

Charakterisierung potentieller Inhibitoren  
von Influenzaviren unter besonderer  
Berücksichtigung der viralen Neuraminidase  
und des Fusionspeptids

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Sverre Morten Schwerdtfeger  
aus Berlin

2016

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen 2011 und 2015 unter Leitung von PD Dr. Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Bastian Opitz

Disputation am 03.03.2017



*Meinem Großvater*  
*Dr. med. Walter-Friedrich Leuchs*  
*(1917 – 2012)*

**E**in Schnupfen hockt auf der Terrasse,  
auf dass er sich ein Opfer fasse  
und stürzt alsbald mit großem Grimm  
auf einen Menschen namens Schrimm.  
Paul Schrimm erwidert prompt: "Pitschü!"  
und hat ihn drauf bis Montag früh.

(Christian Morgenstern)

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Einführung und Taxonomie . . . . .	9
1.2	Molekulare Grundlagen . . . . .	10
1.2.1	NS1 und NS2 . . . . .	12
1.2.2	PB1 . . . . .	12
1.2.3	Matrixproteine . . . . .	13
1.3	Neuraminidasen bei Orthomyxoviren und anderen Pathogenen . . . . .	14
1.4	Hämagglutinin . . . . .	16
1.5	Infektionszyklus – Eintritt, Replikation und Austritt . . . . .	18
1.6	Pathogenese und Klinik . . . . .	21
1.7	Epidemiologie . . . . .	23
1.8	Prophylaxe . . . . .	27
1.9	Antivirale Therapie & Resistenzen . . . . .	28
1.9.1	Adamantane . . . . .	28
1.9.2	Neuraminidaseinhibitoren . . . . .	29
1.9.3	Adjuvante Therapie . . . . .	32
1.10	Medikamente pflanzlichen Ursprunges . . . . .	32
1.11	Flavonoide . . . . .	33
1.12	Problemstellung . . . . .	34
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>36</b>
2.1	Geräte . . . . .	36
2.1.1	Virusanzucht & NA-Inhibitions-Assay . . . . .	36
2.1.2	Fluorometrie . . . . .	36
2.1.3	Absorption . . . . .	36
2.1.4	Bilddokumentation . . . . .	36
2.2	Software . . . . .	36
2.3	Internetdienste . . . . .	37
2.4	Verbrauchsmaterialien . . . . .	37
2.5	Influenzaviren . . . . .	37
2.6	Zellen . . . . .	37
2.7	Chemikalien & Reagenzien . . . . .	38
2.8	Nährmedium . . . . .	38
2.9	Infektionsmedium . . . . .	38
2.10	Lösungen & Puffer . . . . .	39
2.10.1	Erythrozytenlösung . . . . .	39
2.10.2	Avicel-Overlay . . . . .	39

---

2.10.3	Fixier-Färbe-Lösung . . . . .	39
2.10.4	MES . . . . .	39
2.10.5	Stopplösung . . . . .	39
2.10.6	PBS . . . . .	39
2.10.7	PBS* . . . . .	39
2.11	Kits . . . . .	40
2.12	Peptide . . . . .	40
2.13	Untersuchte Naturstoffe . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>44</b>
3.1	Puffer & Lösungen . . . . .	44
3.1.1	Substrat . . . . .	44
3.1.2	Inhibitor . . . . .	44
3.1.3	Lösungsmittel . . . . .	44
3.1.4	Naturstofflösungen . . . . .	44
3.2	MDCK-Zellen . . . . .	44
3.3	Virologische Methoden . . . . .	44
3.3.1	Virusanzucht . . . . .	45
3.3.2	Infektion unter Anwesenheit von Inhibitor bzw. Testsubstanz . . . . .	45
3.3.3	Hämagglutinations-Test (HA-Test) . . . . .	45
3.3.4	Hämagglutinations-Elutions-Test . . . . .	46
3.3.5	Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test . . . . .	46
3.3.6	Plaque-Reduktions-Test . . . . .	47
3.4	Neuraminidase-Inhibitions-Assay . . . . .	47
3.4.1	NA-Aktivitätsbestimmung . . . . .	47
3.4.2	Bestimmung der 50 % inhibitorischen Konzentration (IC <sub>50</sub> ) . . . . .	48
3.4.3	Mathematische Auswertung . . . . .	48
3.5	Enzymkinetische Messung . . . . .	48
3.6	Cytotoxizitätstest . . . . .	50
3.6.1	MTT-Test (Kit) . . . . .	50
3.6.2	LDH-Test (Kit) . . . . .	51
3.7	Selektivitätsindex . . . . .	51
3.8	Molekulares Modell zur Bindungsberechnung . . . . .	52
3.9	Peptidsynthese . . . . .	54
3.10	Peptidbindungsmodelle . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1	Einfluss der Naturstoffe auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	55
4.1.1	NA-Aktivitätsbestimmung . . . . .	55
4.1.2	Einfluss von Amantadin und Oseltamivir auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	56

---

4.1.3	Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	57
4.1.4	Einfluss von Calcium auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	57
4.1.5	Einfluss der Naturstoffe auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	57
4.2	Enzymkinetik . . . . .	60
4.3	Einfluss von Kämpferol auf die Neuraminidase im Hämagglutinations-Elutions-Test	63
4.4	Einfluss des Lösungsmittels auf die Cytotoxizität von MDCK-Zellen . . . . .	63
4.5	Einfluss der Flavonoide auf die Cytotoxizität von MDCK-Zellen . . . . .	64
4.6	Plaque-Reduktions-Test . . . . .	64
4.7	Einfluss von Oseltamivir auf die Infektion und die Virusvermehrung . . . . .	69
4.8	Einfluss der Flavonoide auf die Infektion und die Virusvermehrung . . . . .	69
4.9	Molekulares Modell zur Bindungsberechnung . . . . .	71
4.10	Peptide und deren potentiellen Bindungsstellen am Hämagglutinin . . . . .	73
4.11	Einfluss der Peptide auf die Infektion und die Virusvermehrung . . . . .	78
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
5.1	Naturstoffe inhibieren in unterschiedlichem Maße die Neuraminidasen . . . . .	79
5.2	Kämpferol zeigt einen Einfluss auf die Virusvermehrung . . . . .	85
5.3	Bioverfügbarkeit von Flavonoiden . . . . .	87
5.4	Untersuchte Peptide scheinen die Infektion und die Virusvermehrung nicht zu affektieren . . . . .	90
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>98</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Rezepte gegen Grippe</b>	<b>118</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>120</b>



## 1 Einleitung

Bereits im alten China, Ägypten und in der Antike kannte man virusbedingte Krankheiten, ohne die Pathogenese zu verstehen. Auf zahlreichen Tontafeln und Amphoren findet man Abbildungen von polioegeplagten Menschen. Bei Homer und mesopotamischen Gesetzestexten wird die Tollwut erwähnt [1].

Viren wurden lange Zeit als die kleinste infektiöse Einheit angesehen. Der Begriff stammt ursprünglich aus dem Griechischen (*φίσις*) und bedeutet soviel wie Gift [2]. Wie so vieles fanden auch dieses Wort und die damit verbundenen Vorstellungen Eingang in die römische Kultur und wurden kurzer Hand adaptiert. Das lateinische *virus* (-i, neutr.) mit der Bedeutung Gift, Schleim [3] fand u.a. bei Virgil (70 - 19 v. Chr.) Erwähnung. Es dauerte bis 1892 bis Dimitri I. Iwanowski durch das Tabakmosaikvirus zeigen konnte, dass es ein infektiöses Agens gibt, das kleiner als Bakterien sein muss, da es durch einen Bakterienfilter hindurch treten konnte. Friedrich Loeffler entdeckte zusammen mit Paul Frosch 1898 mit dem Erreger der Maul-und-Klauenseuche das erste tierpathogene Virus [4].

Seit diesen Anfängen der Virologie im 19. Jahrhundert wurden um die 3000 verschiedenen Virusarten entdeckt [5], wobei davon ausgegangen werden kann, dass es noch etliche unentdeckte Arten gibt.

Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und auf die Strukturen der Wirtszelle angewiesen sind, werden sie nicht als Lebewesen angesehen. Je nach Wirtsorganismus können sie in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Viren, die Bakterien befallen (Bakteriophagen), Viren, die Pilze, Protozoen oder Algen infizieren, Viren, die Pflanzen zum Wirt haben und schlussendlich Viren, die Metazoa und damit auch Menschen anstecken.

### 1.1 Einführung und Taxonomie

Die Grippe begleitet uns seit Menschheitsgedenken und führt auch in der modernen Zivilisation jedes Jahr zur Erkrankung von 5-15 % der Weltbevölkerung, wovon zwischen 250.000 und 500.000 Infizierte sterben [6]. Insbesondere in den kälteren Wintermonaten steigt die Zahl der infizierten Menschen. In regelmäßigen Abständen treten neben den saisonalen Verläufen Pandemien auf, die ein Vielfaches an Menschenleben fordern. Zu ihnen zählen u.a. die Spanische Grippe 1918 mit schätzungsweise 40-50 Mio. Todesopfern [7] (und damit deutlich mehr als der Erste Weltkrieg mit ca. 17 Mio. forderte), 1957 die Asiatische Grippe [8] und die Hongkong Grippe 1968 [9]. Zuletzt wurde im Juni 2009 das pandemische H1N1 Virus, im Volksmund auch „Schweinegrippe“ genannt, von der WHO als pandemisches Virus eingestuft [10].

Ursächlich für die Grippe sind Influenzaviren (Abb. 1). Sie gehören in die Familie der Orthomyxoviridae. Innerhalb der humanpathogenen Orthomyxoviren unterscheidet man zwischen Influenza A-, Influenza B- und Influenza C-Viren. Die Typ A-Viren werden je nach ihren Hämagglutinationsprotein (HA) und ihrer Neuraminidase (NA) weiter in Subtypen unterteilt. Innerhalb der Typ B-Viren unterscheidet man zwischen der Yamagata- oder der Victoria-Linie. Alle Influenza-

viren besitzen ein natürliches tierisches Reservoir (Tab. 1).

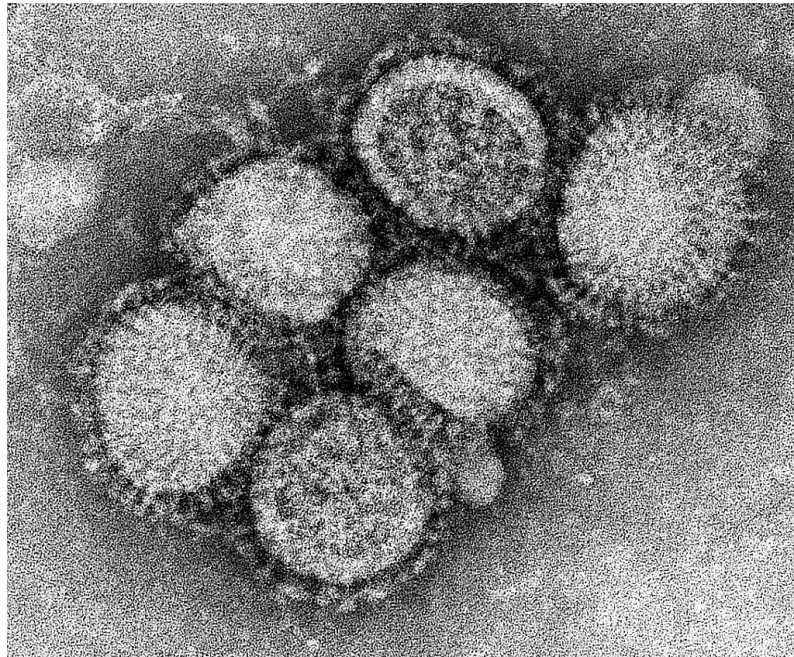


Abbildung 1. **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenzavirionen.** Man erkennt sechs sphärische Partikel, die spikeartig mit den Oberflächenproteinen HA und NA besetzt sind. Bei diesen Vertretern handelt es sich um das pandemische H1N1-Virus von 2009, das in der Öffentlichkeit auch unter dem Namen „Schweinegrippe“ firmierte. <http://www.pierre-markuse.de>.

Tabelle 1. **Systematik der *Orthomyxoviridae*.** Modifiziert nach Flint [1] und Modrow [4].

Familie	Genus	Wirt
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A-Virus	Mensch & Tier (Schweine, Pferde, Robben, Geflügel und Wildvögel)
	Influenza B-Virus	Mensch & Tier (Robben)
	Influenza C-Virus	Mensch & Tier (Schwein)
	Thogotovirus	Tier (Zecken, Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere)
	Isavirus	Tier (Lachs)

Mit dem Influenza A-Virus wurde 1930 zum ersten Mal von Richard Shope ein Influenzavirus aus Schweinen isoliert [11], 1933 dann erstmals direkt aus einem Menschen [12].

## 1.2 Molekulare Grundlagen

*Orthomyxoviridae* besitzen ein segmentiertes RNA-Genom, dessen Stränge in Negativrichtung orientiert sind [13]. Influenzapartikel kommen in der Regel in einer sphärischen Form mit einem Durchmesser von bis zu 120 nm vor [14]. Es treten jedoch auch filamentöse Ausprägungen auf [15]. Das Virus ist aus acht verschiedenen Nucleocapsidsegmenten aufgebaut (Tab. 2), die von einer Lipidmembran umhüllt sind. Ein Nucleocapsidsegment setzt sich aus der einzelsträngigen RNA sowie den mit ihr am 3'-Ende assoziierten Proteinen des Polymerasekomplexes PB1,

PB2 und PA zusammen. Zusätzlich ist die Ribonucleinsäure auf ihrer gesamten Länge mit dem Polypeptid NP komplexiert. Es ist aus zahlreichen basischen Argininresten aufgebaut, ca. 55 kD groß und weist eine Domäne für den Transport in den Zellkern auf. In seiner von der RNA dissoziierten Form unterhält es den korrekten Ablauf der Genomreplikation [4, 16, 17, 18].

Tabelle 2. **Übersicht des segmentierten Genoms von Influenzaviren (A und B) und deren Funktion.**

Segment	Protein	Länge (kB)	Größe (kD)	Funktion
1	PB2	2,3	80/88	Bestandteil des Nucleocapsids und Polymerasekomplexes, Bindung an 5'-Cap-Strukturen
2	PB1	2,3	85/90	Bestandteil des Nucleocapsids und Polymerasekomplexes, RNA-abhängige RNA-Polymerase
	PB1-F2		10	Apoptose-Induktion der Wirtszelle
3	PA	2,2 – 2,3	83	Bestandteil des Nucleocapsids und Polymerasekomplexes
4	NB	1,7 – 1,8	77	Bindung an Neuraminsäure, Membranfusion
	HA			
5	NP	1,5 – 1,8	55	Bestandteil des Nucleocapsids, Kerntransportsignal
6	NA	1,4 – 1,5	56/57	Neuraminidase
	NB		18	nur bei Influenza B-Viren: Ionenkanal
7	M1	1,0 – 1,1	28	Matrixprotein, Rolle bei Morphogenese
	M2/BM2		15/12	Ionenkanal, BM2 bei Influenza B-Viren
8	NS1	0,8 – 1,0	26/40	Multifunktionsprotein, Hauptrolle bei Umgehung des Immunsystems
	NS2/NEP		11	Transportsignal

Der heterotrimere Polymerasekomplex setzt sich aus den nicht kovalent gebundenen basischen Proteinen PB1 und PB2, sowie dem sauren Protein PA zusammen. Es scheint eine wichtige Rolle bei der effektiven Replikation zu haben und an die aminoterminalen Aminosäuren des PB1-Protein gebunden zu sein [19]. PB1 arbeitet als RNA-abhängige RNA-Polymerase im Zellkern, PA bindet an das 5'-Ende der mRNA der Wirtszelle und spaltet nach ca. zehn bis 13 Nucleotiden. Dieses aus zehn bis 13 Nucleotiden bestehende Stück wird dann als Primer für die virale mRNA-Synthese genutzt (sog. cap-Snatching). Pro Viruspartikel liegen in etwa 50 Einheiten des Komplexes vor. Jedes Protein davon besitzt eine Signalsequenz zum Transport in den

Zellkern [20].

### 1.2.1 NS1 und NS2

Die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 liegen bei Influenza A- und B-Viren auf dem achten Segment, bei Influenza C-Viren auf dem siebten. Sie sind 26 kD (Influenza A) bzw. 40 kD (Influenza B) groß, NS2 14 kD [4]. Neben der Beeinflussung des Spleißens von viralen Transkripten unterdrückt NS1 hauptsächlich als Virulenzfaktor die Immunantwort der Zelle. Als Dimer wird es in den Zellkern transportiert, wo es mittels eines aus sechs  $\alpha$ -Helices bestehenden Strukturmotivs an doppelsträngige RNA bindet. Der N-Terminus des Proteins enthält das Transportsignal für den Zellkern (NES nukleäres Exportsignal) und interagiert mit diversen Zellproteinen. Damit entgeht das Virus der Interferonantwort des Wirtes. NS1 blockiert NF $\kappa$ B und beeinflusst somit die Expression von Interferongenen, deren Produkte andere Zellen in der Umgebung eine Infektion signalisieren würden. An die RNA gebunden verhindert NS1 zudem den RNA-Verdau durch die RNase L. Es inhibiert die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) und steigert die Translation viraler mRNA durch Interaktion mit dem zellulären Initiationsfaktor eIF4GI [4, 21, 22, 23].

NS2 bzw. NEP (nuclear export factor) besitzen überlappende Leserahmen und entstehen durch Spleißen aus der mRNA von NS1. Influenzaviren replizieren als eine der wenigen RNA-Viren im Zellkern. Die neugebildeten viralen Ribonucleoproteine (vRNP) werden durch NS2/NEP und NS1 aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert [21, 24].

### 1.2.2 PB1

In Influenza A-Viren wurden darüber hinaus vor nicht allzu langer Zeit zwei weitere Nichtstrukturproteine identifiziert: PB1-F2 und PB1 N40 [25, 26]. Letzteres stellt eine aminoterminal verkürzte Version des PB1-Proteins dar. Die genaue Funktion ist nicht endgültig geklärt. Anders als das vollständige PB1 besitzt es keine Polymeraseaktivität, tritt mit diesem allerdings in Wechselwirkung und scheint dessen Funktion zu beeinflussen. PB1-F2 gehört zu den Virulenzfaktoren und entsteht als Produkt aus einem zweiten offenen Leserahmen (frame-2) des zweiten Genomsegmentes. Fehlt dieses 87 Aminosäuren lange Protein, wird eine verringerte Pathogenität des Virus beobachtet. An PB1 gebunden steigert PB1-F2 dessen Polymeraseaktivität. In die Membran von Mitochondrien eingelagert, bildet es Poren, durch die Cytochrom C in das Cytoplasma strömt und damit die Apoptose induziert. Dieses Phänomen tritt insbesondere in Zellen des Immunsystems, wie Monocyten, Lymphocyten und Alveolarmakrophagen auf. Neben der Suppression der Abwehr im Epithel der Atemwege könnte so auch der Weg für eine bakterielle Superinfektion mit *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* bereitet werden [4, 27, 28].

### 1.2.3 Matrixproteine

In die Membran sind spikeartig die glycolysierten Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das M2-Protein eingelagert (Abb. 2).

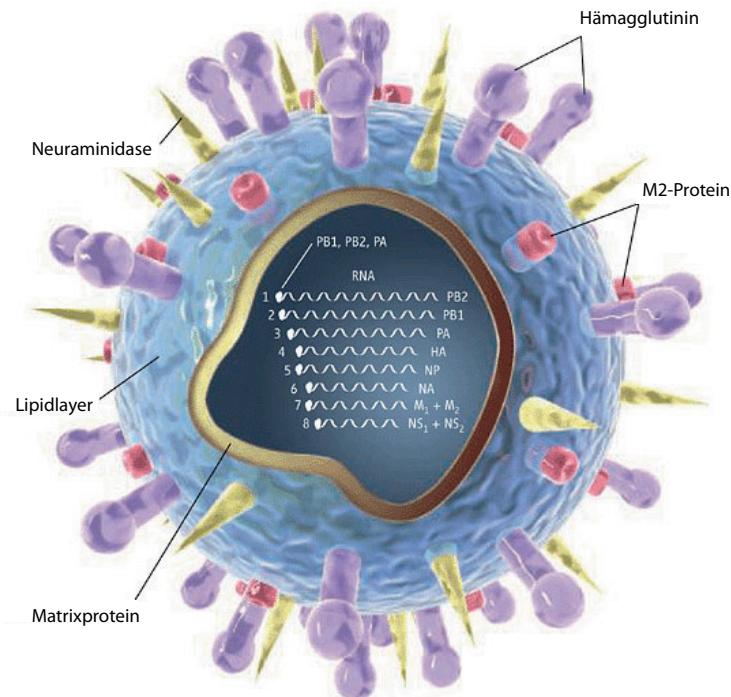


Abbildung 2. **Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenzavirions.** Influenzaviren besitzen eine Lipidmembran, in die spikeartig das trimere Hämagglutinin und die tetramere Neuraminidase eingelagert sind. Das M2-Protein stellt einen Ionenkanal dar. In einem Viruspartikel kommen mindestens acht voneinander verschiedene Nucleocapsidsegmente vor. Ein Nucleocapsidsegment besteht aus der einzelsträngigen RNA, dem mit ihr komplexierten NP-Protein und den Proteinen des Polymerasekomplexes PB1, PB2 und PA am 3'-Ende. An der Innenseite der Hüllmembran bildet das M1-Protein eine Proteinschicht. Adaptiert nach [29].

Das M2-Protein ist ein Homotetramer und als Transmembranprotein in die Virusmembran eingelagert. Diese Transmembranregion wird durch vier  $\alpha$ -Helices gebildet. Bei niedrigem pH-Wert kommt es innerhalb des Proteins zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Weitung des Kanals. In der Folge können selektiv Protonen hindurchtreten und das Endosominnere ansäuern [30]. Indess wird diskutiert, ob die zytoplasmatische Domäne von M2 auch eine Rolle bei der Rekrutierung von M1 während des Buddings spielt [31].

Das 28 kD große M1-Protein kleidet die Innenseite der Virushüllmembran aus und scheint mit der cytoplasmatischen Domäne der Oberflächenproteine HA, NA und dem Transmembranprotein M2 assoziiert zu sein. Es liegt in hoher Kopienzahl vor und spielt eine wesentliche Rolle bei der Verpackung der Nucleocapsidsegmente in die neu entstehenden Virionen, indem es mit den NP-Proteinen interagiert [32, 33, 34].

### 1.3 Neuraminidasen bei Orthomyxoviren und anderen Pathogenen

Neuraminidasen gehören zu der Familie der Exoglykosidasen (EC 3.2.1.18) und spalten hydrolytisch Bindungen zwischen nichtreduzierenden terminalen Sialinsäuren und Mono- oder Oligosacchariden von Glykoproteinen oder Glykolipiden ab, die ketosidisch miteinander verknüpft sind [35]. Sie sind hoch substratspezifisch [36]. Ihre Affinität und Aktivität hängt im Wesentlichen von dem Sialinsäurederivat, der Art der ketosidischen Bindung und dem vorletzten Zuckerrest ab [37]. Durch diese Spezifität ist es dem Organismus u.a. möglich die verschiedenen Funktionen der Sialinsäuren zu kontrollieren [37]. Neuraminidasen konnten in Menschen, Tieren, Protozoen, Bakterien und Viren gefunden werden [38]. Neben der Pathogenese [39] dienen sie in Bakterien auch der Bereitstellung von Kohlenstoffen zur Ernährung [36, 37, 40]. *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* benutzen ihre Neuraminidase zur Bildung von Biofilmen und im initialen Schritt der Infektion des Respirationstraktes [41, 42].

#### Neuraminidase bei Orthomyxoviren

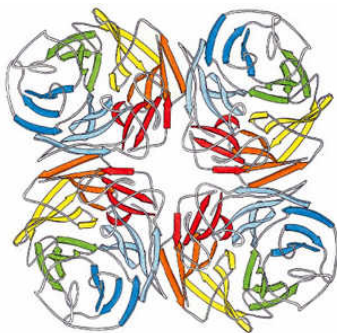


Abbildung 3. Aufsicht auf die an einen  $\beta$ -Propeller erinnernde Neuraminidase.

(<http://www.scientificpsychic.com>).

Die Neuraminidase der Influenza A-Viren (Abb. 3), von der man bisher elf Antigen-Subtypen identifiziert hat (N1 bis N11) [43, 44], ist aus vier identischen Monomeren aufgebaut, die zu einem pilzförmigen Tetramer assoziiert sind. Jedes Monomer besteht seinerseits aus sechs viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, deren Anordnung an einen  $\beta$ -Propeller erinnert. Eine annähernd 6-fache Symmetrieachse läuft durch das Zentrum der Untereinheit und verbindet die sechs  $\beta$ -Faltblätter mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, das nahe dieser Pseudosymmetrieachse liegt [45, 46]. Der Kopf der Neuraminidase ist über einen Stiel mit der

transmembranen Domäne verbunden. Die Funktion des Stiels ist unbekannt [47].

Die Neuraminidase wird den integralen Typ II Membran-Glykoproteinen zugeordnet, die über eine hydrophobe Sequenz von 29 Aminosäuren nahe des N-Terminus in der Membran verankert ist [45, 47]. Das 1413 Nucleotide lange Gen codiert für ein 454 Aminosäuren umfassendes Protein und weist fünf potentielle Glycosylierungsstellen auf [47].

Phylogenetisch werden drei Typen der Neuraminidase unterschieden: die Neuraminidase der Influenza A-Viren, der Influenza B-Viren und der Influenza C-Viren (Abb. 4). Letztere besitzen keine klinische Relevanz. Innerhalb der Influenza B-Viren haben sich zwei Neuraminidaselinien evolviert, die sich in der Yamagata- bzw. der Victoria-Linie finden.

Die Sialinsäure hydrolysierenden Subtypen N1-N9 der Neuraminidase von Influenza A-Viren lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Gruppe eins (1-NA) umfasst die Subtypen N1, N4, N5 und N8, die Gruppe zwei (2-NA) beinhaltet die Subtypen N2, N3, N6, N7 und N9 [48]. 1-

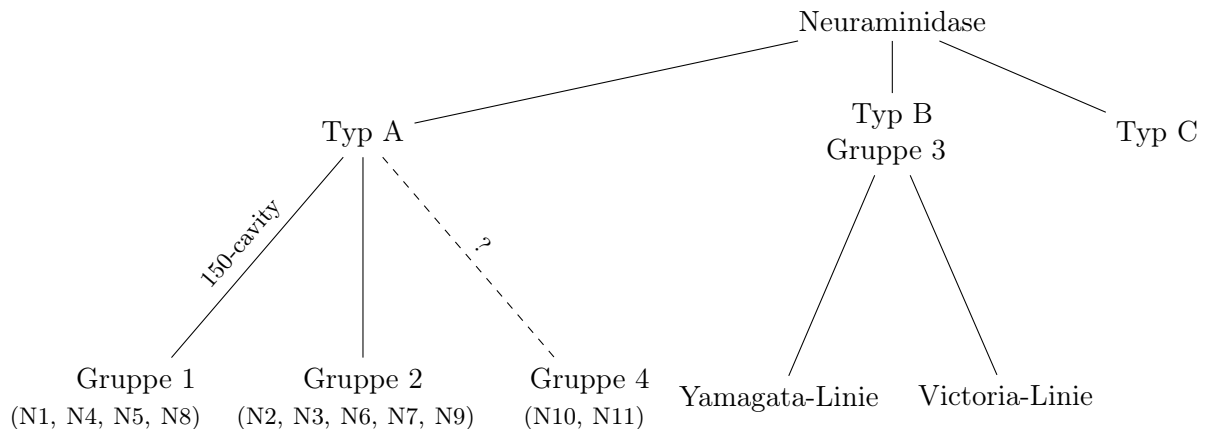


Abbildung 4. **Phylogenie der Neuraminidase.** Die Neuraminidase von A(H1N1)pdm09 wird phylogenetisch der Gruppe 1 zugeordnet, strukturell ähnelt sie jedoch der Gruppe 2. Die Struktur der Neuraminidase vom Subtyp 10 und 11 weicht stark von der der anderen Subtypen ab und zeigt keine oder nur sehr geringe Neuraminidaseaktivität.

NA und 2-NA unterscheiden sich durch einen Hohlraum (sog. 150-cavity) im aktiven Zentrum nahe der Bindungsstelle des Liganden. Die Neuraminidase des pandemischen Virus von 2009 A(H1N1)pdm09 nimmt eine Zwischenstellung ein. Phylogenetisch evolvierte sie aus der Gruppe 1, strukturell gleicht sie jedoch den Neuraminidasen der Gruppe 2, ohne die 150-cavity im aktiven Zentrum [49]. Zuletzt wurde ein zehnter und elfter Subtyp der Neuraminidase (N10 und N11) bei Inflenzaviren in Fledermäusen in Südamerika entdeckt. Er weicht strukturell wie funktionell stark von denen der Gruppe 1 und 2 ab und zeigt *in vitro* nur schwache bis gar keine Neuraminidaseaktivität [44, 50, 51]. Damit könnte es sich um eine dritte Gruppe innerhab der Typ A Neuraminidasen handeln. Die Neuraminidase der Influenza B-Viren bilden eine separate Gruppe (B-NA).

Sowohl zwischen den verschiedenen Subtypen von Influenzavirus A, als auch zwischen Typ A und B ist das aktive Zentrum (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 und Y406) und die das katalytische Zentrum umrahmenden und stabilisierenden Aminosäuren (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294 und E425) hoch konserviert [52].

Die Neuraminidase von Inflenzaviren erkennt endständige N-Acetylneuraminsäuren, die  $\alpha$ 2,3- oder  $\alpha$ 2,6-glykosidisch verknüpft sind und spaltet diese durch Hydrolyse. Sie ist nicht nur für das Ausschleusen der Viruspartikel aus der Wirtszelle und für Verhinderung einer Superinfektion durch andere Viren, die Sialinsäuren als Rezeptor benutzen [53], essentiell, sondern spaltet auch Sialinsäuren von Schleim und umgeht damit ein Haftenbleiben von Viruspartikeln an Nichtzielzellen beim Eintritt in die Atemwege [54]. Inwieweit sie an der hämagglutininvermittelten Virus-Membranfusion beteiligt ist, bleibt unklar [54]. Ohuchi et al. [55] schließen aus Zellkulturstudien, dass die Neuraminidase die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle unterstützt und damit die Infektionseffektivität steigert, wenn das Virus an eine endozytoseinaktive Region der Zelle gebunden hat und so nicht in die Zelle aufgenommen werden kann. Mit Hilfe der Neuraminidase könnte das Virus diese Region jedoch wieder verlassen und anschließend an eine endozytoseakti-

ve Zone binden und so in die Zelle gelangen. Chen et al. [56] postulieren, dass die Neuraminidase neben dem Hämagglutinin auch am Zusammenbau (Assembly) und an der Knospung (Budding) des Viruspartikels beteiligt ist.

