1.2 und 3.2.2 dargestellten Experimenten durchgeführt, sodass das SG auch hier vor, während und nach der Infektion permanent anwesend war. Die Virusüberstände wurden nach 24h p.i. gewonnen. Der infektiöse Titer wurde mit dem PFU-Assay bestimmt und unter Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des SG und des LM. In der ersten Zeile findet sich die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden die Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} %.

Konzentration Substanzgemisch [%]	Komponenten des Substanzgemischs				
	LM [%]	LM [%]	Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	-	-	37,9	50	12,1
10^{-5}	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$
10^{-6}	$8,00 \cdot 10^{-7}$	$8,00 \cdot 10^{-7}$	$3,79 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	$1,21 \cdot 10^{-7}$
10^{-7}	$8,00 \cdot 10^{-8}$	$8,00 \cdot 10^{-8}$	$3,79 \cdot 10^{-8}$	$5,00 \cdot 10^{-8}$	$1,21 \cdot 10^{-8}$

Ergebnisse

HCoV-229E

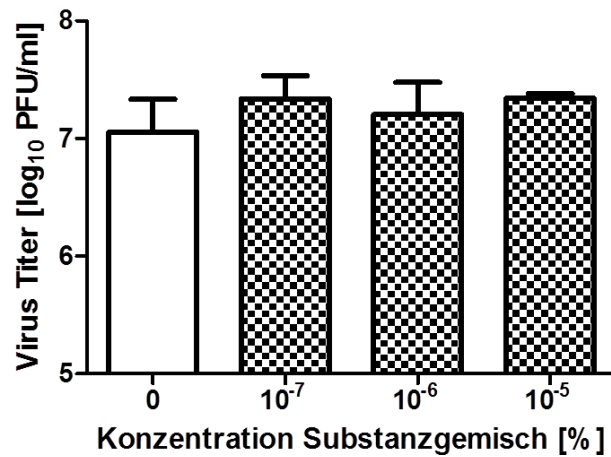
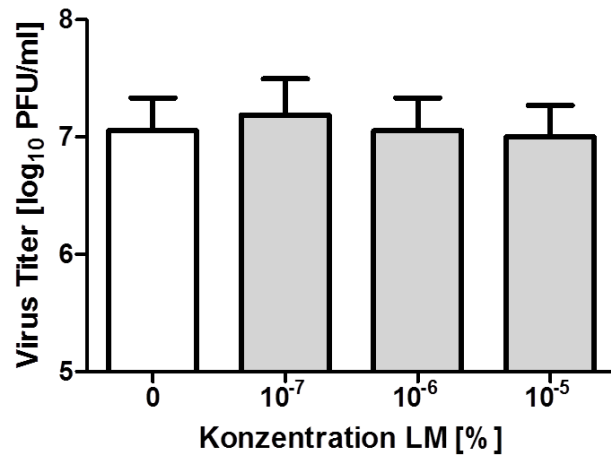


Abbildung 17: Antivirale Wirksamkeit des SG und des LM gegen die HCoV-229E-Vermehrung in HuH7 Zellen.

Die Zellen wurden mit dem HCoV (MOI=0,01) infiziert. Um die maximal mögliche Wirkung zu erzielen, wurden das Virus und die Zellen für 1h mit dem Substanzgemisch oder dem LM vorinkubiert, die vorbehandelten Zellen wurden im Anschluss mit dem vorbehandelten Virus für 1h infiziert. Danach wurde die Virussuspension abgesaugt und die Zellen mit Infektionsmedium mit der entsprechenden Substanz für 24h p.i. inkubiert. Die Virustiter wurden mit dem PFU-Assay bestimmt und die gewonnenen Daten logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet. Als Kontrolle (weißer Balken) diente das unbehandelte Virus auf unbehandelten Zellen. Wie in der Abbildung gezeigt, wurden dem Lösungsmittel und dem Substanzgemisch verschiedene Farben bzw. Schattierungen zugeordnet.

Ergebnisse

Tabelle 15: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder dem SG auf HuH7 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen nach Infektion mit HCoV-229E. Der Virustiter nach Behandlung mit dem LM/SG wurde im Verhältnis zu der unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, dass es durch die entsprechende Behandlung zu einem Virustiteranstieg im Vergleich zu der Virustiterkontrolle gekommen ist.

	Reduktion des Virustiters [%] nach Behandlung mit:						
	Viruskontrolle	LM [%]			Substanzgemisch [%]		
Konzentration bezogen auf das Substanzgemisch	-	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
HCoV-229E	0	-35,3	0	11,8	-47,1	-41,2	-29,4

Tabelle 15 zeigt die Reduktion des Virustiters nach Behandlung mit dem SG und dem LM. Wie bereits den Graphiken unter Abbildung 17 zu entnehmen ist, zeigte sich keine antivirale Wirksamkeit des SG auf die Vermehrung des HCoV-229E.

3.4 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs gegen die humanen Rhinoviren HRV1A und HRV16

In Abschnitt 3.2 und 3.3 wurde bereits die antivirale Wirksamkeit des SG gegen das IAV H1N1pdm09 und das HCoV-229E dargestellt. Nun sollte die antivirale Wirksamkeit des SG gegen das humane Rhinovirus (HRV1A und HRV16), den dritten wichtigen Erreger von respiratorischen Virusinfektionen, getestet werden.

3.4.1 Testung der Zytotoxizität des Substanzgemischs und dessen Lösungsmittel auf HeLa Ohio Zellen

Die Durchführung der Zytotoxizitätstestung auf HeLa Ohio Zellen erfolgte äquivalent zu den Experimenten unter Abschnitt 3.2.1 und 3.3.1. Tabelle 16 gibt eine Übersicht über die neun getesteten Konzentrationen. Die Zellen wurden insgesamt 48h mit dem SG bzw. mit dem LM inkubiert.

Ergebnisse

Tabelle 16: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen. In der ersten Zeile findet sich die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden Konzentrationen von 10^{-2} bis $10^{-10}\%$.

Konzentration des Substanzgemischs [%]		LM [%]	Konzentration der ITCs im Substanzgemisch [%]		
			Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	100	-	37,90%	50%	12,10%
0,01	10^{-2}	8×10^{-3}	$3,79 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,21 \times 10^{-3}$
0,001	10^{-3}	8×10^{-4}	$3,79 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
0,0001	10^{-4}	8×10^{-5}	$3,79 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-5}$
0,00001	10^{-5}	8×10^{-6}	$3,79 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-6}$
0,000001	10^{-6}	8×10^{-7}	$3,79 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-7}$
0,0000001	10^{-7}	8×10^{-8}	$3,79 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-8}$
0,00000001	10^{-8}	8×10^{-9}	$3,79 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-9}$	$1,21 \times 10^{-9}$
0,000000001	10^{-9}	8×10^{-10}	$3,79 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-10}$
0,0000000001	10^{-10}	8×10^{-11}	$3,79 \times 10^{-11}$	$5,0 \times 10^{-11}$	$1,21 \times 10^{-11}$

HeLa Ohio

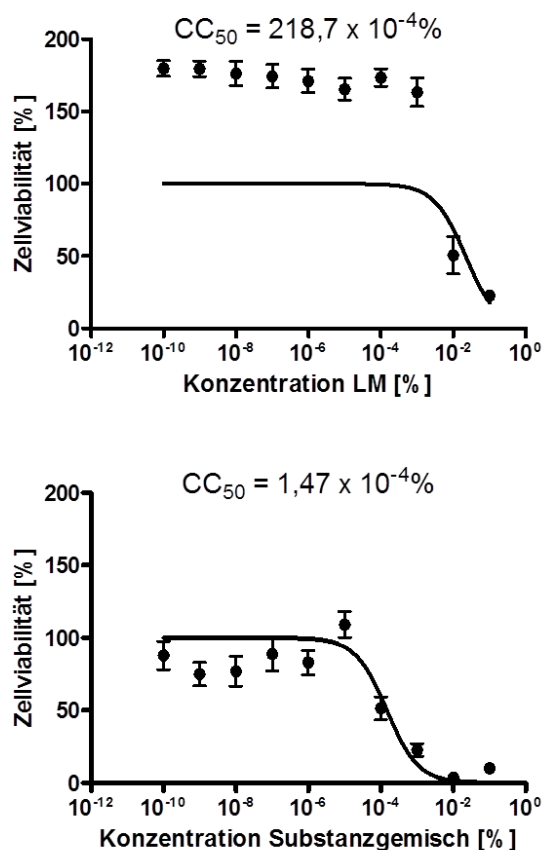


Abbildung 18: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von HeLa Ohio Zellen. Nach einer Behandlung von HeLa Ohio Zellen mit dem SG und dessen LM in den angegebenen Konzentrationen, wurde die zytotoxische Wirkung mittels MTT-Test nach 48h Inkubation ausgewertet. Aus den Messwerten (n=8) der behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet und in Prozent dargestellt. Die CC₅₀-Werte wurden via nicht-linearer Regression berechnet.

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Zytotoxizitätstests. Die CC₅₀-Werte wurden auf Grundlage des MTT-Tests berechnet und sind der Abbildung zu entnehmen. Auch in diesem Experiment zeigte sich eine bessere Verträglichkeit der verschiedenen Konzentrationen des LM gegenüber denen des SG.

3.4.2 Testung der antiviralen Wirksamkeit des Substanzgemischs auf die Vermehrung des HRV1A und des HRV16

Zur Testung der antiviralen Wirksamkeit des LM und des SG gegen HRV1A (Vertreter der Minorgruppe, LDL-Rezeptor) und HRV16 (Vertreter der Majorgruppe, ICAM-1) (124) wurden Konzentrationen im nicht-toxischen Bereich gewählt. Basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 3.4.1 wurden drei Konzentrationen (10⁻⁴ bis 10⁻⁶) gewählt. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Konzentrationen.

Ergebnisse

Tabelle 17: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des LMs und des SGs. In der ersten Zeile findet sich die Übersicht der Konzentrationen ausgehend von der Annahme eines unverdünnten Substanzgemischs. Getestet wurden die Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-6} %.

Konzentration des Substanzgemischs [%]	LM [%]	Komponenten des Substanzgemischs			
		LM [%]	Allyl-ITC [%]	BenzyI-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	-	-	37,9	50	12,1
10^{-4}	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$3,79 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$
10^{-5}	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$3,79 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-6}$
10^{-6}	$8,00 \cdot 10^{-7}$	$8,00 \cdot 10^{-7}$	$3,79 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	$1,21 \cdot 10^{-7}$

HeLa Ohio Zellen wurden entweder mit HRV1A oder mit HRV16 infiziert. Hierzu wurde zunächst eine Virusverdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 der Virusstocks in Infektionsmedium angefertigt, welches das LM bzw. das SG in der jeweiligen Konzentration enthielt, und damit die HeLa Ohio Zellen infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48h p.i. mit LM/SG im Infektionsmedium, erfolgte die Bestimmung des Virustiters mit der unter Abschnitt 2.2.2.4 erläuterten Endpunkttitration.

Ergebnisse

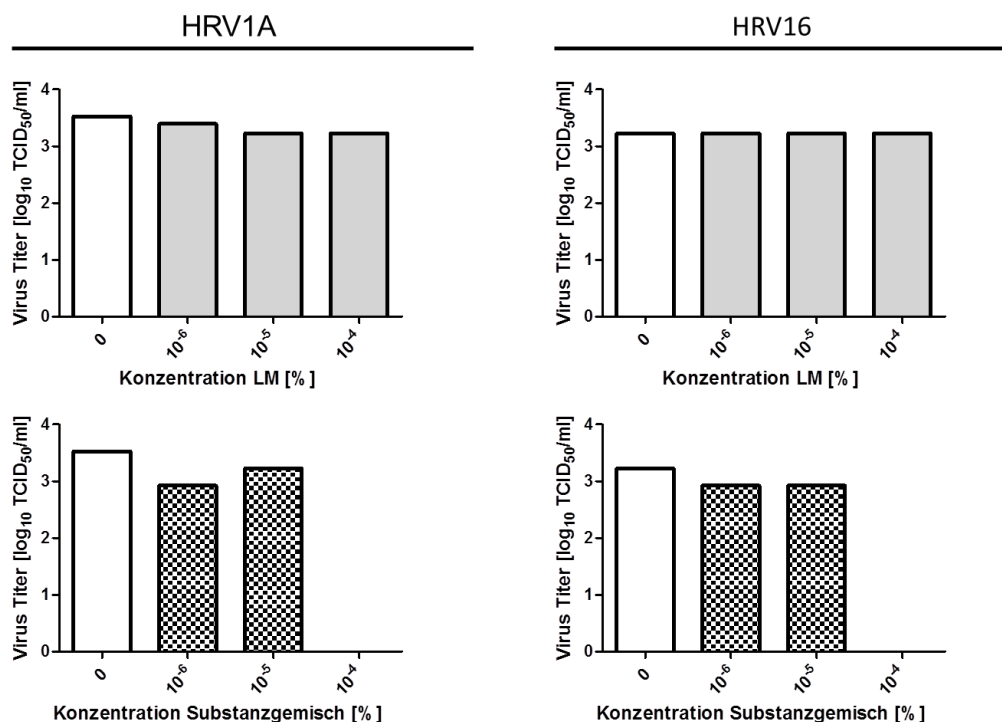


Abbildung 19: Antivirale Wirksamkeit von SG und LM gegen die HRV1A- und HRV16-Vermehrung in HeLa Ohio-Zellen. HeLa Ohio Zellen wurden mit HRV1A und HRV16 in einer Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:256 in Infektionsmedium) infiziert (n=3). Dem Infektionsmedium wurde vorher das SG oder das LM in der jeweiligen Konzentration zugefügt und die Zellen für 48h inkubiert. Mittels Bestimmung der Konzentration bei der die Zellen vollständig zerstört wurden (zytopathogener Effekt des Virus), konnte nach der Berechnung von Reed und Muench der vorhandene Virustiter ermittelt bzw. berechnet und als TCID₅₀/ml angegeben werden. Die gewonnenen Daten wurden logarithmisch aufgetragen. Als Kontrolle (weißer Balken) diente das unbehandelte Virus auf unbehandelten Zellen. Wie in der Abbildung gezeigt, wurden dem LM und dem SG verschiedene Farben bzw. Schattierungen zugeordnet.

Tabelle 18: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung von HRV1A- und HRV16-infizierten HeLa Ohio Zellen mit LM oder SG in unterschiedlichen Konzentrationen. Der Virustiter nach Behandlung mit dem LM/SG wurde im Verhältnis zu der unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert.

Konzentration bezogen auf das Substanzgemisch	Reduktion des Virustiters [%] nach Behandlung mit:						
	Viruskontrolle	LM [%]			Substanzgemisch [%]		
		-	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
HRV 1A	0	26,4	49,9	49,9	75,0	49,9	100,0
HRV 16	0	0	0	0	50,1	50,1	100,0

Abbildung 19 und Tabelle 18 zeigen die Ergebnisse des Experiments. Die Behandlung mit dem LM hatte keinen antiviralen Effekt auf das der Majorgruppe angehörige HRV16 und zeigte somit auch keine Titerreduktion. Die Behandlung des HRV16 mit dem SG

Ergebnisse

zeigte in der höchsten Konzentration (10^{-4}) eine 100%ige Titerreduktion und in den beiden übrigen getesteten Konzentrationen eine ca. 50%ige Titerreduktion.

Während das der Minorgruppe zugehörige HRV1A bereits nach Behandlung mit dem LM eine Titerreduktion von ca. 50% zeigte (für die Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-5}), zeigte die Behandlung mit dem SG in der höchsten Konzentration wie auch für das HRV16 eine Titerreduktion von 100%. Bei den beiden niedrigeren Konzentrationen (10^{-5} und 10^{-6}) zeigte sich im Vergleich mit dem LM kein Unterschied in der Hemmung, sodass die hier beobachtete Hemmung auf die Wirkung des LM zurückzuführen ist.