## 1.4 Hämagglutinin

Das Hämagglutinin ist ein Homotrimer, das 7-8 nm aus der Membranoberfläche herausragt. Aktuell sind von Influenza A-Viren von diesem Protein 18 Varianten (H1-H18) bekannt [43, 44], die sich in ihren Aminosäuresequenzen, der Rezeptorspezifität, der Spaltbarkeit durch zelluläre Proteasen und der Erkennung durch Antikörper unterscheiden. Sie können somit zur Virus-typbestimmung herangezogen werden. Dabei scheinen HA17 und HA18 nicht an Sialinsäure zu binden [57]. Das Hämagglutinin ist in der Lage, Erythrozyten zu binden und sie zu vernetzen.

### Das Hämagglutinin als Fusionspeptid

Das Hämagglutinationsprotein besitzt nicht nur die Fähigkeit an endständige Sialinsäuren auf Zelloberflächen zu binden, sondern ist auch für die Fusion zwischen Virushülle und der Membran der Wirtszelle verantwortlich. Es setzt sich aus zwei Proteinen zusammen (HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>), die miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind und aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein HA<sub>0</sub> durch Proteasen geschnitten werden. Das Vorläuferprotein HA<sub>0</sub> wird aus 560 Aminosäuren mit einem N-Terminus und einem hydrophoben C-Terminus gebildet (Abb. 5). Durch diese hydrophoben Aminosäuren erfolgt die Verankerung in der Membran.

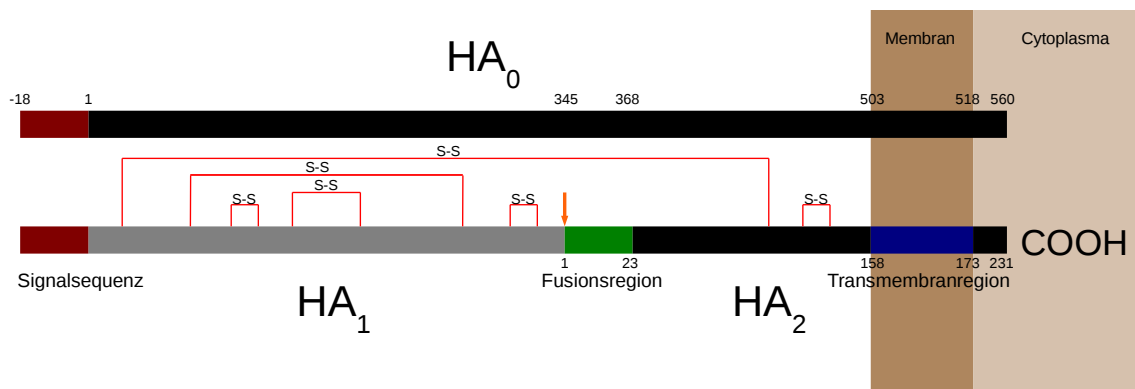


Abbildung 5. **Primärsequenz des HA-Proteins vor der Reifung (HA<sub>0</sub>) und nach der enzymatischen Spaltung in HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub>.** Das Vorläuferprotein HA<sub>0</sub> wird durch Proteasen zwischen den Aminosäuren 340 und 345 (gelber Pfeil) in die beiden Proteine HA<sub>1</sub> (grau) und HA<sub>2</sub> (schwarz) gespalten, die über eine Disulfidbrücke (S-S) weiter miteinander verbunden bleiben. Die Signalsequenz (rot) sorgt für einen Transport über Golgivesikel aus der Zelle hinaus und wird mittels Signalpeptidase abgespalten. Die C-terminale Transmembranregion (blau) ist hydrophob und verankert das Protein in der Virusmembran. Die 23 Aminosäure lange fusiogene Region (Fusionspeptid) (grün) ist ebenfalls stark hydrophob und induziert die Fusion von zellulärer und Virusmembran. Modifiziert nach Flint [1].

HA<sub>0</sub> wird in dem endoplasmatischen Reticulum gebildet. Bevor es posttranslational glycolysiert und zu Trimeren assembliert wird, kommt es cotranslational im Golgi-Apparat zur Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids. Im C-terminalen Bereich werden noch Palmitinsäuren angefügt.



Schließlich spalten intra- und extrazelluläre trypsinähnliche Proteasen das Vorläuferprotein in die beiden Bestandteile HA<sub>1</sub>, das 36 kD, bzw. modifiziert 50 kD groß ist, und HA<sub>2</sub> von 26 kD Größe. Diese Spaltung ist für die Infektiosität essentiell und stellt damit einen Pathogenitätsfaktor dar. Durch die Aminosäuresequenz, besonders die basischen Aminosäuren, wird festgelegt, welche Protease (Tab. 3) spaltet [4, 58].

Tabelle 3. **Übersicht der an der HA<sub>0</sub>-Spaltung beteiligten intra- und extrazellulären Proteasen und ihrer Lokalisation.** HAT human airway trypsin-like protease, TMPRSS2 transmembrane protease serine S1 member 2. Modifiziert nach [4, 59].

Protease	Lokalisation
Furinprotease	Golgi-Vesikel
Mini-Plasmin	Epithelzellen der Segmentbronchien
Protease Clara	Clara-Zellen
Serinproteasen Typ 2 (HAT, TMPRSS2)	Cytoplasmamembran
subtilisinähnliche Proteasen	zellulär

Während die Spaltung des HA-Vorläuferprotein der beiden Subtypen H5 und H7 bereits intrazellulär erfolgt, geschieht dies bei H1, H2 und H3 extrazellulär überwiegend durch die Protease Clara [59]. Der Zeitpunkt der Bildung von HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> könnte zur hohen Pathogenität von H5 und H7 beitragen, da das Virus in diesem Fall schon unmittelbar nach Freisetzung aus der Zelle infektiös ist. Die globuläre Domäne des HA<sub>1</sub> bindet an die Sialinsäure der Zelloberfläche (Abb. 6).

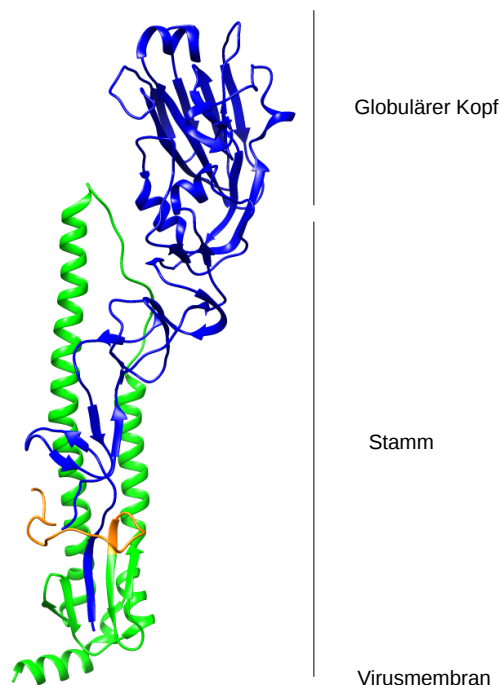


Abbildung 6. **Struktur des matrierten HA-Monomers des Influenzaviruses.** Es besteht aus dem die Sialinsäure bindenden globulären Kopf (HA<sub>1</sub> blau) und der Stammregion (HA<sub>2</sub> grün), die in der Virusmembran verankert ist. Das die Fusion induzierende Peptid am N-terminalen Ende des HA<sub>2</sub> ist orange dargestellt. Modell basierend auf der Struktur des Templates pdb:3LZG von A/California/04/09.

Dabei scheinen die Aminosäuren an den Positionen 226 und 228 (bei H3N2) bzw. 190 und 225 (für H1N1) darüber zu entscheiden, ob die  $\alpha(2,3)$ -glycosidische (aviär, equin, porcine) oder  $\alpha(2,6)$ -glycosidische Bindung (human, porcine) präferiert wird. Erstere wird bevorzugt durch Glutamin und Glycin, letztere durch Leucin- und Serinreste gebunden. Die Domäne selbst ist aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut. Sie bindet an N-Acetyl-Neuraminsäure über eine taschenartig geformte Struktur. Rezeptorbindungsstelle ist somit nicht oberflächenexponiert, für Antikörper daher nicht zugänglich und entgeht folglich dem direkten Selektionsdruck.

Nach der endocytotischen Aufnahme des Viruspartikels, wird das Endosom durch Protonen angesäuert, die durch das M2-Protein eingeschleust werden. Der niedrige pH-Wert induziert eine Konformationsänderung des HA und die fusogene Region am aminoterminalen Ende des HA<sub>2</sub>-Fragments gelangt in räumliche Nähe zur Endosommembran, was letztendlich zur Verschmelzung dieser mit der Wirtszellmembran führt (Abb. 7). Das Fusionspeptid ist das einzige universell konservierte Epitop in allen Influenza A- und B-Virusstämmen [60].

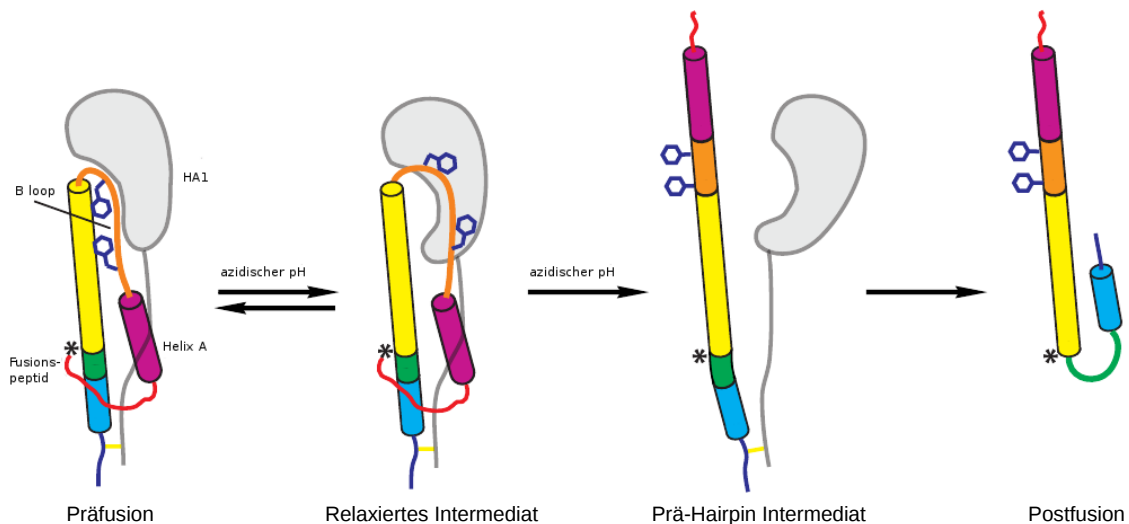


Abbildung 7. **Schematische Darstellung der angenommenen Konformationsänderung von HA während des Fusionsprozesses.** Mit Ansäuerung des Endosoms kommt es im ersten Schritt zu einer Protonierung und damit zur Konformationsänderung von HA<sub>1</sub>, das zuvor wie eine Klammer wirkte. Im weiteren Verlauf können Aminosäurereste des HA<sub>2</sub> protoniert werden, der B-Loop transformiert zur Helix und das Fusionspeptid gelangt in die Endosommembran. Die einzelnen Segmente von HA<sub>2</sub> sind übersichtshalber farblich dargestellt. Adaptiert nach Xu et al. [61].

## 1.5 Infektionszyklus – Eintritt, Replikation und Austritt

Nachdem das Influenzavirus über das Hämagglutinin an die Wirtszelle gebunden hat und endocytisiert wird, veranlasst die Ansäuerung des Endosoms die Lösung der NP-Proteine mit den auf der Virusinnenmembran assoziierten M1-Proteinen. Damit können die segmentierten Nucleocapside zuerst ins Cytoplasma und dann weiter in den Zellkern transportiert werden, wo die virale RNA schließlich transkribiert und repliziert wird [62]. Die Ribonucleoproteinkomplexe dienen als Matrize für die Synthese viraler mRNA-Stränge. Da die viralen Proteine selbst keine

für den Start der Transkription notwendigen 5'-Cap-Gruppen bereitstellen können, bedient sich das Virus mit Hilfe von PA und PB2 zellulärer 5'-Cap-Strukturen [19]. Man spricht von cap-snatching. Dieses Stehlen ermöglicht dem Virus nicht nur die Transkription der eigenen mRNA, sondern trägt auch dazu bei, dass in der Folge nur wenige zelluläre Produkte mehr produziert werden können. Die Zelle ist nun nahezu ausschließlich mit der Transkription und Replikation viraler Produkte beschäftigt [63, 64].

Die Proteine des Polymerasekomplexes PB1, PB2 und PA elongieren die mRNA. NS1 inhibiert die Polyadenylierung zellulärer Transkripte und den Transport in das Cytosol, die dann nicht mehr etwa für die Translation zur Verfügung stehen. Daneben scheint NS1 auch das Spleißen von prä-mRNA unterdrücken zu können. Schließlich werden die viralen Transkripte über den Nxf1-Weg aus dem Kern in das Cytoplasma geschleust [65]. Sofern es sich um membranassoziierte Proteine des Virus handelt, werden sie an den Membranen des rauen endoplasmatischen Reticulums translatiert und modifiziert. Die Synthese der Proteine PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2/NEP und M1 erfolgt an freien Ribosomen. Eine Signalsequenz sorgt, mit Ausnahme von NS2, für ihren anschließenden Transport in den Zellkern. Durch die Anreicherung von NP-Proteinen im Zellkern wird von Transkription auf Replikation umgeschaltet. Mit M1-Proteinen assoziierte Ribonucleocapside werden, mit Hilfe von NS2/NEP, aus dem Zellkern an die Stellen gebracht, an denen eine erhöhte Anzahl viraler Oberflächenproteine (HA, NA und M2) in die Zellmembran eingelagert sind. Dort interagiert M1 mit der cytoplasmatischen Domäne von HA<sub>2</sub>. Es bilden sich die Budding-Strukturen.

Damit das neugebildete Influenzavirus infektiös sein kann, muss jedes der acht verschiedenen Segmente mindestens einmal vertreten sein. In der Regel findet man zwischen elf und 13 Ribonucleocapside in einem Partikel [1, 4, 20]. Anders als bisher vermutet, erfolgt die Verpackung nicht rein zufällig, sondern durch nichtcodierende Abschnitte an den 3'- und 5'-Enden jeder viralen RNA. Diese sorgen dafür, dass die acht verschiedenen viralen RNA-Segmente in dem neu entstehenden Virion gebündelt werden (Abb. 8) [66].

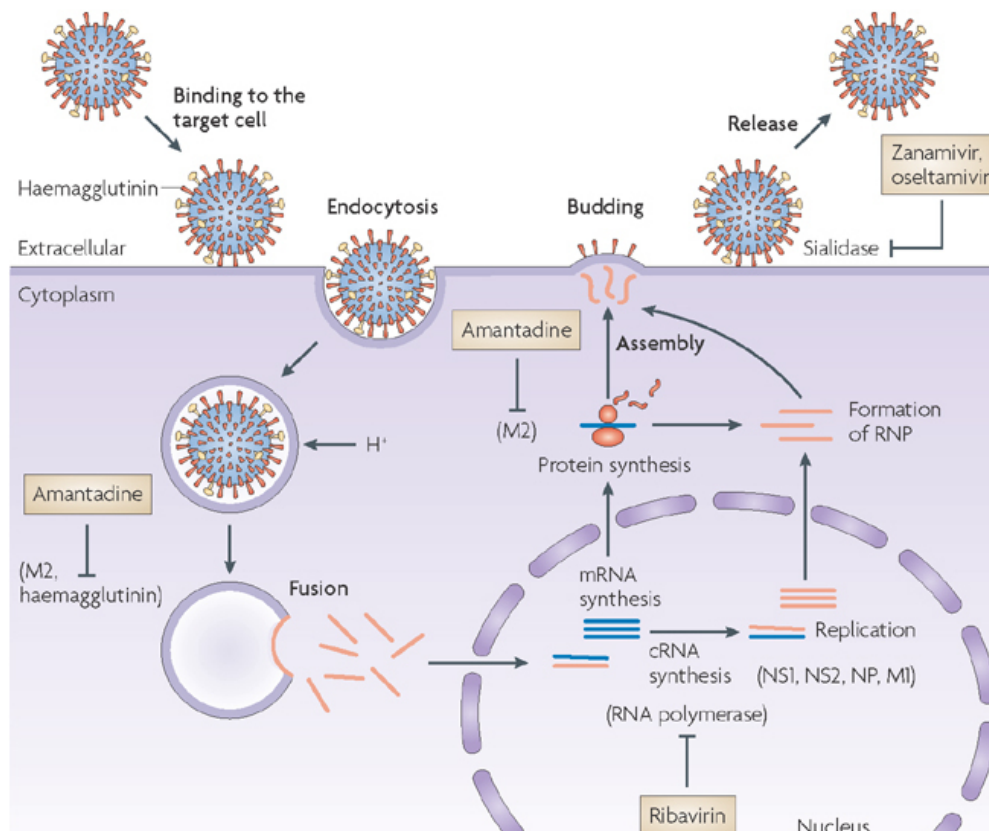


Abbildung 8. **Schematische Darstellung des Infektionszykluses von Influenza.** Viruspartikel binden über das Hämagglutinin an die endständigen Sialinsäuren der Zelloberfläche und werden endozytiert. Nach Ansäuerung des Endosoms über das Ionenkanalprotein M2 fusioniert die Virus- mit der Wirtszellmembran und die viralen Ribonucleocapside werden in das Zytoplasma freigesetzt. Nachdem sie in den Zellkern geschleust worden sind, kommt es dort zur mRNA-Synthese und Replikation. Im Zytoplasma werden die neuen Ribonucleocapside gebildet und zur Zellmembran transportiert (Assembly). Von der Wirtszelle spalten sich neue Viruspartikel ab (Budding) und lösen sich mit Hilfe der Neuraminidase von Sialinsäuren der Zelloberfläche. Antivirale Arzneimittel, die in den Infektionszyklus eingreifen, sind in braunen Kästen am Ort der Intervention dargestellt. Der gestrichelte Kreis repräsentiert den Zellkern. (<http://cfs12.tistory.com>).

## 1.6 Pathogenese und Klinik

Lediglich Influenza A- und B-Virusinfektionen zeigen einen schwereren Krankheitsverlauf, während Influenzavirus C-Infektionen blande bis mild verlaufen. Die Übertragung von Influenzaviren erfolgt über Tröpfchen und Schmierflüssigkeiten. Es werden Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut infiziert (Abb. 9).

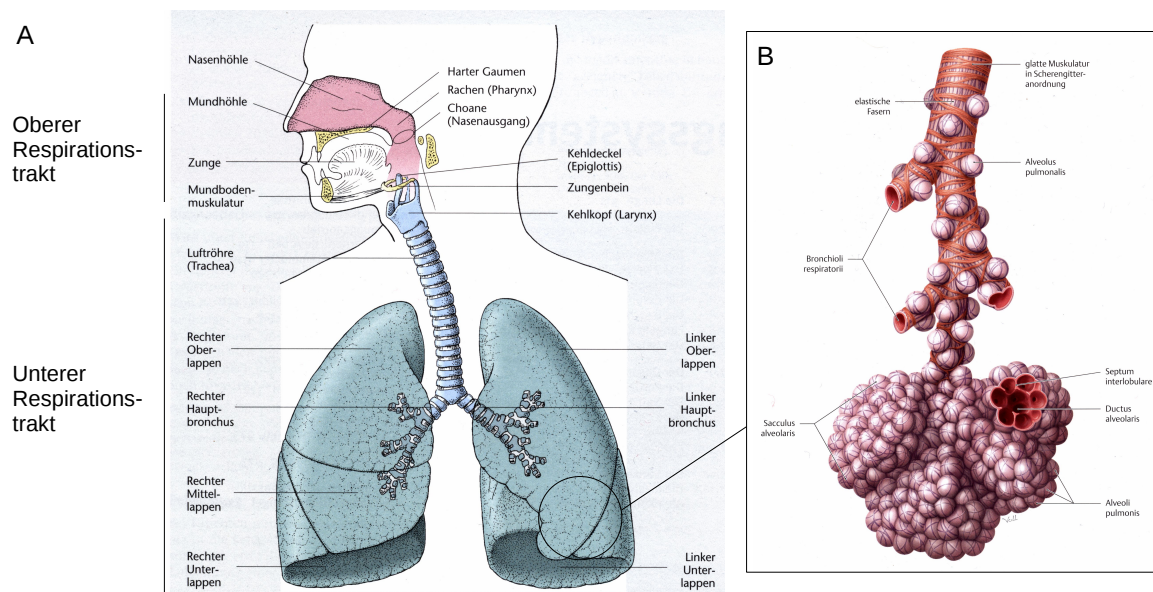


Abbildung 9. **Der Respirationstrakt des Menschen.** **A** Darstellung des menschlichen Respirationstraktes, der sich in einen oberen und einen unteren Abschnitt gliedert. Auf der Mucosa des oberen Abschnittes findet man vornehmlich  $\alpha 2,6$ -glycosidisch verknüpfte Sialinsäuren, im unteren Abschnitt zusätzlich  $\alpha 2,3$ -glycosidisch verknüpfte Sialinsäuren. Die Trachea spaltet sich dichotom in die beiden Hauptbronchien auf, die sich wiederum in Segmentbronchien verzweigen. Am Ende der Verzweigungen stehen die Bronchioli respiratorii (**B**), in denen der Gasaustausch stattfindet. Die Bronchioli werden von Flimmerepithel mit sekretorischen Clara-Zellen ausgekleidet. In den Alveolen herrschen Pneumozyten Typ I und Typ II (auch Alveolarepithelzellen Typ I und II genannt oder kurz: Typ I- und II-Zellen) vor. Erstere dominieren, treten mit den Kapillaren in Kontakt und bilden damit die Blut-Luft-Schranke. Letztere produzieren den Surfactant und können sich als Ersatz in Typ I- Zellen umwandeln. Adaptiert nach [67, 68, 69].

Bei Menschen sitzen auf deren Zelloberfläche die  $\alpha 2,6$ -glycosidisch verknüpften Sialinsäuren. In tieferen Lungenabschnitten findet man hier zusätzlich auch  $\alpha 2,3$ -glycosidisch verbundene Sialinsäuren (Abb. 10) [70]. Durch die Infektion werden das Flimmerepithel und die schleimproduzierenden Schichten in allen Bereichen des Respirationstraktes zerstört. Die Folge sind ödematöse Schwellungen. Die Entzündung lässt neutrophile und mononucleäre Zellen einwandern. Wird das Virus zusätzlich auf das Lungenparenchym übertragen, entwickelt sich eine primäre interstitielle Pneumonie. Die Alveolarwände schwellen stark an, es kommt zu Nekrosen mit Blutungen und Rissen in den Alveolar- und Bronchialwänden. NS1 schaltet die Interferon alpha-vermittelte Immunantwort ab, PB1-F2 löst in den Alveolarmakrophagen und anderen immunologisch aktiven Zellen Apoptose aus [4, 71, 72, 73, 74].

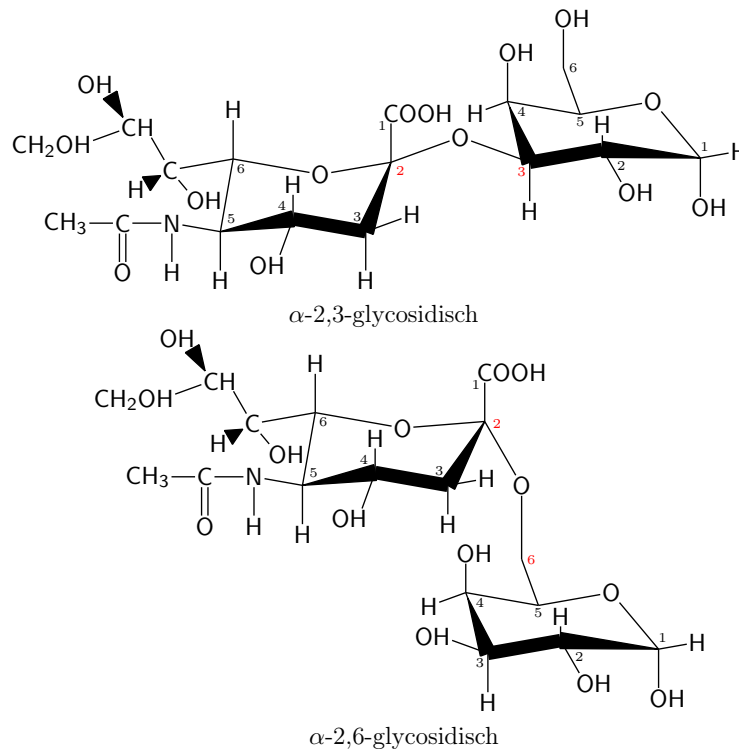


Abbildung 10. **Unterschiede der  $\alpha$ 2,3-glycosidischen und der  $\alpha$ 2,6-glycosidischen Bindung.** Während bei der  $\alpha$ 2,3-glycosidischen Bindung das C2-Atom der N-Acetyl-Neuraminsäure (linker Teil des Moleküls) mit dem C3-Atom der Galactose (rechter Teil des Moleküls) verknüpft ist, wird die Bindung bei der  $\alpha$ 2,6-glycosidischen Verknüpfung über das C2-Atom der N-Acetylneuraminsäure und das C6-Atom der Galactose hergestellt.

Der Körper wehrt sich v.a. durch cytotoxische T-Zellen. Insbesondere die viralen NP-Proteine werden durch MHC-I-Moleülen auf der Zelloberfläche präsentiert und von den T-Lymphozyten erkannt. Da das NP-Protein konserviert ist, können sich auf diese Weise auch CD8<sup>+</sup>-Zellen als „Gedächtnis“ bilden [75]. Über den RIG-I Signalweg wird die Interferonsynthese initiiert, deren Produkte Natürliche Killerzellen aktivieren sowie die Apoptose infizierter Zellen einleiten [76]. Die Inkubationszeit beträgt ein bis vier Tage. Nach Herold verläuft die Infektion in 80 % der Fälle inapparent oder als leichte Erkältungskrankheit [73]. In den restlichen Fällen ist sie durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit starkem Krankheitsgefühl, begleitet von Frösteln und Fieber bis 41°C, charakterisiert. Zusätzlich können eine Laryngo-Tracheo-Bronchitis mit trockenem Husten, Rhinitis, evtl. mit Nasenbluten, Pharyngitis, Konjunktivitis, Photophobie, Abgeschlagenheit, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen und ein aufgedunsen wirkendes Gesicht auftreten. Auch gastrointestinale Beschwerden werden gelegentlich beobachtet. Die eingipfelige Fieberkurve erstreckt sich über zwei bis drei Tage. Ein zweiter Fieberanstieg zeigt meist eine bakterielle Superinfektion an. Das Sputum ist spärlich, zähschleimig und gelegentlich leicht blutig [73]. Laborchemisch stellen sich bei unkomplizierten Verläufen CRP, BSG und Leukozyten meist normal dar, das Serumeisen kann erniedrigt sein. Im Falle einer bakteriellen Superinfektion steigen hingegen CRP und BSG an, es ist eine Leukozytose zu beobachten, während das Serum-

eisen normal ist [73, 77].

Insbesondere bei Risikopatienten, wie Kindern, Schwangeren, älteren Menschen und Menschen mit chronischen Erkrankungen oder Immunsuppression kann eine Infektion zu Komplikationen führen [78]. Dazu gehören am häufigsten die sekundär bakterielle Pneumonie (Superinfektion), hervorgerufen durch u.a. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* und *Haemophilus influenzae*, die oft letal endende primär-hämorrhagische oder interstitielle Influenzapneumonie, Sinusitiden, Otitis media (besonders bei Kindern), Pseudokrupp bei Kleinkindern, Exazerbation einer COPD oder Asthma bronchialis, Purpura Schönlein-Henoch nach Influenza A, Myoperikarditis (evtl. mit plötzlichem Tod), Meningoenzephalitis, orthostatische Hypotonie und selten perakut tödliche Verläufe bei jungen Erwachsenen [73, 79, 80]. Auch können chronische Krankheiten wie Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen und angeborene Herzfehler akut exazerbieren. Die Rekonvaleszenz ist oftmals durch z.T. Wochen anhaltende Schwäche, Müdigkeit und eventuelle Hypotonie-Beschwerden verzögert. Koinfektionen mit Bakterien wie Staphylococcen und Streptococcen können synergistisch zur Entstehung von Lungenentzündungen beitragen, da sie Proteasen besitzen, die in der Lage sind, Hämagglutinin zu spalten [4, 9, 73, 79].

Werden während einer Influenza-Epidemie anamnestisch ein plötzlicher Krankheitsbeginn, Fieber über  $38^{\circ}\text{C}$ , Husten, Muskel-, Glieder- oder Kopfschmerzen erhoben, so handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Virusgrippe. Differentialdiagnostisch ist an einen grippalen Infekt („common cold“) ausgelöst durch Rhino-, Adeno-, Parainfluenzaviren oder RSV, sowie eine Infektion durch Coronaviren, *Bordatella pertussis* (Keuchhusten) oder eine Pneumonie anderer Genese zu denken. Ein Erregernachweis mittels PCR oder Anzucht kann aus Rachenspülwasser oder Nasen-Rachenabstrichen gelingen. Der Nachweis von Antikörpern (z.B. KBR, HAH-Test) hat nur retrospektive Bedeutung. Hier muss ein mindestens vierfacher Titeranstieg im Abstand von ein bis zwei Wochen nach Infektion erfolgen [73].

## 1.7 Epidemiologie

Influenzaviren finden sich auf der ganzen Welt. Zeitlich versetzt treten Epidemien zuerst auf der Südhemisphäre von Mai bis Oktober und anschließend auf der Nordhalbkugel von November bis April, also meist in den Wintermonaten bzw. der Regenzeit, auf. Die sich ausbildende Immunität ist auf neutralisierende Antikörper zurückzuführen, deren Bildung hauptsächlich die Oberflächenproteine HA und NA induzieren.

Bedingt durch diese erworbene temporäre Immunität zirkulieren jede Saison andere Virusstämme (Tab. 4), weshalb auch die Impfung jährlich angepasst werden muss.

So herrschten in der Saison 2013/14 vornehmlich A(H3N2) und A(H1N1)pdm09 (Abb. 11) der Stämme A/Texas/50/2012 (H3N2)-like und A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like vor. Influenza B war mit 9% nur gering vertreten. In der Saison 2014/15 verschob sich die Ver-

Tabelle 4. **Vorherrschende Influenza-Virus-Stämme der Grippesaisons 2007/08 bis 2014/15.** Ab 2009/10 ersetzt das pandemische H1N1-Virus die bis dato zirkulierenden saisonalen H1N1-Viren. (Tabelle basierend auf den Daten des jährlichen Saisonberichts der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch-Instituts, <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>).

Saison	A/H1N1	A/H3N2	B
2007/2008	A/Solomon Island/3/2006 (A/H1N1)-like	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-like, A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like	B/Florida/4/2006-like
2008/2009	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like	B/Florida/4/2006-like, B/Malaysia/2506/2004- like, B/Brisbane/60/2008- like
2009/2010	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	A/Perth/16/2009 (H3N2)-like	B/Brisbane/60/2008- like
2010/2011	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like	A/Perth/16/2009 (H3N2)-like	B/Brisbane/60/2008- like
2011/2012	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like	A/Perth/16/2009 (H3N2)-like	B/Brisbane/60/2008- like
2012/2013	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like	A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like	B/Estonia/55669/2011- like
2013/2014	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like	A/Texas/50/2012 (H3N2)-like	B/Brisebane/60/2008- like, B/Massachusetts/2/2012- like
2014/2015	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09-like	A/Switzerland/9715293/ 2013 (H3N2)-like	B/Brisebane/60/2008- like, B/Phuket/3073/2013- like

teilung zugunsten von Influenza B-Viren (31 %, hauptsächlich B/Brisebane/60/2008-like und B/Phuket/3073/2013-like). H1N1-Viren (vornehmlich A/California/07/2009 (H1N1)pdm09like) zirkulierten nur zu 18 % in Deutschland. Den Hauptanteil machte mit 51 % H3N2 (A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-like) aus.

In Deutschland währt die Grippesaison in der Regel von November bis April. Das heißt jedoch nicht, dass es außerhalb dieser keine Infektionen mit Influenzaviren gibt. Während der Saison 2013/14 wurden hierzulande 6.200 klinisch-labordiagnostische Influenzainfektionen registriert, von denen 23 labordiagnostisch an den Folgen der Infektion starben. Damit fällt die Infektionsrate im Vergleich zur Vorsaison 2012/13 mit 66.000 Betroffenen deutlich geringer aus [81]. In der Saison 2014/15 wurden mit 70.247 klinisch-labordiagnostische Influenzainfektionen dagegen wieder mehr Fälle registriert. Auch die Zahl der an den Folgen einer Infektion verstorbenen Patienten lag mit 274 Todesfällen deutlich über der der Vorsaison [82]. Insgesamt ist eine Übers-



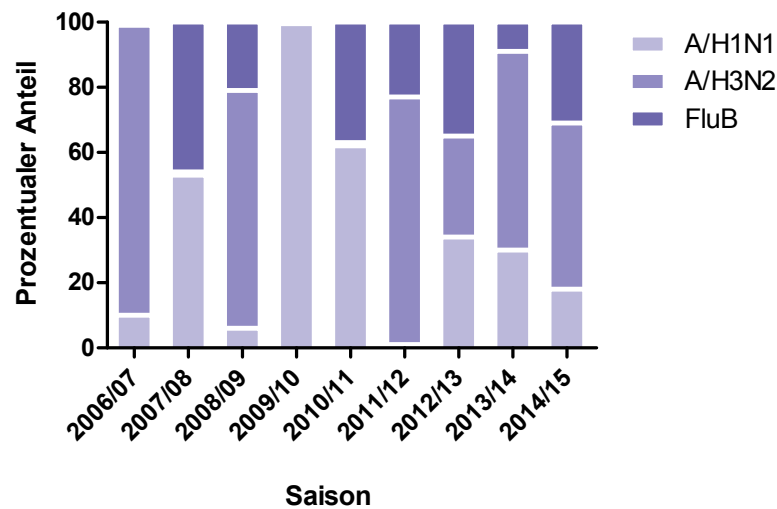


Abbildung 11. **Zirkulation der Influenza-Virus-Stämme in den Grippesaisons von 2006/07 bis 2014/15.** Der Anteil der verschiedenen Virusstämme unterscheidet sich von Saison zu Saison. 2009/2010 herrschte nahezu ausschließlich A(H1N1)pdm09 vor und ersetzte das bis dato zirkulierende saisonale A/H1N1-Virus. (Abbildung basierend auf den Daten des jährlichen Saisonberichts der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch-Instituts, <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>).

terblichkeit von abwehrgeschwächten und älteren Menschen zu beobachten. Bei Kindern und Jugendlichen sind überproportional häufig Influenza B-Viren isoliert worden, die einen tendenziell milden Krankheitsverlauf zeigten [73].

Darüber hinaus treten immer wieder Pandemien mit Millionen Toten weltweit auf; so die Pandemien 1890 (H2N2?), 1900 (H3N2 oder N8?), 1918/19 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) und 1977 (H1N1). Die letzte Pandemie nahm 2009 ihren Ausgang von Mexiko (Abb. 12) [83].

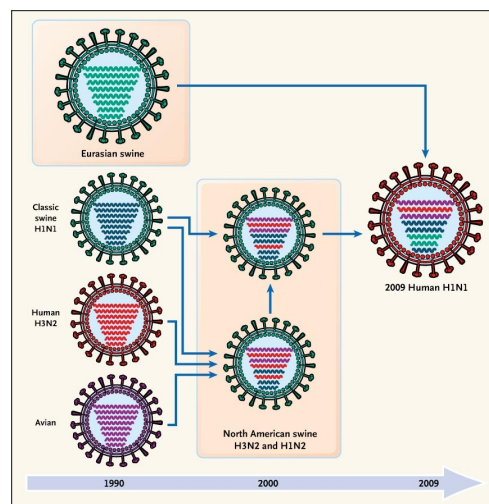


Abbildung 12. **Schematische Darstellung der Entwicklung der Neuen Grippe 2009.** Das pandemische H1N1 Virus von 2009 (Neue Grippe) entstand als Reassortant des eurasischen H1N1 Virus und des nordamerikanischen Schweinevirus. Dieses ging ungefähr im Jahr 2000 aus dem klassischen Schweinevirus H1N1, einem humanen H3N2 und einem aviären Virus hervor [84].

Grundsätzlich besitzen alle Influenzaviren zoonotisches Potential; eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung der Pandemien. Ermöglicht wird das durch sog. Reassortanten. Dabei kommt es bei Doppelinfection einer Zelle - bevorzugt in Schweinen - zum Austausch (Reassortment) von Segmenten humaner und aviärer Viren, da Schweine sowohl  $\alpha$ -2,3-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren als auch  $\alpha$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren besitzen und somit sowohl für aviäre, porcine als auch humane Influenzastämme empfänglich sind. Der spezielle Austausch von den Oberflächenproteinen HA und NA codierenden Segmenten bezeichnet man auch als „antigenic shift“ [85].

Tabelle 5. **Übersicht der Subtypen des Hämagglutinins.** Insbesondere die Aminosäuren an Position 226 und 228 des Hämagglutinins scheinen dafür ausschlaggebend zu sein, ob das HA bevorzugt an  $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren bindet. Adaptiert nach [4, 44].

HA-Subtyp	Wirt
H1	Vogel, Mensch, Schwein
H2	Vogel, Mensch, Schwein
H3	Vogel, Mensch, Schwein, Pferd, Hund
H4	Vogel
H5	Vogel, (Mensch) <sup>†</sup> , Vogel
H6	Vogel
H7	Vogel, (Mensch) <sup>†</sup> , Pferd
H8	Vogel
H9	Vogel, (Mensch) <sup>†</sup> , Schwein
H10	Vogel
H11	Vogel
H12	Vogel
H13	Vogel
H14	Vogel
H15	Vogel
H16	Vogel
H17	Fledermäuse
H18	Fledermäuse

<sup>†</sup> Bei aviären Influenzaviren der Hämagglutinin-subtypen H5, H7 und H9 wurden vereinzelt direkte Übertragungen auf den Menschen beobachtet.

Der durch das Reassortment neu entstandene Virussubtyp besitzt Ribonucleocapsidsegmente unterschiedlicher Herkunft (Abb. 13). Zusätzlich können in Oberflächenproteinen Punktmutationen auftreten (antigenic drift). Das neu entstandene Antigenmuster ist dem humanen Abwehrsystem noch nicht bekannt. Dieser neue Virustyp kann somit dem menschlichen Immunsystem erfolgreich entgehen und sich ungehindert ausbreiten.

Neben der Sialinsäurerestbindung (human:  $\alpha$ -2,6, aviär und equin:  $\alpha$ -2,3 und porcine:  $\alpha$ -2,6 und  $\alpha$ -2,3) scheinen wohl auch PB1 und PB2, sowie die NP-, M1- und M2- Proteine für die Wirtsspezifität verantwortlich zu sein [1]. So werden Menschen hauptsächlich von Influenzaviren der Subtypen H1, H2 und H3 infiziert (Tab. 5), die in der Regel keine virämischen Phasen durchlaufen. Stattdessen spielt sich die Infektion, wie bei Schweinen und Pferden, vorzüglich im Respirationstrakt ab, in dem eine Temperatur von ca. 33 °C herrscht. Demgegenüber verläuft die Infektion in Vögeln normalerweise subklinisch im Gastrointestinaltrakt, bei der Geflügelpest systemisch mit Temperaturen von 37 bis 38 °C. Die Viren vermehren sich im Gastrointestinaltrakt und werden über den Kot ins Wasser ausgeschieden. Durch Zugvögel kommt es zu einer Durchmischung und da-

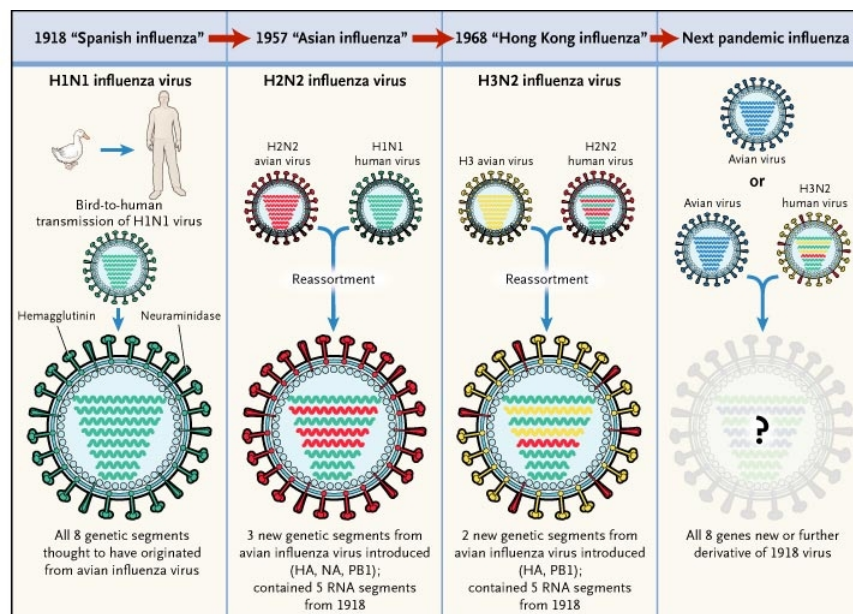


Abbildung 13. Schematische Darstellung der Entwicklung von Reassortanten und der daraus resultierenden Pandemien von 1918, 1957 und 1968. Durch Anpassung an den neuen Wirt, die u.a. Rezeptorspezifität und Temperatur beinhaltet, gelang einem aviären H1N1 Stamm die Überbrückung der Wirtsbarriere und damit die Infektion von Menschen. 1957 kam es zum Austausch von drei Segmenten eines aviären H2N2 Stamms mit dem zirkulierenden, unterdessen an den Menschen angepassten H1N1 von 1918. Das Virus der Hongkong Grippe von 1968 nahm zwei aviäre Segmente (HA und PB1) auf [86].

mit einer weltweiten Verbreitung der Virussubtypen. Insgesamt lässt sich bei Tieren eine hohe Morbidität, aber geringe Mortalität beobachten.

## 1.8 Prophylaxe

Mit der Impfung gegen Influenza steht die Prophylaxe im Vordergrund und stellt damit einen wichtigen Bestandteil in der Vorsorge gegen die Grippe dar. Allerdings ist, bedingt durch die Entwicklung und Herstellung von an die jeweils zirkulierenden Virusstämme angepassten Vakzinen, die Reaktionszeit verzögert. So dauerte es 2009 sechs Monate bis ein Impfstoff gegen A(H1N1)pdm09 entwickelt werden konnte. Indess entfalten die Impfungen nur bei rund 34 % der älteren Bevölkerung (über 50 Jahre) einen effektiven Schutz, im Gegensatz zu 36-58 % bei immunkompetenten jungen Menschen (sechs Monate bis 49 Jahre) [87]. Gerade in erster Bevölkerungsgruppe ist jedoch die Mortalität einer Infektion durch Influenzaviren besonders hoch. Die Impfstoffe werden aus inaktivierten Viren (Totimpfstoff), die zuvor vornehmlich in Hühnereiern, teils aber auch in Zellkulturen angezüchtet worden sind, hergestellt. Basierend auf den jeweils zirkulierenden Virussubtypen werden die Vakzinen jährlich angepasst. Sie bestehen in der Regel aus drei Virusstämmen (trivalenter Impfstoff), zwei Influenza A-Virusstämmen und einem Influenza B-Virusstamm (für 2009/10 waren das A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und ein Influenza B-Stamm). Seit der Saison 2013/14 werden auch quadrivalente Impfstoffe eingesetzt. Dieser setzte sich in der Saison 2014/15 aus den Influenzastämmen A/California/07/2009 (H1N1)pdm09,

A/Texas/50/2012 (H3N2), B/Massachusetts/2/2012 und zusätzlich B/Brisbane/60/2008 zusammen (<http://www.rki.de>). Gegen Influenza C-Viren wird nicht geimpft. Die Impfstoffe enthalten entweder das durch Formalin inaktivierte komplette Virus oder gereinigte immunogene Spaltprodukte des Virus [78]. In den USA ist zusätzlich ein Lebendimpfstoff aus attenuierten, kälteadaptierten Viren zur nasalen Applikation zugelassen, der zu einer lokalen Immunität der Atemwege führt [88, 89]. Seit Dezember 2013 ist in der EU ebenfalls ein Lebendimpfstoff zur intranasalen Anwendung bei Kindern zwischen dem 2. und 18. Lebensjahr lizenziert (<http://www.ema.europa.eu>).

## 1.9 Antivirale Therapie & Resistenzen

### 1.9.1 Adamantane

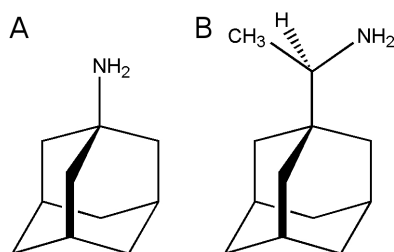


Abbildung 14. **Struktur der Arzneimittel Amantadin (A) und Rimantadin (B).**

Amantadin wurde ursprünglich für die Therapie des Morbus Parkinson entwickelt, da es an zellulären Ionenkanälen wirkt. Erst später entdeckte man auch die antivirale Eigenschaft gegen Influenza A-Viren. Auf diese Weise werden auch die unerwünschten Wirkungen auf das zentrale Nervensystem unter Amantadintherapie bei einer Grippe verständlich [1, 46, 93].

Eine schnelle Resistenzbildung durch Mutation von Aminosäuren in der Transmembranregion (Tab. 6) sowie die Einsatzbeschränkung auf Influenza A-Viren machten die Suche nach neuen Angriffspunkten in der Grippe-therapie notwendig [1, 94]. Die Amantadinkonzentrationen ab denen das M2-Protein der Influenza B-Viren effizient inhibiert wird, liegen außerhalb des therapeutischen Fensters. Die Adamantane besitzen eine geringe therapeutische Breite. Da diese Substanzklasse auf die zur Zeit zirkulierenden Influenzaviren nicht mehr wirkt (es genügt eine Mutation), empfehlen die Centers for Disease Control (CDC) 2006 sie nicht mehr einzusetzen [90].

Als erster spezifisch wirkender, potenter antiviraler Arzneistoff gilt Amantadin (Abb. 14), das vor mehr als 30 Jahren entwickelt wurde und bereits in geringen Konzentrationen ( $5 \mu M$ ) wirkt, indem es das Ionenkanalprotein M2 blockiert. Diverse methylierte Derivate wie das Rimantadin wirken ebenso. Eine medikamentöse Behandlung muss innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden nach Infektion erfolgen.

Tabelle 6. **Mutationen im M2-Protein, die zu einer Resistenz gegenüber dem Arzneimittel Amantadin führen.** Vor allem die Mutation S31N sorgte ab 2003/04 für ein sprunghaftes Ansteigen der Resistenzraten gegenüber den Adamantanen.

Mutation	Amantadin	Referenz
<i>L26F</i>	+	[90, 91]
<i>V27A/G/I</i>	+	[90, 91, 92]
<i>A30T</i>	+	[90, 91]
<i>S31N</i>	+	[90, 91]
<i>G34E</i>	+	[90, 91]

## 1.9.2 Neuraminidaseinhibitoren

Zwischen 1999 und 2002 wurden in weiten Teilen der Welt die Arzneistoffe Zanamivir und Oseltamivir (Abb. 15) zugelassen, 2002 auch in der Europäischen Union [95]. Während der Influenzapandemie 2009/10 erhielt Peramivir von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA bis 2010 eine temporäre Zulassung. Seit Dezember 2014 ist es dort regulär zugelassen. Auch in Japan und Südkorea ist Peramivir lizenziert. Mit Laninamivir steht dort auch ein langwirkendes Arzneimittel mit einer Halbwertszeit von fünf bis sieben Tagen zur Verfügung, das sich in anderen Ländern noch in Phase III der klinischen Studien befindet oder kurz vor der Zulassung steht [96]. In Japan ist seit 2014 auch Favipiravir von der Aufsichtsbehörde lizenziert worden.

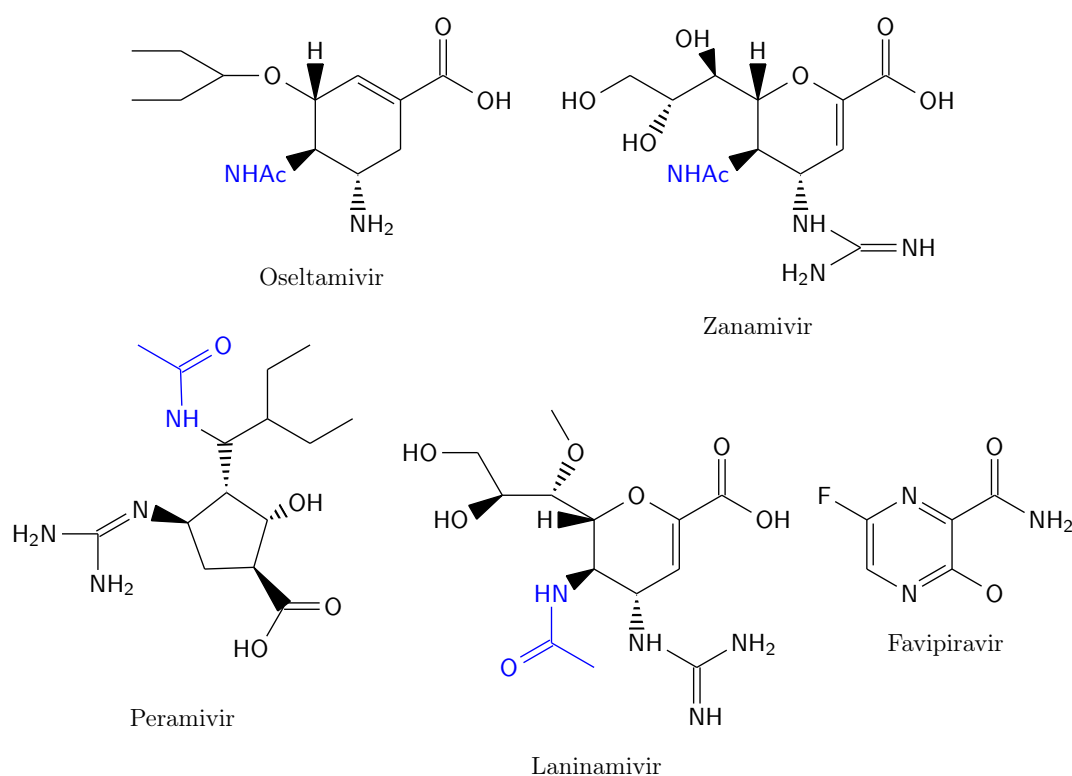


Abbildung 15. Strukturformeln der bis dato in der EU zugelassenen Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir und Zanamivir, sowie des in Japan und Südkorea zugelassenen Peramivirs und Laninamivirs und des in Japan zugelassenen Favipiravirs. N-Acetylgruppen (NHAc) sind blau dargestellt.

Bei allen fünf Substanzen handelt es sich um Neuraminidase-Inhibitoren (NAI), die zwar nicht die Infektion als solche, jedoch die Ausbreitung des Virus im Wirtsorganismus verhindern. Sie gehören damit zu den Virusstatika und verkürzen die Dauer der Symptome um ein bis drei Tage, wenn sie innerhalb der ersten 48 Stunden eingesetzt werden [1, 97]. Die Nebenwirkungen sind gering und äußern sich bisweilen in Beschwerden des Gastrointestinaltraktes (z.B. Übelkeit und Erbrechen) und selten durch Verwirrheitszustände [73, 98].

Während Oseltamivir als Prodrug oral aufgenommen und nach der Resorption im Gastrointestinaltrakt durch hepatische Esterasen in die aktive Form (Carboxylat) metabolisiert wird,

inhaliert man Zanamivir - ähnlich eines Asthmasprays -, damit es in die tieferen Regionen des Respirationstraktes gelangen kann. Laninamivir wird nasal, Peramivir parenteral appliziert (Tab. 7). Daher eignet sich letzteres besonders für den Einsatz auf Intensivstationen bei schwer erkrankten Patienten, denen keine orale Medikation verabreicht werden können [99].

Tabelle 7. **Übersicht der zugelassenen oder in klinischen Studien befindlichen Arzneimittel gegen Influenzavirusinfektionen.** Flu Influenzavirus, i.v. intravenös, M2 Ionenkanal, NA Neuraminidase, p.o. per os, RdRP RNA-abhängige RNA-Polymerase, tgl. täglich. Modifiziert nach [98, 100].

Name	Anwendung	Angriffspunkt	Applikation	Dosierung
Amantadin (Symadine®)	Flu A	M2	p.o.	2 x tgl. 100 mg
Oseltamivir (Tamiflu®)	Flu A, B	NA	p.o.	2 x tgl. 30, 40, 75 mg
Zanamivir (Relenza®)	Flu A, B	NA	Inhalation	2 x tgl. 5 oder 10 mg
Laninamivir (Inavir®)	Flu A, B	NA	nasal	einmalig 20 oder 40 mg
Peramivir (Rapivab®)	Flu A, B	NA	i.v.	1 x 600 mg oder 2 x 300 mg
Favipiravir <sup>†</sup> (Avigan®)	Flu A, B	NA, RdRP	p.o.	2 x tgl. 1600 mg (1. Tag) dann 2 x tgl. 600 mg für 4 Tage

<sup>†</sup> Zulassung in Japan

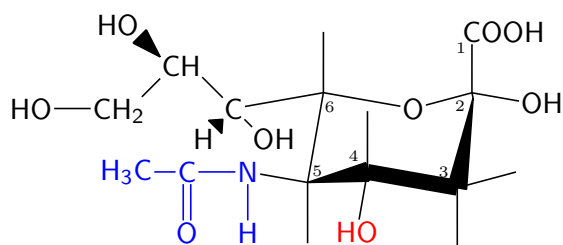


Abbildung 16. **Strukturformel der N-Acetyl-Neuraminsäure.** Die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 4 (C4) (rot dargestellt) ist bei Oseltamivir durch eine Aminogruppe, bei Zanamivir und Laninamivir durch eine Guanidgruppe substituiert. Diese Substitution resultiert in einer höheren Bindungsaffinität der NAI zum Enzym Neuraminidase. Am C5 sitzt die N-Acetylgruppe (blau).

Im Gegensatz zu der Hydroxylgruppe der Neuraminsäure (Abb. 16) füllt die Aminogruppe der NAI die leere Tasche im aktiven Zentrum der Neuraminidase komplett aus. Durch mehr intermolekulare Wechselwirkungen erhöht sich die Bindungsaffinität. Da die NAI an die konservierten Reste im aktiven Zentrum der Neuraminidase binden, stehen diese unter selektivem Druck [52]. Die NAI binden spezifisch an die virale und bakterielle Neuraminidase und inhibieren somit keine zellulären Neuraminidasen des Wirtes [1].

Peramivir besitzt Ähnlichkeiten sowohl zu Zanamivir als auch zu Oseltamivir. Wie Oseltamivir weist es eine hydrophobe Seitenkette auf, deren Umlagerung für eine Bindung an die Neuraminidase notwendig ist. Die für Oseltamivir wichtige Mutation H274Y kann zu klinisch relevanten Kreuzresistenzen bei Peramivir führen [101, 102].

Favipiravir inhibiert nicht nur die Neuraminidase, sondern ahmt in seiner aktiven Form als Ribofuranosyltriphosphatderivat auch Purinnucleoside nach und hemmt damit die virale RNA-

abhängige RNA-Polymerase (RdRP). Die humane Polymerase wird hingegen nicht tangiert [100].

**Resistenzmutationen** Die Neuraminidasen bei Wildtypstämmen vom Subtyp N2, N3, N6, N7 und N9 (2-NA) erwiesen sich sensitiver gegenüber Zanamivir als gegen Oseltamivir, wohingegen N1, N4, N5 und N8 (1-NA) potenter durch Oseltamivir inhibiert werden konnten [103]. Resistenzen in der Gruppe der einen Subtypen müssen folglich nicht zwangsläufig zu einer Resistenz in der Gruppe der Neuraminidase der anderen Subtypen führen [47].

Resistenzen können durch Mutationen im aktiven Zentrum des Enzyms durch selektiven Druck, aber auch nahe der Rezeptorbindungsstelle vom Hämagglutinin (HA) entstehen. Eine zugleich auftretende Mutation im Hämagglutinin, die in einer schwächeren Bindung an die Sialinsäure resultiert, kann jedoch die nachteilige NA-Mutation ausgleichen, wie Rameix-Welti et al. [104] darlegen konnten.

Nach Oseltamivir Behandlung von mit H1N1 oder H5N1 infizierten Patienten konnte die Mutation N294S isoliert werden. Auch die 2005 aus einem H5N1-Virus isolierte Substitution von Histidin durch Tyrosin an Position 275 (H275Y) führt zu einer Resistenz gegenüber Oseltamivir [52] und ist eine der am häufigsten detektierten Mutationen [105]. Diese trat in der Influenzasaison 2007/08 bei zweidrittel der H1N1-Viren in Norwegen auf, das bisher einen sehr geringen Einsatz von NAI hatte [106]. Die Glutaminsäuren an Position 119 und 227 interagieren mit der C4 Guanidingruppe des Zanamivirs und wahrscheinlich mit der C4 Aminogruppe von Oseltamivir [52]. Beide Aminosäuren tun dies jedoch nur mit den Inhibitoren und nicht mit dem natürlichen Liganden Sialinsäure [46].

Über Wasserstoffbrückenbindungen und positive Ladungen interagieren die Aminosäuren R118, R292 und R371 mit der Carboxylgruppe des Zanamivir und Oseltamivir. Mutationen von E119 führen zu Resistenzen sowohl gegen Zanamivir (E119A/D/G) als auch Oseltamivir (E119V). Die Substitution von Arginin zu Lysin an Position 152 bewirkt ebenfalls eine Resistenz gegen beide Neuraminidase-Inhibitoren. Sie wurde bisher nur in Influenza B-Viren und nicht in Typ-A Viren beobachtet [52].

Die Wahrscheinlichkeit, dass nach einer NAI-Behandlung replikationsfähige potente Mutationen auftreten, ist daher besonders bei R371K, E276D und R292K Viren gegeben (N2-Nummerierung). Sie replizieren effizient [52]. Um solche Mutationen zu verhindern, scheint es sinnvoll, zukünftige Inhibitoren so strukturnah zum natürlichen Liganden als möglich zu entwickeln. In Betracht kommen dabei besonders jene Aminosäuren, deren Substitution am unwahrscheinlichsten ist, da sie für das Funktionieren des Enzyms essentiell sind, wie etwa R118 und E227 [52]. Inwieweit NAI die Bildung von Reassortanten fördern, indem die neuraminidasebedingte Verhinderung von Superinfektionen ausgesetzt wird, muss weiter beobachtet werden. In Zellkulturen konnte dieser Effekt auf jeden Fall nachgewiesen werden [53]. Zunehmende Resistenzentwicklung weltweit gegenüber Oseltamivir ohne gleichzeitigen Einsatz dieses Arzneimittels lassen jedoch an einem Zusammenhang zwischen Gebrauch und Sensitivitätsverlust zweifeln [107]. Dennoch könnte ein möglicher Motor für Resistenzentwicklungen im Falle einer Pandemie der massenhafte Einsatz von Oseltamivir sein. Da dieses Arzneimittel unverändert vom menschlichen Körper aus-

geschieden wird, könnten Wildvögel über Abwässer in hohen Konzentrationen mit der Substanz in Kontakt geraten [108, 109].

**Resistenzirkulation** In der Influenzasaison 2007/08 wurden in Europa bei 25 % von H1N1 Resistenzen mit der Mutation H274Y festgestellt. Ein Jahr zuvor betrug die Zahl noch unter 0,5 % [110]. Die Resistenzrate erreichte in der darauf folgenden Saison fast 100 % [111, 112]. Dabei ist von der Resistenzentwicklung hauptsächlich der bis 2009 zirkulierende saisonale Subtyp H1N1 tangiert [112]. Das seit 2009/10 zirkulierende A(H1N1)pdm09 ist dagegen in der Regel gegenüber Oseltamivir sensitiv. Warum es zum nahezu vollständigen Austausch der Oseltamivir sensitiven gegen resistente Stämme gekommen ist, ist noch immer nicht in Gänze verstanden. Ein Grund könnte in der geringeren Immunogenität und niedrigeren Suszeptibilität des resistenten Virus gegenüber neutralisierenden Antikörpern sein liegen [113].

Anders als bei den M2-Inhibitoren (Adamantane) treten innerhalb der Neuraminidaseinhibitoren nur geringe Kreuzresistenzen auf. Diese werden wenn bevorzugt zwischen Zanamivir und Laninamivir bzw. zwischen Oseltamivir und Peramivir beobachtet. Das hängt mit ihren strukturellen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschieden zusammen und dem damit verbundenen Ort der Aminosäuremutation im aktiven Zentrum der Neuraminidase [105].

### 1.9.3 Adjuvante Therapie

Neben der medikamentösen Therapie mit NAI steht noch die symptomatische Therapie mit Flüssigkeitssubstitution und Fiebersenkung durch z.B. Wadenwickel und Antipyretika wie Paracetamol oder Metamizol. Bei bakterieller Superinfektion ist eine kalkulierte Antibiose indiziert.

## 1.10 Medikamente pflanzlichen Ursprunges

Pflanzen dienen Menschen seit Jahrhunderten als Medizin. So findet man erste Listen mit pflanzlichen Heilmitteln in Keilschrift auf Tontafeln bei den Sumerern [114]. Im 19. Jahrhundert begann man einzelne Substanzen aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren und allmählich auch zu modifizieren (z.B. Aspirin). Auch Oseltamivir wurde zuerst aus der als Sekundärmetabolit anfallenden Shikimisäure des Sternanis (*Illicium verum* Hook fil.) synthetisiert [115]. Ca. 80 % der 46 in den letzten 29 Jahren registrierten antiviralen Arzneimitteln sind auf einen pflanzlichen Ursprung zurückzuführen [116, 117]. Einige der potentesten Chemotherapeutika gegen diverse Tumore basieren direkt auf pflanzlichen Substanzen (Tab. 8). Schätzungen zufolge sind bisher jedoch weniger als fünf Prozent der bekannten 400.000 Pflanzenarten auf ihr medizinisches Potential hin untersucht worden [114, 118]. Sie stellen damit weiter eine aberwitzig umfangreiche Ressource auf der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen die vielfältigsten Erkrankungen und Symptome dar [119]. Das veranlasste 2009 auch die WHO auf der Suche nach neuen Arzneimitteln gegen Influenza explizit zur Erforschung „natürlicher“ Substanzen in ihrer Agenda aufzurufen (“WHO public health research agenda for Influenza”) [120].