3.5 Untersuchungen zum Angriffspunkt des Substanzgemischs im Vermehrungszyklus von H1N1pdm09

Zur näheren Eingrenzung, an welcher Stelle des Infektionszyklus des H1N1pdm09 das Substanzgemisch wirkt, wurden insgesamt drei weitere Experimente durchgeführt. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen aus den vorangegangenen Experimenten, wurden dafür MDCK-II Zellen verwendet.

Tabelle 19: Übersicht der in den unter Punkt 3.5 verwendeten Konzentrationen des LMs und des SGs

Konzentration des Substanzgemischs [%]		LM [%]	Konzentration der ITCs im Substanzgemisch [%]		
			Allyl-ITC [%]	Benzyl-ITC [%]	Phenyl-ITC [%]
100	100	-	37,90%	50%	12,10%
0,01	10^{-2}	8×10^{-3}	$3,79 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$1,21 \times 10^{-3}$
0,001	10^{-3}	8×10^{-4}	$3,79 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}	$1,21 \times 10^{-4}$
0,0001	10^{-4}	8×10^{-5}	$3,79 \times 10^{-5}$	5×10^{-5}	$1,21 \times 10^{-5}$
0,00001	10^{-5}	8×10^{-6}	$3,79 \times 10^{-6}$	5×10^{-6}	$1,21 \times 10^{-6}$
0,000001	10^{-6}	8×10^{-7}	$3,79 \times 10^{-7}$	5×10^{-7}	$1,21 \times 10^{-7}$

3.5.1 Zugabe von LM/SG zu unterschiedlichen Zeitpunkten der H1N1pdm09-Infektion

Das Ziel dieser Untersuchung war es, durch Zugabe des SG oder des LM zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach der Infektion, eine Aussage über deren Wirkung auf den influenzaviralen Replikationszyklus treffen zu können. Dabei sollte untersucht werden, ob das SG eventuell die Bindung des Virus über das HA an die Zellen hemmt, oder/und die Sialinrezeptoren der Zellen blockiert werden, oder die inhibitorische Wirkung des SG intra-zellulär auf die Virusreplikation wirkt (Abb. 20). Zum näheren Verständnis der verschiedenen untersuchten Ansätze dient Tab. 19. Damit

Ergebnisse

eine toxische Wirkung des LM/SG ausgeschlossen werden konnte, wurde für dieses Experiment eine LM/SG Konzentration von $10^{-4}\%$ gewählt (darin enthaltene ITC-Konzentrationen s. Tab. 19). Die Inkubationsdauer der infizierten Zellen betrug diesmal nur 24h. Da es nach 36h Inkubation mit einer Konzentration $10^{-4}\%$ zu keiner toxischen Wirkung kommt (CC_{50} -Wert LM = $20,8 \times 10^{-3}\%$; SG = $1,39 \times 10^{-3}\%$, s. Abb. 11) ist davon auszugehen, dass nach 24h bei der gleichen Konzentration ebenfalls keine Zytotoxizität auftritt.

Zum besseren Verständnis der einzelnen experimentellen Ansätze wurde das in Abb. 20 gezeigte Experiment nachfolgend aufgeteilt um die experimentellen Fragestellungen in den folgenden Abschnitten anhand einzelner Abbildungen näher zu erläutern. Dabei wurde die Balkennummerierung in Abb. 20, entsprechend der unter Tab. 20 aufgeführten Behandlungsansätze beibehalten.

Ergebnisse

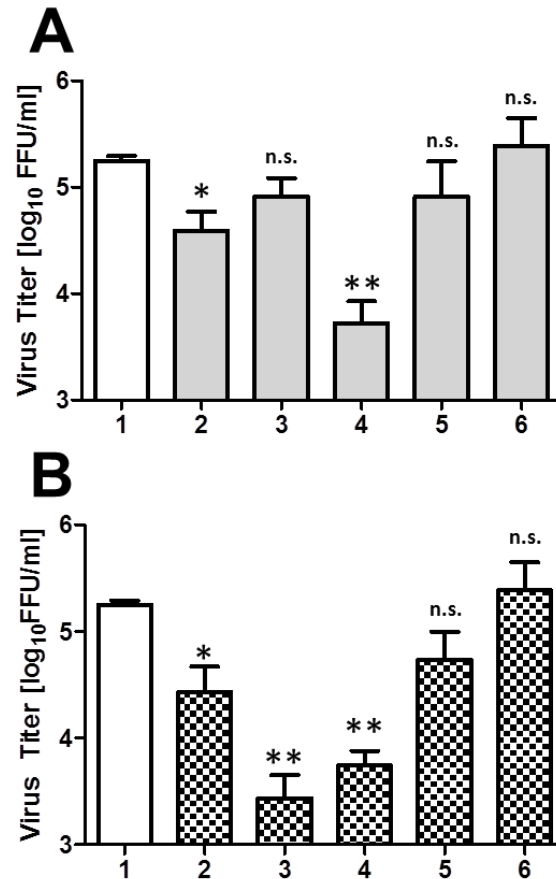


Abbildung 20: Antivirale Wirksamkeit von SG und LM nach der Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der IAV-Infektion. MDCK-II Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit dem IAV infiziert und zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion/ des Infektionszyklus mit dem LM [A] oder dem SG [B] behandelt (n=2). Getestet wurde eine Konzentration des LM/SG von 10⁻⁴%. Die Proben wurden 24h p.i. gewonnen und mittels FFU-Assay titriert. Der Virustiter wurde logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (*P>0,05, **P>0,005, n.s. = nicht signifikant).

Tabelle 20: Die Tabelle zeigt das Behandlungsschema zu dem unter Abbildung 20 dargestellten Experiment.

	Behandlung	1	2	3	4	5	6
A	Inkubation der Zellen und des Virus während der Infektion mit LM/ Substanzgemisch	-	-	+	-	+	-
B	Vorinkubation der Zellen mit LM/ Substanzgemisch	-	-	+	+	-	+
C	Inkubation mit LM/ Substanzgemisch p.i.	-	+	+	+	-	-

3.5.1.1 Beeinflusst eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Substanzgemisch die Infizierbarkeit der Zellen?

Zur Überprüfung ob das LM/SG den Virustiter reduziert, indem es die Infektion (Adsorption/ Eintritt) der MDCK-II Zellen durch H1N1pdm09 beeinflusst, wurden nur

Ergebnisse

die Zellen mit LM/SG für 1h vorinkubiert, anschließend infiziert (MOI=0,01), für 24h ohne LM/SG inkubiert und anschließend der Virustiter ermittelt (s. Ansatz #6, Tab. 20).

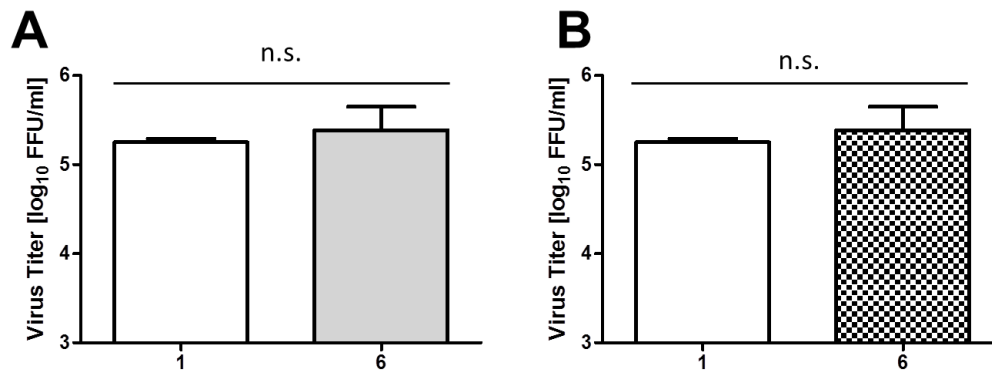


Abbildung 21: Effekt von SG und LM auf die IAV-Vermehrung nach Vorinkubation der MDCK-II Zellen mit LM oder SG und anschließender Infektion mit dem unbehandelten H1N1pdm09. MDCK-II Zellen wurden 1h vor der Infektion mit LM und SG (10⁻⁴%) behandelt, danach gewaschen und mit LM/SG-freiem Medium infiziert (s. Balken 6). Nach 24h wurde der Virustiter bestimmt. Die Kontrolle (unbehandeltes Virus auf unbehandelten Zellen) ist als weißer Balken aufgetragen und mit einer 1 beschriftet. Der Virustiter wurde logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (n.s. = nicht signifikant).

Abbildung 21 zeigt, dass es zu keiner Reduktion des Virustiters nach alleiniger Vorinkubation der Zellen mit dem LM [A] oder dem SG [B] kommt. Es kommt vielmehr zu einem Anstieg des Virustiters. So zeigt sich nach Behandlung der Zellen mit dem LM ausschließlich vor der Infektion ein Virustiteranstieg von 84% (s. Tab. 21 Ansatz #6) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Nach Behandlung der Zellen mit dem SG ausschließlich vor der Infektion (s. Tab. 21 Ansatz #6) zeigt sich ebenfalls ein Virustiteranstieg von 36,7%. Eine hemmende Wirkung des SG oder des LMs vor der Infektion kann hiermit ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

Tabelle 21: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] bei unterschiedlicher Behandlung mit LM oder SG. Der Virustiter nach Behandlung mit dem LM/SG wurde ins Verhältnis zur unbehandelten Viruskontrolle gesetzt und im Anschluss davon subtrahiert. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, dass es durch die entsprechende Behandlung zu einem Virustiteranstieg im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle gekommen ist. Mit den Zahlen 1-6 sind die unterschiedlichen Ansätze bezeichnet, die Buchstaben A, B und C stehen für die jeweilige Behandlung während (A), vor (B) oder nach der Infektion (C).

	Behandlung			Reduktion des Virus Titers [%] nach Behandlung mit:	
	A	B	C	LM [%]	Substanzgemisch [%]
1	-	-	-	0	0
2	-	-	+	78,1	84,8
3	+	+	+	54,4	98,5
4	-	+	+	97,1	96,9
5	+	-	-	54,5	69,5
6	-	+	-	-84,0	-36,7

3.5.1.2 Beeinflusst die Virusvorbehandlung die Infektiosität von H1N1pdm09?

Zur Kontrolle ob das LM oder SG den Virustiter reduzieren, indem sie u.U. die Bindung des HAs an die zellulären Rezeptoren behindern und damit die Infektiosität von H1N1pdm09 beeinflussen, wurde das Virus mit LM/SG für 1h vorinkubiert. Anschließend wurden damit die unbehandelten Zellen infiziert (MOI= 0,01), für 24h ohne LM/SG inkubiert und anschließend der Virustiter ermittelt (s. Ansatz #5, Tab. 19).

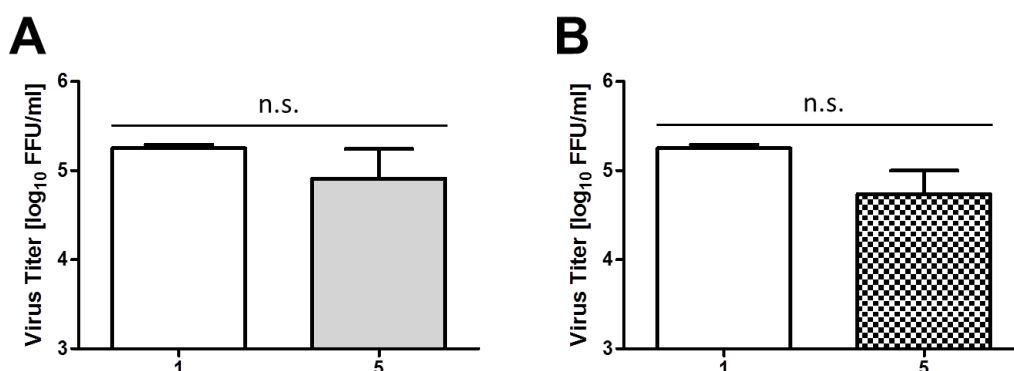


Abbildung 22: Effekt von LM und SG auf die IAV-Vermehrung nach Vorinkubation des Virus mit LM oder SG. H1N1pdm09 wurde für 1h mit LM [A] oder SG [B] vorbehandelt und die Zellen im Anschluss damit für 1h infiziert. Die Zellen wurden dann für 24h ohne LM/SG inkubiert, anschließend der Virustiter bestimmt und statistisch ausgewertet (n.s. = nicht signifikant).

Ergebnisse

Bei einem Vergleich der in den Abbildung 22 [A] und [B] dargestellten Balken 1 und 5, kann eine Reduktion des Virustiters konstatiert werden. Tabelle 21 ist zu entnehmen, dass es durch die Behandlung mit LM zu einer ca. 55%igen Reduktion und durch das SG zu einer ca. 70%igen Reduktion des Virustiters im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gekommen ist. Somit lässt sich sagen, dass die alleinige Virusvorbehandlung (s. Balken 5) einen Effekt auf die Virusvermehrung zu haben scheint, der aber auch teilweise durch die Wirkung des LM (siehe Abb. 22 [A]) verursacht wird. Nach Abzug der virustiterreduzierenden Wirkung des LM bleibt so noch eine ca. 15% Wirkung, die auf das SG alleine zurückgeführt werden kann.

3.5.1.3 Beeinflusst das Substanzgemisch die intra-zelluläre Vermehrung von H1N1pdm09?

Zur Analyse ob das LM/SG den Virustiter reduziert, indem es die intra-zelluläre Virusvermehrung von H1N1pdm09 beeinflusst, wurden die Zellen mit LM/SG ausschließlich nach der Infektion (MOI=0,01) für 24h mit LM/SG inkubiert und anschließend der Virustiter ermittelt (s. Ansatz #2, Tab. 21).

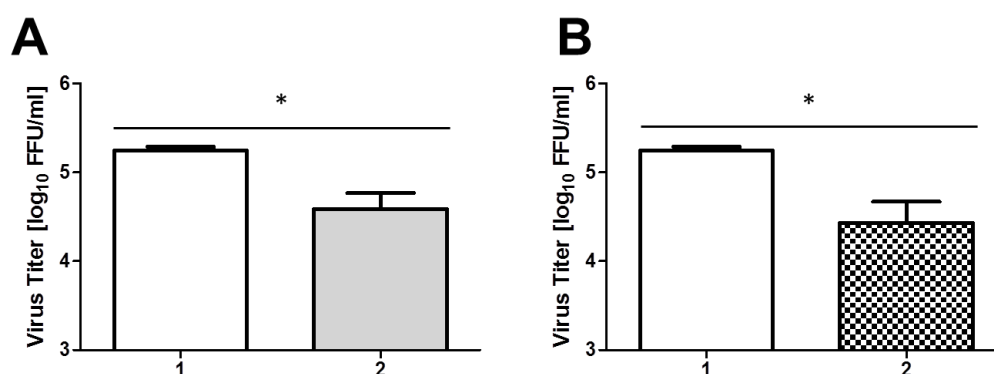


Abbildung 23: Effekt von LM und SG auf die intra-zelluläre IAV-Vermehrung. Balken 1 in [A] und [B] stellt den Virustiter ohne Zugabe von LM/SG dar. Balken 2 in [A] zeigt den infektiösen Virustiter nach Zugabe von LM direkt nach der Infektion, Balken 2 in [B] zeigt den Virustiter nach Zugabe des SG direkt nach der Infektion. Der Virustiter wurde logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (*P<0,05).

Balken 2 in Abbildung 23 stellt den Virustiter nach Zugabe von LM [A] oder SG [B] zu dem Infektionsmedium dar und zeigt, dass dieser Ansatz eine virustiterreduzierende Wirkung hat. Dabei führt das SG zu einer Reduktion des Virustiters von 84,8%. Das LM hat ebenfalls eine virustiterreduzierende Wirkung (78,1%). Diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie die des SG (s. Tab. 21). Es lässt sich also feststellen, dass im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle (siehe Balken 1 Abb. 23) das LM und das SG einen

Ergebnisse

signifikanten Einfluss ($P < 0,05$) auf die Virusvermehrung in der Zelle haben, also eine intra-zelluläre Wirkung entfalten. Allerdings beträgt der Unterschied zwischen LM und SG nur 6,7%, sodass die inhibitorische Wirkung größtenteils durch das LM verursacht wird.