Tabelle 8. Ausgewählte Beispiele von Arzneimitteln pflanzlichen Ursprunges.

Pflanze	Wirkstoff	Anwendung
<i>Artemisia annua</i> L.	Artemisin	Malaria
<i>Atropa belladonna</i> L.	Atropin	Parasympatholytikum
<i>Calophyllum langigerum</i> Miq.	Calanolid A	HIV (NNRTI), Phase I der klin. Studien
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (ehemals <i>Vinca rosea</i> )	Vinblastin, Vincristin, Vindesin	Hodgkin, NHL, Mamma-Ca, Hoden-Ca, ALL, CML
<i>Cinchona officinalis</i> L.	Chinin	Malaria
<i>Chondrodendron tomentosum</i> Ruiz. et. Pav.	TubeCurarin	Muskelrelaxans
<i>Claviceps purpurea</i> (Fries) Tulasne	Ergotamin	Akuter Migräneanfall
<i>Digitalis purpurea</i> L.	Digoxin, Digitoxin	Chronische Herzinsuffizienz, Tachyarrhythmie, paroxysmale supraventrikuläre Tachykardie
<i>Illicium verum</i> Hook fil.	Oseltamivir	Influenza
<i>Melissa officinalis</i> L.	Phenolcarbon-säuren	HSV-1 & HSV-1
<i>Papaver somniferum</i> L.	Morphin	Schwere Schmerzzustände
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn.	Extrakt	HBV
<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes	Pilocarpin	Parasympathomimetikum (Glaukom)
<i>Podophyllum peltatum</i> L.	Teniposid, Etoposid	Zytostatika
<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth. ex Kurz, <i>R. vomitoria</i> Afzelius	Reserpin	Antisymphotonikum
<i>Salix alba</i> L.	Salicylsäure	Psoriasis
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Paclitaxel	Mamma-Ca, Ovarial-Ca

### 1.11 Flavonoide

Die Flavonoide gehören neben Phenolcarbonsäuren, Stilbenen und Lignanen in die Gruppe der Polyphenole, von denen es mehrere tausend Verbindungen gibt (Abb. 17) [121].

Polyphenole zählen zu den sog. sekundären Pflanzenmetaboliten, die im Organismus als bioaktive Substanzen eine Vielzahl von Aufgaben übernehmen, wie vor Infektionen, Fraßfeinden (Prädatoren) und UV-B-Strahlung schützen oder als Farbstoff Insekten zur Bestäubung anlocken. Sie können auch als Wachstumsregulatoren und zur Reperatur von Zellschäden fungieren.

Dabei handelt es sich um aromatische Verbindungen, die zwei oder mehrere Hydroxylgruppen direkt am aromatischen Ring aufweisen. Den Flavonoiden, von denen zur Zeit mehr als 6500 Verbindungen bekannt sind, liegt ein Flavan als Struktur zugrunde (Abb. 18). Durch unterschiedliche Hydroxylierungs- und Glykosylierungsmuster entsteht eine Vielfalt an Flavonoiden, die ihren Ausdruck in den sechs Untergruppen der Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanole,

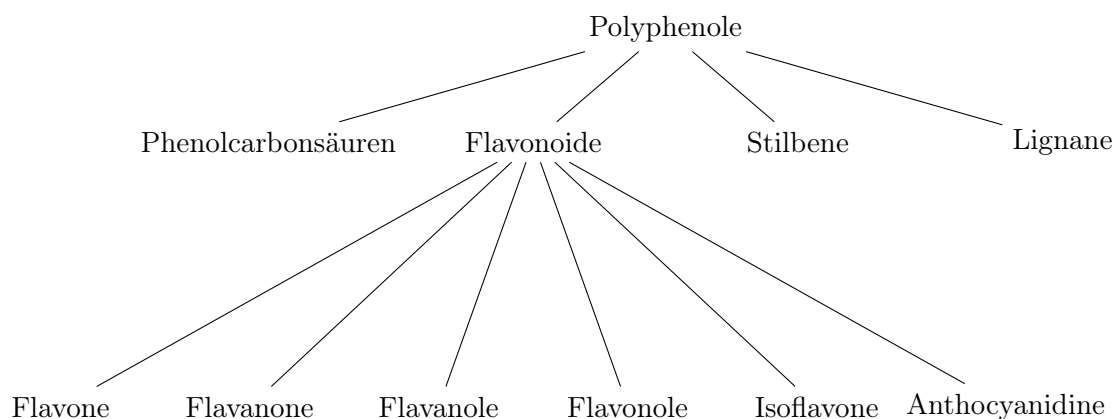


Abbildung 17. **Unterteilung der Polyphenole und Flavonoide.** Die zu den sekundären Pflanzenmetaboliten zählenden Polyphenole werden in vier Hauptklassen geliedert, von denen eine die der Flavonoide ist. Flavonoide können ihrerseits in sechs Gruppen zusammengefasst werden.

Anthocyanidine und Isoflavone wiederfindet.

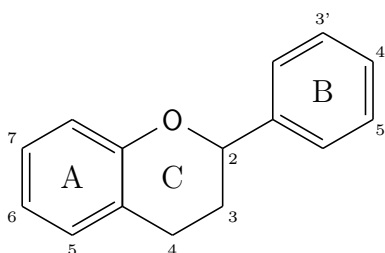


Abbildung 18. **Flavan als Grundstruktur der Flavonoide.** Der B Ring und die C3 Brücke zum C Ring stammen aus dem Shikimisäurezyklus. Durch Hydroxylierung und Anfügen von Glykosidresten entstehen die vielfältigen Strukturen der Flavonoide. Als Untergruppen zählen zu ihnen die Flavanole, Flavanonole, Chalkone, Flavonole, Aurone, Flavone, Flavanone und Isoflavone.

## 1.12 Problemstellung

Mehrere Therapiealternativen zur Behandlung resistenter Influenzaviren werden diskutiert. Zum einen wird eine höhere Dosierung und längere Gabe von Oseltamivir in Betracht gezogen [122], zum anderen könnte Zanamivir oder Kombinationen von Zanamivir, Oseltamivir und/oder den M2-Protonenkanalblockern Amantadin und Rimantadin eine effektive Therapie, gerade auch in immunsupprimierten Patienten, bilden [112, 123].

Auch die Suche nach neuen Neuraminidasehemmern sollte fokussiert werden. Hier bieten Substanzen aus der Natur, insbesondere sekundäre Pflanzenmetabolite eine vielversprechende Quelle [124]. Daneben müssen andere Mechanismen der Inhibierung des Influenzavirus in Betracht gezogen werden, wie etwa das Eingreifen in den Fusionsprozess, die Inhibierung der viralen Polymerase, des PB2 oder der vRNP.

Vor diesem Hintergrund wurden Substanzen ausgewählt, denen in der Literatur Antiinfluenza-Eigenschaften zugeschrieben werden, ohne dass der Wirkmechanismus näher beschrieben worden

ist oder die auf die bakterielle Neuraminidase inhibitorische Effekte zeigten. Da sich die bakterielle und virale Neuraminidasen strukturell unterscheiden (u.a. Monomer vs. Tetramer), können Ergebnisse nicht ohne weiteres von einem Neuraminidasetypen auf einen anderen übertragen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen auf Grundlage dieser Überlegungen ausgewählte Naturstoffe und synthetisierte Peptide charakterisiert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Influenzaviren zu inhibieren. Dazu wurden diese zuerst in einem Neuraminidase-Enzymassay betrachtet, um im Anschluß eine vielversprechende Auswahl in Zellkulturmodellen weiter zu analysieren. In enzymkinetischen Versuchen gewonnene Ergebnisse dienten als Grundlage für computergestützte Bindungsmodelle.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Virusanzucht & NA-Inhibitions-Assay

Brutschrank Heraeus B6200, Hanau, Deutschland

Sicherheitswerkbank Thermo Fisher Scientific Safe 2020, Waltham, USA

MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Deutschland

Zentrifuge 5417 R Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.2 Fluorometrie

Fluorometrie: Spectra FLUOR, Tecan, Mannedorf, Schweiz

#### 2.1.3 Absorption

Absorption: FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland

#### 2.1.4 Bilddokumentation

Scanner: HP Scanjet G4050

### 2.2 Software

Adobe Acrobat

Textverarbeitung

Adobe Photoshop CS8

Bildbearbeitung

ChemDraw

Programm zum Zeichnen chemischer Strukturen

Chimera 1.8.1

Programm zur Visualisierung von molekularen Modellen

Corina 3.0.0

Programm zur Erstellung von 3D Strukturen

Desmond MD 3.1.51.1

Molekular-dynamische Simulationen

Gimp

Bildbearbeitung

GOLD suit v5.1

Programm zur Simulation von Protein-Liganden-Bindungen

GraphPad Prism 5.0

Graphikerstellung, Statistik

JabRef

Literaturverwaltung

L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X	Textsatzsystem basierend auf der Programmiersprache TeX
LigandScout 3.1	Programm zur Visualisierung und Analyse von Pharmacophoren
Linux Ubuntu	Betriebssystem
Magellan	Absorptions- & Fluoreszenzmessung
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation
Microsoft Windows XP	Betriebssystem
Microsoft Word	Textverarbeitung
Molecular Operating Environment (MOE) 2010.12	Proteinmodellierung
PROPKA	Programm zur Kalkulation von pka-Werten

### 2.3 Internetdienste

Pubmed	Literaturrecherche
Scroogle	Onlinesuche
Startpage	Onlinesuche
Wikipedia	Onlineenzyklopädie

### 2.4 Verbrauchsmaterialien

Assay Plate, 96 Well Platten (weiß), Corning Incorporated, New York, USA  
 Assay Plate, 96 Well Platten (durchsichtig), Corning Incorporated, New York, USA  
 Assay Plate, 12 Well Platten (durchsichtig), Corning Incorporated, New York, USA  
 Assay Plate, 6 Well Platten (durchsichtig), Corning Incorporated, New York, USA  
 Zellkulturflaschen, TPP, Trasadingen, Schweiz  
 Zellschaber, TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.5 Influenzaviren

A/California/7/09, A(H1N1)pdm09 , RKI, Berlin, Deutschland  
 A/Perth/16/09, A(H3N2), RKI, Berlin, Deutschland  
 B/Brisbane/60/08, FluB, RKI, Berlin, Deutschland

### 2.6 Zellen

MDCK (Zelllinie aus der Niere des Hundes), RKI, Berlin, Deutschland

## 2.7 Chemikalien & Reagenzien

Avicel	(FMC Biopolymer, Belgien)
Bovines Serum Albumin 30 % (BSA)	(PAA Laboratories, Linz)
CaCl <sub>2</sub>	(Merck KGaA, Darmstadt)
DMSO	(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
Ethanol	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
FBS	(Biochrom, Cambridge, Großbritannien)
L-Glutamin	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Glycerin	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
KCl	(Merck KGaA, Darmstadt)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Merck KGaA, Darmstadt)
Kristallviolett	(Serva, Heidelberg)
MEM	(Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
MES	(Fluka)
Methanol	(KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar)
Methylumbelliferyl- <i>N</i> -acetylneuraminsäure (MUNANA)	(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
NaCl	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
NaOH	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Oseltamivir Carboxylat	(Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen)
Penicillin	(Invitrogen, Karlsruhe)
Streptomycin	(Invitrogen, Karlsruhe)
TPCK-Trypsin	(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
Trypsin	(Invitrogen, Karlsruhe)

## 2.8 Nährmedium

MEM
10 % FBS
1 % L-Glutamin
1 % Penicillin/Streptomycin

## 2.9 Infektionsmedium

MEM
0,2 % BSA
1 mg/ml TPCK-Trypsin

## 2.10 Lösungen & Puffer

### 2.10.1 Erythrozytenlösung

1 % Hahnerythrozyten in 0,9 % NaCl                      Preclinics, Potsdam, Deutschland  
0,75 % Meerschweinchenerythrozyten in 0,9 % NaCl    Preclinics, Potsdam, Deutschland

### 2.10.2 Avicel-Overlay

MEM (2x) / 0,4 % BSA 20 ml  
Avicel (2,5 % in Aqua bidest) 20 ml  
TPCK-Trypsin (1 mg/ml) 80 µl

### 2.10.3 Fixier-Färbe-Lösung

20 % Ethanol (v/v)  
1 % Kristallviolett (w/v)  
1 : 10 mit 4 % Formaldehyd

### 2.10.4 MES

32 mM MES  
4 mM CaCl<sub>2</sub>  
pH 6,5

### 2.10.5 Stopplösung

0,1 M Glycin  
25 % Ethanol  
Aqua bidest  
pH 10,7

### 2.10.6 PBS

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
80,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 2.10.7 PBS\*

PBS  
0,2 % BSA  
0,1 g/l MgCl<sub>2</sub>  
0,13 g/l CaCl<sub>2</sub>

### 2.11 Kits

Cell Proliferation Kit I (MTT)	(Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	(Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen)

### 2.12 Peptide

Peptid#1	GLFGAIAGFIEG, GenScript
Peptid#7	GLFGAFAGFIEN, GenScript
Peptid#10	GLFGAIASFIEN, GenScript

### 2.13 Untersuchte Naturstoffe

Tabelle 9 gibt Aufschluss über die untersuchten Substanzen und ihre Herkunft.



Tabelle 9. **Untersuchte Substanzen, ihr Vorkommen und ihre Herkunft.** ❶ Koch-Light Laboratories Ltd., England ❷ Prof. Lindequist, Universität Greifswald ❸ Merck KGaA, Darmstadt ❹ Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe ❺ Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen.

Stoffgruppe	Substanz	Struktur	Vorkommen	Herkunft	Reinheit
<b>Alkaloide</b>	Berberinsulfat	Berberin	<i>Chelidonium majus</i> , <i>Mahonia aquifolium</i>	❺	≥ 95 %
	Cryptopin	Cryptopin	<i>Chelidonium majus</i> , <i>Fumaria officinalis</i>	❶	≥ 95 %
<b>Catechine</b>	Catechin	(+)-Catechin	<i>Camellia sinensis</i>	❹	≥ 95 %
	Epigallocatechingallat	(-)-Epigallocatechin-3-O-gallat	<i>Camellia sinensis</i>	❺	≥ 95 %
<b>Flavonoide</b>					
→ Flavon	Apigenin	Apigenin	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Matricaria recutita</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , Propolis	❹	≥ 95 %
	Apiin	Apigenin-7-(6-O-apiosyl)glucosid	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Chamaemelum nobile</i> , <i>Matricaria recutita</i>	❹	≥ 95 %
	Luteolin	Luteolin	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Matricaria recutita</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , Propolis	❹	≥ 95 %
	Luteolin-7-glucosid	Luteolin-7-O-glucosid	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Chamaemelum nobile</i>	❹	≥ 95 %
→ Flavanon	Naringenin	Naringenin	<i>Citrus aurantium</i> ssp. <i>aurantium</i> , <i>Thymus vulgaris</i>	❺	≥ 95 %

Tabelle 9 (Fortsetzung). **Untersuchte Substanzen, ihr Vorkommen und ihre Herkunft.** ❶ Koch-Light Laboratories Ltd., England ❷ Prof. Lindequist, Universität Greifswald ❸ Merck KGaA, Darmstadt ❹ Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe ❺ Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen.

Stoffgruppe	Substanz	Struktur	Vorkommen	Herkunft	Reinheit
→ Flavonol	Hyperosid	Quercetin-3-O-galactosid	<i>Betula pendula</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Tilia spec.</i>	❹	≥ 95 %
	Isoquercitrin	Quercetin-3-O-glucosid	<i>Dactylorhiza spec.</i> , <i>Vitis vinifera</i>	❹	≥ 95 %
	Kämpferol	Kämpferol	<i>Ginkgo biloba</i> , <i>Passiflora spec.</i> , <i>Rhodiola rosea</i> , <i>Vitis vinifera</i>	❹	≥ 95 %
	Quercetin	Quercetin	<i>Matricaria recutita</i>	❺	≥ 95 %
	Quercitrin	Quercetin-3-O-rhamnosid	<i>Betula pendula</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Tilia spec.</i>	❹	≥ 95 %
	Rutin	Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl)glucosid	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Tilia spec.</i>	❸	≥ 95 %
	<b>Hydroxybenzene</b> Bergenin	Bergenin	<i>Bergenia spec.</i>	❷	≥ 95 %
	<b>Kaffeensäureester</b> Chlorogensäure	5-O-Caffeoyl-D-chinasäure	v.a. <i>Melissa officinalis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Camellia sinensis</i>	❸	≥ 95 %
	Ferulasäure	4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure	<i>Actaea racemosa</i>	❺	≥ 95 %

Tabelle 9 (Fortsetzung). **Untersuchte Substanzen, ihr Vorkommen und ihre Herkunft.** ❶ Koch-Light Laboratories Ltd., England ❷ Prof. Lindequist, Universität Greifswald ❸ Merck KGaA, Darmstadt ❹ Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe ❺ Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen.

Stoffgruppe	Substanz	Struktur	Vorkommen	Herkunft	Reinheit
	Kaffeesäurephenylethylester (CAPE)	Kaffeesäurephenylethylester	Propolis	❺	≥ 95 %
	Rosmarinsäure	2-O-Caffeoyl-2-hydroxy- 2,3-dihydrokaffeesäure	v.a. <i>Melissa officinalis</i> , <i>Men- tha</i> × <i>piperita</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Thymus vulgaris</i>	❺	≥ 95 %
<b>Lignane</b>	Nordihydrogujaretsäure	4,4'-(2,3-Dimethylbutane- 1,4-diyl)dibenzene-1,2-diol	<i>Larrea divaricata</i>	❺	≥ 95 %
<b>Phenylacrylsäure</b>	Kaffeesäure	3,4-Dihydroxizimtsäure	u.a. <i>Chamaemelum nobile</i>	❺	≥ 95 %

## 3 Methoden

### 3.1 Puffer & Lösungen

#### 3.1.1 Substrat

MUNANA wurde als Substrat in MES-Puffer solviert, aliquotiert (1000  $\mu\text{M}$  Stock) und bis zum Einsatz bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.1.2 Inhibitor

Als Referenzinhibitor diente die aktive Form des in der Europäischen Union seit 2002 als Arzneimittel gegen Influenza zugelassene Oseltamivir (Oseltamivircarboxylat). Es wurde in MES-Puffer gelöst (100  $\mu\text{M}$  Stock) aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zum Gebrauch gelagert.

#### 3.1.3 Lösungsmittel

Als Lösungsmittel der getesteten Substanzen diente DMSO.

#### 3.1.4 Naturstofflösungen

Für den Neuraminidase-Inhibitions-Test und die enzymkinetischen Messungen wurden die Naturstoffe mittels DMSO (100 %) in Lösung gebracht (4 mg/ml Stock). Schwerlösliche Substanzen wurden zusätzlich bis zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad behandelt. Die in den MTT-Test, Infektionsversuchen und Plaque-Reduktions-Tests eingesetzten Substanzen wurden jeweils vor den Versuchen in 4 % DMSO, MEM und 0,5 % NaOH gelöst (3 mg/ml).

### 3.2 MDCK-Zellen

#### Zellkultur

MDCK (Madin-Darby canine kidney) ist eine adhärent wachsende Zelllinie, die 1958 aus dem Nierenepithel eines Cockerspaniels isoliert worden ist.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Nährmedium MEM bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ -humidifizierter Atmosphäre als Monolayer kultiviert. Mit einer Verdünnung von 1:10 erfolgte die Passagierung nach Bedarf bei konfluentem Zellrasen. Bei dieser wurde zuerst mit PBS-Puffer (ohne  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ) gespült und anschließend mit 1,5 ml Trypsin inkubiert bis sich alle Zellen vom Boden gelöst haben. Alsdann wurden die Zellen in FBS-haltigem Medium (s. 2.8) aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Nährmedium überführt. Alle zwei Tage fand ein Mediumwechsel mit MEM statt.

### 3.3 Virologische Methoden

Alle virologischen Arbeiten fanden unter BSL-2 Bedingungen statt.

### 3.3.1 Virusanzucht

Die verschiedenen Virenstämme wurden mit Hilfe von konfluenten MDCK-Zellkulturen (Monolayer) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen angezüchtet. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml Allantoisflüssigkeit der mit den jeweiligen Viren beimpften Hühnereiern infiziert. Anschließend wurden die virusinfizierten Zellen bei 33 °C inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Wechsel des Minimum Essential Mediums (MEM). Bei sichtbarem Auftreten des infektionsbedingten cytopathischen Effekts der Zellen wurde die Virussuspension aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.3.2 Infektion unter Anwesenheit von Inhibitor bzw. Testsubstanz

In 12-Well-Platten wurden MDCK-Zellen ausgesät ( $3 \times 10^3$ ) und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit einer MOI von 0,01 infiziert (1). Zuvor fand eine einstündige Inkubation der Viren mit dem zu testenden Inhibitor (Oseltamivir, Peptid bzw. Naturstoff) in gleichem Volumenverhältnis (1:2) statt. Nach der Infektion wurden die Zellplatten mit dem Inoculum (100 µl pro Well) bei Raumtemperatur inkubiert und alle 15 Minuten geschwenkt. Nach 45 Minuten wurde das Inoculum entfernt, die Zellen mit 1 ml Infektionsmedium beschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dem Infektionsmedium wurde die entsprechende Konzentration des zu testenden Inhibitors beigefügt. 2-3 Tage später, je nach Ausprägung des cytopathischen Effekts in der Kontrollgruppe, wurde der Überstand geerntet, Zellreste bei 1000 *x g* für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und aliquotiert. Unmittelbar im Anschluß erfolgte die Bestimmung des HA-Titers mittels HA-Test, bevor die Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert worden sind.

$$\text{MOI} = \frac{\text{Volumen (Virus)} \cdot \text{Konzentration (Virus)}}{\text{Volumen (Zellkultur)} \cdot \text{Konzentration (Zellkultur)}} \quad (1)$$

### 3.3.3 Hämagglutinations-Test (HA-Test)

In eine durchsichtige 96-Well-Platte mit V-Boden wurden in die erste Reihe 100 µl der Virusproben, in die folgenden Reihen 50 µl PBS pipettiert. Im folgenden wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) erstellt, indem ausgehend von der ersten Reihe je 50 µl in die darauffolgende Reihe überführt worden sind. Aus der letzten Reihe wurden je 50 µl entfernt, sodass das Endvolumen in jedem Well 50 µl betrug. Eine Durchmischung erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. In jedes Well wurden anschließend 50 µl einer Hahnerythrozytenlösung (A(H1N1)pdm09 und FluB) bzw. Meerschweincherythrozytenlösung für A(H3N2) gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte die Auswertung.

Durch das Hämagglutinin der Viruspartikel kommt es zu einer sichtbaren Verklottung der Erythrozyten. Bei zunehmender Verdünnung der Virusproben und der daraus resultierenden Abnahme der Viruspartikel ist eine Hämagglutination ab einem bestimmten Punkt nicht mehr

möglich [125]. Der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine sichtbare Vernetzung der Erythrozyten stattfand, stellt den HA-Titer dar (Abb. 19). Ausgehend vom HA-Titer (oder auch HA-Unit [HAU]) kann auf die hämagglutinierenden Partikel (HAP) geschlossen werden (2) [126].

$$\frac{HAP}{ml} = \frac{HAU}{ml} \cdot 5 \times 10^6 \quad (2)$$

Limitationen dieses Tests sind die Mindestanzahl von Virionen, die für eine sichtbare Hämagglutination notwendig sind ( $>10^6$ ) sowie die fehlende Diskriminierung zwischen replikationsfähigen Virionen und sog. DI-Partikeln (defective interfering particles).

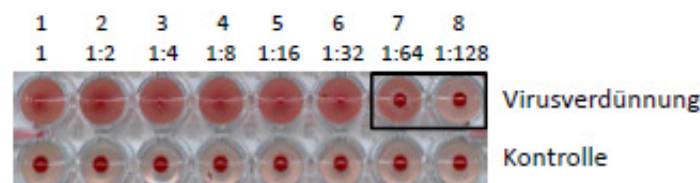


Abbildung 19. **HA-Test nach Hirst.** Bei ausreichender Viruskonzentration kommt es zu einer sichtbaren Agglutination der Erythrozyten. Diese können dann nicht mehr zu Boden sinken. In diesem Beispiel liegt der HA-Titer bei 32.

### 3.3.4 Hämagglutinations-Elutions-Test

Bei dem Hämagglutinations-Elutions-Test handelt es sich um einen modifizierten Hämagglutinationstest [101]. Es wird ähnlich dem HA-Test verfahren, nur dass sich an die Inkubation bei 4 °C eine weitere Inkubation bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln anschließt. Bei dieser Temperatur wird die Neuraminidase aktiviert und spaltet die Bindung zwischen dem viralen Hämagglutinin und der Sialinsäure der Erythrozyten, wodurch die Agglutination dieser rückgängig gemacht wird. Wird zu Virus und Erythrozyten ein Neuraminidaseinhibitor gegeben (je 50  $\mu$ l pro Well), so bleibt die Agglutination bestehen. Für A/California/7/09 und B/Brisbane/60/08 wurde eine 1 %ige Hahnerythrozytenlösung, für A/Perth/16/09 ein 0,75 %ige Meerschweinchen-Erythrozytenlösung verwendet.

### 3.3.5 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test

Mit Hilfe der sog. Plaque-bildenden Einheiten (PFE bzw. englisch PFU) lässt sich der Titer einer Virussuspension ermitteln. Durch Lyse der initial infizierten Zelle können die neu freigesetzten Viren Nachbarzellen infizieren. Nach angemessener Zeit ist an dieser Stelle ein makroskopisches Loch im Zellrasen zu beobachten. Durch Anfärben der verbliebenen Zellen kann dieses sichtbar gemacht werden. Bei dieser Methode werden nur infektiöse Partikel berücksichtigt.

In 6-Well-Platten wurden MDCK-Zellen ausgesät ( $3 \times 10^5$  pro Well) und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert. Alsdann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal

mit PBS gewaschen und mit 250  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Virusverdünnungen, die seriell zehnfach in PBS\* aus den Virusstocks hergestellt worden sind, infiziert. Es schloss sich eine 45-minütige Inkubation unter Lichtausschluss an, bei der die Platten alle 15 Minuten gründlich geschwenkt worden sind. Nun wurden zu jedem Well 2 ml Avicel-Overlay hinzugefügt und für drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Mittels 2 ml Fixier-Färbe-Lösung wurden die Zellen für 30 Minuten fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Plaques. Der Virustiter konnte durch die Anzahl der Plaques, den Verdünnungsfaktor und das eingesetzte Volumen der Virusverdünnung ermittelt werden (3).

$$\text{Titer} \left( \frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right) = \text{Anzahl der Plaques} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{1}{\text{Volumen Virusverdünnung [ml]}} \quad (3)$$

### 3.3.6 Plaque-Reduktions-Test

Um die neuraminidaseinhibierende Wirkung der Testsubstanzen in mit Influenzaviren infizierten Zellen zu beurteilen, wurde ein Plaque-Reduktions-Test nach Weight et al. [127] durchgeführt. In einer 6-Well-Platte wurden dazu MDCK-Zellen ( $3 \times 10^5$  pro Well) ausgesät und 24 Stunden bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin fand die Infektion mit 500  $\mu\text{l}$  des Virus-Inhibitor-Gemisches statt, das zu gleichen Volumenteilen aus Viruspräparation (800 Pfu/ml) und Inhibitor bestand. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Inoculum entfernt und die Zellen mit 2 ml Avicel-Overlay überschichtet. Die Auswertung erfolgte nach dreitägiger Bebrütung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und anschließender Fixierung und Färbung mit Fixier-Färbe-Lösung für 30 Minuten durch Plaquezählung und Vermessung der Plaquegröße.

## 3.4 Neuraminidase-Inhibitions-Assay

### 3.4.1 NA-Aktivitätsbestimmung

Um den Einsatz von äquimolaren Mengen der Neuraminidase zu ermitteln, wurden von den Stocks ausgehend die Viren in serieller Verdünnung (1:2) titriert. Die Verdünnung erfolgte mit MES. In alle Wells wurden je 30  $\mu\text{l}$  Substrat (100  $\mu\text{M}$  MUNANA) pipettiert, sodass die Endkonzentration 60  $\mu\text{M}$  im Well betrug (Tab. 10).

Tabelle 10. Testaufbau zur NA-Aktivitätsbestimmung.

Reagenzie	Probe	Blindwert
MES-Puffer	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
Virusverdünnung	10 $\mu\text{l}$	–
Substrat	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
Stopplösung	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$
$\Sigma$	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C unter Lichtausschluss und Schütteln inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch 150  $\mu\text{l}$  Stopplösung pro Well beendet. Das durch die Neuraminidase freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde fluorometrisch bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 465 nm gemessen. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen. Die optimale Virusverdünnung liegt im linearen Bereich der sigmoiden

Enzymaktivitätskurve (bei etwa 35.000 relativen Fluoreszenzeinheiten [RFU]). Dies entspricht der Virusmenge, die bei 37 °C in 60 Minuten 10  $\mu\text{mol}$  MUNANA umsetzt.

### 3.4.2 Bestimmung der 50 % inhibitorischen Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ )

Die einzelnen Substanzen wurden nach dem in Tabelle 11 dargestellten Schema pipettiert. Virus und Inhibitor bzw. die zu untersuchende Substanz (je 10  $\mu\text{l}$  pro Well) wurden für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln im Dunkeln, nach dem Hinzufügen des Substrats für eine weitere Stunde unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Viren wurden durch 150  $\mu\text{l}$  Stopplösung inaktiviert und das durch die Neuraminidase freigesetzte 4-Methylumbelliferon bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 465 nm gemessen.

Tabelle 11. Testaufbau zur Messung der Neuraminidaseaktivität im Neuraminidase-Inhibitions-Test (MUNANA-Test).

Reagenzie	Probe	Positivkontrolle	Blindwert
MES-Puffer	–	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Virus	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	–
Inhibitor/Untersuchungssubstanz	10 $\mu\text{l}$	–	10 $\mu\text{l}$
Substrat	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
Stopplösung	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$
$\Sigma$	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$

### 3.4.3 Mathematische Auswertung

Die Inhibitorische Konzentration 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) ist die Konzentration einer Substanz, bei der 50 % des Enzyms inhibiert sind. Um sie zu ermitteln, wurde die jeweilige Aktivität der Neuraminidase gegen die verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Substanzen halblogarithmisch aufgetragen. Bei inhibitorischer Aktivität ergibt sich eine sigmoide Kurve, in deren linearen Abschnitt die  $\text{IC}_{50}$  bestimmt werden kann.

## 3.5 Enzymkinetische Messung

Die Enzymkinetik beschreibt die Geschwindigkeit von enzymkatalysierten Reaktionen und erlaubt Rückschlüsse auf Funktion und Eigenschaft des Enzyms. Leonor Michaelis und Maud Menten brachten dies mit einer Gleichung (4) Anfang des 20. Jahrhunderts zum Ausdruck.

$$V_0 = V_{max}[E]_T \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (4)$$

Die Umsatzgeschwindigkeit  $V_0$  lässt sich graphisch als Funktion der Substratkonzentration  $[S]$  darstellen.  $[E]_T$  ist die Enzymgesamtkonzentration und  $K_M$  die Michaelis-Menten-Konstante, die die Substratkonzentration widerspiegelt, bei der die Umsatzgeschwindigkeit die Hälfte des



Maximalwertes ( $\frac{V_{max}}{2}$ ) erreicht [128]. Da sich die Reaktionsgeschwindigkeit asymptotisch ihrem Maximum ( $V_{max}$ ) nähert, kann dem Graphen kein definitiver  $K_M$ -Wert entnommen werden. Daher kommt die Darstellung nach Lineweaver-Burk zur Anwendung (doppeltreziprokes Diagramm). Durch Bildung der Kehrwerte wird die Michaelis-Menten-Gleichung in eine Geradengleichung umgewandelt (5). Die Steigung der Geraden entspricht  $\frac{K_M}{V_{max}}$ , der Schnittpunkt mit der y-Achse  $\frac{1}{V_{max}}$  und der Schnittpunkt mit der x-Achse  $\frac{-1}{K_M}$ .

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

Neben dem Substrat ist der  $K_M$ -Wert von den Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke abhängig. Liegt die Substratkonzentration unterhalb des  $K_M$ -Wertes, so ist keine nennenswerte Katalyse möglich, da dann das aktive Zentrum von weniger als der Hälfte aller Enzyme besetzt ist.

Während der  $K_M$ -Wert also die Bindungsaffinität des Substrats zum Enzym beschreibt, spiegelt der  $K_i$ -Wert als Dissoziationskonstante die Bindungsstärke wieder; je kleiner der Wert, desto stärker die Bindung und damit die Hemmung des Enzyms [129].

Die enzymkinetischen Messungen der Neuraminidaseaktivität erfolgten fluorometrisch mit dem Substrat MUNANA auf Grundlage der Methode von Potier [130], die von Rameix-Welti et al. [104] angepasst worden ist. Dazu wurde das Substrat ausgehend von einer Konzentration von  $160 \mu M$  seriell bis  $5 \mu M$  1 : 2 verdünnt. Als Referenzinhibitor diente Oseltamivir, das in drei unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich des  $IC_{50}$ -Werts eingesetzt worden ist. Für A(H1N1)pdm09 und A(H3N2) betragen sie  $2 nM$ ,  $1 nM$  und  $0,5 nM$ , für FluB  $200 nM$ ,  $100 nM$  und  $50 nM$ . Die Flavonoide wurden in Konzentrationen von  $200 \mu M$ ,  $100 \mu M$  und  $50 \mu M$  für alle drei Virusstämme hinzugefügt (Tab. 12). Die Durchführung erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben.

**Tabelle 12. Übersicht der für die Ermittlung der  $K_M$ - und  $K_i$ -Werte eingesetzten Konzentrationen von Oseltamivir und den jeweiligen Flavonoiden.** Die Messungen basieren auf dem MUNANA-Test nach Potier, modifiziert nach Rameix-Welti. Statt konstanter Substratkonzentration wird MUNANA seriell von  $160 \mu M$  ausgehend 1:2 verdünnt. Die eingesetzten Konzentrationen von Oseltamivir bzw. den Flavonoiden orientieren sich an dem zuvor ermittelten  $IC_{50}$ -Wert. Die Virusstämme A(H1N1)pdm09 und A(H3N2) sind hier als FluA zusammengefasst, B/Brisbane/60/08 firmiert unter FluB.

MUNANA [ $\mu M$ ]	Oseltamivir [nM]									Flavonoid [ $\mu M$ ]			
	FluA			FluB						FluA & FluB			
5	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	
10	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	
20	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	
40	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	
80	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	
160	0	0,5	1,0	2,0	0	25	50	100	0	50	100	200	

Die Berechnung der  $K_M$ - und  $K_i$ -Werte erfolgte über die Darstellung durch Lineweaver-Burk (5) mittels des Programms GraphPad Prism.

### 3.6 Cytotoxizitätstest

#### 3.6.1 MTT-Test (Kit)

Zur Ermittlung der Cytotoxizität der eingesetzten Wirkstoffe diente der MTT-Test nach Mosmann [131]. Hierbei wird ein Tetrazoliumsalz (MTT) von zellulären Succinat-Dehydrogenasen sowie NADH und NADPH in das purpurfarbene Formazan reduziert. Werden die Formazankristalle anschließend in Lösung gebracht, kann der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden (Abb. 20). Dabei entspricht der Grad der Farbbildung der Viabilität der Zellen.

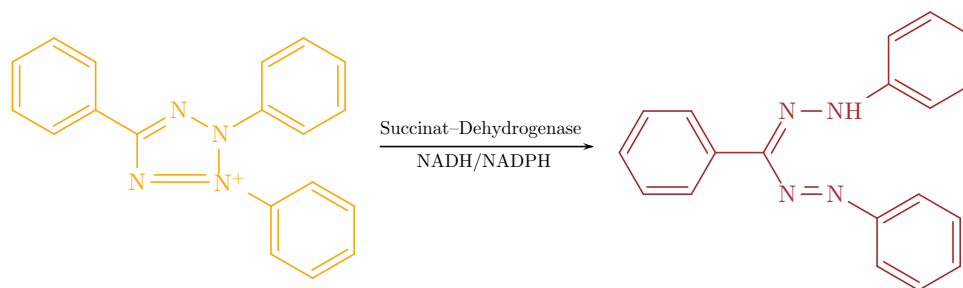


Abbildung 20. **MTT-Test nach Mosmann zur Messung der Zellviabilität.** Zelluläre Succinat-Dehydrogenasen sowie NADH und NADPH reduzieren Tetrazolium zu Formazan. Als Resultat wird ein Farbumschlag von gelb nach rot sichtbar, der bei 570 nm colorimetrisch gemessen werden kann.

Da Flavonoide in der Lage sind, MTT in Abwesenheit von lebenden Zellen zu reduzieren und somit ein falschpositives Ergebnis zu liefern, ist es wichtig, die Zellen nach Entfernen der Flavonoide und vor dem Hinzufügen vom MTT mehrmals zu waschen [132].

**Durchführung** In einer 96-Well-Platte wurden MDCK-Zellen ( $1,2 \times 10^5$  pro Well) ausgesät und 24 Stunden bei 36 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 50  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Substanz sowie 50  $\mu\text{l}$  frischem Medium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden bei 36 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde die Suspension nach dreimaligem Waschen mit PBS durch 90  $\mu\text{l}$  frisches Medium und 10  $\mu\text{l}$  des Tetrazoliumsalzes (5 mg/ml MTT gelöst in PBS) ausgetauscht. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  für vier Stunden. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Solubilisierungs-Lösung pro Well wurden die entstandenen Formazankristalle in Lösung gebracht. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 570 nm unter Subtraktion der Referenzwellenlänge von 690 nm. Die Ergebnisse aus den Messungen von unbehandelten Zellen bzw. Zellen, die nur mit 0,4 % DMSO behandelt worden sind, stellen die Positivkontrolle dar und werden mit 100 % gleichgesetzt. Die Werte aus den Messungen von mit Flavonoiden behandelten Zellen werden zu den der Positivkontrolle prozentual ins Verhältnis gesetzt.

### 3.6.2 LDH-Test (Kit)

Mit Hilfe des LDH-Tests kann die Zellschädigung aus dem Überstand der Zellkultur und damit zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden, ohne dass die Zellen lysiert werden müssen. Die Grundlage dieses Tests stellt die Lactatdehydrogenase (LDH) dar, die in Zellmembranen vorkommt. Bei Zellschädigungen wird das Enzym freigesetzt und kann im Medium nachgewiesen werden (Abb. 21) [133, 134].

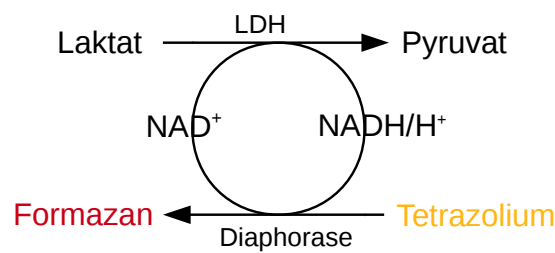


Abbildung 21. **LDH-Test zur Messung der Cytotoxizität.** Die Lactatdehydrogenase (LDH) wandelt Laktat in Pyruvat um,  $\text{NAD}^+$  wird dabei zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. Dieses kann daraufhin seinerseits Tetrazolium in Formazan reduzieren. Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb nach rot, der bei 570 nm colorimetrisch gemessen werden kann.

**Durchführung** In einer 96-Well-Platte wurden  $100\ \mu\text{l}$  der jeweiligen Probe (Überstand der Zellkultur) vorgelegt und mit  $100\ \mu\text{l}$  der zuvor frisch zubereiteten Reaktionslösung gemischt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 0,4% DMSO behandelt worden sind, da die getesteten Substanzen in DMSO gelöst worden waren und in den Wells eine Endkonzentration von 0,4% DMSO vorlag. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten DMSO-Konzentrationen einen cytotoxischen Einfluss auf die Zellen zeigten. Es schloß sich eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 570 nm unter Subtraktion der Referenzwellenlänge von 690 nm. Dabei verhält sich die relative Absorption direkt proportional zum Grad der Zellschädigung.

### 3.7 Selektivitätsindex

Der Selektivitätsindex (SI) errechnet sich aus dem Quotienten der cytotoxischen Konzentration 50 ( $\text{CC}_{50}$ ) und der inhibitorischen Konzentration 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) (6).

$$SI = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{IC}_{50}} \quad (6)$$

Je höher der Wert, desto stärker überwiegt die inhibitorische Aktivität gegenüber der cytotoxischen Eigenschaft der betreffenden Substanz. Die Substanz besitzt eine höhere therapeutische Breite.

### 3.8 Molekulares Modell zur Bindungsberechnung

Die molekularen Bindungsmodelle wurden auf Grundlage der enzymkinetischen Messungen und der damit ermittelten  $K_M$ -Werte, sowie der  $IC_{50}$ -Werte entwickelt. Die Aminosäuresequenzen der jeweiligen Neuraminidasen von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und B wurden der RCSB Protein Datenbank entnommen. Der Homologiegrad zwischen den Enzymen der verschiedenen Subtypen wurde mit der Software Molecular Operating Environment (MOE) errechnet (Tab. 13). Mit Hilfe des Programms Desmond MD wurden die Modelle in dynamischen Simulationen von 40 ns Dauer (im OPLS-AA 2005 Kraftfeld) untersucht [135].

Die Arbeiten zum molekularen Modell wurden durch die AG Wolber am Institut für Pharmazie - Pharmazeutische Chemie - der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Tabelle 13. **Sequenzvergleich und Homologiegrad zwischen den Neuraminidasen von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB [135].** HM Homologes Modell, PDB Protein Data Bank, bp Basenpaare.

HM	Original	Template (PDB- Code)	Länge (bp)	Kategorie	Seq. ID	Seq.- Überein- stimmung	Sequenz- vergleich des HM	Sequenzvergleich des aktiven Zen- trums des HM
1	A/California/7/09	3TI6	388	Influenza A Virus (A/California/04/2009 (H1N1)pdm09)	100 %	100 %	(1:2) 44 %	(1:2) 77 %
2	A/Perth/16/09	4GZP	393	Influenza A Virus (A/Tanzania/205/2010 (H3N2))	99 %	99 %	(2:3) 28 %	(2:3) 60 %
3	B/Brisbane/60/08	3K3A	397	Influenza B Virus (B/Perth/211/2001)	94 %	96 %	(1:3) 32 %	(1:3) 61 %

### 3.9 Peptidsynthese

Die 12-mer Peptide wurden von GenScript (<http://www.genscript.com>) synthetisiert, bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch in PBS solviert. Die Reinheit betrug >95 %, die Stocklösungen hatten eine Konzentration von 10 mg/ml.

### 3.10 Peptidbindungsmodelle

Mit Hilfe des Programms PEP-Fold (<http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD>) wurde von den 12-mer Peptiden 3D Strukturen angefertigt und jeweils das Modell mit der geringsten Energie (sOPEP, score Optimized Potential for Efficient structure Prediction), das die größte Peptidstabilität verspricht, ausgewählt [136, 137, 138]. Potentielle Bindungsstellen zwischen dem jeweiligen Peptid und dem Hämagglutinin von A(H1N1)pdm09, in der 3D-Struktur von PDB:3LZG repräsentiert, bzw. dem Precursorprotein HA<sub>0</sub>, in der 3D-Struktur von PDB:1RD8 (Tab. 14), wurden durch den ClusPro.2.0 Server errechnet (<http://cluspro.bu.edu/login>) [139, 140, 141, 142]. Die Bindungsmodelle wurden anschließend mit Chimera visualisiert. Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische, wurden durch den CMA Server ermittelt (Contact Map Analysis, <http://ligin.weizmann.ac.il/cma/>) [143].

Tabelle 14. **Sequenzvergleich zwischen den maturierten Hämagglutininen (HA) von A/California/07/09 und A/California/04/09 sowie dem Vorläuferprotein (HA<sub>0</sub>) von A(H1N1)1918.** HM Homologes Modell, PDB Protein Data Bank. Fusiogene Region: 20 Aminosäuren des N-terminalen Ende des HA<sub>2</sub>. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Blast [144]. A/California/07/09 gilt als Referenzsequenz und wird mit 100 % gleichgesetzt.

HM	Original	Template (PDB- Code)	Kategorie	Seq.-Überein- stimmung gesamt	Seq.-Überein- stimmung fusio- gene Region
1	A/California/07/09		A(H1N1)	100 %	100 %
2	A/California/04/09	3LZG	A(H1N1)	99,5 %	100 %
3	A(H1N1)1918	1RD8	A(H1N1)	88,0 %	95,7 %

## 4 Ergebnisse

Auch ohne den Einsatz von Medikamenten entstehen durch Mutationen Resistenzen gegen die gängigen Arzneimittel zur Behandlung der Virusgrippe, wie die bis zum Auftreten der pandemischen Grippe zirkulierenden saisonalen Stämme gezeigt haben. Zudem scheint die Wirksamkeit von Oseltamivir *in vivo* weit weniger ausgeprägt zu sein als bislang vermutet [145].

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit zum einen nach weiteren Wirkstoffen gesucht werden, die, ebenso wie Oseltamivir, in der Lage sind, die virale Neuraminidase zu inhibieren und damit eine Infektion und deren Ausbreitung im Organismus zu verhindern. Zum anderen sollten neue Zielstrukturen und Möglichkeiten zur Unterbindung vom Eintritt des Virus in die Zelle untersucht werden.

Dazu wurden zunächst 22 Substanzen aus sieben Stoffgruppen (Alkaloide, Catechine, Flavonoide, Hydroxybenze, Kaffeesäureester, Lignane und Phenylacrylsäuren) (vgl. Tab. 9), denen in der Literatur Antiinfluenza-Eigenschaften zugeschrieben werden, ohne dass der Wirkmechanismus näher beschrieben worden ist oder die auf die bakterielle Neuraminidase inhibitorische Effekte zeigten, in einem Enzymassay auf ihr Potential, die Neuraminidase von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB zu inhibieren, im Vergleich zu Oseltamivir getestet (Abschnitt 4.1.5). Im weiteren Verlauf wurden von einer vielversprechenden Auswahl dieser Substanzen die cytotoxischen Eigenschaften auf MDCK-Zellen ermittelt (Abschnitt 4.5), um anschließend die im Enzymassay erzielten Ergebnisse im Zellkulturmodell mit MDCK-Zellen zu überprüfen (Abschnitt 4.6 und 4.8). Für eine Aussage potentieller Bindungsstellen und -stärke der Substanzen am Enzym erfolgten enzymkinetische Messungen (Abschnitt 4.2 und 4.9).

Zusätzlich wurden drei Peptide im MDCK-Zellkulturmodell in Hinblick auf ihre Fähigkeit, über das Fusionpeptid von A(H1N1)pdm09 den Eintritt des Virus in die Wirtszellen zu inhibieren, betrachtet (Abschnitt 4.11). Zuvor wurden von den Peptiden potentielle 3D-Modelle und Bindungsstellen am Hämagglutinin errechnet (Abschnitt 4.10).

### 4.1 Einfluss der Naturstoffe auf die Neuraminidaseaktivität

#### 4.1.1 NA-Aktivitätsbestimmung

Um im Neuraminidasetest reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssen vergleichbare Mengen der drei Virusstämme eingesetzt werden. Dazu wurde initial die Aktivität der Neuraminidase der jeweiligen Virusstämme bestimmt (s. 3.4.1) (Abb. 22 A). Die optimale Virusmenge liegt im linearen Bereich der sigmoiden Kurve. Ausgehend von den Stocks wurden A(H1N1)pdm09 und A(H3N2) 1:8 und FluB 1:16 verdünnt in den Assays eingesetzt.

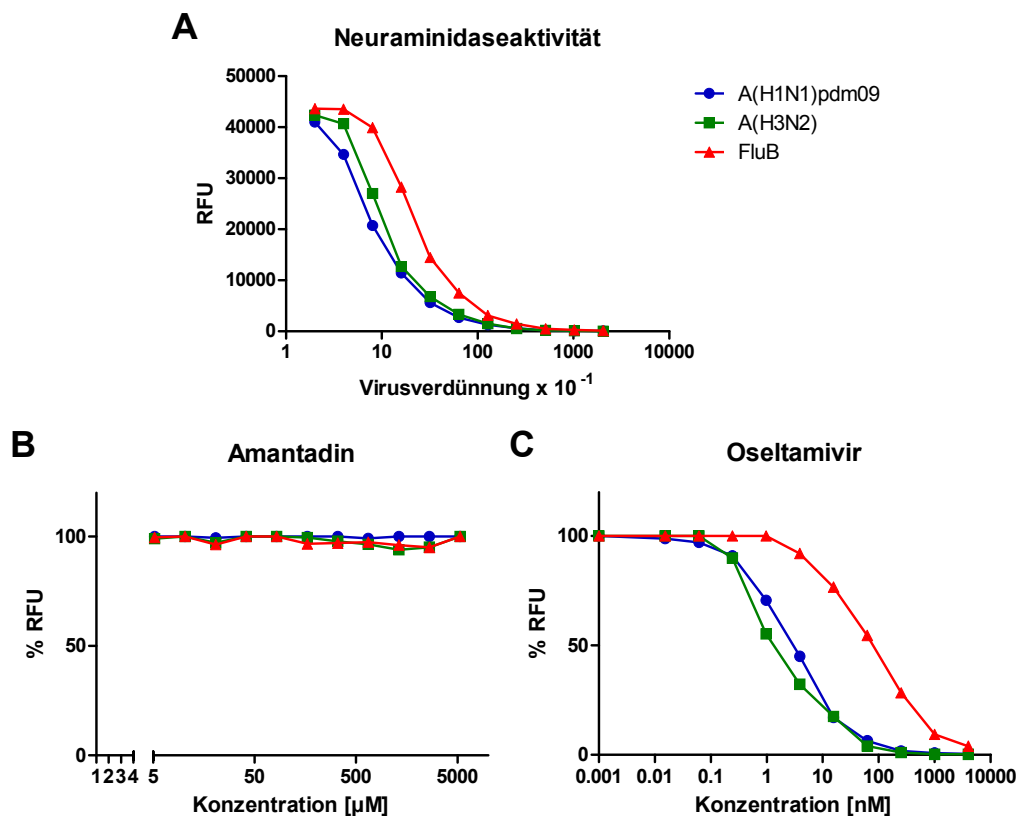


Abbildung 22. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität (A) und -sensitivität auf Amantadin (B) und Oseltamivir (C) des pandemischen H1N1 Virus (A(H1N1)pdm09), des H3N2 Virus (A(H3N2)) und des B Virus (FluB). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im MUNANA-Test mittels Virustitration in serieller Verdünnung. Die Sensitivität auf Amantadin und Oseltamivir wurde im MUNANA-Test unter vergleichbaren Mengen von Substrat und Virus bei serieller Verdünnung der jeweiligen Substanz bestimmt. RFU relative Fluoreszenzeinheiten (vgl. 3.4.1).

#### 4.1.2 Einfluss von Amantadin und Oseltamivir auf die Neuraminidaseaktivität

Nach Ermittlung der Aktivität der Enzyme im Assay wurde die Sensitivität auf Amantadin (Abb. 22 B) und Oseltamivir (Abb. 22 C) betrachtet (vgl. 3.4.2). Bei erster Substanz handelt es sich um ein Derivat des Adamantan, das als Arzneimittel gegen Grippe in Europa zugelassen ist. Da es sich um einen Protonenkanalblocker handelt, ist die Neuraminidase nicht tangiert; das Substrat MUNANA wird unabhängig der Konzentration von Amantadin umgesetzt. Anders verhält es sich mit der zweiten Substanz Oseltamivir. Das 2002 in der EU, ebenfalls gegen Grippe, zugelassene Arzneimittel wirkt direkt auf die virale Neuraminidase; entsprechend reduzierte sich der Substratumsatz in Abhängigkeit zur eingesetzten Oseltamivirkonzentration. Damit diente es als Kontrolle gegenüber den getesteten Substanzen.



#### 4.1.3 Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Neuraminidaseaktivität

Da die Flavonoide und Alkaloide in DMSO gelöst worden sind, wurde überprüft, ob das Lösungsmittel einen Einfluss auf die virale Neuraminidase im Enzymassay hatte. Ein solcher konnte jedoch auf die Enzymaktivität nicht nachgewiesen werden. Dazu wurde DMSO im Neuraminidase-Inhibitions-Assay (vgl. 3.4.2) in Endkonzentrationen von 5 %, 2 % und 1 % im Well eingesetzt.

#### 4.1.4 Einfluss von Calcium auf die Neuraminidaseaktivität

Da Calcium ein essentieller Cofaktor der Neuraminidase ist, wurde getestet, inwieweit Veränderungen der Calciumkonzentration innerhalb des Neuraminidase-Inhibitions-Assay zu einer Beeinflussung der Neuraminidase und damit der  $IC_{50}$ -Werte führt. Dazu wurden Messungen mit doppelter bzw. halber Calciumkonzentration im MES-Puffer (8 mM bzw. 2 mM statt der regulären 4 mM  $CaCl_2$ ) durchgeführt. Weder eine Verdopplung noch eine Halbierung der Calciumkonzentration im Testsystem führten zu einer Veränderung der  $IC_{50}$ -Werte.

#### 4.1.5 Einfluss der Naturstoffe auf die Neuraminidaseaktivität

Nachdem ein Effekt des Lösungsmittels DMSO auf die virale Neuraminidaseaktivität ausgeschlossen werden konnte, wurde der Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf dieses Enzym näher betrachtet (Tab. 15) (vgl. 3.4.2). Zum Vergleich wurden frühere Untersuchungen mit der Neuraminidase von *Vibrio cholerae* anstelle der viralen Enzyme herangezogen [124].

Tabelle 15. Einfluss ausgewählter Substanzen auf die virale Neuraminidaseaktivität von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB, sowie zum Vergleich auf die bakterielle Neuraminidaseaktivität von *Vibrio cholerae*. Für die virale Neuraminidaseaktivität diente Oseltamivir, für die bakterielle Neuraminidase Zanamivir als Kontrolle. Die Sensitivitätsbestimmungen wurden im MUNANA-Test unter äquimolaren Mengen von Virus bei serieller Verdünnung der jeweiligen Substanz bestimmt. Die Daten zu *Vibrio cholerae* entstammen [124].

Stoffgruppe	Substanz	<i>Vibrio cholerae</i> IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	A/California/7/09 (N1-09) IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	A/Perth/16/09 (N2) IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	B/Brisbane/60/08 (B-NA) IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
Alkaloide	Berberinsulfat	111	115,3 $\pm$ 19,8	117,8 $\pm$ 19,7	132,7 $\pm$ 2,9
	Cryptopine	> 542	> 1084,0	> 1084,0	> 1084,0
Catechine	Catechin	> 689	> 1378,0	> 1378,0	> 1378,0
	Epigallocatechingallat	361	560,6 $\pm$ 130,1	328,4 $\pm$ 203,9	472,7 $\pm$ 157,3
Flavon	Apigenin	33	170,43 $\pm$ 35,6	146,4 $\pm$ 48,2	220,2 $\pm$ 185,19
	Apigenin-7-glucosid	140	205,7 $\pm$ 93,3	184,2 $\pm$ 95,2	328,2 $\pm$ 244,0
	Luteolin	152	117,6 $\pm$ 44,8	115,8 $\pm$ 33,6	57,2 $\pm$ 39,5
	Luteolin-7-glucosid	104	66,6 $\pm$ 19,7	51,2 $\pm$ 9,1	57,2 $\pm$ 25,1
Flavanon	Naringenin	295	1171,1 $\pm$ 322,5	866,3 $\pm$ 500,0	1154,0 $\pm$ 464,6
Flavonol	Hyperosid	143	62,5 $\pm$ 3,9	85,5 $\pm$ 43,6	88,1 $\pm$ 31,3
	Isoquercitrin		370,2 $\pm$ 22,4	477,1 $\pm$ 98,5	384,5 $\pm$ 69,4
	Kämpferol	70	85,2 $\pm$ 1,1	42,2 $\pm$ 16,1	90,8 $\pm$ 61,4
	Quercetin	28	170,3 $\pm$ 52,1	141,2 $\pm$ 94,5	151,9 $\pm$ 39,9
	Quercitrin	86	109,0 $\pm$ 12,9	121,2 $\pm$ 53,0	112,4 $\pm$ 68,2
	Rutin	167	96,8 $\pm$ 19,3	95,9 $\pm$ 41,2	104,9 $\pm$ 60,0
	Hydroxybenzene	Bergenin	> 610	> 1720,0	> 1720,0
Kaffeesäureester	Chlorogensäure	540	138,0 $\pm$ 45,0	141,9 $\pm$ 66,5	240,7 $\pm$ 92,0
	Ferulasäure	> 1030	188,5 $\pm$ 24,6	201,2 $\pm$ 85,0	253,7 $\pm$ 105,0
	CAPE	149	196,1 $\pm$ 67,8	169,6 $\pm$ 72,3	151,1 $\pm$ 25,4
	Rosmarinsäure	191	131,1 $\pm$ 21,2	143,4 $\pm$ 43,8	150,1 $\pm$ 16,1
Lignane	Nordihydroguajaretsäure	150	541,4 $\pm$ 247,2	423,2 $\pm$ 165,1	483,4 $\pm$ 342,2
Phenylacrylsäuren	Kaffeesäure	1553	276,3 $\pm$ 116,6	299,9 $\pm$ 148,6	302,2 $\pm$ 174,5
	Zanamivir	215			
	Oseltamivir		2,57 nM $\pm$ 1,52 nM	1,39 nM $\pm$ 1,08 nM	45,39 nM $\pm$ 20,41 nM

Die Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin, Kämpferol, Luteolin-7-glucosid, Quercitrin und Rutin, deren  $IC_{50}$  im Neuraminidase-Enzym-Assay bei mindestens einer der drei getesteten viralen Neuraminidasen unter  $100 \mu\text{M}$  lagen, wurden in enzymkinetischen Messungen (4.2) und im Zellkulturmodell (4.6 & 4.8) eingehender analysiert (Abb. 23).

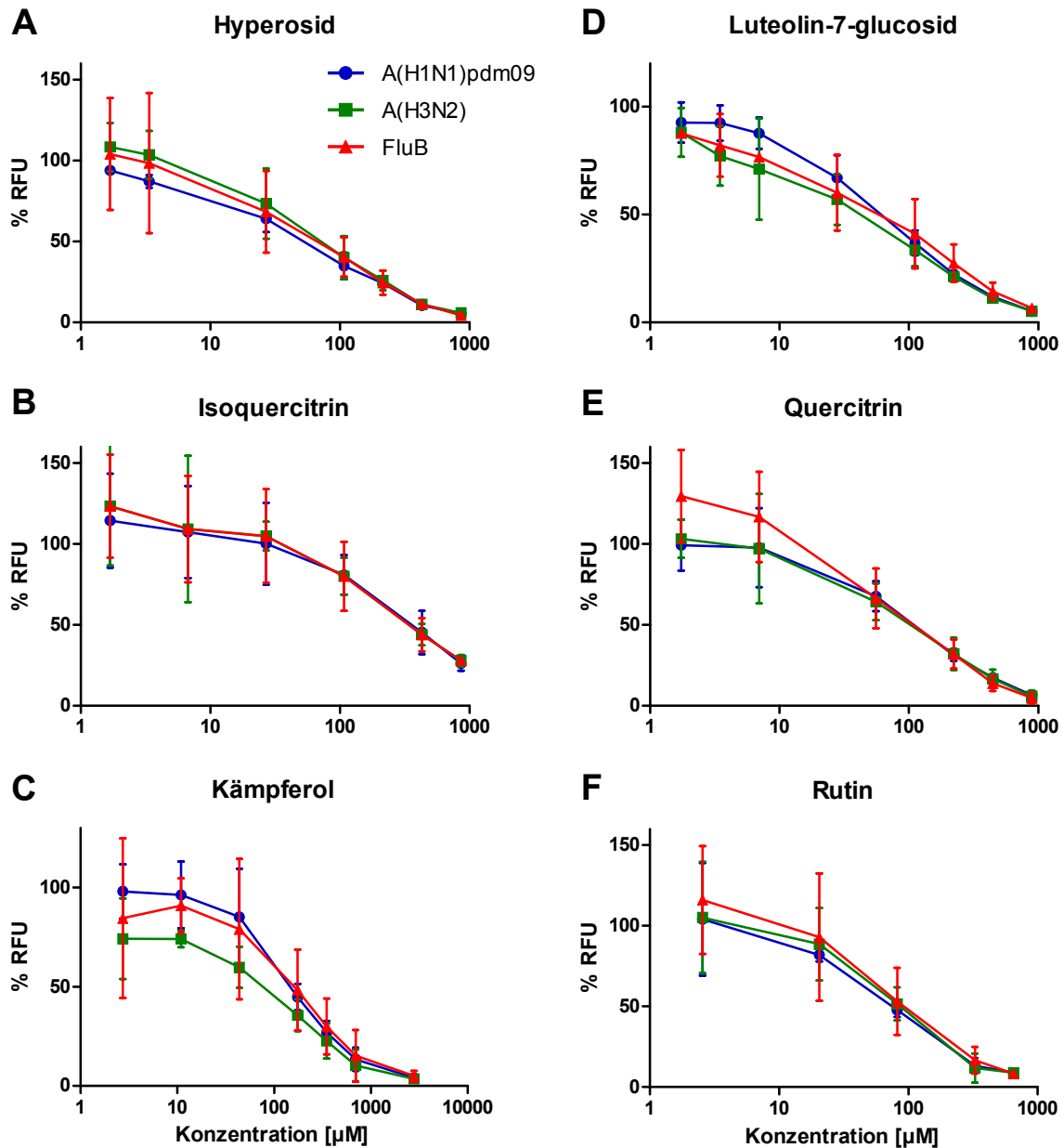


Abbildung 23. Einfluss von Hyperosid (A), Isoquercitrin (B), Kämpferol (C), Luteolin-7-glucosid (D), Quercitrin (E) und Rutin (F) auf die virale Neuraminidaseaktivität von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB. Die Sensitivitätsbestimmungen wurden im MUNANA-Test unter vergleichbaren Mengen von Substrat und Virus bei serieller Verdünnung der jeweiligen Substanz bestimmt. RFU relative Fluoreszenzeinheiten (vgl. 3.4.1).