3.5.1.4 Beeinflusst die Vorinkubation der Zellen zusammen mit der Anwesenheit des Substanzgemisches im Infektionsmedium die H1N1pdm09- Vermehrung?

Um festzustellen inwieweit die Vorbehandlung der Zellen und die Anwesenheit des LM/SG im Infektionsmedium den Virustiter reduziert, wurden die Zellen für 1h mit LM/SG vorinkubiert, danach die Zellen mit dem unbehandelten Virus infiziert (MOI=0,01, 1h) und nach der Infektion für 24h mit LM/SG im Infektionsmedium inkubiert bevor der Virustiter ermittelt wurde (s. Ansatz #4, Tab. 21).

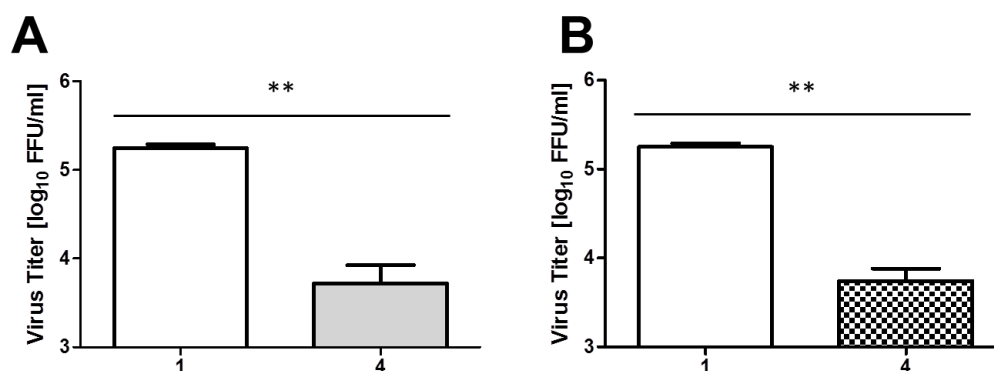


Abbildung 24: Effekt der Vorinkubation der Zellen mit dem LM oder SG in Kombination mit der Anwesenheit des LM oder SG im Infektionsmedium auf die Virusvermehrung. [A] zeigt den infektiösen Virustiter unter Anwesenheit vom LM, [B] zeigt den infektiösen Virustiter unter Anwesenheit des SG bei der Vorinkubation der Zellen sowie während der 24-stündigen Inkubationszeit. Die Zellen wurden für 1h mit LM/SG vorinkubiert, danach die Zellen mit dem unbehandelten Virus infiziert und anschließend für 24h mit LM/SG im Infektionsmedium inkubiert bevor der Virustiter bestimmt wurde. Der Virustiter wurde logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (** $P < 0,005$).

Behandelt man die Zellen vor der Infektion für 1h mit dem LM/SG und gibt das LM/SG nach der Infektion zu dem Infektionsmedium, ohne das Virus zu behandeln, so zeigt sich in beiden Ansätzen eine signifikante Reduktion des Virustiters ($P < 0,005$). Dabei reduziert das SG den Virustiter um 96,9%. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, wird der Virustiter jedoch auch durch die alleinige Zugabe des LM reduziert (97,1%), sodass die virustiterreduzierende Wirkung auf den Einfluss des LM und nicht auf die des SG zurückzuführen ist. Unter 3.5.1.1. wurde die alleinige Vorinkubation der Zellen mit dem

Ergebnisse

LM/SG vor der Infektion untersucht, wobei sich keine Titerreduktion zeigte. Unter 3.5.1.3. wurde die Wirkung des LM/SG nach alleiniger Zugabe zum Infektionsmedium nach der Infektion analysiert, wobei sich zwar eine Titerreduktion zeigte, allerdings hatte das SG keinen signifikanten Effekt. Der hier unter 3.5.1.4 dargestellte Effekt der Kombination aus den unter 3.5.1.1 und 3.5.1.3 beschriebenen Ansätzen, weist eine stärkere virustiterreduzierende Wirkung des SG auf, allerdings ist auch diese auf die Wirkung des LM zurückzuführen.

3.5.1.5 Beeinflusst die permanente Anwesenheit des Substanzgemisches die H1N1pdm09-Vermehrung?

Zur Untersuchung inwieweit die permanente Anwesenheit von LM/SG eine Inhibition der Virusvermehrung verursacht, wurden sowohl das Virus als auch die Zellen für 1h mit LM/SG vorinkubiert, danach die Zellen mit dem Inoculum infiziert (MOI=0,01, 1h) und nach der Infektion für 24h mit dem LM/SG im Infektionsmedium inkubiert bevor der Virustiter ermittelt wurde (s. Ansatz #3, Tab. 21).

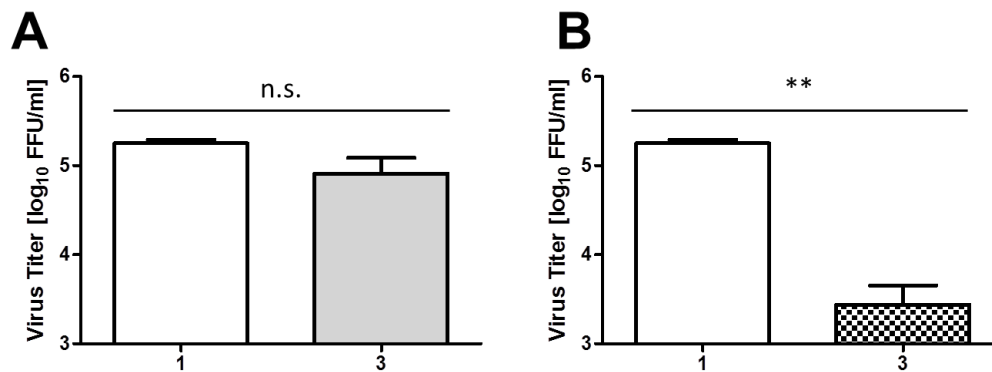


Abbildung 25: Effekt der permanenten Anwesenheit des LM/SG auf die IAV-Vermehrung. [A] zeigt den infektiösen Virustiter unter ständiger Anwesenheit von LM, [B] zeigt den infektiösen Virustiter unter ständiger Anwesenheit von SG. Das Virus und die Zellen wurden für 1h mit LM/SG vorinkubiert, danach die Zellen mit dem jeweiligen Inoculum infiziert und anschließend für 24h mit LM/SG im Infektionsmedium inkubiert bevor der Virustiter bestimmt wurde. Der Virustiter wurde logarithmisch aufgetragen und statistisch ausgewertet (**P<0,005, n.s.=nicht signifikant).

Balken 3 in Abbildung 25 stellt den Virustiter unter permanenter Anwesenheit von LM [A] oder SG [B] dar. Es zeigte sich, dass die Vorbehandlung der Zellen und des Virus mit dem SG und die anschließende Zugabe des SG zum Infektionsmedium nach der Infektion zu einer signifikanten Virustiterreduktion (98,5%, P<0,005) im Vergleich zur

Ergebnisse

unbehandelten Viruskontrolle führt. Die Behandlung mit LM zeigt lediglich eine Virustiterreduktion von 54,4%.

3.5.1.6 Ist der antivirale Effekt auf die Vermehrung des IAV auf die Wirkung des SG alleine zurückzuführen?

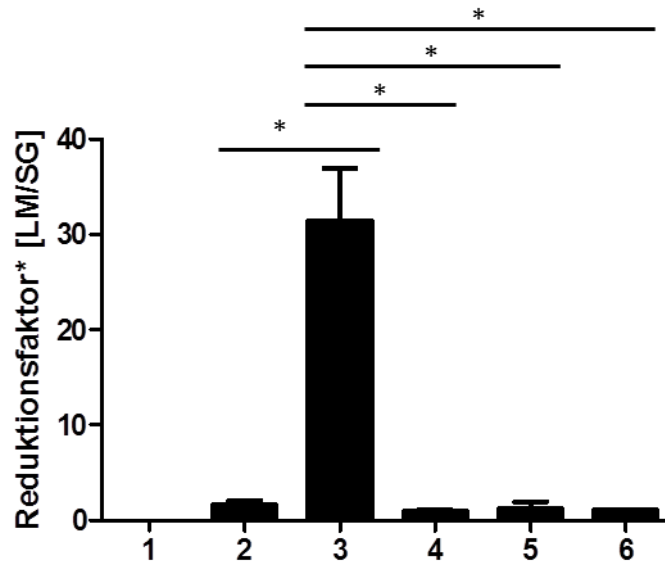


Abbildung 26: Ausschließliche Wirkung des SG auf die IAV Vermehrung durch Berechnung des Reduktionsfaktors. Zur Darstellung, ob der Effekt der Virustiterreduktion durch das SG und die Art der Behandlung zustande kommt und nicht durch die Behandlung mit dem LM, wurde der Virustiter nach Behandlung mit dem LM durch den Virustiter nach Behandlung mit dem SG (das ebenfalls das LM enthält) geteilt. Diese Abbildung soll eine Aussage darüber treffen lassen, ob die Virustiterreduktion von dem SG bzw. der Art der Behandlung hervorgerufen wird oder lediglich durch das LM. Die Nummern der Balken auf der X-Achse entsprechen den unter Tabelle 20 erläuterten Ansätzen. Die Ansätze wurden vergleichend zu Ansatz 3 statistisch ausgewertet (* $P < 0,05$).

Bei der Betrachtung der einzelnen Ergebnisse aus Abbildung 20, zeigen sich, wie auch in der Literatur bereits beschrieben (150), eine virustiterreduzierende Wirkung des LM. Zur Unterscheidung, ob die Virustiterreduktion durch das SG und die Art der Behandlung selbst verursacht wurde oder durch das darin enthaltene LM, wurde wie in Abbildung 26 dargestellt, der Virustiter nach Behandlung mit dem LM durch den Virustiter nach Behandlung mit dem SG (das ebenfalls das LM enthält) geteilt und der so entstandene Reduktionsfaktor graphisch dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass nur wenn das Virus und die Zellen mit SG vorbehandelt werden und das SG während und nach der Infektion anwesend ist, eine Virustiterreduktion erreicht wird, die nicht (auch) durch das LM verursacht ist. Vergleichend zu den anderen Ansätzen (Ansatz # 2, 4, 5, und 6) ist dieser Effekt signifikant ($P < 0,05$).

3.5.2 Hämagglutinations-Inhibitions-Assay (HAI-Assay)

Der erste Schritt im Replikationszyklus des IAV stellt die Anheftung und das Eindringen des Virus in die Wirtszelle dar. Diese hängt in erster Linie von der Interaktion zwischen dem viralen HA und den spezifischen zellulären sialinsäurehaltigen Rezeptoren ab. Indem diese Interaktion verhindert wird, wird gleichermaßen die Aufnahme des Virus in die Zelle und somit die Vermehrung des Virus eingeschränkt. Dieser Mechanismus wurde hier mit Hilfe des HAI-Assays getestet. Hierfür wurde das Virus mit LM oder SG in 5 verschiedenen Konzentrationen von 10^{-2} bis $10^{-6}\%$ (darin enthaltene ITC-Konzentrationen s. Tabelle 19) vorbehandelt. Damit eine möglichst starke Wirkung auf die Bindungsfähigkeit des HAs erzielt werden konnte, wurde auch eine, an sich toxische, Konzentration verwendet, was aber in diesem Assay nicht relevant ist. Nach 1h oder 4h Vorbehandlung des Virus, erfolgte die Zugabe von Hühnererythrozyten. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1h und 20h bei 4°C (verhindert die NA-Aktivität), wurden die Platten abgelesen und ausgewertet. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse des HAI-Assays nach 1h [A] und 4h [B] Vorinkubation des Virus und einer einstündigen Inkubation mit Hühnererythrozyten bei 4°C . Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse des HAI-Assay nach 1h [C] und 4h [D] Vorinkubation des Virus und einer 20-stündigen Inkubation mit den Hühnererythrozyten bei 4°C .

Ergebnisse

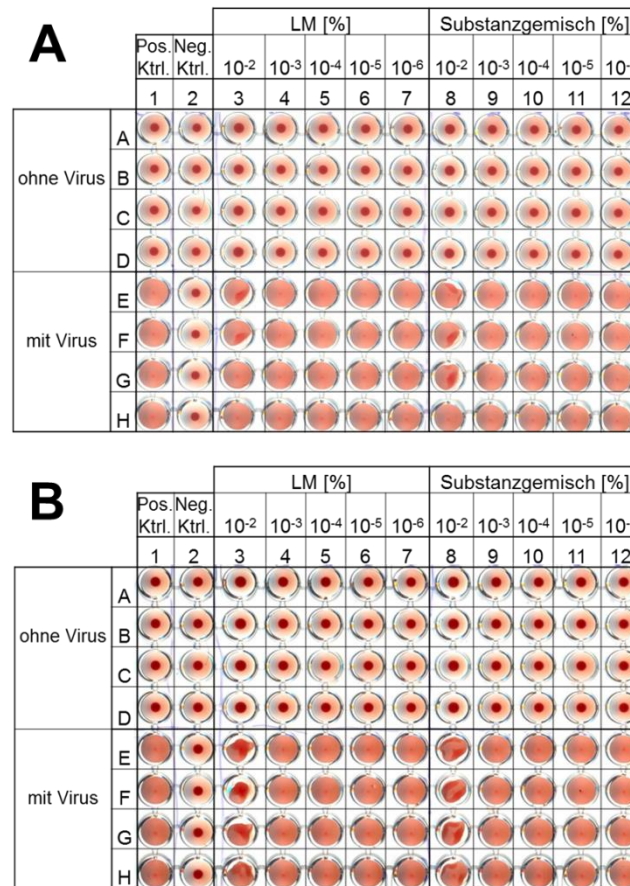


Abbildung 27: Hämagglutinations-Inhibitions-Assay. Das IAV wurde in verschiedenen Verdünnungen mit LM oder SG für 1h [A] oder 4h [B] bei 4°C vorinkubiert, im Anschluss wurde ein HA-Assay durchgeführt (n=4). Das Ablesen und Auswerten erfolgte 1h nach Zugabe der Hühnererythrozyten und Inkubation bei 4°C. Zur Kontrolle einer Interferenz von LM oder SG, wurde das Experiment zusätzlich unter gleichen Bedingungen, ohne die Zugabe von Virus durchgeführt.