Hyperosid und Luteolin-7-glucosid inhibierten die Neuraminidasen von A(H1N1)pdm09, A-

(H3N2) und FluB mit Konzentrationen deutlich unter  $100 \mu\text{M}$  am stärksten. Dabei zeigten sich keine deutlichen Unterschiede der Inhibierung auf die drei Neuraminidasegruppen N1-09, N2 und NA-B. Lediglich Hyperosid wies einen etwas stärkeren Einfluss auf die Inhibierung von N1-09 ( $\text{IC}_{50} 62,5 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu N2 ( $\text{IC}_{50} 85,5 \mu\text{M}$ ) und B-NA ( $\text{IC}_{50} 88,1 \mu\text{M}$ ) auf. Kämpferol inhibierte N2 ( $\text{IC}_{50} 42,2 \mu\text{M}$ ) stärker als N1-09 und B-NA ( $\text{IC}_{50} 85,2 \mu\text{M}$  bzw.  $90,8 \mu\text{M}$ ).

Isoquercitrin wurde trotz der hohen  $\text{IC}_{50}$  zwischen  $370 \mu\text{M}$  und  $478 \mu\text{M}$  eingehender betrachtet, da in der Literatur anti-Influenza Eigenschaften beschrieben worden sind [146, 147].

Alle Substanzen aus den Gruppen der Alkaloide, Catechine, Hydroxybenzene, Kaffeesäureester, Lignane und Phenylacrylsäuren zeigten sowohl auf N1-09 als auch auf N2 und B-NA geringe bis gar keine inhibitorische Aktivität. Allein das zu den Flavonoiden gehörende Flavon Luteolin inhibierte die Neuraminidase von FluB im Neuraminidase-Enzym-Assay potent ( $\text{IC}_{50} 57,2 \mu\text{M}$ ). Die Neuraminidasen aus der Gruppe N1-09, N2 und die bakterielle Neuraminidase von *Vibrio cholerae* wurden dagegen durch Luteolin weniger stark gehemmt ( $\text{IC}_{50} 117,6 \mu\text{M}$ ,  $115,8 \mu\text{M}$  bzw.  $152 \mu\text{M}$ ).

## 4.2 Enzymkinetik

Im weiteren wurde die Enzymkinetik der Neuraminidase von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB (Tab. 16 und Abb. 24) ohne Inhibitoren, unter Zugabe von Oseltamivir als Referenzinhibitor (Abb. 25) und unter Zugabe des jeweiligen Flavonoids Hyperosid, Isoquercitrin, Kämpferol, Luteolin-7-glucosid, Quercetrin und Rutin untersucht (vgl. 3.5).

Tabelle 16. **Übersicht der  $K_m$ -Werte der Neuraminidasen N1-09, N2 und B-NA von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und Influenza B-Viren.**  $K_m$ -Werte in  $\mu\text{M}$ . Messungen in Duplikaten, Substanzen  $n = 3$ , ungehemmt  $n = 7$ . Die enzymkinetischen Messungen der Neuraminidaseaktivität erfolgten fluorometrisch mit MUNANA als Substrat auf Grundlage der Methode von Potier [130], adaptiert von Rameix-Welti et al. [104]. Das Substrat wurde seriell verdünnt und zu gleichen Mengen Virus und Inhibitor hinzugegeben (vgl. 3.5).

Neuraminidase	Substanz	$K_m$		
		$200 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$	$50 \mu\text{M}$
N1-09		$48,76 \pm 7,68$	$26,49 \pm 5,85$	$55,90 \pm 5,94$
N2	Hyperosid	$147,96 \pm 88,32$	$61,29 \pm 39,04$	$145,09 \pm 108,74$
B-NA		$60,44 \pm 33,76$	$44,00 \pm 26,68$	$73,61 \pm 41,06$
N1-09	Isoquercitrin	$26,86 \pm 4,67$	$66,02 \pm 5,81$	$40,59 \pm 10,35$
N2		$130,45 \pm 28,50$	$227,30 \pm 50,06$	$99,37 \pm 11,78$
B-NA		$72,90 \pm 32,72$	$110,05 \pm 3,89$	$83,22 \pm 12,20$
N1-09	Kämpferol	$37,14 \pm 15,09$	$32,23 \pm 14,45$	$32,58 \pm 14,85$
N2		$94,80 \pm 49,17$	$119,04 \pm 49,60$	$93,67 \pm 74,59$
B-NA		$68,93 \pm 11,69$	$71,14 \pm 23,37$	$59,59 \pm 25,32$

Tabelle 16 (Fortsetzung). **Übersicht der  $K_m$ -Werte der Neuraminidasen N1-09, N2 und B-NA von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und Influenza B-Viren.**  $K_m$ -Werte in  $\mu\text{M}$ . Messungen in Duplikaten, Substanzen  $n = 3$ , ungehemmt  $n = 7$ . Die enzymkinetischen Messungen der Neuraminidaseaktivität erfolgten fluorometrisch mit MUNANA als Substrat auf Grundlage der Methode von Potier [130], adaptiert von Rameix-Welti et al. [104]. Das Substrat wurde seriell verdünnt und zu gleichen Mengen Virus und Inhibitor hinzugegeben (vgl. 3.5).

Neuraminidase	Substanz	$K_m$		
		$200 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$	$50 \mu\text{M}$
N1-09		$38,51 \pm 5,34$	$32,00 \pm 5,54$	$37,08 \pm 3,15$
N2	Luteolin-7-glucosid	$51,36 \pm 35,87$	$91,69 \pm 39,53$	$159,60 \pm 120,01$
B-NA		$69,48 \pm 34,41$	$73,51 \pm 40,26$	$89,71 \pm 52,10$
N1-09		$32,63 \pm 10,70$	$39,33 \pm 11,11$	$32,44 \pm 5,94$
N2	Quercitrin	$91,64 \pm 49,75$	$94,18 \pm 69,98$	$69,31 \pm 32,46$
B-NA		$86,92 \pm 47,02$	$64,94 \pm 51,22$	$73,81 \pm 34,03$
N1-09		$41,09 \pm 4,65$	$27,31 \pm 7,28$	$48,22 \pm 21,61$
N2	Rutin	$102,07 \pm 16,03$	$75,58 \pm 19,90$	$107,05 \pm 53,03$
B-NA		$68,68 \pm 14,48$	$86,53 \pm 23,36$	$89,91 \pm 60,14$
		$2 \text{ nM}$	$1 \text{ nM}$	$0,5 \text{ nM}$
N1-09		$76,64 \pm 10,55$	$62,74 \pm 12,74$	$37,20 \pm 2,20$
N2	Oseltamivir	$53,62 \pm 14,90$	$48,27 \pm 13,80$	$30,74 \pm 7,23$
		$100 \text{ nM}$	$50 \text{ nM}$	$25 \text{ nM}$
B-NA		$153,97 \pm 36,37$	$106,50 \pm 20,35$	$55,01 \pm 6,44$
N1-09			$44,04 \pm 7,69$	
N2	Ungehemmt		$32,75 \pm 6,20$	
B-NA			$39,18 \pm 7,70$	

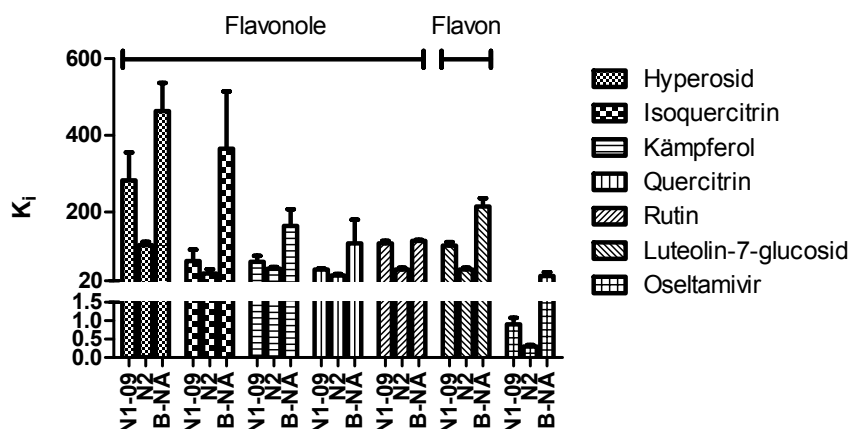


Abbildung 24. Übersicht der  $K_i$ -Werte der Neuraminidasen N1-09, N2 und B-NA von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und Influenza B-Viren. Messungen in Duplikaten, Substanzen  $n = 3$ , ungehemmt  $n = 7$ ,  $K_i$ -Werte in  $\mu\text{M}$ . Die enzymkinetischen Messungen der Neuraminidaseaktivität erfolgten fluorimetrisch mit MUNANA als Substrat auf Grundlage der Methode von Potier [130], adaptiert von Rameix-Welti et al. [104]. Das Substrat wurde seriell verdünnt und zu gleichen Mengen Virus und Inhibitor hinzugeben (vgl. 3.5).

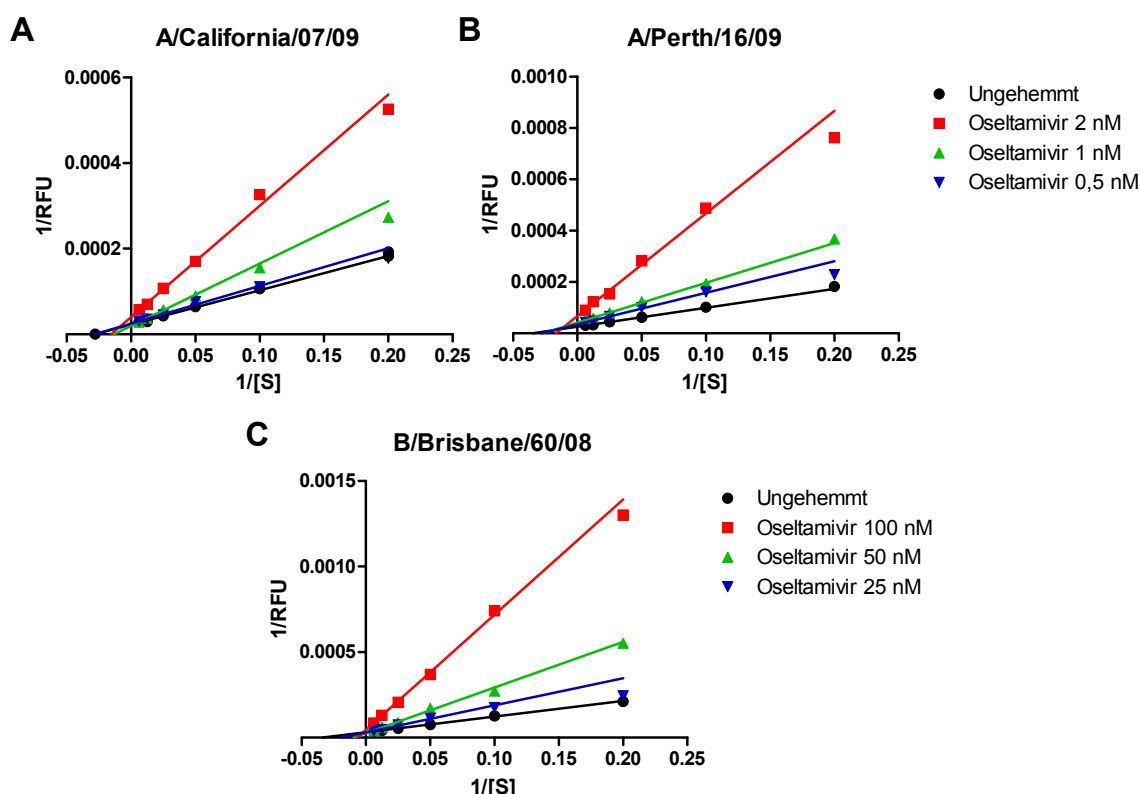


Abbildung 25. Doppeltreziproke Darstellung (Lineweaver-Burk) der Enzymkinetik von Osetamivir mit der Neuraminidase von (A) A(H1N1)pdm09, (B) A(H3N2) und (C) FluB. Die enzymkinetischen Messungen der Neuraminidaseaktivität erfolgten fluorimetrisch mit dem Substrat MUNANA auf Grundlage der Methode von Potier [130], adaptiert von Rameix-Welti et al. [104].

Die aus den Messungen der Enzymkinetik berechenbaren  $K_m$ - und  $K_i$ -Werte können Auskunft

über Bindungsart (kompetitiv, unkompetitiv, nicht kompetitiv), Bindungsaffinität und Bindungsstärke liefern (vgl. 3.5). Aus Übersichtsgründen wurden die  $K_m$ -Werte der Neuraminidase tabellarisch, die  $K_i$ -Werte als Abbildung dargestellt.

Innerhalb der Flavonoide wies N2 die höchsten und N1-09 die niedrigsten  $K_m$ -Werte auf (Tab. 16). Die  $K_m$ -Werte von B-NA lagen in der Regel bei allen Flavonoiden zwischen denen von N1-09 und N2. Anders verhielt es sich mit den  $K_m$ -Werten bei Oseltamivir. Hier waren die von N2 am niedrigsten ( $53,62 \mu\text{M}$ ;  $48,27 \mu\text{M}$  und  $30,74 \mu\text{M}$ ) gefolgt von den Werten von N1-09 ( $76,64 \mu\text{M}$ ;  $62,74 \mu\text{M}$  und  $37,20 \mu\text{M}$ ). Die höchsten Werte wies B-NA auf ( $153,97 \mu\text{M}$ ;  $106,50 \mu\text{M}$  und  $55,01 \mu\text{M}$ ).

Die  $K_i$ -Werte des Flavonols Hyperosid aller Neuraminidasetypen (N1-09, N2 und B-NA) lagen deutlich über  $100 \mu\text{M}$  und waren somit von allen getesteten Substanzen die höchsten. Die niedrigsten  $K_i$ -Werte wies Oseltamivir auf ( $0,9 \pm 0,18 \mu\text{M}$  für N1-09;  $0,3 \pm 0,04 \mu\text{M}$  für N2 und  $32,89 \pm 9,33 \mu\text{M}$  für B-NA) (Abb. 24).

### 4.3 Einfluss von Kämpferol auf die Neuraminidase im Hämagglutinations-Elutions-Test

Für Kämpferol wurde zusätzlich ein Hämagglutinations-Elutions-Test (s. Kap. 3.3.4) durchgeführt (Tab. 17). Damit sollte zusätzlich zum und unabhängig vom Neuraminidaseinhibitions-Assay eine neuraminidaseinhibierende Eigenschaft von Kämpferol untersucht werden. Ab Konzentrationen über  $25 \mu\text{M}$  (A(H1N1)pdm09 exemplarisch für Influenza A) bzw.  $50 \mu\text{M}$  (FluB) konnte Kämpferol die Neuraminidase in dem Ausmaß inhibieren, dass wieder eine Agglutination der Erythrozyten und damit keine Sedimentierung stattfand.

Tabelle 17. **Hämagglutinations-Elutions-Test.** Ausgewertet nach 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$ . „+“ bedeutet, dass eine Sedimentierung und damit keine Agglutination der Erythrozyten stattfand. A(H3N2) zeigte keine Agglutination mit der Meerschweinchen-Erythrozytenlösung. Osel Oseltamivir.

	A(H1N1)pdm09		FluB	
	Osel.	Kämpferol	Osel.	Kämpferol
25 $\mu\text{M}$ / 400 $\mu\text{M}$	-	-	-	-
2,5 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	-	-	-	-
250 nM / 100 $\mu\text{M}$	-	-	-	-
25 nM / 50 $\mu\text{M}$	-	-	+	+
2,5 nM / 25 $\mu\text{M}$	+	+	+	+
0,25 nM / 12,5 $\mu\text{M}$	+	+	+	+
0 nM / 0 $\mu\text{M}$	+	+	+	+
DMSO (2,5 %)	+	+	+	+

### 4.4 Einfluss des Lösungsmittels auf die Cytotoxizität von MDCK-Zellen

Da die eingesetzten Flavonoide in DMSO gelöst worden sind, wurde die Cytotoxizität von DMSO auf die im Zellkulturassay verwendeten MDCK-Zellen untersucht (vgl. 3.6). Ab einer Konzen-

tration von 3,1 % DMSO im Ansatz konnten cytotoxische Eigenschaften auf die MDCK-Zellen beobachtet werden. Die ermittelte cytotoxische Konzentration ( $CC_{50}$ ) betrug  $7,8\% \pm 0,5\%$  ( $n = 3$ ).

Die durch die Flavonoidansätze eingebrachte DMSO-Konzentration lag in allen Versuchen weit unter 3,1 % und hatte damit keinen cytotoxischen Einfluss auf die MDCK-Zellen.

#### 4.5 Einfluss der Flavonoide auf die Cytotoxizität von MDCK-Zellen

Um einen cytotoxischen Einfluss der im Zellkulturassay verwendeten Flavonoide auszuschließen, wurde deren Cytotoxizität 50 im MTT-Test ermittelt (vgl. 3.6). Lediglich Kämpferol zeigte cytotoxische Eigenschaften innerhalb der getesteten Konzentrationen. Die  $CC_{50}$  lag im Mittel bei  $581 \mu\text{M}$  (Tab. 18).

Tabelle 18. **Einfluss der Flavonoide auf die Cytotoxizität im MTT-Test nach Mosmann mit MDCK-Zellen und der Selektivitätsindex (SI).** Zelluläre Succinat-Dehydrogenasen sowie NADH und NADPH reduzieren Tetrazolium zu Formazan. Als Resultat wird ein Farbumschlag von gelb nach rot sichtbar, der bei 570 nm colorimetrisch gemessen wird. CC Cytotoxische Konzentration.  $SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$ .

Flavonoid	$CC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	A(H1N1)pdm09 SI	A(H3N2) SI	FluB SI
Hyperosid	> 431	> 6,9	> 5,0	> 4,9
Isoquercitrin	> 431	> 1,2	> 0,9	> 1,1
Kämpferol	$581,29 \pm 99,98$	6,8	13,8	6,4
Luteolin-7-glucosid	> 446	> 6,7	> 8,7	> 7,8
Quercitrin	> 446	> 4,1	> 3,7	> 4,0
Rutin	> 328	> 3,4	> 3,4	> 3,1
Oseltamivir	> 100 <sup>†</sup>	> 38.910	> 71.942	> 2.203

<sup>†</sup> Zum Vergleich die  $CC_{50}$  von Oseltamivir aus [148]

#### 4.6 Plaque-Reduktions-Test

Nachdem im Neuraminidase-Inhibitions-Assay für manche Substanzen eine neuraminidaseinhibierende Aktivität beobachtet und für die verwendeten Konzentrationen eine Cytotoxizität ausgeschlossen werden konnte, wurde der Einfluss der Flavonoide auf die Plaquebildung und -größe untersucht (vgl. 3.3.6). Damit sollte getestet werden, inwieweit die Infektiösität und Verbreitung der Influenzaviren durch die untersuchten Substanzen beeinflusst wird. Als Referenzdiente Oseltamivir (Abb. 26).

Ab einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  Oseltamivir wurden weder bei A(H1N1)pdm09, noch bei A(H3N2) oder FluB Plaques gefunden. Die Plaquegröße war dagegen schon bei Konzentrationen ab  $1,6 \mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert.

Weder bei Hyperosid noch bei Isoquercitrin konnte eine konzentrationsabhängige Veränderung in der Anzahl oder Größe der Plaques festgestellt werden (Abb. 27). Dies betraf alle drei unter-



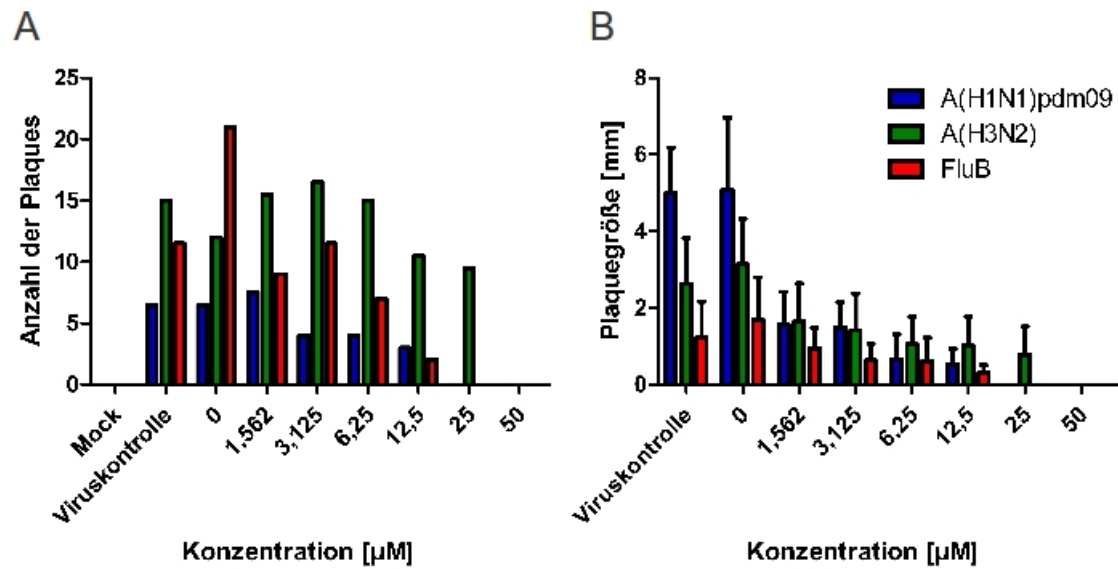


Abbildung 26. Einfluss von Oseltamivir auf die Plaquebildung (A) und -größe (B). MDCK-Zellen wurden unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Oseltamivir mit A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB infiziert (MOI 0,01). Nach Fixierung und Färbung durch Kristallviolett erfolgte die Auszählung und Vermessung der Plaques.

suchten Virusstämme.

Ebenso zeigten Luteolin-7-glucosid (Abb. 28 A) und Quercitrin (Abb. 28 B) keinen Einfluss auf die virale Aktivität von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB in MDCK-Zellen; weder die Anzahl der Plaques noch deren Größe zeigten Unterschiede zur Kontrolle.

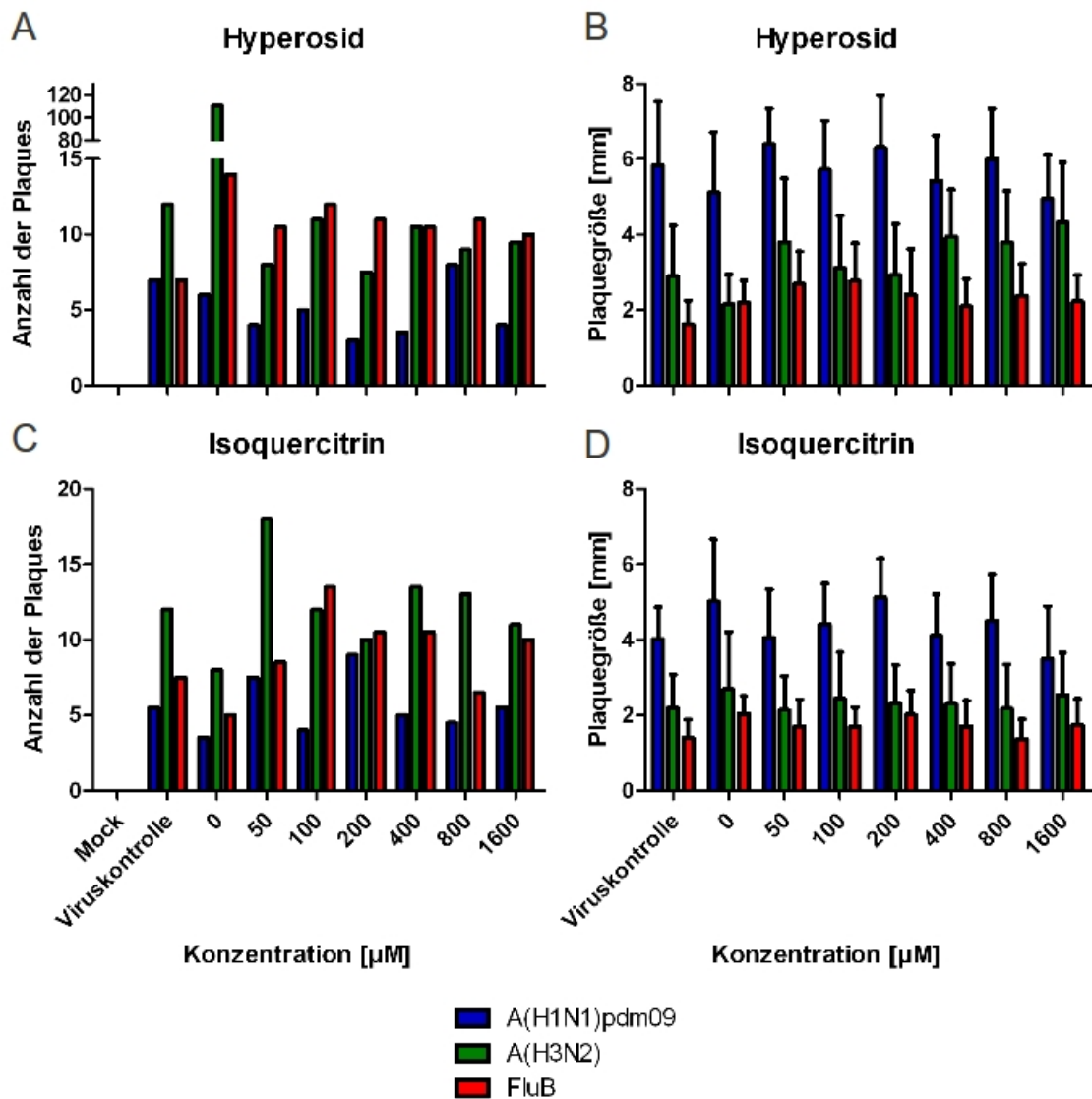


Abbildung 27. Einfluss von Hyperosid (A & B) und Isoquercitrin (C & D) auf die Plaquebildung (A & C) und -größe (B & D). MDCK-Zellen wurden unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Hyperosid bzw. Isoquercitrin mit A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB infiziert (MOI 0,01). Nach Fixierung und Färbung durch Kristallviolett erfolgte die Auszählung und Vermessung der Plaques.

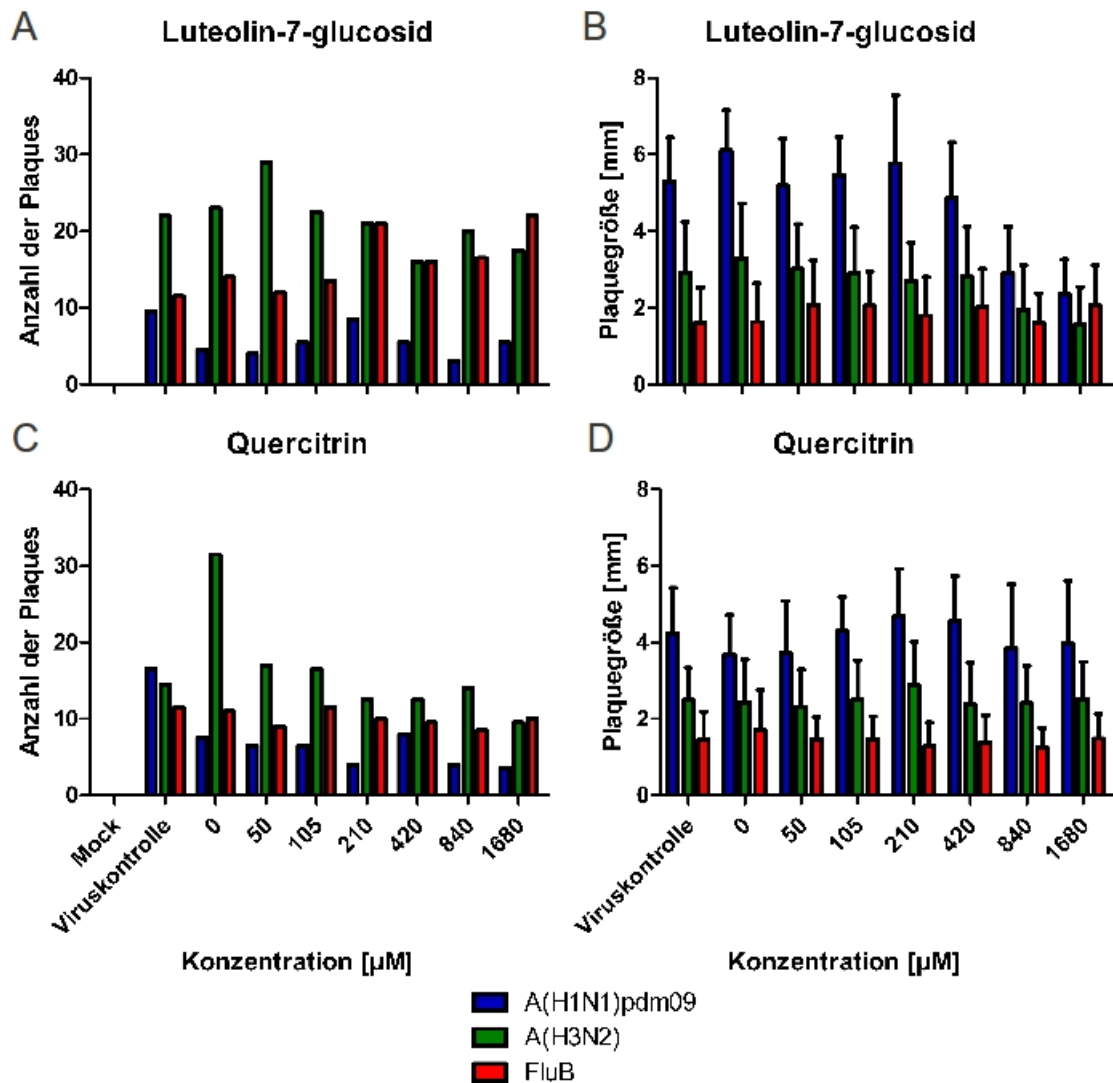


Abbildung 28. Einfluss von Luteolin-7-glucosid (A & B) und Quercitrin (C & D) auf die Plaquebildung (A & C) und -größe (B & D). MDCK-Zellen wurden unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Luteolin-7-glucosid bzw. Quercitrin mit A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB infiziert (MOI 0,01). Nach Fixierung und Färbung durch Kristallviolett erfolgte die Auszählung und Vermessung der Plaques.