Ergebnisse

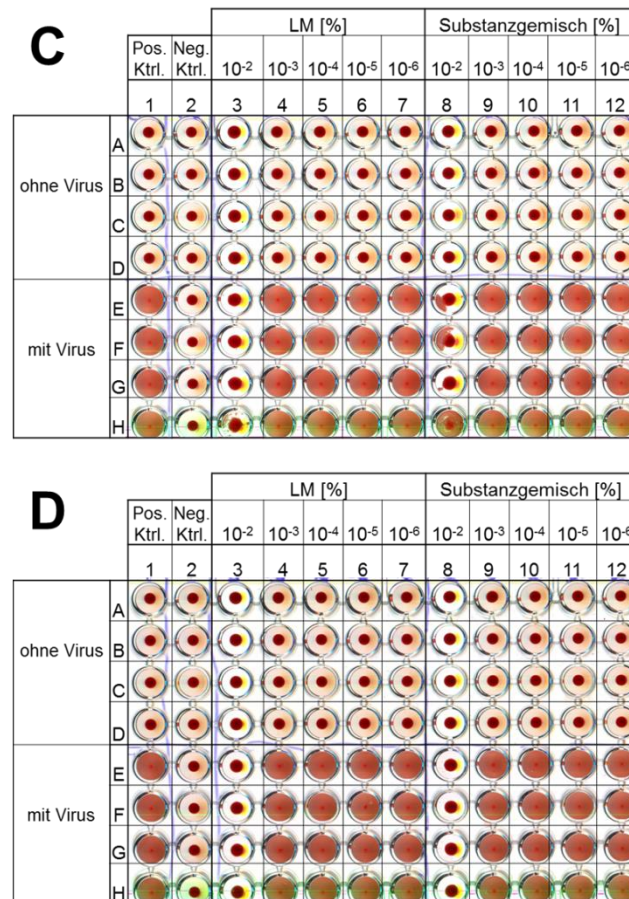


Abbildung 28: Hämagglutinations-Inhibitions-Assay. Das IAV wurde in verschiedenen Verdünnungen mit LM oder SG für 1h [A] oder 4h [B] bei 4°C vorinkubiert, im Anschluss wurde ein HA-Assay durchgeführt (n=4). Das Ablesen und Auswerten erfolgte 20h nach Zugabe der Hühnererythrozyten und Inkubation bei 4°C. Zur Kontrolle einer Interferenz von LM oder SG, wurde das Experiment zusätzlich unter gleichen Bedingungen, ohne die Zugabe von Virus durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass **(i)** die eingesetzte Virusmenge prinzipiell zu einer Hämagglutination führt (Positivkontrolle: Virus ohne Vorbehandlung), **(ii)** ohne Virus keine Hämagglutination stattfindet (Negativkontrolle) und **(iii)** dass es in der stärksten Konzentration (10⁻²%) von LM oder SG, nach 1h zunächst zur inkompletten ([A] und [B]) und nach 20h zur kompletten ([C] und [D]) Knöpfchenbildung kommt. Die Hämagglutination wird also beeinträchtigt. Da dies auch nach Behandlung mit dem LM stattfindet, ist dieser Effekt jedoch nicht auf die SG-Wirkung zurückzuführen. Die weiteren (niedrigeren) Konzentrationen zeigen durchgehend Hämagglutination; die Agglutination der Erythrozyten wurde hier also nicht verhindert.

Das Ergebnis bestätigt die Annahme, dass der Wirkmechanismus des SG nicht in der Verhinderung der Virusanheftung an die Wirtszelle liegt (vgl. Abschnitt 3.5.1.2). Tabelle 22 zeigt einen Überblick der Ergebnisse.

Ergebnisse

Tabelle 22: Interaktion von LM/SG mit dem viralen HA, vereinfachte Darstellung. Mit einem + gekennzeichnet ist die Agglutination der Erythrozyten. Mit einem - gekennzeichnet ist die Inhibierung der Agglutination. Mit +/- ist die inkomplette Hämagglutination nach 1h Inkubation gekennzeichnet.

Vorinkubation [h]	Inkubation [h]	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Vorbehandlung des Virus mit										
				LM [%]					Substanzgemisch [%]					
				10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
1	1	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
4	1	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
1	20	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4	20	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

3.5.3 Effekt von LM/SG auf die Bildung des viralen NP

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lässt sich die intra-zelluläre Präsenz und Lokalisation des Influenzavirusproteins NP darstellen. NP ist als Hauptbestandteil der RNPs (112) in die virale Replikation und Transkription eingebunden. Da die Produktion des NPs in der frühen Phase der Virusreplikation stattfindet, eignet es sich als guter Indikator für die Virusinfektion der Wirtszelle. So lässt sich darstellen, ob eine Zelle infiziert wurde und aktiv neue RNPs gebildet werden und wo die RNPs zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion bzw. des Replikationszyklus lokalisiert sind.

Hierzu wurden mit SG oder LM für 1h vorbehandelte MDCK-II-Zellen mit dem ebenfalls für 1h vorbehandelten IAV infiziert und im Anschluss mit Infektionsmedium mit SG oder LM für 8h p.i. inkubiert. Die Zellen wurden danach fixiert und wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, immunhistochemisch gefärbt und mittels konfokaler *laserscanning*-Mikroskopie ausgewertet. Die Inkubationsdauer der infizierten Zellen betrug diesmal nur 8h – entsprechend einem späten Zeitpunkt im Replikationszyklus des Virus. Da es nach 36h Inkubation mit einer Konzentration 10⁻³% zu keiner toxischen Wirkung kommt (CC₅₀-Wert LM = 20,8 x 10⁻³%; SG = 1,39 x 10⁻³%, s. Abb. 14) ist davon auszugehen, dass nach 8h bei der gleichen Konzentration ebenfalls keine Zytotoxizität auftritt. Aus diesem Grund wurde für dieses Experiment die nicht-toxische Konzentration von 10⁻³ % gewählt.

Ergebnisse

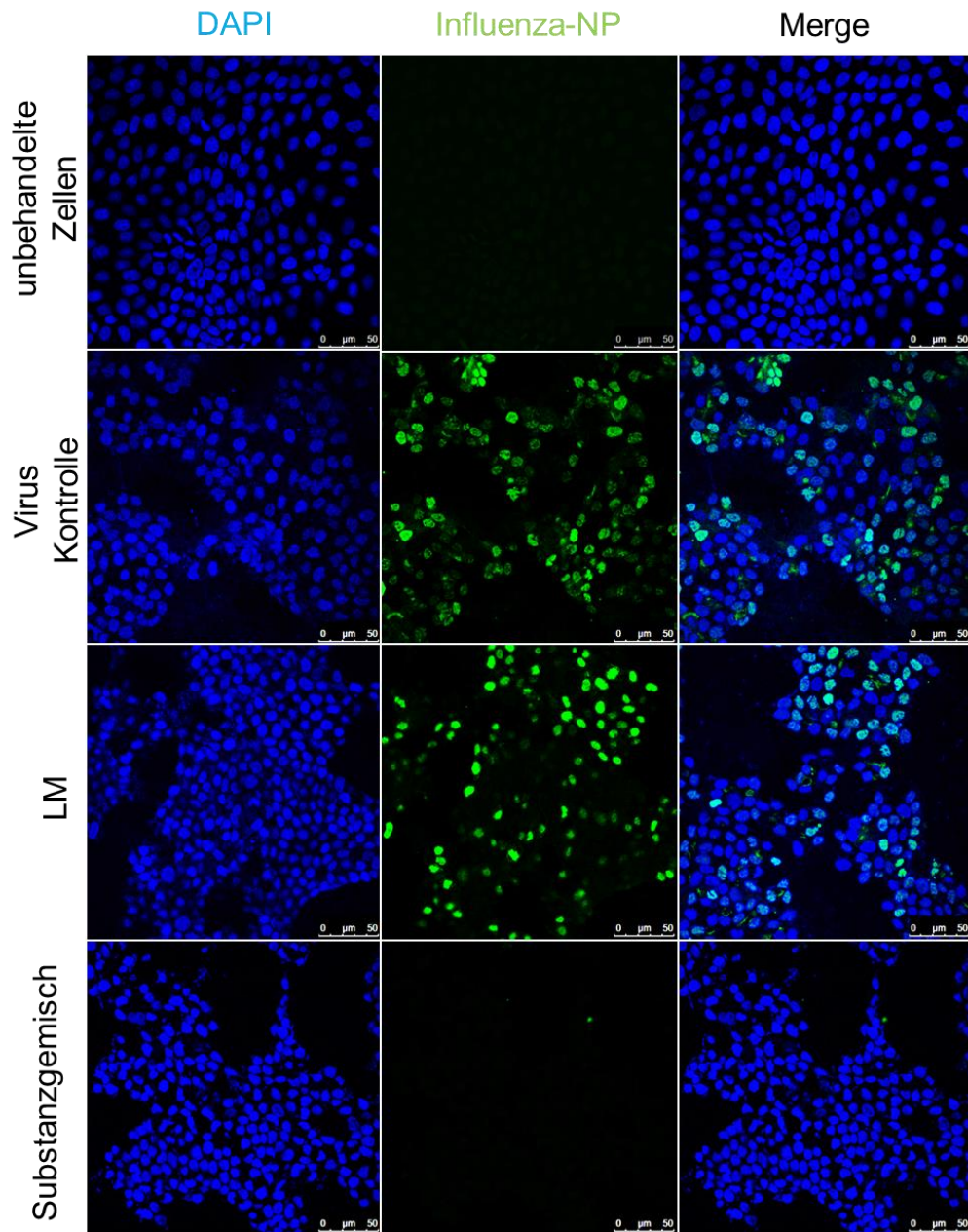


Abbildung 29: Analyse der produktiven Infektion anhand des Immunfluoreszenznachweis von NP nach Behandlung mit LM oder SG. Darstellung des in die virale Replikation und den nukleären Export eingebundenen Influenzavirusproteins NP (grün) nach 8h p.i.. Um die maximal mögliche Wirkung des SG zu erzielen, wurden zunächst das IAV und die Zellen für 1h mit dem LM oder dem SG behandelt. Nach Zugabe des behandelten Virus zu den behandelten Zellen wurde das Inoculum nach 1h Inkubationszeit abgesaugt und das tryptinreiche Infektionsmedium mit dem SG oder dem LM für 8h auf den Zellen belassen. Um ausreichend viele Zellen zu infizieren und einen größtmöglichen Effekt zu erzielen, wurde mit einer MOI von 1 infiziert und eine Konzentration des SG bzw. des LM von 10^{-3} % gewählt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. Die unter „Merge“ dargestellten Abbildungen sind eine Überlagerung der beiden vorher in der jeweiligen Reihe dargestellten Abbildungen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle dienten infizierte, unbehandelte Zellen. Das Experiment wurde mit Unterstützung von Frau Dr. Christin Müller durchgeführt und ausgewertet.

Ergebnisse

Abbildung 29 stellt das Ergebnis des immunfluoreszenztechnischen Nachweises der intra-zellulären NP-Bildung und -Lokalisation dar. In der linken Spalte stellen sich die DAPI gefärbten Zellkerne blau dar. Ersichtlich ist, dass in allen 4 Ansätzen eine ähnliche Verteilung der Kernfärbung vorliegt, d.h. dass es durch die unterschiedlichen Behandlungen der Zellen (ohne Virus, mit Virus, mit Virus und LM, mit Virus und LM und SG) zu keiner Reduktion der Zellzahl gekommen ist und die Zellverteilung in allen Fällen vergleichbar ist. In der zweiten Spalte stellt sich das virale NP nach entsprechender Immunfluoreszenzfärbung grün dar. In der ersten Zeile zeigt sich keine Grünfärbung, da die Zellen nicht mit Virus infiziert wurden (Negativkontrolle). In der zweiten Zeile zeigt sich eine deutliche Grünfärbung (Positivkontrolle). Die Behandlung mit dem LM ist in Zeile 3 zu sehen und zeigt ebenfalls eine deutliche Grünfärbung, vergleichbar zur Positivkontrolle. In der vierten Zeile ist die Behandlung mit dem SG dargestellt. Hier zeigt sich keine Grünfärbung, also kein Nachweis von viralem NP.

Das Experiment zeigt, dass die Behandlung mit dem SG zu einer deutlichen Reduktion der Bildung des viralen NPs führt. Wie unter Abschnitt 3.5.1.3 bereits dargestellt, konnte mit diesem Experiment die Vermutung bestärkt werden, dass das SG, bestehend aus den drei verschiedenen Senfölen, intra-zellulär wirkt und der Effekt spezifisch zu sein scheint, da das LM hier keinen Effekt auf die virale NP-Bildung zeigt.

4. Diskussion

Humanpathogene, respiratorisch Viren wie IAV, HCoV und HRV führen jedes Jahr weltweit zu einer Vielzahl an Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstrakts und können die Morbidität und Mortalität signifikant erhöhen (62). Gegen klassische HCoV- oder HRV-Infektionen gibt es aktuell weder eine entsprechende Impfung, noch eine zielgerichtete Therapie. Die bei schwereren Verläufen einer IAV Infektion eingesetzten medikamentösen Therapien mit NA- oder M2-Inhibitoren haben im Zusammenhang mit den letzten IV-Pandemien und -Epidemien zunehmende Resistenzbildungen hervorgerufen. Daher sucht die aktuelle Forschung nach neuen, möglichst gut verträglichen, schnell verfügbaren und breit anwendbaren antiviralen Strategien, die keine Resistenzentwicklung erlauben.

Hierbei könnten Senföle interessante pflanzliche Substanzen darstellen, die als bereits antibakteriell wirksam erwiesene Substanzen auch für die Entwicklung und Erforschung neuer antiviraler Behandlungsmöglichkeiten verwendet wurden. Die Studienlage zur antibakteriellen Wirkung der Senföle ist vielfältig. Seit Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts gibt es eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien, welche die antibakterielle Wirksamkeit von Senfölen belegen. Beispielsweise führten Klesse et al. bereits 1955 Untersuchungen zur bakteriostatischen Wirkung von Senfölen durch (73). 1969 berichteten Kienholz et al. über die antibakterielle Wirkung der ätherischen Öle aus der Meerrettichwurzel (67). Conrad et al. führten 2006 eine breite antibakterielle Wirksamkeitsstudie mit drei verschiedenen Senfölen (A-ITC, B-ITC, P-ITC) gegen klinisch relevante gram-positive und gram-negative Bakterien, sowie gegen multiresistente Bakterien wie *MRSA*- Stämme und *ESBL* positive *E.coli* Stämme *in vitro* durch (16, 17). Im gleichen Jahr veröffentlichten Goos et al. eine prospektive Kohortenstudie zur Wirksamkeit eines senföhlhaltigen Arzneimittels bei akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung. Sie konnten zeigen, dass die Therapie dieser Erkrankungen mit dem senföhlhaltigen Pflanzenextrakt vergleichbar zu einer Therapie mit einem Standardantibiotikum ist (48). 2007 stellten Albrecht et al. in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie die gute Verträglichkeit und Wirksamkeit dieses Senfölgemischs bei der Behandlung von Patienten mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfekten dar (3).

Vergleichend zur antibakteriellen Wirksamkeit der Senföle ist die Studienlage zur antiviralen Wirkung von Senfölen geringer. 1958 veröffentlichten Winter et al. ihre

Ergebnisse zu einer Studie über die antivirale Wirksamkeit von Senfölen (darunter A-ITC und B-ITC) auf die Vermehrung eines IAV im embryonierten Hühnerei (150) und bestätigten damit die zuvor von Sprössig et al. 1956 durchgeführte Studie bezüglich des inhibitorischen Einflusses des Wirkstoffes aus der Kapuzinerkresse auf die intra-zelluläre Virusvermehrung (84).

In der hier vorliegenden *in vitro* Studie sollte mit aktuellen virologischen Methoden die antivirale Wirksamkeit der in Angocin® Anti-Infekt N vorkommenden einzelnen Senföle und des Gemischs aus diesen getestet werden. Dabei wurde die Wirkung gegen Viren getestet, die generell **(i)** im Menschen zu häufigen Infektionen führen, **(ii)** eine hohe respiratorische Pathogenität aufweisen und somit **(iii)** eine enorme volkswirtschaftliche und klinische Relevanz darstellen. Als humanpathogene Vertreter hierfür wurden ein Influenza A Virus, ein humanes Coronavirus sowie zwei humane Rhinovirus Subtypen verwendet.

4.1 Die einzelnen Senföle sind in der Lage konzentrationsabhängig den infektiösen Virustiter sowie die Gesamtmenge der Viruspartikel nach Infektion mit dem H1N1pdm09 unterschiedlich stark zu hemmen

Da sich im ersten Abschnitt dieser Arbeit nach Vorinkubation von Virus und Zellen, sowie der anschließenden Behandlung der infizierten Zellen mit den einzelnen ITCs in nicht-toxischen Konzentrationen keine nennenswerten zellspezifischen, jedoch konzentrations- und substanzabhängige Unterschiede der Wirksamkeit zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung der ITCs auf ihre unterschiedliche chemische Struktur zurückzuführen ist. Ob der in P-ITC und B-ITC enthaltene Benzolring (s. Abbildung 8) dabei eine Rolle spielt, müsste näher eruiert werden.

Einen ersten Hinweis auf die Art der Wirkung der ITCs liefert hier die Tatsache, dass nicht nur der infektiöse Virustiter durch die Behandlung mit den jeweiligen Senfölen gehemmt wird, sondern auch die Hämagglutination, welche repräsentativ für die virale (infektiöse und nicht-infektiöse) Gesamtpartikelproduktion steht. Das lässt drauf schließen, dass die Produktion viraler Proteine und/oder die virale Genomreplikation beeinträchtigt sein könnte.

4.2 Im Vergleich zu den einzeln verwendeten ITCs führt die Kombination der Senföle (als SG) zu einer stärkeren Reduktion des H1N1pdm09-Titers

Bei der Testung eines breiten Spektrums an klinisch relevanten und teilweise multiresistenten Bakterienstämmen sowie auch *Candida spp.*, zeigte sich ein ergänzender Effekt durch Kombination der 3 Senföle miteinander im Vergleich zu vorhergehenden Testungen mit den einzelnen ITCs (17). Bei der Kombination mehrerer Substanzen miteinander in ihrer Wirkung auf denselben Zielparameter, spricht die Pharmakologie von einem Synergismus. Entspricht dabei die Summe der Einzelwirkung der der Gesamtwirkung, wird dies als additiver Synergismus bezeichnet. Ist hingegen eine stärkere Wirkung als bei der Verwendung der einzelnen Substanzen zu verzeichnen, gilt dies als über-additiver Synergismus. Bezogen auf die medikamentöse Therapie von verschiedenen Krankheiten lässt sich so durch die Kombination zweier oder mehrerer Wirkstoffe, trotz Dosisreduktion der darin enthaltenen Einzelsubstanz(en), u.U. die gleiche Wirkung erzielen und dadurch mögliche Nebenwirkungen reduzieren (63, 69). So wurde in dieser Arbeit nach Testung der antiviralen Wirkung der Einzelsubstanzen (s. Abschnitt 3.1) in einem weiteren Experiment das Gemisch aus den 3 ITCs (s. Abschnitt 3.2), ihrem jeweiligen Anteil in Angocin® Anti-Infekt N entsprechend, verwendet, um eine maximal mögliche antivirale Wirkung zu erzielen. Da sich bei der stärksten eingesetzten, nicht zytotoxischen Konzentration eine vollständige Hemmung des infektiösen Virustiters, wie auch der Gesamtpartikelzahl zeigte, scheint die Kombination der 3 ITCs in den vorgegeben Verhältnis zueinander deutlich effizienter zu wirken, als die 3 ITCs einzeln. Ob es sich bei den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zur antiviralen Wirksamkeit des SG um einen über-additiven synergistischen oder additiv synergistischen Effekt der ITCs handelt, müsste pharmakologisch weiter untersucht werden. Interessanterweise zeigten die beiden verwendeten Zelllinien in der Zytotoxizitätstestung eine bessere Verträglichkeit des SG gegenüber den Einzelsubstanzen. Vergleichend zu den Versuchen aus Abschnitt 3.1 dieser Arbeit, konnte in Abschnitt 3.2 eine um den Faktor 10 höhere Konzentration der ITCs eingesetzt werden.

4.3 Die hemmende Wirkung der ITCs scheint bezogen auf H1N1pdm09 nicht zell- oder wirtsspezifisch zu sein

Die H1N1pdm09 Replikation konnte nach Zugabe der ITCs einzeln und in Kombination nicht nur auf MDCK-II Zellen, sondern auch auf A549-Zellen, konzentrationsabhängig

gehemmt werden. Da es sich bei den genannten Zelllinien zum einen um Hundenierenzellen (MDCK-II) und zum anderen um humane Adenokarzinomzellen der Lunge (A549) handelt, wurde die Virusreplikation nicht nur in 2 unterschiedlichen Organsystemen (Niere und Lunge) getestet, sondern auch in 2 unterschiedlichen Spezies (Hund und Mensch) gehemmt, was zeigt, dass die durch die ITCs verursachte antivirale Wirkung, bezogen auf das H1N1pdm09 nicht zell- oder wirtsspezifisch ist.

4.4 Das Substanzgemisch hat keinen Einfluss auf die Adsorption/ den Eintritt des IAV in die Zelle

Der erste Schritt im Replikationszyklus des IAV besteht in der HA-vermittelten Bindung an spezifische sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Zielzelle (111). Dieser Vorgang kann verhindert werden, indem entweder **(i)** das auf der Virusoberfläche vorhandene HA in seiner Funktion oder **(ii)** der Rezeptor der Zielzelle beeinflusst wird. Wird einer dieser Faktoren blockiert, kann sich das Virus nicht an die Zielzelle anheften und nicht in die Zelle eingeschleust werden. In Abschnitt 3.5.1.1 und 3.5.1.2 zeigte sich, dass die alleinige Vorbehandlung der Zellen mit dem SG keinen inhibitorischen Effekt auf die Virusvermehrung hatte. Die Vorbehandlung des Virus mit dem SG bewirkte zwar eine Reduktion (70%) des Virustiters, jedoch war diese **(i)** teilweise auf das LM zurückzuführen (55%) und stellte sich **(ii)** als nicht signifikant heraus. Diese antivirale Aktivität lässt sich allerdings nicht auf eine Hemmung der HA/Rezeptorinteraktion zurückführen, da die Hämagglutination nicht spezifisch durch das SG beeinflusst wird. Diese Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass weder die Rezeptoren der Zelle (s. Abschnitt 3.5.1.1), noch das HA des Virus durch das SG (s. Abschnitt 3.5.1.2) maßgeblich beeinflusst werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das SG nicht die Adsorption in der frühen Phase der Infektion hemmt, sondern sich die Wirkung der ITCs wie in der Literatur bereits für A-ITC, B-ITC und P-ITC beschrieben, intra-zellulär entfaltet (84, 150).

4.5 Die intra-zelluläre NP Produktion von H1N1pdm09 wird gehemmt

Die Tatsache, dass bei permanenter Anwesenheit des SG vor, während und nach der Infektion, das virale NP in der späten Phase des influenzaviralen Replikationszykluses

weder im Zellkern noch im Zytoplasma von IAV-infizierten Zellen nachweisbar war, lässt vermuten, dass es zu einer vollständigen Hemmung der viralen NP-Produktion kam. Die scheinbar vollständige Hemmung der NP Produktion kann von mehreren Punkten abhängen: **(i)** die Freisetzung der RNPs aus dem Viruspartikel und/oder der anschließende RNP-Kernimport könnten beeinträchtigt sein; **(ii)** auch könnte die Produktion der mRNA (Transkription des viralen Genoms) im Zellkern gehemmt sein oder **(iii)** der mRNA-Kernexport durch die Kernporen in das Zytoplasma könnte beeinflusst sein. Die Beeinträchtigung dieser Mechanismen würde nicht nur zu einer verminderten Produktion von viralem NP, sondern auch zur verminderten Produktion der anderen viralen Proteine führen. Wie unter Punkt 4.1. bereits angesprochen, kommt es durch die Behandlung mit dem SG nicht nur zur Reduktion des infektiösen Virustiters, sondern auch zur Reduktion des HA-Titers, d.h., einer Reduzierung an neugebildeten Viruspartikeln. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Bildung neuer viraler Proteine gehemmt wird, was durch *Western-Blot Analysen* weiter untersucht werden könnte.

Außerdem ist es möglich, dass die Replikation des viralen Genoms durch die Virus-Polymerase inhibiert wird. Dadurch würde ebenfalls die Transkription und damit die Bildung neuer viraler Proteine gehemmt werden. Eine nähere Klärung, auf welcher Ebene die Inhibition auftritt, würde **(i)** durch Bestimmung der viralen Replikations- und Transkriptionsaktivität mittels *Primer Extension Assay*, bei dem die Menge an neugebildeter viraler mRNA (Transkription) sowie cRNA und vRNA (Replikation) bestimmt werden kann, sowie **(ii)** durch Bestimmung der viralen Expressionsaktivität mittels eines *Mini-Genom-Assays*, in welchem die Expression eines auf einer virusähnlichen vRNA kodierten Reportergens detektiert werden kann, liefern, wie in der mitveröffentlichten Arbeit von Wang et al. beschrieben (143).

4.6 Permanente Anwesenheit des SG vor, während und nach der Infektion führt zur stärksten Hemmung der intra-zelluläre H1N1pdm09 Vermehrung

Da **(i)** die alleinige Vorbehandlung des Virus mit dem SG oder **(ii)** die Zugabe des SG ausschließlich nach der Infektion nur zu einer geringen Reduktion der influenzaviralen Replikation führte, jedoch die Zugabe des SG zu dem Virus/den Zellen vor, während und nach der Infektion, also die Kombination aus **(i)** und **(ii)**, die stärkste Reduktion der Virusreplikation zeigte, wird deutlich, dass erst die Kombination der Wirkung des SG auf das Virus und auf die Zellen in einer signifikanten Hemmung der viralen Replikation

resultiert, die nicht auf das LM zurückzuführen ist. Hierbei ist eine Hemmung der Virusbindung an die Zelle durch das SG auszuschließen, da (i) die alleinige Vorbehandlung der Zellen mit dem SG keinen Einfluss auf die virale Replikation zeigte (s. Ansatz #6, Abschnitt 3.5.1.1) und (ii) das SG auch im *HAI-Assay* (Abschnitt 3.5.2) die Hämagglutination (bei nicht-toxischen Konzentrationen) nicht beeinträchtigte. Auf welcher Ebene die beobachtete Inhibition der viralen Genexpression (s. NP) durch das SG auftritt und ob dabei ausschließlich virale Faktoren/Mechanismen gehemmt werden, oder auch hierfür notwendige zelluläre Faktoren beeinträchtigt werden, ist noch offen. Eine durch das SG hervorgerufene Wirkung auf zelluläre Komponenten der Virusvermehrung ließe erwarten, dass durch die Therapie mit dem SG virale Resistenzen weniger wahrscheinlich wären.

4.7 Das SG hemmt den infektiösen Virustiter von HRV, nicht aber von HCoV

Für eine effiziente antivirale Therapie wird aktuell nach möglichst gut verträglichen, schnell verfügbaren und breit anwendbaren antiviralen Strategien, die keine Resistenzentwicklung erlauben, gesucht. Die Frage, ob ITCs neben IAV weitere humanpathogene RNA-Viren hemmen, wurde anhand von zwei humanen Rhinovirus (HRV)-Subtypen und einem klassischen humanen Coronavirus (HCoV-229E) -Subtyp untersucht. Bei diesen Viren handelt es sich im Gegensatz zu IAV (negativ-Strang RNA Viren, (-) ssRNA) um positiv-Strang RNA Viren ((+) ssRNA), die anders als IAV im Zytoplasma und nicht im Zellkern replizieren. Tabelle 23 führt einige wesentliche Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Viren auf.

Diskussion

Tabelle 23: Übersicht über die Eigenschaften der hier verwendeten verschiedenen respiratorisch pathogenen Viren. Die in kursiv markierten Viren wurden in dieser Arbeit nicht getestet, sondern sind nur der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

	Influenzaviren	Rhinoviren	Coronaviren
Genom	(-) ssRNA Segmentiert	(+) ssRNA nicht segmentiert	(+) ssRNA nicht segmentiert
Rezeptor	sialinsäurehaltiger Rezeptor	ICAM-1 (HRV16) LDL (HRV1A)	Aminopeptidase N (HCoV229E) <i>ACE-2</i> (<i>SARS-CoV</i>) <i>Dipetidylpeptidase 4</i> (<i>MERS-CoV</i>)
Replikationsort	Zellkern	Zytoplasma	Zytoplasma

Wie auch bei H1N1pdm09 zeigte die Untersuchung einer antiviralen Wirkung des SG gegen HRV, eine Reduktion des Virustiters bei permanenter Anwesenheit des SG während und nach der Infektion (vgl. Abschnitt 3.2 und 3.4). Die Tatsache, dass das SG sowohl die H1N1pdm09- als auch die HRV-Vermehrung in verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Organismen hemmt zeigt, dass die inhibitorische Wirkung der ITCs **(i)** nicht zellspezifisch ist (Nierenepithelzellen, Alveolarepithelzellen, Gebärmutterhalsepithelzellen), **(ii)** nicht wirtsspezifisch ist (Hund, Mensch) und **(iii)** nicht virusspezifisch ist (H1N1pdm09, HRV1A und HRV16).

Zur genaueren Klärung des Wirkmechanismus der ITCs bei der HRV-Replikation sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei wäre ebenfalls zu klären, ob **(i)** das SG auf das Virus selbst einen inhibitorischen Effekt hat, **(ii)** die Bindung des Virus an die Zielzelle beeinflusst wird oder **(iii)** die intra-zelluläre Replikation des Virus beeinflusst wird. Bei Untersuchungen zur Rolle des oxidativen Stresses in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen in humanen Endothelzellen konnten Huang et al. zeigen, dass B-ITC und P-ITC indirekt zu einer Hemmung der ICAM-1-Expression führen (60). Dies könnte ein möglicher Hinweis auf die ITC-Wirkung zumindest bei der HRV16-Vermehrung sein, da es sich bei ICAM-1 interessanterweise um den HRV16 Rezeptor handelt. Da in der Bronchialschleimhaut von Asthmatiker eine erhöhte Expression von ICAM-1 festgestellt wurden (83, 85, 163), könnte hier ebenfalls ein Grund für die durch

Diskussion

Rhinoviren verursachten zahlreichen infektiösen Exazerbationen von Patienten mit *Asthma bronchiale* liegen (153). Hier stellt sich somit ein weiterer interessanter Ansatz für zusätzliche Untersuchungen dar.

Obwohl die Untersuchung der antiviralen Wirkung des SG auf die HCoV-229E-Vermehrung keinen inhibitorischen Effekt zeigte, wäre es u.U. interessant die ITC-Wirkung auf die Vermehrung weiterer CoV-Stämme, die andere Zielrezeptoren benutzen (z.B. SARS-CoV oder MERS-CoV, s. Tab. 23) zu überprüfen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass diese Arbeit nicht nur zum näheren Verständnis der Wirkung von Isothiocyanaten auf den Replikationszyklus der hier getesteten klinisch relevanten und humanpathogenen respiratorischen Viren beiträgt, sondern auch Hinweise für die Wirkweise aufzeigt. Somit ergeben sich interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen, die möglicherweise neue antivirale Strategien bei der Behandlung der durch diese Viren verursachten Krankheitsbilder liefern.