Anders verhielt es sich mit Kämpferol. Ab einer Konzentration von über  $160\ \mu\text{M}$  traten keine Plaques in den mit A(H1N1)pdm09 und FluB infizierten Zellen mehr auf, bei Konzentrationen größer als  $320\ \mu\text{M}$  auch nicht mehr in mit A(H3N2) infizierten Zellen (Abb. 29 A). Die Plaquesgrößen blieben bis zum Nichtmehrauftreten der Plaques dagegen bei allen Virusstämmen gleich.

Rutin ließ ebensowenig einen Effekt auf die Bildung wie auf die Größe der Plaques erkennen (Abb. 29 B). Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den einzelnen Virusstämmen.

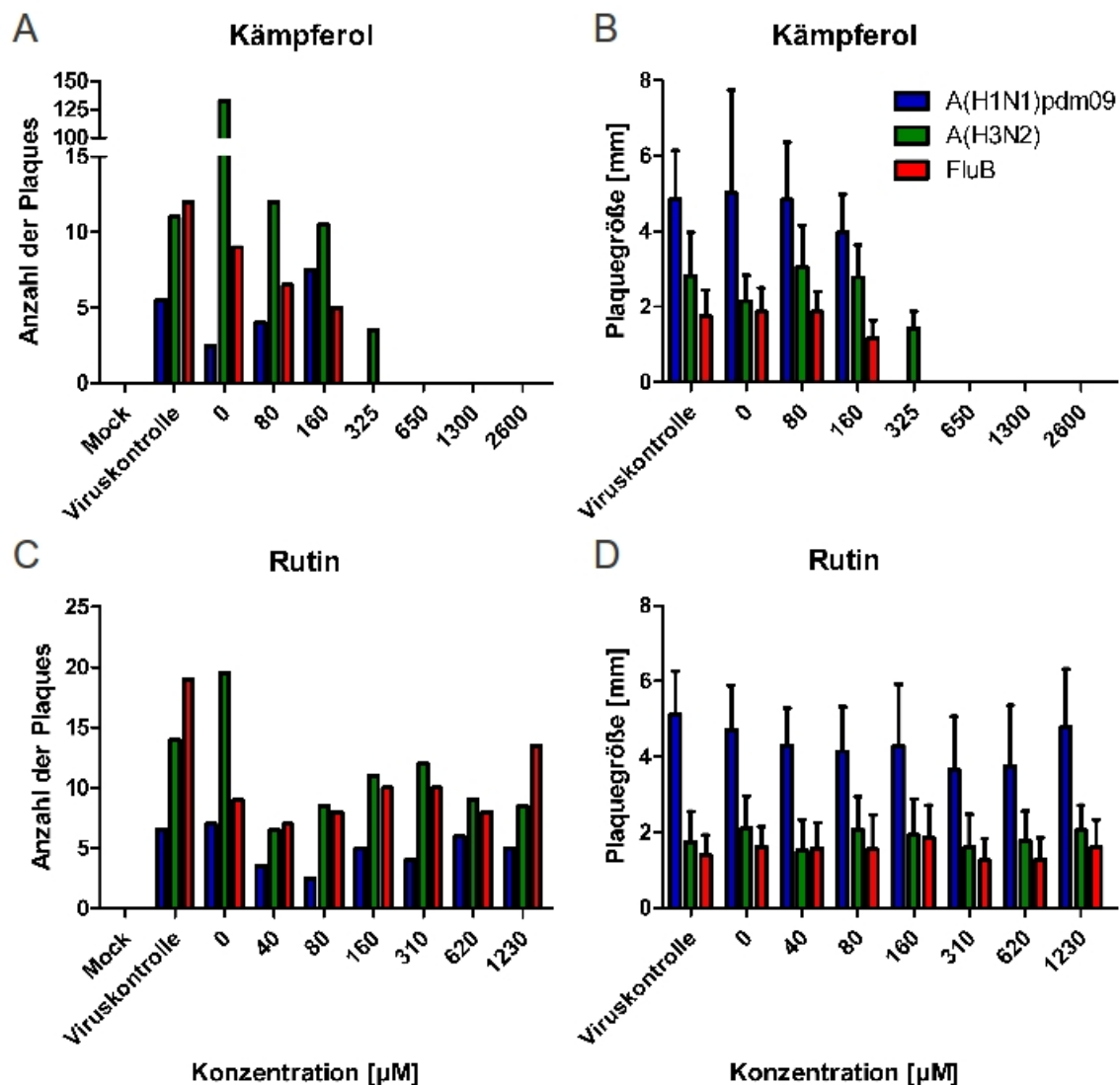


Abbildung 29. Einfluss von Kämpferol (A & B) und Rutin (C & D) auf die Plaquebildung (A & C) und -größe (B & D). MDCK-Zellen wurden unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Kämpferol bzw. Rutin mit A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB infiziert (MOI 0,01). Nach Fixierung und Färbung durch Kristallviolett erfolgte die Auszählung und Vermessung der Plaques.

#### 4.7 Einfluss von Oseltamivir auf die Infektion und die Virusvermehrung

Mit der Betrachtung von Oseltamivir und der Flavonoide im Plaque-Reduktions-Test wurde ein statisches Bild gewonnen, da es sich um eine Endpunktbestimmung nach 72 Stunden handelte. Im nächsten Schritt sollte daher beurteilt werden, wie die jeweiligen Substanzen auf die Virusvermehrung wirken (vgl. 3.3.2).

Ab einer Konzentration von  $0,05 \mu\text{M}$  Oseltamivir konnte man eine leichte Reduzierung der Anzahl der PFU/ml erkennen (Abb. 30 B).  $0,5 \mu\text{M}$  Oseltamivir reduzierte die Viruskonzentration um  $10^1$  auf  $10^7$  PFU/ml bereits deutlich, und ab Konzentrationen von  $5 \mu\text{M}$  war keine Virusvermehrung mehr zu erkennen (Abb. 30 A und B). Ebenso reduzierte sich der HA-Titer von initial 32 (0 und  $0,005 \mu\text{M}$  Oseltamivir) auf 2 ( $50 \mu\text{M}$  Oseltamivir).

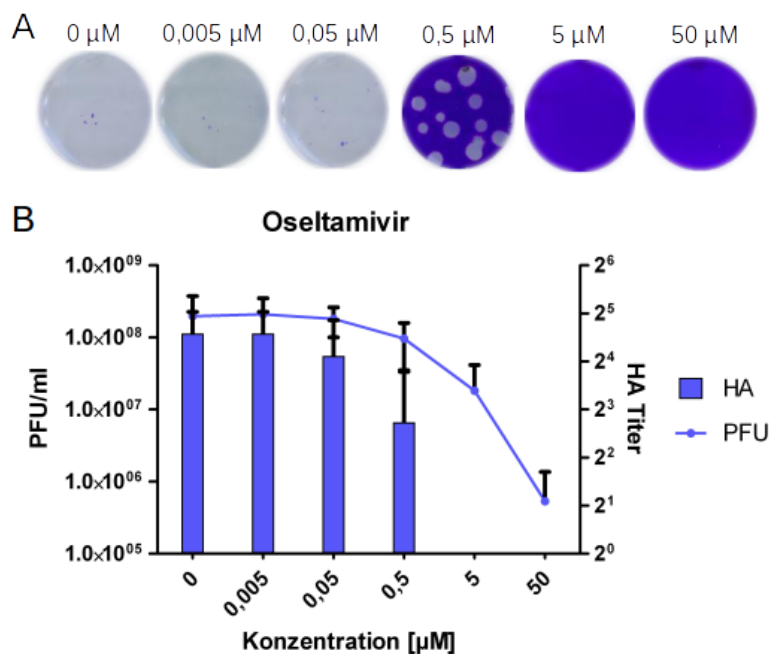


Abbildung 30. **Einfluss von Oseltamivir auf die Virusvermehrung von A(H1N1)pdm09.** Oseltamivir in den verschiedenen Konzentrationen wurde mit A(H1N1)pdm09 für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden MDCK-Zellen mit dem Inoculum aus Oseltamivir und A(H1N1)pdm09 infiziert (MOI 0,01) und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. 3.3.2). Mit Hilfe von Plaque-Tests auf MDCK-Zellen (A) wurde der Virustiter (B) bestimmt (vgl. 3.3.5). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.8 Einfluss der Flavonoide auf die Infektion und die Virusvermehrung

Die Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Rutin zeigten keinen Einfluss auf die Virusvermehrung (Abb. 31 A, B, E und F). Bei keinem der drei Virusstämme kam es zu einer Reduzierung der Anzahl der PFU/ml durch eine der Substanzen. Luteolin-7-glucosid vermochte die Vermehrung von A(H1N1)pdm09 ab  $223 \mu\text{M}$  bzw. von A(H3N2) ab  $1115 \mu\text{M}$  geringfügig zu reduzieren; die Vermehrung von FluB blieb unbeeinflusst (Abb. 31 D).

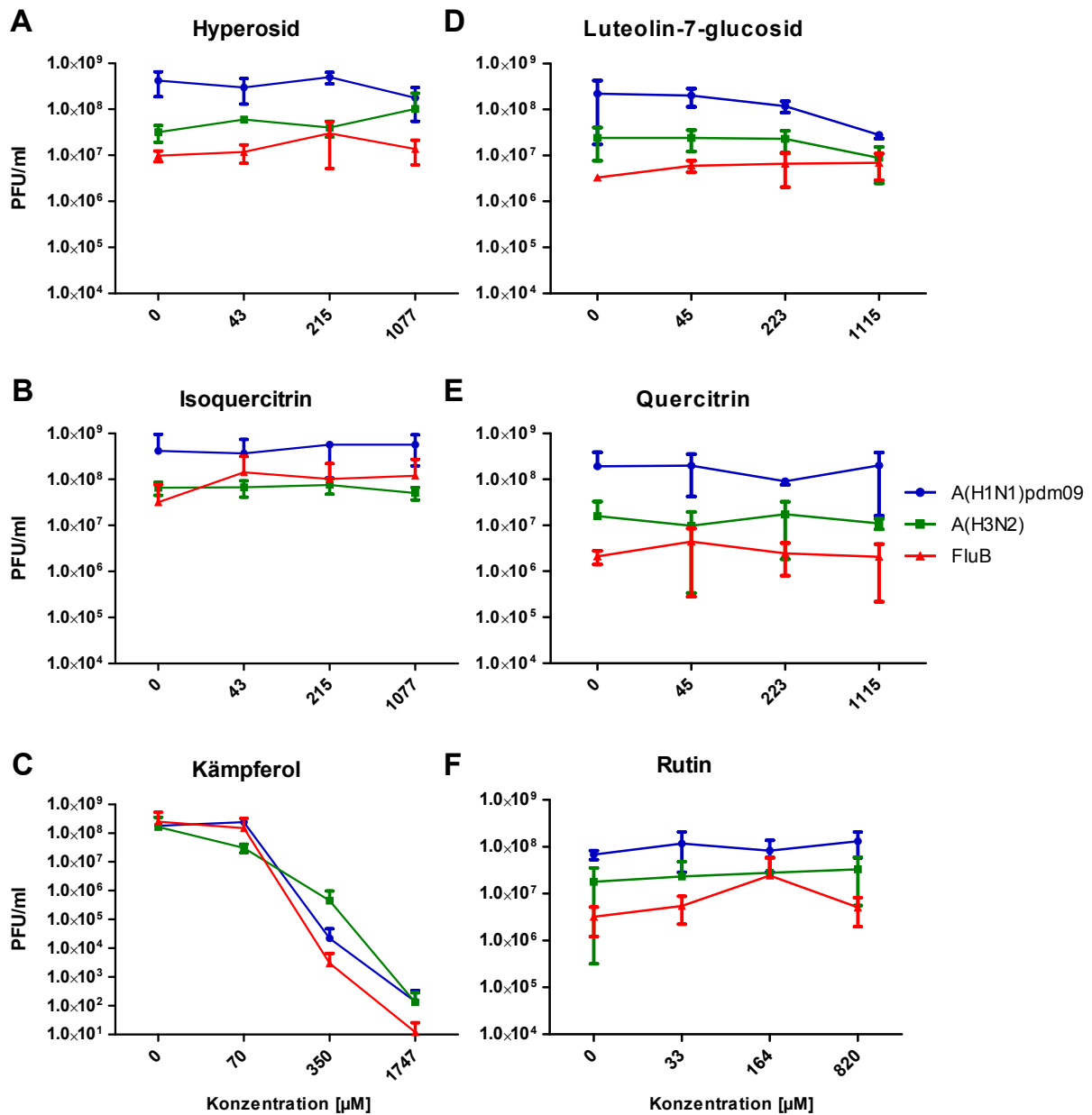


Abbildung 31. Einfluss der Flavonoide Hyperosid (A), Isoquercitrin (B), Kämpferol (C), Luteolin-7-glucosid (D), Quercitrin (E) und Rutin (F) auf die Virusvermehrung von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB in MDCK-Zellen. Die Flavonoide in den verschiedenen Konzentrationen wurden mit A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die MDCK-Zellen mit dem Inoculum aus Flavonoid und Virus infiziert (MOI 0,01) und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. 3.3.2). Mittels Plaquetests auf MDCK-Zellen wurde der Virustiter bestimmt (vgl. 3.3.5). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu zeigten Konzentrationen ab  $70 \mu\text{M}$  Kämpferol einen deutlichen Effekt auf die Vermehrung aller drei Virusstämme. Die Viruskonzentration sank von  $10^8/\text{ml}$  auf  $10^2/\text{ml}$  (bei A(H1N1)pdm09 und A(H3N2)) bzw. auf  $10^1/\text{ml}$  bei FluB unter  $1750 \mu\text{M}$  Kämpferol (Abb. 31 C) nach 72 Stunden. Die getesteten Höchstkonzentrationen von Kämpferol lagen damit bereits im cytotoxischen Bereich (vgl. Tab. 18).

#### 4.9 Molekulares Modell zur Bindungsberechnung

Um eine Vorstellung der Interaktion von Oseltamivir und den Flavonoiden mit der Neuraminidase zu bekommen, wurden beruhend auf den enzymkinetischen Messungen in Kooperation mit der AG Wolber am Institut für Pharmazie - Pharmazeutische Chemie - der Freien Universität Berlin computerbasierte Bindungsstudien erstellt (vgl. 4.2).

Zunächst wurde die Einbettung von Oseltamivir im aktiven Zentrum der Neuraminidase von A(H1N1)pdm09 simuliert (Abb. 32 A), um dann Interaktionen von Seitenketten der Neuraminidase mit Oseltamivir genauer betrachten zu können (Abb. 32 B und C).

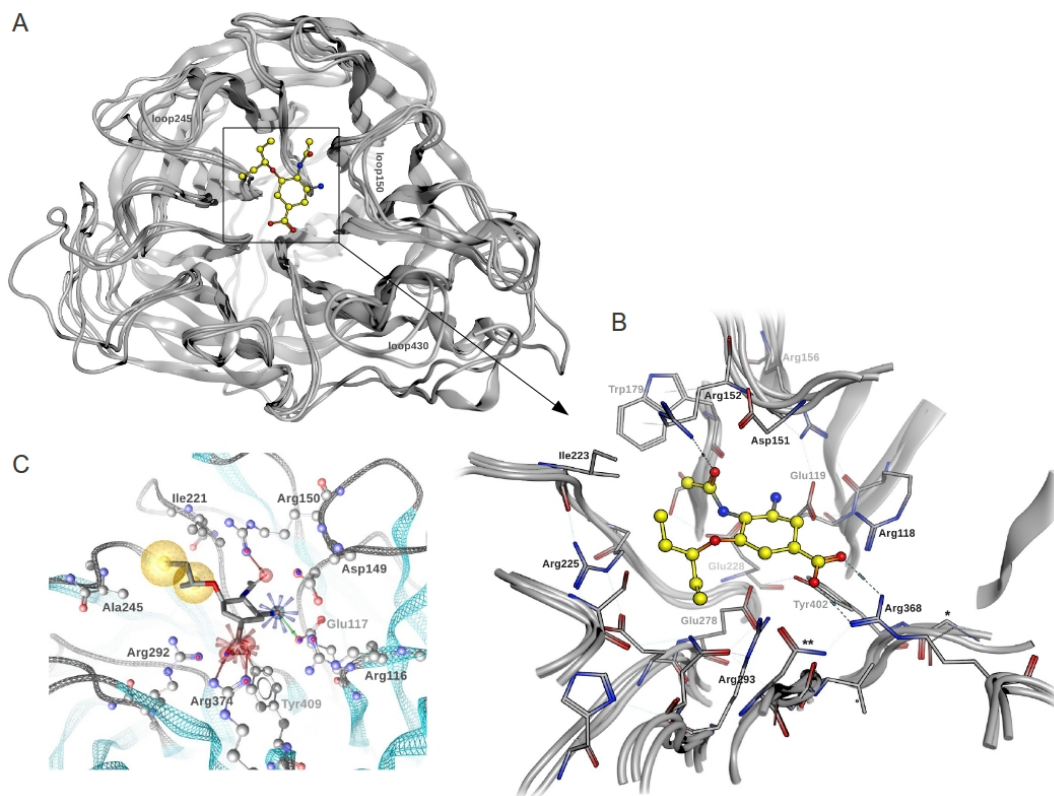


Abbildung 32. (A) Berechnete 3D Struktur der Neuraminidase mit einem Oseltamivir-Molekül im aktiven Zentrum. (B) Angenommene Interaktionen zwischen Oseltamivir und den Seitenketten der Neuraminidase von A(H1N1)pdm09. (C) Bindung und Interaktion von Oseltamivircarboxylat (grau) im aktiven Zentrum der Neuraminidase von A(H1N1)pdm09. Unterschiede zwischen den Neuraminidasen der Virussubtypen sind mit Sternchen gekennzeichnet: \* Gly401/405 bei A(H1N1)pdm09 und A(H3N2), Trp408 bei FluB; \*\* Asn344 bei A(H1N1)pdm09, His347 bei A(H3N2) und Gly346 bei FluB. Aus [135].

Während sich zwischen den Aminosäuren Glu117, Arg150, Arg374 und Tyr409 und Oseltamivir Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (durch rote bzw. grüne Pfeile in Abb. 32 C gekennzeichnet), kommt es zu hydrophoben Interaktionen zwischen Oseltamivir und den Aminosäuren Ile221 und Ala245 (dargestellt als gelbe Kreise). Ionische Bindungen sowohl zwischen der Carboxylgruppe des Oseltamivirs und Arg292 als auch der Ammoniumgruppe des Oseltamivirs und Asp149 tragen zur Stabilisierung des Moleküls im aktiven Zentrum der Neuraminidase bei.

Die simulierten Bindungen von Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin im aktiven Zentrum der Neuraminidase sind in Abb. 33 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind ihre Strukturen in unterschiedlichen Farben übereinander gelegt.

Anders als bei Oseltamivir, das dem natürlichen Liganden Sialinsäure nachempfunden ist, bindet aus sterischen Gründen nicht das gesamte Flavonoid im aktiven Zentrum der Neuraminidase, sondern nur dessen Zuckerrest. Allein in ihm unterscheiden sich auch nur die drei Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin. Er ragt einem Anker gleich ins aktive Zentrum. Die zahlreichen Hydroxylgruppen bilden mit den Aminosäuren Asp149, Arg150, Arg292, Glu276 und Tyr409 Wasserstoffbrücken und stabilisieren damit diesen Teil des Moleküls in der Tasche der Neuraminidase (Abb. 33 A). Da Hyperosid und Isoquercitrin lediglich im Zuckerrest differieren, jedoch eine größere Differenz in der  $IC_{50}$  aufweisen (vgl. 4.1.5), wurde deren Interaktionen in Abb. 33 B eingehender betrachtet. Während die eine Hydroxylgruppe von Hyperosid vier Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann (Glu276, Arg292 und Tyr409), vermag die Hydroxylgruppe von Isoquercitrin nur eine solche mit Glu276 zu bilden.

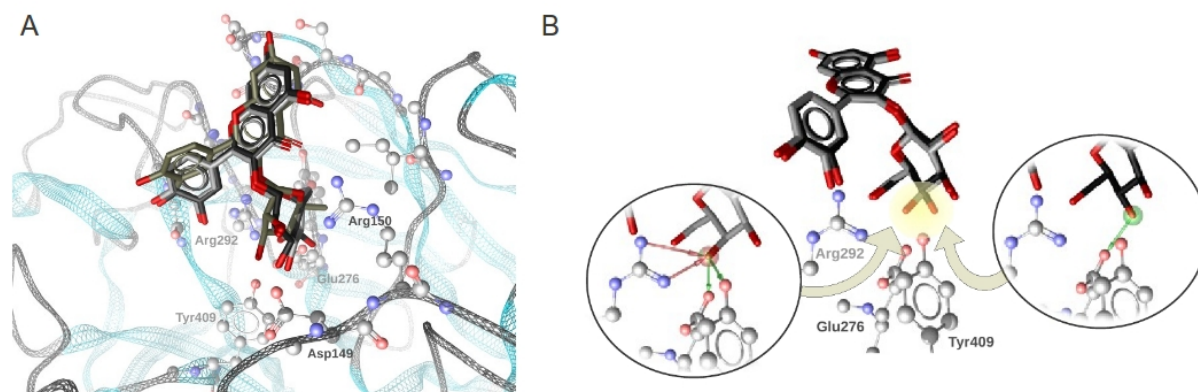


Abbildung 33. (A) Berechnete Bindung von Hyperosid (grau), Isoquercitrin (schwarz) und Quercitrin (braun) an das aktive Zentrum der Neuraminidase. (B) Vergleich zwischen den Bindungen durch Hyperosid (grau) und Isoquercitrin (schwarz) an das aktive Zentrum der Neuraminidase von A(H1N1)pdm09. Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxylgruppen der Flavonoide und Aminosäuren des Enzyms sind grün (Donator) oder rot (Akzeptor) dargestellt. Aus [135].

Auch wenn die Strukturen und damit die Bindungen und Interaktionen von Luteolin-7-glucosid und Rutin sich von denen von Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin deutlicher unterscheiden, so gilt auch bei diesen beiden Molekülen eine Bindung des Zuckerrests im aktiven Zentrum der Neuraminidase als wahrscheinlich (Abb. 34 B und C). Auch hier tragen die Wasserstoffbrücken



zwischen den Hydroxylgruppen der beiden Flavonoide mit den Aminosäuren Arg116, Glu117, Arg150, Glu276, Arg292 und Tyr409 im aktiven Zentrum der Neuraminidase zur Stabilisierung bei. Bei Kämpferol führt neben den Wasserstoffbrücken zusätzlich eine  $\pi - \pi$  Bindung mit Arg292 der Neuraminidase im aktiven Zentrum zu einer Festigung der Interaktion beider Moleküle.

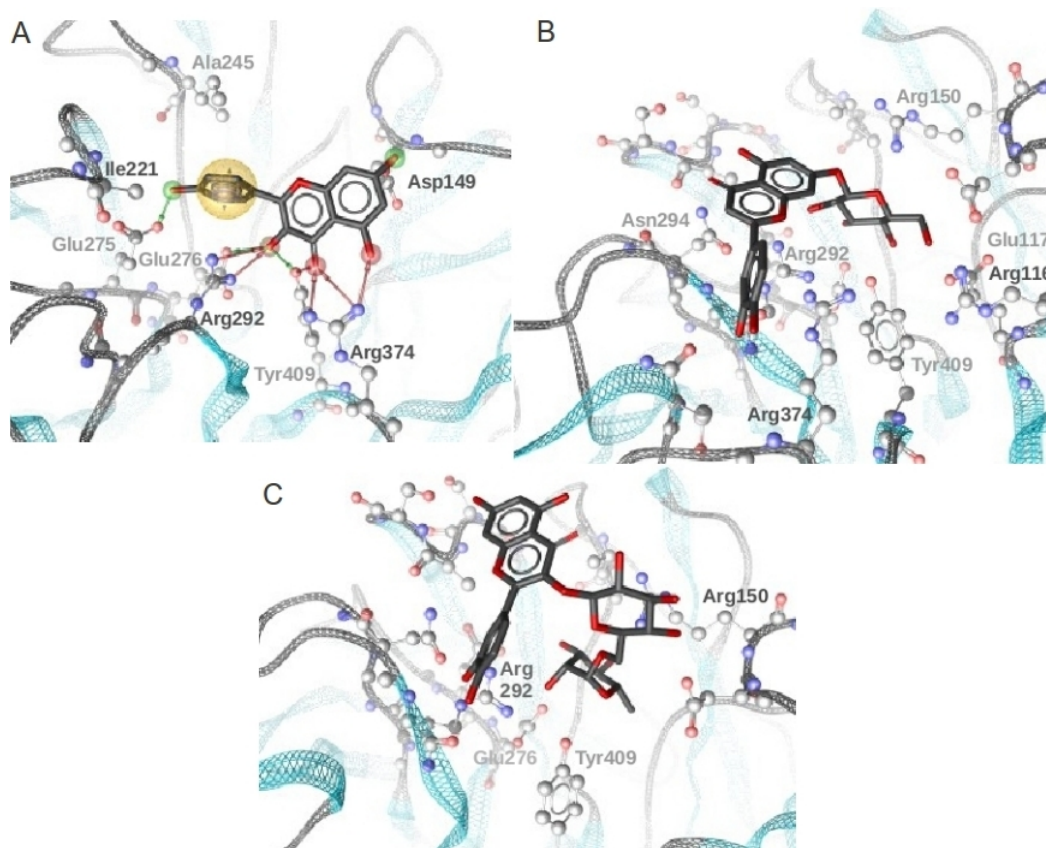


Abbildung 34. Berechnete Bindung von Kämpferol (A), Luteolin-7-glucosid (B) und Rutin (C) im aktiven Zentrum der Neuraminidase. Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxylgruppen der Flavonoide und Aminosäuren des Enzyms sind grün (Donator) oder rot (Akzeptor) dargestellt. Aus [135].

Insgesamt zeigt sich, dass von allen Flavonoiden der Zuckerrest im aktiven Zentrum zu binden scheint und vor allem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den diversen Hydroxylgruppen und Aminosäuren zu einer Stabilisierung der Molekülinteraktion beitragen.

#### 4.10 Peptide und deren potentiellen Bindungsstellen am Hämagglutinin

Neben der viralen Neuraminidase müssen auch andere Zielstrukturen als Ansatz zur Virusinhibierung in den Fokus gerückt werden. Ein vielversprechender Angriffspunkt scheint dabei die fusiogene Domäne im HA-Protein zu sein. Kann diese Struktur besetzt werden, wird die Fusion von Virus- und Wirtsmembran und damit das Einbringen des viralen Genoms in die Wirtszelle blockiert. Eine Infektion kann nicht stattfinden.

Vor diesem Hintergrund wurden von GenScript drei der Fusionssequenz homologe Peptide syn-

thetisiert, die in die taschenartige Struktur des Fusionspeptids HA binden und somit eine Konformationsänderung und Aktivierung desselben verhindern sollen (vgl. 1.4).

Die durch das Programm PEP angefertigten 3D Strukturen der Peptide #1, #7 und #10 wurden mittels des ClusPro.2.0 Servers sowohl an das maturierte (gespaltene) als auch unreife (ungespaltene) HA gedockt. Der CMA Server ermittelte Interaktionen zwischen den Peptiden und den errechneten Bindungsstellen.

Für Peptid #1 (Abb. 35 A) wird eine Bindung im Bereich der B-Loop von HA<sub>2</sub> angenommen (Abb. 35 B), während es im ungespaltene Hämagglutinin in der globulären Domäne bindet (Abb. 35 C). Interaktionen sind sowohl zwischen der A-Kette (HA<sub>1</sub>) als auch der B-Kette des HA zu beobachten.

Trotz geringer Sequenzunterschiede zwischen Peptid #1 und #7 zeigt sich eine andere Tertiärstruktur (Abb. 36 A) und damit auch eine andere Bindedomäne am maturierten HA. Diese liegt in der Stielregion zwischen dem Fusionspeptid und der Oberflächenmembran des Virus (Abb. 36 B). Peptid #7 bildet sowohl Bindungen zur A-Kette als auch zur B-Kette. Die Bindung am Precursor-HA fällt etwas anders aus, bleibt aber im Bereich der globulären Domäne (Abb. 36 C).

Ähnlich Peptid #1 scheint Peptid #10 (Abb. 37 A) am gespaltenen HA in der Nähe der B-Loop zu binden (Abb. 37 B). Die Region des Andockens am ungespaltenen HA ist wie bei Peptid #1 und #7 der Kopf des Hämagglutinins.

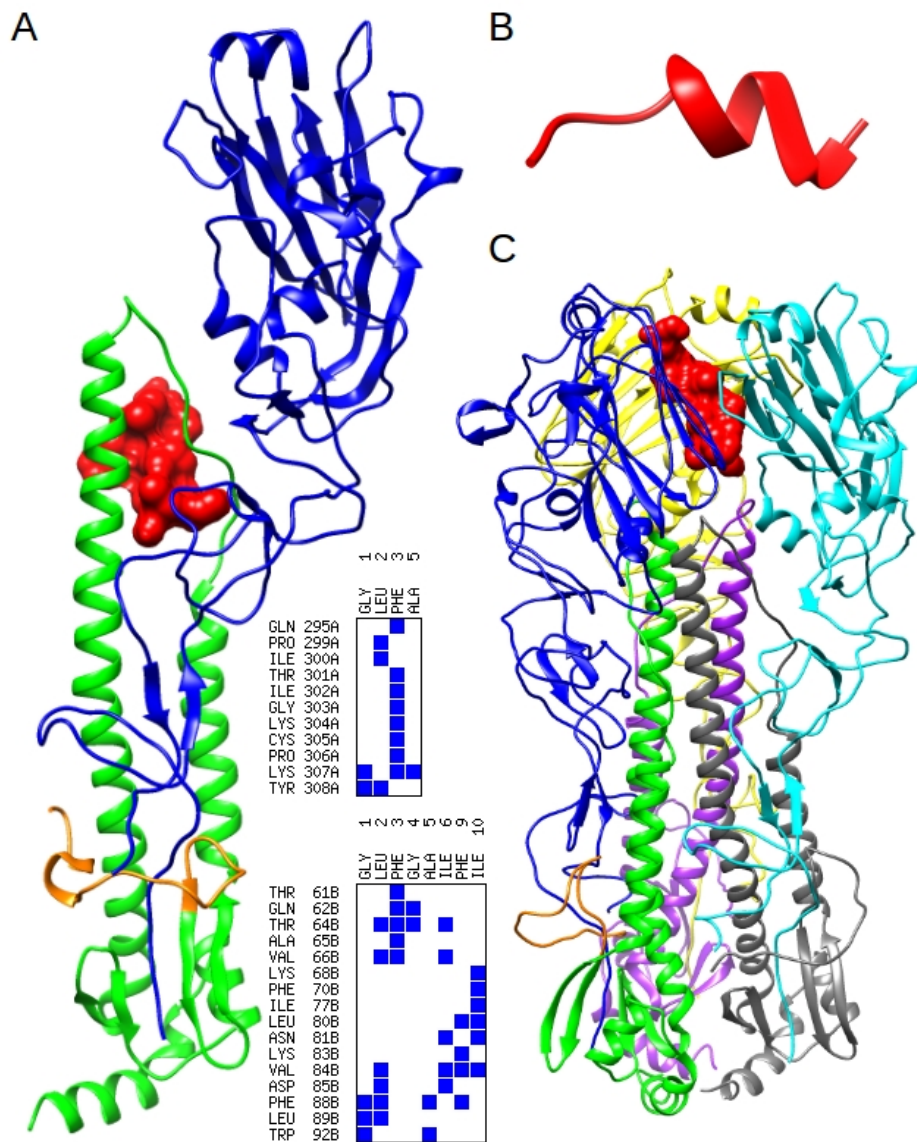


Abbildung 35. **A** Bindung von Peptid #1 im Bereich der B-Loop vom maturierten HA. **B** Modellierter Sekundärstruktur von Peptid #1. In Tabellenform sind als blaue Quadrate Bindungen zwischen Aminosäuren des Peptids (Zeile oben) und des Hämagglutinins (erste Spalte links) dargestellt. Dabei spiegelt die obere Tabelle Interaktionen der Kette A und die untere der Kette B des HA wieder. **C** Bindung von Peptid #1 an das ungespaltene HA in der globulären Domäne. Der Übersicht halber sind in A nur die Ketten A und B des Trimers dargestellt. Kette A blau, Kette B grün, Kette C cyan, Kette D grau, Kette E gelb, Kette F violett, Peptid #1 rot, fusiogene Region (N-Terminus) der Kette B orange.