5. Zusammenfassung

Atemwegsinfektionen stellen eine jährliche Herausforderung dar. Dabei spielen Infektionen mit humanen Rhinoviren (HRV), humanen Coronaviren (HCoV) (Erkältungsviren) und Influenzaviren (IV), eine übergeordnete Rolle. Im Fall der IV und des aktuell zirkulierenden SARS-CoV-2, können diese schwere Verläufe annehmen und zu enormen gesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Schäden führen. Gegen HRV- und (reguläre) HCoV-Infektionen gibt es aktuell weder eine zielgerichtete Therapie, noch eine Impfung. Virale Resistenzbildung gegen die wenigen zugelassenen anti-IV-Medikamente verringert deren Wirksamkeit. Antivirale Strategien gegen SARS-CoV-2 sind noch meist in der Entwicklung und die Wirksamkeit bzw. die Schutzdauer der zugelassenen Vakzine lässt sich zur Zeit nicht abschließend bewerten. Daher ist die Entwicklung von neuen antiviralen Medikamenten mit breiter Wirksamkeit gegen verschiedene Viren und guter Verfügbarkeit äußerst wichtig. Da dies aber zeit- und kostenintensiv ist, stellt die Verwendung bereits zugelassener Medikamente (Repurposing) einen Vorteil dar. Senföle wurden bereits 1957 auf ihre anti-IV Wirkung im embryonierten Hühnerei getestet. Da sich hierbei aber nur ein virustatischer, nicht jedoch ein viruzider Effekt zeigte, war es Ziel dieser Arbeit, die antivirale Wirkung der in Angocin® Anti-Infekt N enthaltenen Senföle bzw. deren Kombination, auf die Vermehrung respiratorisch relevanter Viren *in vitro*, mit aktuellen virologischen und zellbiologischen Methoden zu analysieren und deren Wirkmechanismus näher zu charakterisieren.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass **(i)** die einzelnen Senföle in der Lage sind, konzentrationsabhängig den infektiösen Virustiter, sowie die Gesamtmenge der Viruspartikel nach Infektion mit dem IV H1N1pdm09 unterschiedlich stark zu reduzieren und dass **(ii)** die Kombination der Senföle als Substanzgemisch (SG) zu einer noch stärkeren Reduktion des H1N1pdm09-Titers führt. Zur näheren Betrachtung der Wirkweise konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung der Senföle bezogen auf H1N1pdm09 weder **(i)** zell- oder wirtsspezifisch zu sein scheint, noch **(ii)** einen Einfluss auf die Adsorption/ den Eintritt des IV in die Zelle zu haben scheint. Unter permanenter Anwesenheit des SG vor, während und nach der Infektion mit dem H1N1pdm09 zeigte sich eine vollständige Hemmung der Produktion des viralen Nukleoproteins (NP). An welcher Stelle des viralen Replikationszyklus die beobachtete Inhibition der viralen Genexpression durch das SG auftritt und ob dabei

Zusammenfassung

ausschließlich virale Faktoren/ Mechanismen gehemmt werden oder auch hierfür notwendige zelluläre Faktoren beeinträchtigt werden, ist noch offen. Obwohl die Behandlung mit dem SG keinen inhibitorischen Effekt auf die Vermehrung von HCoV-229E zeigte, konnten die Untersuchungen eine antivirale Wirkung des SG gegen HRV1A/-16 mit einer Reduktion des Virustiters bei permanenter Anwesenheit des SG während und nach der Infektion zeigen.

6. Summary

Respiratory infections are an annual challenge. Infections with human rhinoviruses (HRV), human coronaviruses (HCoV) (common cold viruses) and influenza viruses (IV) play a predominant role. In the case of IV and the currently circulating SARS-CoV-2, these infections can take severe courses and cause enormous health and economic damage. Currently, there is neither a targeted therapy nor a vaccination against HRV and (regular) HCoV infections available. Viral resistance to the few approved anti-IV drugs reduces their effectiveness. Antiviral strategies against SARS-CoV-2 are still mostly in development, and the efficacy or duration of protection of approved vaccines cannot be conclusively evaluated at this time. Therefore, the development of new antiviral drugs with broad efficacy against different viruses and good availability is extremely important. However, since this is time-consuming and costly, the use of already approved drugs (repurposing) is an advantage. Mustard oils were tested for their anti-IV activity in embryonated chicken eggs as early as 1957. However, since this only showed a virus static effect, but not a virucidal effect, the aim of this work was to analyze the antiviral effect of the mustard oils contained in Angocin® Anti-Infekt N, or their combination, on the reproduction of respiratory relevant viruses *in vitro*, using current virological and cell biological methods, and to characterize their mechanism of action in more detail.

In the present study, it was shown that **(i)** the individual mustard oils are able to reduce the infectious virus titer, as well as the total amount of virus particles after infection with IV H1N1pdm09 to different degrees, depending on the concentration and, that **(ii)** the combination of the mustard oils as a substance mixture (SG) leads to an even stronger reduction of the H1N1pdm09 titer. For a closer look at the mode of action, further experiments showed that the inhibitory effect of the mustard oils related to H1N1pdm09 does not appear to be **(i)** cell- or host-specific, nor **(ii)** does it appear to have an effect on the adsorption/entry of the IV into the cell. Under permanent presence of SG before, during and after infection with H1N1pdm09, complete inhibition of viral nucleoprotein (NP) production was demonstrated. At which point of the viral replication cycle the observed inhibition of viral gene expression by the SG occurs and whether only viral factors/mechanisms are inhibited or also cellular factors necessary for this are affected is unknown. Even though SG treatment had no inhibitory effect on HCoV-229E replication, the studies could show an antiviral effect against HRV1A/-16 with a reduction of the viral titer in the permanent presence of the SG during and after infection.

7. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A549	humane Lungenadenokarzinomzellen
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
A-ITC	Allyl-ITC
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
B-ITC	Benzyl-ITC
BSA	Bovines Serumalbumin
CC ₅₀	<i>cytotoxic concentration 50%</i>
CF	Cystische Fibrose
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CoV	Coronavirus
CPE	<i>cytopathic effect</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Doppelmembranvesikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>“Escherichia coli”</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-Protein	<i>envelope-Protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi-intermediate compartment</i>
ESBL	extended-spectrum beta-lactamasen
FCS	<i>fetal. calf serum</i>
FFU	<i>focus forming units</i>

Abkürzungsverzeichnis

FKS	fötales Kälberserum
GE	Grunderkrankung
GFP	green fluorescent protein
Glc	Glucose
HA	Hämagglutinin
HAU	hämagglutinierende Einheiten
HCoV	humanes Coronavirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRV	humanes Rhinovirus
IAV	Influenzavirus A
IBV	Influenzavirus B
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICV	Influenzavirus C
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ITC	Isothiocyanat
IV	Influenzavirus
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen 1</i>
LM	Lösungsmittel
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
mAb	monoklonaler Antikörper
MDCK-II	<i>Madin Darby Canine Kidney cells II</i>
MERS	<i>middle east respiratory syndrome</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	Membran-Protein
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRSA	<i>Methicillin resistenter Staphylococcus aureus</i>
NA	Neuraminidase
NEP	nukleäres Exportprotein

Abkürzungsverzeichnis

NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
N-Protein	Nukleokapsidprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
nsp	Nichtstrukturprotein
p.i.	<i>post infectionem</i>
p.t.	<i>post treatment</i>
PA	<i>polymerase acid</i>
PB1	<i>polymerase basic 1</i>
PB2	<i>polymerase basic 2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pdm	pandemisch
PFU	<i>plaque forming units</i>
P-ITC	Phenyl-ITC
pp	Polyprotein
R	Rest
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RT	Raumtemperatur
RTC	Replikations- und Transkriptionskomplex
S	Schwefel
S3-Leitlinie	Stufenklassifikationsschema zur Handlungsempfehlung der AWMF
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SG	Substanzgemisch
sgRNA	subgenomische RNA
S-Protein	<i>spike</i> -Protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit
VP	virales Protein
vRNA	virale RNA

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Influenza Pandemien des 20. und 21. Jahrhunderts.	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza A Virus.	5
Abbildung 3: Replikationszyklus von Influenzaviren.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher antiviraler Angriffspunkte.	10
Abbildung 5: Replikationszyklus von Rhinoviren.	13
Abbildung 6: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung eines Coronavirus.	16
Abbildung 7: Replikationszyklus von Coronaviren.	18
Abbildung 8: Spaltung von Glucosinolat und Entstehung von Isothiocyanaten (ITCs), vereinfachte Darstellung.	22
Abbildung 9: Kapuzinerkresse (<i>Tropaeoli majoris herba</i> , links) und Meerrettichwurzel (<i>Armoraciae rusticanae radix</i> , rechts).	25
Abbildung 10: Formel nach L.J. Reed und H. Muench zur Bestimmung der TCID ₅₀ . (118)	39
Abbildung 11: Bestimmung des zytotoxischen Effekts der ITCs und des LM auf die Viabilität von MDCK-II und A549 Zellen.	46
Abbildung 12: Antivirale Wirksamkeit der einzelnen ITCs und des LMs gegen die IAV-Vermehrung in MDCK-II Zellen.	49
Abbildung 13: Antivirale Wirksamkeit der einzelnen ITCs und des LMs gegen die IAV-Vermehrung in A549 Zellen.	52
Abbildung 14: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von MDCK-II und A549 Zellen.	54
Abbildung 15: Antivirale Wirksamkeit des SG und des LM gegen die IAV-Vermehrung in MDCK-II und A549 Zellen.	56
Abbildung 16: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von HuH7 Zellen.	59
Abbildung 17: Antivirale Wirksamkeit des SG und des LM gegen die HCoV-229E-Vermehrung in HuH7 Zellen.	61
Abbildung 18: Bestimmung des zytotoxischen Effekts des SG und des LM auf die Viabilität von HeLa Ohio Zellen.	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Antivirale Wirksamkeit von SG und LM gegen die HRV1A- und HRV16- Vermehrung in HeLa Ohio-Zellen.	66
Abbildung 20: Antivirale Wirksamkeit von SG und LM nach der Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der IAV-Infektion.	69
Abbildung 21: Effekt von SG und LM auf die IAV-Vermehrung nach Vorinkubation der MDCK-II Zellen mit LM oder SG und anschließender Infektion mit dem unbehandelten H1N1pdm09.	70
Abbildung 22: Effekt von LM und SG auf die IAV-Vermehrung nach Vorinkubation des Virus mit LM oder SG.	71
Abbildung 23: Effekt von LM und SG auf die intra-zelluläre IAV-Vermehrung.	72
Abbildung 24: Effekt der Vorinkubation der Zellen mit dem LM oder SG in Kombination mit der Anwesenheit des LM oder SG im Infektionsmedium auf die Virusvermehrung.	73
Abbildung 25: Effekt der permanenten Anwesenheit des LM/SG auf die IAV-Vermehrung.	74
Abbildung 26: Ausschließliche Wirkung des SG auf die IAV Vermehrung durch Berechnung des Reduktionsfaktors.	75
Abbildung 27: Hämagglutinations-Inhibitions-Assay.	77
Abbildung 28: Hämagglutinations-Inhibitions-Assay.	78
Abbildung 29: Analyse der produktiven Infektion anhand des Immunfluoreszenznachweis von NP nach Behandlung mit LM oder SG.	80

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Einteilung der Risikoklassen von Patienten mit Superinfektionen.	20
Tabelle 2: Tabellarische Ansicht der in dieser Arbeit verwendeten Viren und deren Zelllinie(n).....	33
Tabelle 3: Tabellarische Ansicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	34
Tabelle 4: Tabellarische Ansicht der unterschiedlichen Behandlung der Zellen/ des Virus.	41
Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Experimente.	43
Tabelle 6: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs.....	45
Tabelle 7: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des LMs und der einzelnen ITCs.....	47
Tabelle 8: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder den ITCs auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen.	52
Tabelle 9: Reduktion der Gesamtmenge der Viruspartikel [%] nach Behandlung mit dem LM oder den ITCs auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen.	53
Tabelle 10: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs.....	54
Tabelle 11: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des SG und LM.....	55
Tabelle 12: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder dem SG auf MDCK-II und A549 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen nach Infektion mit IAV.....	57
Tabelle 13: Übersicht der im MTT-Test auf HuH7 verwendeten Konzentrationen des Substanzgemischs und der darin enthaltenen ITCs.....	58
Tabelle 14: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des SG und des LM.	60
Tabelle 15: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung mit dem LM oder dem SG auf HuH7 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen nach Infektion mit HCoV-229E.....	62
Tabelle 16: Übersicht der im MTT-Test verwendeten Konzentrationen.	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 17: Übersicht über die im nachfolgenden Experiment eingesetzten Konzentrationen des LMs und des SGs.	65
Tabelle 18: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] nach Behandlung von HRV1A- und HRV16-infizierten HeLa Ohio Zellen mit LM oder SG in unterschiedlichen Konzentrationen.	66
Tabelle 19: Übersicht der in den unter Punkt 3.5 verwendeten Konzentrationen des LMs und des SGs.....	67
Tabelle 20: Die Tabelle zeigt das Behandlungsschema zu dem unter Abbildung 20 dargestellten Experiment.....	69
Tabelle 21: Reduktion des infektiösen Virustiters [%] bei unterschiedlicher Behandlung mit LM oder SG.	71
Tabelle 22: Interaktion von LM/SG mit dem viralen HA, vereinfachte Darstellung.	79
Tabelle 23: Übersicht über die Eigenschaften der hier verwendeten verschiedenen respiratorisch pathogenen Viren.....	88

10. Literaturverzeichnis

1. **Abraham GM, Morton JB, Saravolatz LD.** 2020. Baloxavir: A Novel Antiviral Agent in the Treatment of Influenza. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciaa107.
2. **Agency EM.** 2020. EMA recommends first COVID-19 vaccine for authorisation in the EU. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-first-covid-19-vaccine-authorisation-eu>. Accessed
3. **Albrecht U, Goos KH, Schneider B.** 2007. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of a herbal medicinal product containing *Tropaeoli majoris herba* (Nasturtium) and *Armoraciae rusticanae radix* (Horseradish) for the prophylactic treatment of patients with chronically recurrent lower urinary tract infections. *Curr Med Res Opin* **23**:2415-2422.
4. **Amodio E, Vitale F, Cimino L, Casuccio A, Tramuto F.** 2020. Outbreak of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2): First Evidences From International Scientific Literature and Pending Questions. *Healthcare (Basel)* **8**.
5. **Anonymous.** 2015. [Acute uncomplicated respiratory tract infections. Phytotherapy with mustard oils recommended by expert panel]. *MMW Fortschr Med* **157**:76-77.
6. **Athmer J, Fehr AR, Grunewald M, Smith EC, Denison MR, Perlman S.** 2017. In Situ Tagged nsp15 Reveals Interactions with Coronavirus Replication/Transcription Complex-Associated Proteins. *MBio* **8**.
7. **Biedenkopf N, Lange-Grunweller K, Schulte FW, Weisser A, Muller C, Becker D, Becker S, Hartmann RK, Grunweller A.** 2017. The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication. *Antiviral Res* **137**:76-81.
8. **Bizzantino J, Lee WM, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, Martin AC, Khoo SK, Cox DW, Geelhoed GC, McMinn PC, Goldblatt J, Gern JE, Le Souëf PN.** 2011. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J* **37**:1037-1042.
9. **Blaas D, Fuchs R.** 2016. Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol Cell Pediatr* **3**:21.
10. **Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ.** 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* **77**:8801-8811.
11. **Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, Hillebrands JL, Navis GJ, Gordijn SJ, Bolling MC, Dijkstra G, Voors AA, Osterhaus AD, van der Voort PH, Mulder DJ, van Goor H.** 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol* **251**:228-248.
12. **Brockway SM, Clay CT, Lu XT, Denison MR.** 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **77**:10515-10527.
13. **Buda S DR, Biere B, Buchholz U, Tolksdorf K, Prahm K, Streib V, Haas W, und die AGI Studiengruppe.** 2018. Influenza Monatsbericht Influenza-Monatsbericht Kalenderwochen 33 bis 36 (1108 bis 07092018).
14. **Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R.** 2020. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19), StatPearls, Treasure Island (FL).

15. **Cheng PK, Leung TW, Ho EC, Leung PC, Ng AY, Lai MY, Lim WW.** 2009. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis* **15**:966-968.
16. **Conrad A, Biehler D, Nobis T, Richter H, Engels I, Biehler K, Frank U.** 2013. Broad spectrum antibacterial activity of a mixture of isothiocyanates from nasturtium (*Tropaeoli majoris herba*) and horseradish (*Armoraciae rusticanae radix*). *Drug Res (Stuttg)* **63**:65-68.
17. **Conrad A, Kolberg T, Engels I, Frank U.** 2006. [In vitro study to evaluate the antibacterial activity of a combination of the haulm of nasturtium (*Tropaeoli majoris herba*) and of the roots of horseradish (*Armoraciae rusticanae radix*)]. *Arzneimittelforschung* **56**:842-849.
18. **Davies HA, Macnaughton MR.** 1979. Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch Virol* **59**:25-33.
19. **de Haan CA, Rottier PJ.** 2005. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res* **64**:165-230.
20. **DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Regla-Nava JA, Jimenez-Guardeño JM, Fernandez-Delgado R, Fett C, Castaño-Rodríguez C, Perlman S, Enjuanes L.** 2014. Inhibition of NF- κ B-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J Virol* **88**:913-924.
21. **Dietz G.** 1996. Zulassung von pflanzlichen Arzneimitteln: Gemäß den Kriterien der Schulmedizin, vol 93.
22. **Dobson M.** 2013. Die Geschichte der Medizin, vol 373. National Geographic History.
23. **Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A.** 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-562.
24. **Dziewiatkowski NA, Osmon EN, Chahine EB, Thornby KA.** 2019. Baloxavir: A Novel Single-Dose Oral Antiviral for the Treatment of Influenza. *Sr Care Pharm* **34**:243-252.
25. **Eccles R.** 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* **5**:718-725.
26. **Eisfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y.** 2015. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* **13**:28-41.
27. **Elgner F, Sabino C, Basic M, Ploen D, Grunweller A, Hildt E.** 2018. Inhibition of Zika Virus Replication by Silvestrol. *Viruses* **10**.
28. **Esteve M.** 2020. Mechanisms Underlying Biological Effects of Cruciferous Glucosinolate-Derived Isothiocyanates/Indoles: A Focus on Metabolic Syndrome. *Front Nutr* **7**:111.
29. **Etzel F.** 2015. Expertengremium empfiehlt Senföle zur kausal orientierten Therapie von Atemwegsinfekten, on EL PATO Medien GmbH. <https://www.apotheke-adhoc.de/branchennews/alle-branchennews/branchennews-detail/cgc-expertengremium-empfoehlt-senfuele-zur-kausal-orientierten-therapie-von-atemwegsinfekten/>. Accessed
30. **Eustachi DmA.** 2012. Infekte der oberen Luftwege, Hausmittel und Naturheilkunde. Kirchheim-Verlag, Mainz.
31. **Fehr AR, Perlman S.** 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* **1282**:1-23.
32. **Fields BN, Knipe DM, Howley PM.** 2013. Orthomyxoviridae, Orhtomyoviruses, p 1151-1243. In David M. Knipe PMH (ed), *Fields Virology*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

33. **Fintelmann V, Albrecht U, Schmitz G, Schnitker J.** 2012. Efficacy and safety of a combination herbal medicinal product containing *Tropaeoli majoris herba* and *Armoraciae rusticanae radix* for the prophylactic treatment of patients with respiratory tract diseases: a randomised, prospective, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Curr Med Res Opin* **28**:1799-1807.
34. **Fleck F.** 2003. WHO says SARS outbreak is over, but fight should go on. *BMJ* **327**:70.
35. **Forst CV.** 2012. Influenza infection and therapy: a systems approach. *Journal of Future Virology* **7**:1-16.
36. **Frank PDMU, Biehler DrnK.** 2010. Senföle vermeiden Antibiotikaresistenzen, 02/2010 ed, p 28-31. MiM Verlagsgesellschaft mbH, Neu-Isenburg.
37. **Frank PDMU, Conrad DmA.** 2008. Abschlussbericht: Weitergehende Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Angocin (R) Anti-Infekt N. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene,
38. **Freeman MC, Graham RL, Lu X, Peek CT, Denison MR.** 2014. Coronavirus replicase-reporter fusions provide quantitative analysis of replication and replication complex formation. *J Virol* **88**:5319-5327.
39. **Freytmuth F, Vabret A, Rozenberg F, Dina J, Petitjean J, Gouarin S, Legrand L, Corbet S, Brouard J, Lebon P.** 2005. Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line. *J Med Virol* **77**:295-301.
40. **Fuchs R, Blaas D.** 2010. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol* **20**:281-297.
41. **Fujita J.** 2020. Introducing the new anti-influenza drug, baloxavir marboxil. *Respir Investig* **58**:1-3.
42. **Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Bragazzi NL, Panatto D.** 2014. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: Influenza life-cycle and currently available drugs. *J Prev Med Hyg* **55**:69-85.
43. **Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Bragazzi NL, Panatto D.** 2014. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part II: Future compounds against influenza virus. *J Prev Med Hyg* **55**:109-129.
44. **Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP.** 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**:1417-1423.
45. **GmbH R.** 2010. Fachinformation (Zusammenfassung der Produkteigenschaften / SPC), Repha Angocin (R) Anti-Infekt N filmtabletten. https://www.gelbe-liste.de/produkte/ANGOCIN-Anti-Infekt-N-Filmtabletten_13856/fachinformation. Accessed August/ 2010.
46. **Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A.** 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**:11538-11547.
47. **Goos KH, Albrecht U, Schneider B.** 2006. [Efficacy and safety profile of a herbal drug containing nasturtium herb and horseradish root in acute sinusitis, acute bronchitis and acute urinary tract infection in comparison with other treatments in the daily practice/results of a prospective cohort study]. *Arzneimittelforschung* **56**:249-257.
48. **Goos KH, Albrecht U, Schneider B.** 2006. Wirksamkeit und Vertraglichkeit eines pflanzlichen Arzneimittels mit Kapuzinerkressenkraut und Meerrettich bei

- akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung im Vergleich zu anderen Therapien unter den Bedingungen der taglichen Praxis. *Arzneimittelforschung* **62**:e4.
49. **Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, O'Meara MJ, Rezelj VV, Guo JZ, Swaney DL, Tummino TA, Hüttenhain R, Kaake RM, Richards AL, Tutuncuoglu B, Foussard H, Batra J, Haas K, Modak M, Kim M, Haas P, Polacco BJ, Braberg H, Fabius JM, Eckhardt M, Soucheray M, Bennett MJ, Cakir M, McGregor MJ, Li Q, Meyer B, Roesch F, Vallet T, Mac Kain A, Miorin L, Moreno E, Naing ZZC, Zhou Y, Peng S, Shi Y, Zhang Z, Shen W, Kirby IT, Melnyk JE, Chorba JS, Lou K, Dai SA, Barrio-Hernandez I, Memon D, Hernandez-Armenta C, et al.** 2020. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**:459-468.
 50. **Gräfe K.** 2018. Baloxavir erhält Zulassung in den USA. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH, Eschborn.
 51. **Grienke U, Mair CE, Kirchmair J, Schmidtke M, Rollinger JM.** 2018. Discovery of Bioactive Natural Products for the Treatment of Acute Respiratory Infections - An Integrated Approach. *Planta Med* **84**:684-695.
 52. **Haasbach E, Hartmayer C, Planz O.** 2013. Combination of MEK inhibitors and oseltamivir leads to synergistic antiviral effects after influenza A virus infection in vitro. *Antiviral Res* **98**:319-324.
 53. **Hayden FG, de Jong MD.** 2011. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J Infect Dis* **203**:6-10.
 54. **Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, Ishida T, Sekino H, Yamada K, Portsmouth S, Kawaguchi K, Shishido T, Arai M, Tsuchiya K, Uehara T, Watanabe A, Baloxavir Marboxil Investigators G.** 2018. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med* **379**:913-923.
 55. **He J, Qi WB, Wang L, Tian J, Jiao PR, Liu GQ, Ye WC, Liao M.** 2013. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza Other Respir Viruses* **7**:922-931.
 56. **Hilsch M, Goldenbogen B, Sieben C, Höfer Chris T, Rabe Jürgen P, Klipp E, Herrmann A, Chiantia S.** 2014. Influenza A Matrix Protein M1 Multimerizes upon Binding to Lipid Membranes. *Biophysical Journal* **107**:912-923.
 57. **Hoc S.** 2004. Atemwegsinfektionen: Superinfektion kann zu Komplikationen führen, *on* Deutscher Ärzteverlag GmbH. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/treffer?mode=s&wo=1008&typ=16&aid=44695&autor=Hoc%2C+Siegfried>. Accessed
 58. **Hof HD, Rüdiger.** 2005. Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie, vol 3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 59. **Hu Y, Sneyd H, Dekant R, Wang J.** 2017. Influenza A Virus Nucleoprotein: A Highly Conserved Multi-Functional Viral Protein as a Hot Antiviral Drug Target. *Curr Top Med Chem* **17**:2271-2285.
 60. **Huang CS, Lin AH, Liu CT, Tsai CW, Chang IS, Chen HW, Lii CK.** 2013. Isothiocyanates protect against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by upregulating Nrf2-dependent antioxidation and suppressing NFκB activation. *Mol Nutr Food Res* **57**:1918-1930.

61. **ICTV.** 2011. ICTV - 9th Report (2011). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/223/coronaviridae-figures. Accessed
62. **Intakhab Alam M, Mostafa A, Kanrai P, Müller C, Dzieciolowski J, Lenz E, Kuznetsova I, Schult-Dietrich P, Ziebuhr J, Dietrich U, Pleschka S.** 2016. Verapamil has Antiviral Activities that Target Different Steps of the Influenza Virus Replication Cycle, vol 8.
63. **Jacobi H, Witte I.** 1995. Additive und synergistische Kombinationswirkungen von Xenobiotika in subtoxischen Konzentrationen auf menschliche Fibroblasten. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **7**:256-260.
64. **Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ.** 2013. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* **26**:135-162.
65. **Karl-Heinz Goos UA, Berthold Schneider.** 2007. Aktuelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit eines pflanzlichen Arzneimittels mit Kapuzinerkressenkraut und Meerrettich bei akuter Sinusitis, akuter Bronchitis und akuter Blasenentzündung bei Kindern im Vergleich zu anderen Antibiotika. *Arzneimittelforschung (Drug Research)* **57**:238-246.
66. **Keller K, Knöss, W., Reh, K. et al.** 2003. Phytopharmaka: Begriffsbestimmungen und Hintergründe. **46(12)**:1036-1039. doi:<https://doi.org/10.1007/s00103-003-0735-x>.
67. **Kienholz M, Kemkes B.** 1960. [The antibacterial action of ethereal oils from horseradish root (*Cochlearia armoracia* L.)]. *Arzneimittelforschung* **10**:917-918.
68. **Kikuchi T, Watanabe A.** 2019. Baloxavir heralds a new era in influenza virus biology. *Respir Investig* **57**:1-2.
69. **Kirch W.** 2005. Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Wechselwirkungen, Pharmakogenetik, p 27. In Wehling M (ed), *Klinische Pharmakologie* vol 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
70. **Kissen R, Bones AM.** 2009. Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **284**:12057-12070.
71. **Kitching A, Roche A, Balasegaram S, Heathcock R, Maguire H.** 2009. Oseltamivir adherence and side effects among children in three London schools affected by influenza A(H1N1)v, May 2009 - an internet-based cross-sectional survey. *Euro Surveill* **14**:19287.
72. **Klenk H-D.** 2010. Orthomyxoviren (Inflenzaviren), p 600-609. In Doerr HW, Gerlich WH (ed), *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, vol 2. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
73. **Klesse P, Lukoschek P.** 1955. [Studies on the bacteriostatic effects of some mustard oils]. *Arzneimittelforschung* **5**:505-507.
74. **Kordyukova LV, Shtykova EV, Baratova LA, Svergun DI, Batishchev OV.** 2019. Matrix proteins of enveloped viruses: a case study of Influenza A virus M1 protein. *J Biomol Struct Dyn* **37**:671-690.
75. **Krawitz C, Mraheil MA, Stein M, Imirzalioglu C, Domann E, Pleschka S, Hain T.** 2011. Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Altern Med* **11**:16.
76. **Kromer C, Peitsch WK, Herr R, Schmieder A, Sonntag D, Schaarschmidt ML.** 2017. Behandlungspräferenzen für Biologika bei Psoriasis: erfahrene Patienten legen Wert auf Nachhaltigkeit. *J Dtsch Dermatol Ges* **15**:189-201.

77. **Kuo L, Godeke GJ, Raamsman MJ, Masters PS, Rottier PJ.** 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* **74**:1393-1406.
78. **Lackenby A, Thompson CI, Democratis J.** 2008. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Curr Opin Infect Dis* **21**:626-638.
79. **Leitlinienprogramm DGU A.** 30.04.2017 2010. Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten, *on* Ständige Kommission „Leitlinien“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-0441_S3_Harnwegsinfektionen.pdf. Accessed 27.05.
80. **Lenz E, Müller C, Mostafa A, Dzieciolowski J, Kanrai P, Dam S, Cwientzek U, Prenner L-N, Pleschka S.** 2018. Authorised medicinal product Aspecton® Oral Drops containing thyme extract KMTv24497 shows antiviral activity against viruses which cause respiratory infections doi:10.1016/j.hermed.2018.02.003.
81. **Lindsey AS, Sullivan LM, Housley NA, Koloteva A, King JA, Audia JP, Alvarez DF.** 2019. Analysis of pulmonary vascular injury and repair during *Pseudomonas aeruginosa* infection-induced pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Pulm Circ* **9**:2045894019826941.
82. **Lohmeyer J.** 2010. HNO-Virusinfektionen, p 217. *In* Doerr HW, Gerlich WH (ed), *Medizinische Virologie*, vol 2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
83. **Lopez-Souza N, Dolganov G, Dubin R, Sachs LA, Sassina L, Sporer H, Yagi S, Schnurr D, Boushey HA, Widdicombe JH.** 2004. Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**:L373-381.
84. **M. Sprössig MS-S.** 1956. Einfluß des Wirkstoffes aus der Kapuzinerkresse auf die intracelluläre Virussynthese. *Zeitschrift für Hygiene* **143**:215-222.
85. **Manolitsas ND, Trigg CJ, McAulay AE, Wang JH, Jordan SE, D'Ardenne AJ, Davies RJ.** 1994. The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the beta 1-integrins in asthma. *Eur Respir J* **7**:1439-1444.
86. **Mennicke WH, Gorler K, Krumbiegel G, Lorenz D, Rittmann N.** 1988. Studies on the metabolism and excretion of benzyl isothiocyanate in man. *Xenobiotica* **18**:441-447.
87. **Mirabelli C, Wotring JW, Zhang CJ, McCarty SM, Fursmidt R, Frum T, Kadambi NS, Amin AT, O'Meara TR, Pretto CD, Spence JR, Huang J, Alysandratos KD, Kotton DN, Handelman SK, Wobus CE, Weatherwax KJ, Mashour GA, O'Meara MJ, Sexton JZ.** 2020. Morphological Cell Profiling of SARS-CoV-2 Infection Identifies Drug Repurposing Candidates for COVID-19. *bioRxiv* doi:10.1101/2020.05.27.117184.
88. **Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H.** 2010. *Molekulare Virologie*, vol 3. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
89. **Mostafa A, Pleschka S.** 2018. Influenza H3N2 Vaccines: Recent Challenges. *Trends Microbiol* **26**:87-89.
90. **Müller C.** 2018. Grippeimpfung nicht zu spät und nicht zu früh!, *on* Deutsche Apotheker Zeitung, DAZ online. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2018/09/25/grippeimpfung-nicht-zu-spaet-und-nicht-zu-frueh>. Accessed
91. **Muller C, Obermann W, Schulte FW, Lange-Grunweller K, Oestereich L, Elgner F, Glitscher M, Hildt E, Singh K, Wendel HG, Hartmann RK,**

- Ziebuhr J, Grunweller A.** 2020. Comparison of broad-spectrum antiviral activities of the synthetic rocaglate CR-31-B (-) and the eIF4A-inhibitor Silvestrol. *Antiviral Res* **175**:104706.
92. **Muller C, Ulyanova V, Ilinskaya O, Pleschka S, Shah Mahmud R.** 2017. A Novel Antiviral Strategy against MERS-CoV and HCoV-229E Using Binase to Target Viral Genome Replication. *Bionanoscience* **7**:294-299.
93. **Nadeem MS, Zamzami MA, Choudhry H, Murtaza BN, Kazmi I, Ahmad H, Shakoori AR.** 2020. Origin, Potential Therapeutic Targets and Treatment for Coronavirus Disease (COVID-19). *Pathogens* **9**.
94. **Nakamura Y, Miyoshi N.** 2006. Cell death induction by isothiocyanates and their underlying molecular mechanisms. *BioFactors* **26**:123-134.
95. **Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, Droese B, Klaus JP, Makino S, Sawicki SG, Siddell SG, Stamou DG, Wilson IA, Kuhn P, Buchmeier MJ.** 2011. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* **174**:11-22.
96. **Newman DJ, Cragg GM.** 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **79**:629-661.
97. **Nguyen KT, Holloway MP, Altura RA.** 2012. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Biol* **3**:137-151.
98. **Nichols WG, Peck Campbell AJ, Boeckh M.** 2008. Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances. *Clin Microbiol Rev* **21**:274-290, table of contents.
99. **Nicholson KG, Kent J, Ireland DC.** 1993. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *Bmj* **307**:982-986.
100. **Oostra M, Hagemeyer MC, van Gent M, Bekker CP, te Lintelo EG, Rottier PJ, de Haan CA.** 2008. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J Virol* **82**:12392-12405.
101. **Organization W-WH.** 2021. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Accessed
102. **Paget C, Trottein F.** 2019. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front Immunol* **10**:336.
103. **Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB.** 2010. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol* **125**:1190-1199; quiz 1200-1191.
104. **Pankhaniya RR, Tamura M, Allmond LR, Moriyama K, Ajayi T, Wiener-Kronish JP, Sawa T.** 2004. Pseudomonas aeruginosa causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit Care Med* **32**:2293-2299.
105. **Park HW, Choi KD, Shin IS.** 2013. Antimicrobial activity of isothiocyanates (ITCs) extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against oral microorganisms. *Biocontrol Sci* **18**:163-168.
106. **Park SE.** 2020. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr* **63**:119-124.
107. **Patick AK.** 2006. Rhinovirus chemotherapy. *Antiviral Res* **71**:391-396.
108. **Peltola V, Waris M, Osterback R, Susi P, Hyypia T, Ruuskanen O.** 2008. Clinical effects of rhinovirus infections. *J Clin Virol* **43**:411-414.

109. **Perwitasari O, Yan X, O'Donnell J, Johnson S, Tripp RA.** 2015. Repurposing Kinase Inhibitors as Antiviral Agents to Control Influenza A Virus Replication. *Assay Drug Dev Technol* **13**:638-649.
110. **Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA.** 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**:517-528.
111. **Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson JB.** 2009. Anti-viral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virol J* **6**:197.
112. **Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, Ludwig S.** 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **3**:301-305.
113. **Pott A.** 2016. Experteninterview: Pflanzliche Arzneimittel - viel ungenutztes Potential, *on* (c) BIOPRO Baden-Württemberg GmbH. <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/aktuell/pflanzliche-arzneimittel-viel-ungenutztes-potenzial/>. Accessed 14.11.
114. **Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR.** 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* **279**:10136-10141.
115. **Prevention CCfDCa.** 15.10.2019 2019. How the Flu Virus Can Change: "Drift" and "Shift". <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>. Accessed
116. **Pyrk K, Bosch BJ, Berkhout B, Jebbink MF, Dijkman R, Rottier P, van der Hoek L.** 2006. Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2000-2008.
117. **Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J.** 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11223-11228.
118. **Reed LJ MH.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* **27**:493-497.
119. **RKI.** 2021. Beschluss der STIKO zur 4. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung und die dazugehörige wissenschaftliche Begründung, *on* Robert Koch Institut. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2021/16/Art_01.html. Accessed 08.04.2021.
120. **RKI.** 2018. Informationen des RKI zu Erkrankungsfällen durch das MERS-Coronavirus. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/M/MERS_Coronavirus/MERS-CoV.html. Accessed 13.03.
121. **Ruch TR, Machamer CE.** 2012. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses* **4**:363-382.
122. **Russier M, Yang G, Rehg JE, Wong SS, Mostafa HH, Fabrizio TP, Barman S, Krauss S, Webster RG, Webby RJ, Russell CJ.** 2016. Molecular requirements for a pandemic influenza virus: An acid-stable hemagglutinin protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:1636-1641.
123. **Schmitt AP, Lamb RA.** 2005. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv Virus Res* **64**:383-416.
124. **Schuler BA, Schreiber MT, Li L, Mokry M, Kingdon ML, Raugi DN, Smith C, Hameister C, Racaniello VR, Hall DJ.** 2014. Major and minor group rhinoviruses elicit differential signaling and cytokine responses as a function of receptor-mediated signal transduction. *PLoS One* **9**:e93897.

125. **Schulz PDV.** 2008. Erfolgreiche Pophylaxe redzidivierender Harnwegsinfekte, Kombination aus Kapuzinerkresse und Meerrettichwurzel ist wirksam. Zeitschrift für Phytotherapie **29**:130-131.
126. **Schutten M, van Baalen C, Zoetewij P, Fraaij P.** 2013. The influenza virus: disease, diagnostics, and treatment. MLO Med Lab Obs **45**:38-40.
127. **Shah Mahmud R, Mostafa A, Muller C, Kanrai P, Ulyanova V, Sokurenko Y, Dzieciolowski J, Kuznetsova I, Ilinskaya O, Pleschka S.** 2018. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus-infected MDCK-II cells. Virol J **15**:5.
128. **Skehel JJ, Wiley DC.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem **69**:531-569.
129. **Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, Mommaas AM.** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. J Virol **80**:5927-5940.
130. **Soundararajan P, Kim JS.** 2018. Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. Molecules **23**.
131. **Stegmann T.** 2000. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. Traffic **1**:598-604.
132. **Stott EJ, Tyrrell DA.** 1968. Some improved techniques for the study of rhinoviruses using HeLa cells. Arch Gesamte Virusforsch **23**:236-244.
133. **Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M.** 2017. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. Virulence **8**:1580-1591.
134. **Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A.** 2020. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018. Antiviral Res **175**:104718.
135. **Taubenberger JK.** 1998. Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:9713-9715.
136. **Thiel H.** 1958. [Experiences with angocin in medical practice]. Hippokrates **29**:601-603.
137. **Tobita K, Sugiura A, Enomote C, Furuyama M.** 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. Med Microbiol Immunol **162**:9-14.
138. **Todt D, Moeller N, Praditya D, Kinast V, Friesland M, Engelmann M, Verhoye L, Sayed IM, Behrendt P, Dao Thi VL, Meuleman P, Steinmann E.** 2018. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. Antiviral Res **157**:151-158.
139. **Turner RB.** 1997. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold. Ann Allergy Asthma Immunol **78**:531-539; quiz 539-540.
140. **Valgimigli L, Iori R.** 2009. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. Environ Mol Mutagen **50**:222-237.
141. **Vasin AV, Petrova AV, Egorov VV, Plotnikova MA, Klotchenko SA, Karpenko MN, Kiselev OI.** 2016. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. BMC Res Notes **9**:279.

142. **Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, Fu L, Cui Y, Liu X, Arledge KC, Chen YH, Zhang L, Wang X.** 2013. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res* **23**:986-993.
143. **Wang Z, Robb NC, Lenz E, Wolff T, Fodor E, Pleschka S.** 2010. NS reassortment of an H7-type highly pathogenic avian influenza virus affects its propagation by altering the regulation of viral RNA production and antiviral host response. *J Virol* **84**:11323-11335.
144. **Ward SE, Kim HS, Komurov K, Mendiratta S, Tsai PL, Schmolke M, Satterly N, Manicassamy B, Forst CV, Roth MG, Garcia-Sastre A, Blazewska KM, McKenna CE, Fontoura BM, White MA.** 2012. Host modulators of H1N1 cytopathogenicity. *PLoS One* **7**:e39284.
145. **Whayne TF, Jr.** 2018. Clinical Use of Digitalis: A State of the Art Review. *Am J Cardiovasc Drugs* **18**:427-440.
146. **WHO-Weltgesundheitsorganisation RfE.** 2020. Pandemie der Coronavirus-Krankheit (COVID-19). <http://www.euro.who.int/de/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019-ncov>. Accessed
147. **WHO.** 2021. Middle East respiratory syndrome (MERS). WHO - World Health Organization
148. **Wilschut J, McElhaney JE.** 2004. *Influenza, Influenza*. Mosby, Elsevier Limited.
149. **Wimmer E, Paul W.** 2010. Picornaviren, p 446-489. *In* Doerr HW, Gerlich WH (ed), *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, vol 2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
150. **Winter AG, Rings-Willeke L.** 1958. Untersuchungen über den Einfluß von Senfölen auf die Vermehrung des Influenza-Virus im embryonierten Hühnerei. *Archiv für Mikrobiologie* **31**:311-318.
151. **Winter AG, Willeke L.** 1957. [Excretion of an antibiotic substance from nasturtium (*Tropaeolum maius*); comparison in man and experimental animals]. *Arzneimittelforschung* **7**:692-694.
152. **Winther B.** 2011. Rhinovirus infections in the upper airway. *Proc Am Thorac Soc* **8**:79-89.
153. **Winther B, Arruda E, Witek TJ, Marlin SD, Tsianco MM, Innes DJ, Hayden FG.** 2002. Expression of ICAM-1 in nasal epithelium and levels of soluble ICAM-1 in nasal lavage fluid during human experimental rhinovirus infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**:131-136.
154. **Wittstock UF, Kimberly; Burow, Meike; Reichelt, Michael; Gershenzon, Jonathan** 2004. Forschungsbericht 2004: Die Biochemie der Glucosinolat-Hydrolyse: Wie entschärfen Insekten pflanzliche Senföle-Bomben?, *on* Max-Planck-Gesellschaft. <https://www.mpg.de/869312/forschungsSchwerpunkt1>. Accessed
155. **Wood JN.** 2015. From plant extract to molecular panacea: a commentary on Stone (1763) 'An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**.
156. **Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y.** 2013. *Fields Virology*, p 1186-1243, *Fields Virology*, vol 2. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, cop., Philadelphia
157. **Wu X, Zhu Y, Yan H, Liu B, Li Y, Zhou Q, Xu K.** 2010. Isothiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer* **10**:269.

158. **Xu L, Zhang Y, Liu Y, Chen Z, Deng H, Ma Z, Wang H, Hu Z, Deng F.** 2009. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from raccoon dog can serve as an efficient receptor for the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Gen Virol* **90**:2695-2703.
159. **Yang Y, Zhang L, Geng H, Deng Y, Huang B, Guo Y, Zhao Z, Tan W.** 2013. The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists. *Protein Cell* **4**:951-961.
160. **Ye Y, Hogue BG.** 2007. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. *J Virol* **81**:3597-3607.
161. **Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**:420-422.
162. **Yoshii N, Tochino Y, Fujioka M, Sakazaki H, Maruyama N, Asai K, Kakeya H, Shintaku H, Kawaguchi T.** 2020. The Comparison of the Efficacy of Baloxavir and Neuraminidase Inhibitors for Patients with Influenza A in Clinical Practice. *Intern Med* **59**:1509-1513.
163. **Zambrano JC, Carper HT, Rakes GP, Patrie J, Murphy DD, Platts-Mills TA, Hayden FG, Gwaltney JM, Jr., Hatley TK, Owens AM, Heymann PW.** 2003. Experimental rhinovirus challenges in adults with mild asthma: response to infection in relation to IgE. *J Allergy Clin Immunol* **111**:1008-1016.
164. **Zeng ZQ, Chen DH, Tan WP, Qiu SY, Xu D, Liang HX, Chen MX, Li X, Lin ZS, Liu WK, Zhou R.** 2018. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **37**:363-369.
165. **Zhang W, Zheng Q, Yan M, Chen X, Yang H, Zhou W, Rao Z.** 2018. Structural characterization of the HCoV-229E fusion core. *Biochem Biophys Res Commun* **497**:705-712.
166. **Ziebuhr J.** 2010. Coronaviren, p 505-515. *In* Doerr HW, Gerlich WH (ed), *Medizinische Virologie : Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, vol 2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
167. **Ziebuhr J.** 2005. The Coronavirus Replicase. *In* L. E (ed), *Coronavirus Replication and Reverse Genetics: Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 287. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
168. **Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**:853-879.
169. **Zimmermann NC.** 2009. Ergänzung zur Schulmedizin, Naturheilmittel im Trend. <https://www.n-tv.de/wissen/Naturheilmittel-im-Trend-article45183.html>. Accessed 02.01.
170. **Zuniga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gomez PA, Palacio L, Enjuanes L.** 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* **84**:2169-2175.

11. Publikationsverzeichnis

Lenz, Eva, Müller, Christin, Mostafa, Ahmed, Dzieciolowski, Julia. Kanrai, Pumaree, Dam, Sharmistha, Cwientzek, Ute, Prenner, Lars-Norbert, Pleschka, Stephan (2018). *Authorised medicinal product Aspecton® Oral Drops containing thyme extract KMTv24497 shows antiviral activity against viruses which cause respiratory infections.* Journal of Herbal Medicine. 13. 10.1016/j.hermed.2018.02.003.

Mohammad Alam, Ahmed Mostafa, Pumaree Kanrai, Christin Müller, Julia Dzieciolowski, **Eva Lenz**, Irina Kuznetsova, Patricia Schult-Dietrich, John Ziebuhr, Ursula Dietrich, Stephan Pleschka. *Verapamil has antiviral activities that target different steps of the influenza virus replication cycle* Journal of Antivirals and Antiretrovirals, December 2016 DOI: 10.4172/jaa.1000147

Petersen H, Wang Z, **Lenz E**, Pleschka S, Rautenschlein S. *Reassortment of NS segments modifies highly pathogenic avian influenza virus interaction with avian hosts and host cells.* J Virol. 2013 May;87(10):5362-71. doi: 10.1128/JVI.02969-12. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23468508; PMCID

Wang Z, Robb NC, **Lenz E**, Wolff T, Fodor E, Pleschka S. *NS reassortment of an H7-type highly pathogenic avian influenza virus affects its propagation by altering the regulation of viral RNA production and antiviral host response.* J Virol. 2010 Nov;84(21):11323-35. doi: 10.1128/JVI.01034-10. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20739516; PMCID: PMC2953208.

In Vorbereitung

Lenz Eva, et al. *Antivirale in vitro Wirksamkeit verschiedener Senföle aus der Behandlung von akuten, entzündlichen Erkrankungen der Atemwege auf die Vermehrung von humanpathogenen, respiratorischen Viren*

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

13. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Stephan Pleschka** bedanke ich mich für die jahrelange Betreuung, Zusammenarbeit, immerwährende Unterstützung und vor allem Geduld bei meiner Arbeit. Die Zeit im Labor – auch in meiner damaligen Funktion als MTLA - hat mich geprägt und mir auf meinem bisherigen Weg sehr geholfen.

Ebenso möchte ich mich bei allen (ehemaligen) Labormitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bedanken, die mich einen Teil der letzten 13 Jahre begleitet haben: Zhongfang, Michi, Pumaree, Marco, Julia, Ahmed und den anderen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie.

Ein großer Dank geht an meine Vorgesetzten und Arbeitskollegen der Abteilung für Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Schotten, durch die es erst möglich war, mir neben meiner ärztlichen Tätigkeit die Zeit zu nehmen und diese Arbeit zu verfassen.

Ein herzlicher Dank geht an **Dr. Christin Müller**, die mir bei der Verfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in der Durchführung der Experimente tatkräftig und beratend unterstützt hat.

Mein allergrößter Dank gilt meiner **Familie** und **Schwiegerfamilie**. Ohne meine **Eltern** und ihre immerwährende Unterstützung, wäre es für mich nicht möglich gewesen, den hinter mir liegenden, teilweise auch holprigen Weg zu gehen. Das Verständnis und die Geduld, die mir von meinem Umfeld entgegengebracht wurde, sehe ich nicht als selbstverständlich an und bin deshalb umso dankbarer für die Menschen, die mir in den letzten Jahren durch Höhen und Tiefen so viel Verständnis und Unterstützung entgegen gebracht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann bedanken, der die letzten 12 Jahre an meiner Seite verbracht hat und mich immer unterstützt hat. Vielen Dank **Steffen** für deine immerwährende Geduld und Unterstützung. Ich freue mich auf die Zeit die vor uns liegt.