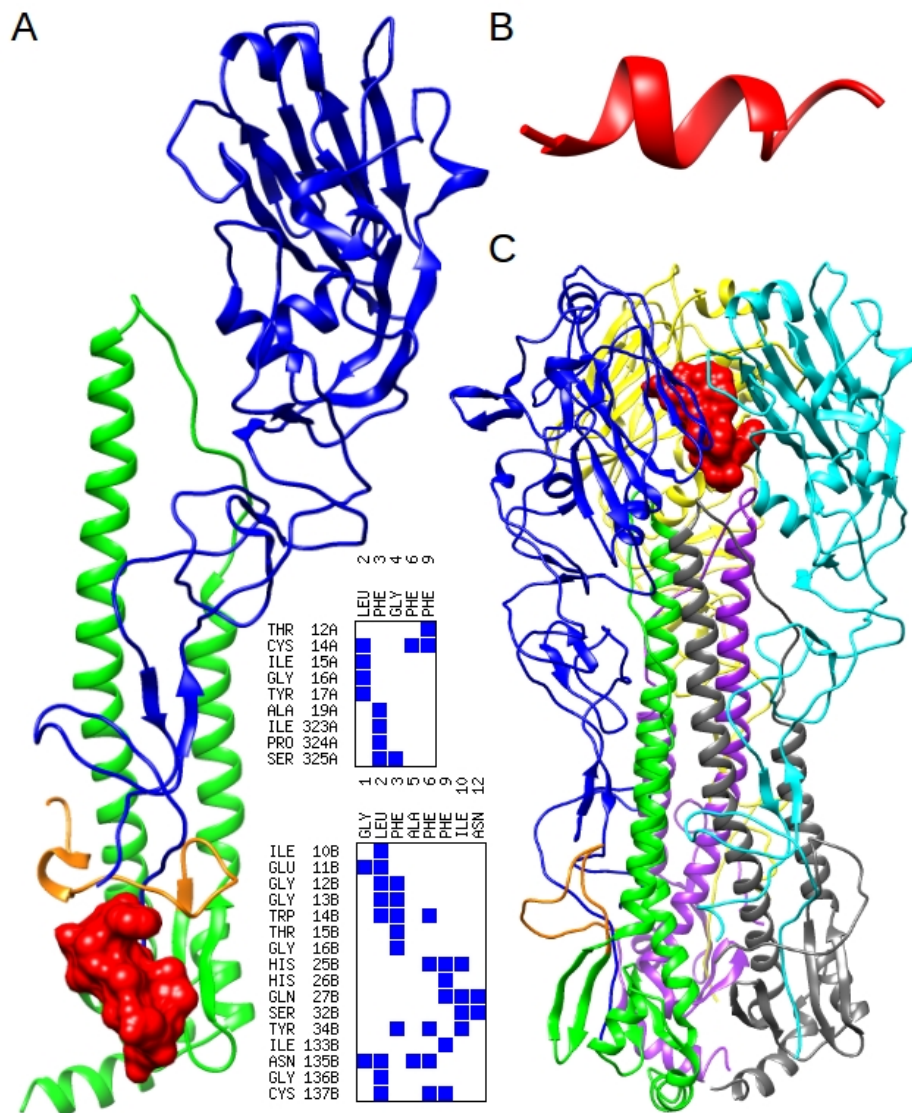


Abbildung 36. **A** Bindung von Peptid #7 im Bereich der membran-nahen Stielregion vom maturierten HA. **B** Modellierter Sekundärstruktur von Peptid #7. In Tabellenform sind als blaue Quadrate Bindungen zwischen Aminosäuren des Peptids (Zeile oben) und des Hämagglutinins (erste Spalte links) dargestellt. Dabei spiegelt die obere Tabelle Interaktionen der Kette A und die untere der Kette B des HA wieder. **C** Bindung von Peptid #7 an das ungespaltene HA im Bereich der globulären Domäne. Der Übersicht halber sind in A nur die Ketten A und B des Trimers dargestellt. Kette A blau, Kette B grün, Kette C cyan, Kette D grau, Kette E gelb, Kette F violett, Peptid #7 rot, fusiogene Region (N-Terminus) der Kette B orange.

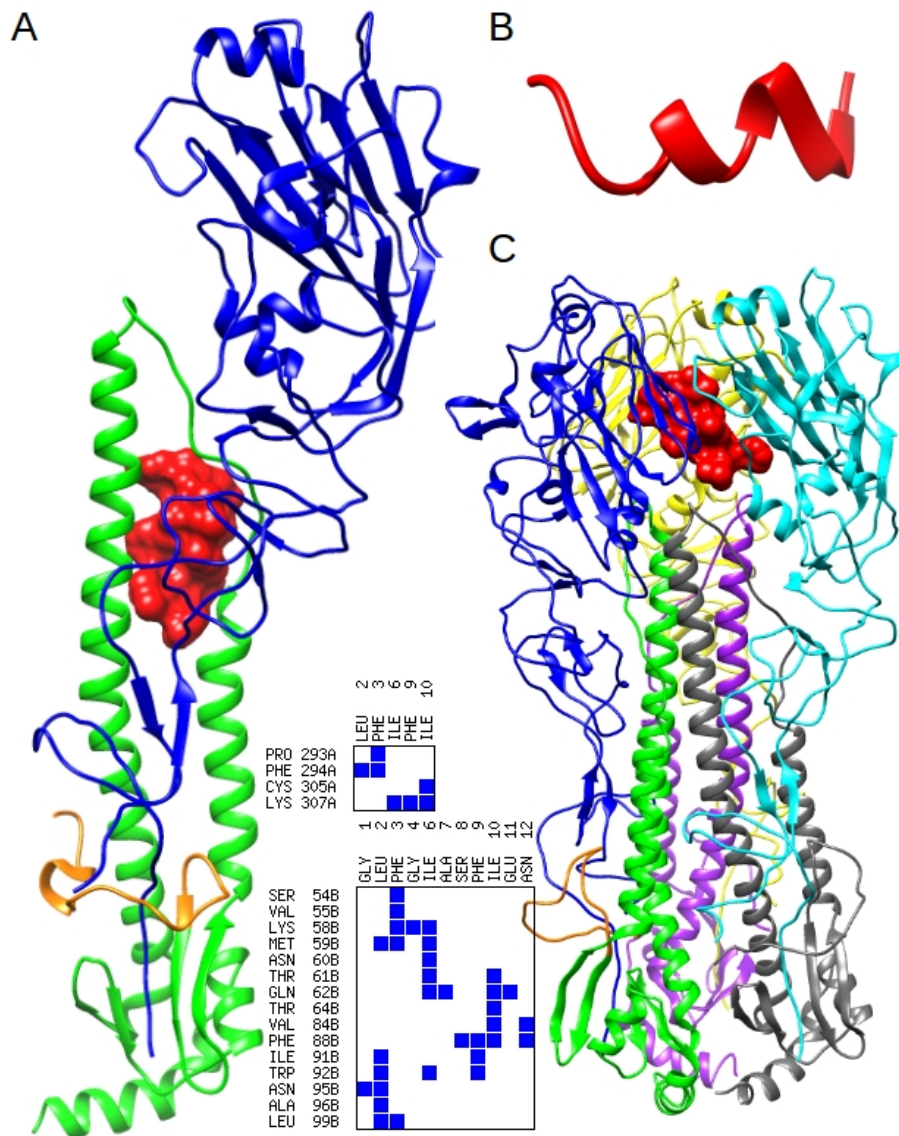


Abbildung 37. **A** Bindung von Peptid #10 im Übergangsbereich der Stiel- zur globulären Region vom maturierten HA. **B** Modellierter Sekundärstruktur von Peptid #10. In Tabellenform sind als blaue Quadrate Bindungen zwischen Aminosäuren des Peptids (Zeile oben) und des Hämagglutinins (erste Spalte links) dargestellt. Dabei spiegelt die obere Tabelle Interaktionen der Kette A und die untere der Kette B des HA wieder. **C** Bindung von Peptid #10 an das ungespaltene HA im Bereich der globulären Domäne. Der Übersicht halber sind in A nur die Ketten A und B des Trimers dargestellt. Kette A blau, Kette B grün, Kette C cyan, Kette D grau, Kette E gelb, Kette F violett, Peptid #10 rot, fusiogene Region (N-Terminus) der Kette B orange.

### 4.11 Einfluss der Peptide auf die Infektion und die Virusvermehrung

Dazu wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben, Zellen mit Viren infiziert, die zuvor mit den Peptiden in den Konzentrationen 2, 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inkubiert worden waren. Nach 72 Stunden wurde der Überstand geerntet, etwaige Zellreste abzentrifugiert und der HA- und Virus-Titer bestimmt.

Die Peptide zeigten bei keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Einfluss auf die Virusvermehrung von A(H1N1)pdm09. Weder die Viruskonzentration im Plaque-Assay noch der HA-Titer wiesen eine Reduktion bei zunehmender Peptidkonzentration auf. Das galt für alle drei getesteten Peptide #1, #7 und #10 (Abb. 38).

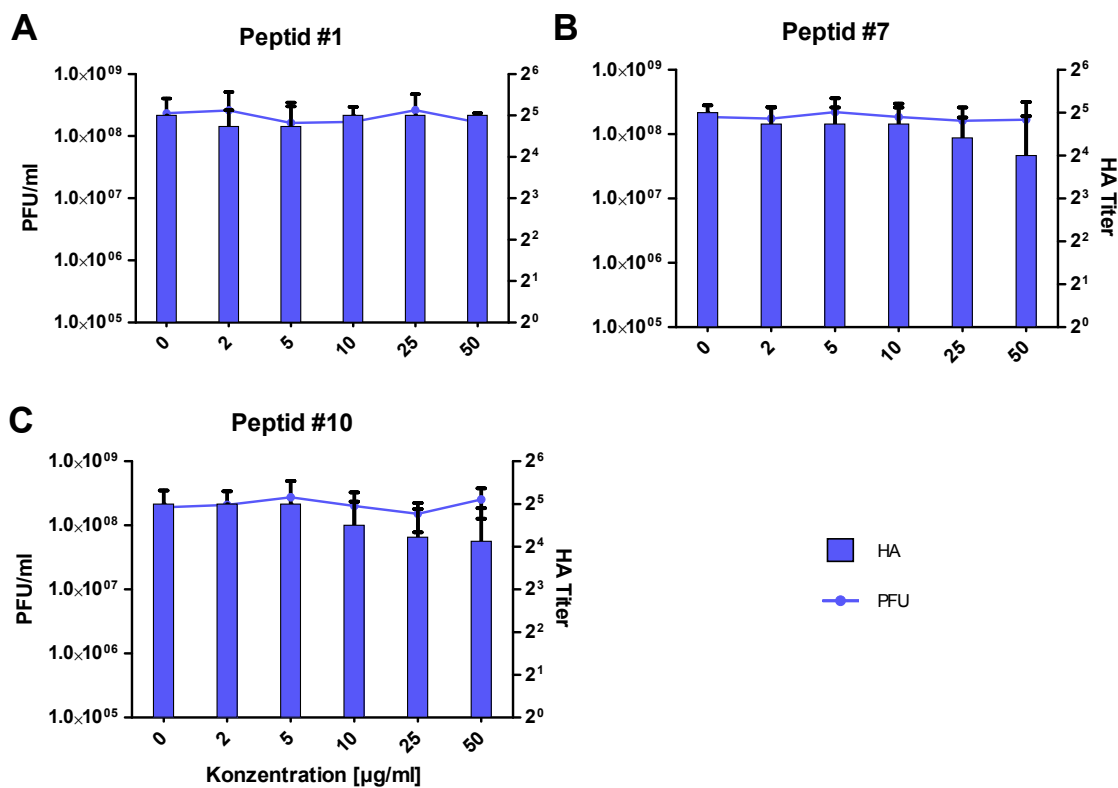


Abbildung 38. Einfluss der Peptide #1 (A), #7 (B) und #10 (C) auf die Infektion von MDCK-Zellen durch A(H1N1)pdm09 und der Virusvermehrung. Die Peptide wurden in den verschiedenen Konzentrationen mit A(H1N1)pdm09 für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden MDCK-Zellen mit dem Inoculum aus Peptiden und A(H1N1)pdm09 infiziert (MOI 0,01) und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. 3.3.2). Mittels Plaque-tests auf MDCK-Zellen wurde der Virustiter bestimmt (vgl. 3.3.5). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Naturstoffe inhibieren in unterschiedlichem Maße die Neuraminidasen

Um einen Effekt von ausgewählten Substanzen, denen in der Literatur Antiinfluenza-Eigenschaften zugeschrieben werden, ohne dass der Wirkmechanismus näher beschrieben worden ist oder die auf die bakterielle Neuraminidase inhibitorische Effekte zeigten, auf die virale Neuraminidase zu untersuchen, wurde ein Fluoreszenztest mit dem Substrat MUNANA basierend auf der Methode von Potier et al. [130] ausgewählt. Er ist seit Dezember 2012 am Nationalen Referenzzentrum für Influenza (NRZ) am RKI flexibel akkreditiert (Validierungsdaten bei Dr. Duwe, FG17) und wird dort u.a. zur Überwachung und Detektierung von Resistenzen gegenüber Oseltamivir und Zanamivir der zirkulierenden Influenzastämme eingesetzt. Im Vergleich zu colorimetrischen Analysen besitzt der MUNANA-Assay eine höhere Sensitivität und bessere Reproduzierbarkeit [149]. Barnett et al. betonte 2000 die Vorzüge des Enzymassays gegenüber den Zellkultur-Inhibierungs-Testsystem zur Untersuchung von Neuraminidaseinhibitoren [150].

Die im Neuraminidase-Inhibitions-Assay ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für Oseltamivir entsprachen mit im Mittel 2,57 nM für A(H1N1)pdm09, 1,39 nM für A(H3N2) und 45,39 nM für FluB den in anderen Arbeiten publizierten Werten [95, 151, 152, 153]. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen, die je nach Virusstamm zwischen dem halben Mittelwert (20,41 nM FluB) und fast einem ganzen Mittelwert (1,08 nM A(H3N2)) liegen. Diese Schwankungen sind dem Test geschuldet und wurden vom NRZ bestätigt [154]. Während sich die inhibitorischen Konzentrationen für A(H1N1)pdm09 und A(H3N2) im unteren einstelligen Bereich befinden, bedarf es für die Inhibierung der Neuraminidase von FluB der bis zu 33fachen Konzentration an Oseltamivir im Vergleich zu A(H1N1)pdm09 und A(H3N2). Hier machen sich die strukturellen Unterschiede im aktiven Zentrum des Enzyms zwischen den Stämmen bemerkbar, die bereits in der Vergangenheit diskutiert wurden [123, 155, 156, 157].

Für die bakterielle Neuraminidase liegen keine  $IC_{50}$ -Werte durch Oseltamivir vor, da sich das Enzym nicht durch die Substanz inhibieren läßt. In den Versuchen mit der Neuraminidase von *V. cholerae* wurde stattdessen Zanamivir eingesetzt [124].

Im Gegensatz zu den inhibitorischen Konzentrationen von Oseltamivir gegenüber den viralen Neuraminidasen, die im nanomolaren Bereichen lagen, wurden für die Inhibierung der Enzyme durch die Naturstoffe Konzentrationen im mikromolaren Bereich benötigt. Dabei ließen sich Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Virusstämmen als auch zwischen den viralen Neuraminidasen und der bakteriellen Neuraminidase von *Vibrio cholerae* feststellen. So inhibierte Apigenin die bakterielle Neuraminidase potent mit einer  $IC_{50}$  von 33  $\mu$ M, die viralen Neuraminidasen dagegen nur mäßig (170  $\mu$ M (A(H1N1)pdm09), 146  $\mu$ M (A(H3N2)) und 220  $\mu$ M (FluB)). Umgekehrt betrug die  $IC_{50}$  von Hyperosid für die Neuraminidase von *Vibrio cholerae* 143  $\mu$ M, für die viralen Neuraminidasen dagegen zwischen 62 und 88  $\mu$ M. Insgesamt zeigten die Glykoside der Flavonoide eine potentere Inhibierung der viralen Neuraminidasen. Die bakterielle Neura-

minidase wurde dagegen durch die Aglyka der Flavonoide potenter inhibiert (Abb. 39).

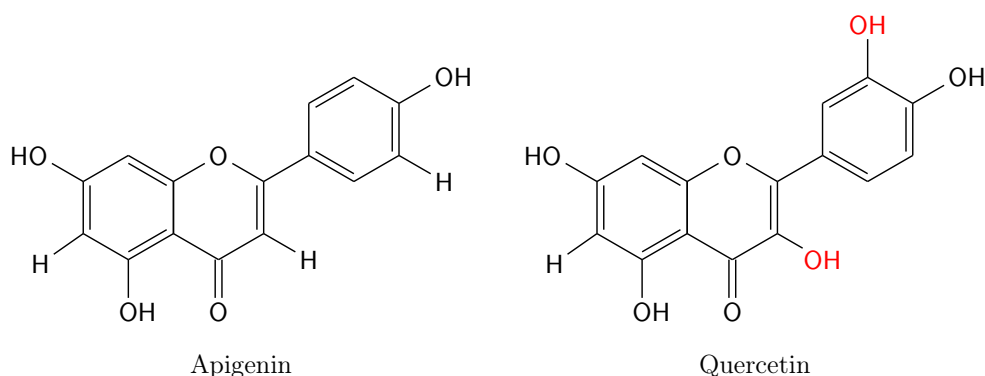


Abbildung 39. **Strukturformeln der Flavonoidaglyka Apigenin und Quercetin.** Bei Apigenin handelt es sich um ein Flavon, Quercetin zählt zu den Flavonolen. Das unterschiedliche Hydroxylierungsmuster ist in Rot dargestellt.

Das Flavonoid Kämpferol inhibierte als einzige untersuchte Substanz die bakterielle und die viralen Neuraminidasen etwa gleich potent ( $70 \mu\text{M}$  *V. cholerae*,  $85 \mu\text{M}$  A(H1N1)pdm09,  $42 \mu\text{M}$  A(H3N2) und  $90 \mu\text{M}$  FluB).

Die unterschiedlichen  $\text{IC}_{50}$ -Werte zwischen den getesteten Substanzen einerseits und zwischen den verschiedenen Neuraminidasen andererseits lassen eine unspezifische Inhibierung des Enzyms als unwahrscheinlich erscheinen. Eine, wie in der Literatur beschriebene, Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$ , das ein essentieller Cofaktor der Neuraminidase ist, durch die Flavonoide konnte ausgeschlossen werden [158] (s. 4.1.4).

Insgesamt entsprachen die ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte denen früherer Publikationen, soweit die Substanzen getestet worden sind [118, 159, 160, 161, 162, 163, 164]. Für Berberinsulfat, Cryptopine, Hyperosid, Bergenin, Ferulasäure, CAPE, Rosmarinsäure, Nordihydroguajaretsäure und Kaffeesäure konnten in der Literatur für die virale Neuraminidase keine Daten zu  $\text{IC}_{50}$ -Werten gefunden werden. Sie werden hier an dieser Stelle zum ersten Mal beschrieben. Zur neuraminidaseinhibierenden Eigenschaft der Chlorogensäure fanden sich zwei Publikationen, die ausschließlich auf Chinesische verfasst waren und sich damit dem Vergleich des Autors entzogen [165, 166]. Von Epigallocatechingallat werden Antiinfluenza-Eigenschaften im Plaque-Test beschrieben. Die Neuraminidaseaktivität wurde dort jedoch nicht untersucht [167].  $\text{IC}_{50}$ -Werte, die mittels der bakteriellen Neuraminidase von *Clostridium perfringens* oder *Vibrio cholerae* ermittelt worden sind, fanden hier ebenso keine Berücksichtigung, da sich die bakterielle von der viralen Neuraminidase u.a. in Struktur (Monomer vs. Tetramer), Bindungsaffinität und Enzymaktivität unterscheidet und damit erzielte Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragbar sind [38].

Anders als durch die hier ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte festgestellt, beschreiben Liu et al. [159, 168] und Jeong et al. [160] eine schwächere inhibitorische Potenz der Flavonoidglykoside gegenüber ihren Aglyka und nennen sterische Hinderungen als einen Hauptgrund. Sie machen die Hydroxylgruppe in Position 4' und 7, die Oxogruppe in Position 4 sowie die Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 als besonders wichtig für eine potente Wirkung aus (Abb. 18) und stellen inner-



halb der Flavonoide hinsichtlich ihrer antiviralen Wirkung folgende absteigende Reihenfolge auf: Aurone > Flavon(ol)e > Isoflavone > Flavanon(ol)e und Flavan(ol)e. Mehr Hydroxylgruppen im B Ring reduzieren den Effekt der 4'OH-Gruppe [159]. Alle hier näher betrachteten Flavonoide erfüllen diese Kriterien mit Ausnahme des Luteolin-7-glykosids, das an Position 7 statt der Hydroxylgruppe ein Glykosidrest aufweist. Apigenin und Luteolin, die ebenfalls diese Voraussetzungen aufweisen, inhibierten interessanterweise nur die bakterielle Neuraminidase potent bzw. im Falle des Luteolins auch diese nicht. Auch Quercetin, das zusätzlich an Position 5' und 3 je eine Hydroxylgruppe besitzt, konnte nur die bakterielle Neuraminidase effektiv inhibieren. Apigenin, Luteolin, Kämpferol, Quercetin und Rutin konnten die Neuraminidase von *Clostridium perfringens* weniger potent inhibieren als die eines rekombinanten Influenza-A-Virus [160].

Kongkamnerd et al. und Chamni et al. berichten allerdings über falsch-positive Inhibitionen unter Flavonoiden im MUNANA-Assay durch den Quenching-Effekt. Dabei interagieren die Polyphenole mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4-Methylumbelliferon und führen zu einer reduzierten Detektierung, ohne dass es enzymbedingt einen geringeren Substratumsatz gegeben hätte. Mit Ausnahme des Naringenins, für das ein solcher Quenching-Effekt nachgewiesen worden ist, befand sich keines der hier näher betrachteten Substanzen unter den von Kongkamnerd et al. untersuchten Flavonoiden. Oseltamivir zeigte keinen Quenching-Effekt auf das Methylumbelliferon [169, 170].

Um nun gezieltere Aussagen über die Wirkweise der Flavonoide auf die Neuraminidase treffen zu können und einen Quenching-Effekt ausschließen zu können, wurden die Enzymkinetik und die aus ihr entwickelten Bindungsmodelle näher untersucht.

Betrachtet man Oseltamivir, so spiegeln sich die vergleichsweise niedrigen  $IC_{50}$ -Werte sowohl in der Bindungsaffinität – ausgedrückt im  $K_m$ -Wert – als auch in der Bindungsstärke – ausgedrückt im  $K_i$ -Wert – wieder. Während diese Werte für die Neuraminidase von A(H1N1)pdm09 und A(H3N2) im Mittel im gleichen Bereich liegen ( $K_m = 37$  bis  $76 \mu\text{M}$  und  $K_i = 0,9 \mu\text{M}$  für A(H1N1)pdm09 bzw.  $K_m = 30$  bis  $53 \mu\text{M}$  und  $K_i = 0,3 \mu\text{M}$  für A(H3N2)), bindet Oseltamivir weniger affin und schwächer an die Neuraminidase von FluB ( $K_m = 55$  bis  $154 \mu\text{M}$  und  $K_i = 33 \mu\text{M}$ ) (Abb. 25). Dies findet seine Entsprechung im höheren  $IC_{50}$ -Wert. Diese Daten sind konform mit denen der Literatur [101, 155, 156]. Bei Oseltamivir handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor [47].

Bei den getesteten Flavonoiden fällt hingegen auf, dass die Bindungsaffinität zur Neuraminidase von A(H3N2) am geringsten ist; der  $K_m$ -Wert ist vergleichsweise hoch. Im Gegensatz dazu ist die Bindung zum Enzym stark; der  $K_i$ -Wert also niedrig.

Die Bindungen der Flavonoide an die Neuraminidase von A(H1N1)pdm09 verhalten sich dem entgegengesetzt. Ein niedriger  $K_m$ -Wert indiziert eine hohe Bindungsaffinität, ein relativ hoher  $K_i$ -Wert eine geringere Bindungsstärke. Als Ausnahme sticht Quercitrin hervor, das neben einer hohen Affinität auch eine starke Bindung zeigt. In der theoretischen Erwägung einer Therapie

müssten damit geringere Konzentrationen der Substanz eingesetzt werden.

Anders als bei Oseltamivir beobachtet, liegt die Bindungsaffinität der Flavonoide zur Neuraminidase von FluB nicht deutlich von der des Enzyms von A(H1N1)pdm09 entfernt. Die Bindungsstärke ist hier jedoch – ebenso wie bei Oseltamivir – im Verhältnis zu der Neuraminidase der anderen beiden Virusstämme am niedrigsten ausgeprägt.

Jeong et al. ermittelten u.a. für Kämpferol und Rutin  $K_i$ -Werte von  $21,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$  bzw.  $33,8 \pm 3,3 \mu\text{M}$  [160]. Die  $K_i$ -Werte lagen damit unter denen, die hier bestimmt worden sind. Es gilt jedoch zu beachten, dass Neuraminidasen unterschiedlicher Virusstämme Verwendung fanden (rekombinantes Influenza-A-Virus bzw. A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und FluB), die diese Unterschiede erklären können. Für Hyperosid, Isoquercitrin, Luteolin-7-glucosid und Quercitrin gab es in der Literatur weder  $K_i$ - noch  $K_m$ -Werte, konnten somit nicht verglichen werden und finden in dieser Arbeit erstmals Erwähnung.

Da sich die  $K_i$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Werte der in dieser Arbeit eingehender getesteten Flavonoide (Hyperosid, Isoquercitrin, Kämpferol, Luteolin-7-glucosid, Quercitrin und Rutin) nicht gleichen, ist eine kompetitive Hemmung denkbar [129]. Sowohl bei unkompetitiver als auch nicht-kompetitiver Inhibierung gleichen sich  $K_i$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Wert [129].

Visualisiert man nun die aus den  $K_m$ -Werten abgeleiteten Bindungen, erhält man ein Bild, wie die einzelnen Substanzen an der Neuraminidase binden. Für Oseltamivir existieren solche Bindungsstudien bereits [46, 52, 171, 172, 173, 174], die hier bestätigt werden konnten. Die von dem natürlichen Liganden Sialinsäure abgeleitete Struktur des Oseltamivirs bindet im aktiven Zentrum in einer Art Tasche. Oseltamivir besitzt dabei eine sperrige Seitenkette. Die Neuraminidase muß infolge einer Konformationsänderung vollführen, indem die Aminosäure E276 rotiert und eine Bindung mit der Aminosäure R224 eingeht. Mutationen, die diese Rotation sterisch behindern, wie H275Y und R292K, sorgen somit für eine reduzierte Bindungsaffinität des Oseltamivirs zum aktiven Zentrum der Neuraminidase. Davon unberührt bleiben die Sialinsäure und andere Neuraminidaseinhibitoren, die keine solche Seitenkette aufweisen und es damit zum Binden am Enzym keiner Konformationsänderung bedarf, wie zum Beispiel Zanamivir [175].

Dabei zeigen sich kleine, aber entscheidende Unterschiede in der Konformation zwischen den verschiedenen Neuraminidasen (vgl. 1.3). Die Neuraminidase von A(H1N1)pdm09 fällt in Gruppe 1 (N1), A(H3N2) in Gruppe 2 (N2) und Flu B in Gruppe 3 (B-NA) [48]. Dennoch ist das aktive Zentrum mit den Aminosäuren Arg118, Glu119, Asp151, Arg152, Ile223, Arg225, Glu278, Arg293, Arg368 und Tyr402 (Nummerierung von A(H1N1)pdm09) hoch konserviert [45, 52]. Allein im Bereich der Schlaufe bei Position 430 fällt ein größerer Unterschied zwischen den Enzymen der drei Subtypen auf; die Aminosäuresequenz von Flu B ist um drei Moleküle kürzer als bei A(H1N1)pdm09 und A(H3N2).

Oseltamivir interagiert mit den Aminosäuren Glu117, Arg150, Arg374 und Tyr409 des aktiven Zentrums über Wasserstoffbrückenbindungen. Hydrophobe Interaktionen bilden sich zwischen Ile221 und Ala245 (Nummerierung von Flu B). Zusätzliche Stabilität verleihen Bindungen von

dem kationischen Ammonium und der negativ geladenen Carboxylatgruppe des Inhibitors mit Arg292 (kationisch) und Asp149 (anionisch).

Bei allen getesteten Substanzen, unabhängig ob Flavonol oder Flavon und einschließlich der Kontrollsubstanz Oseltamivir, wird also eine Gruppierung der Neuraminidasesubtypen durch die  $K_i$ -Werte deutlich. Die Bindungsstärke der Substanzen gegenüber der Neuraminidase N1-09 ist im Vergleich zu der der Neuraminidase N2 geringer. Die geringste Bindungsstärke weisen jedoch die Substanzen zu der Neuraminidase von FluB (B-NA) auf. Die phylogenetisch bedingten strukturellen Unterschiede spiegeln sich also auch bei den in dieser Arbeit getesteten Substanzen wieder.

Während Oseltamivir polar ist und komplett im aktiven Zentrum bindet, unterscheiden sich die Moleküle der getesteten Flavonoide in Struktur und Größe stark von den natürlichen Liganden, so dass ein gleicher Bindungsmodus auszuschließen ist [45, 47]. Aufgrund der unterschiedlichen, wenn auch hohen,  $IC_{50}$ -,  $K_i$ - und  $K_m$ -Werte ist nicht anzunehmen, dass die Polyphenole unspezifisch an der Oberfläche des Enzyms binden und somit auf diese Art und Weise zu einer Funktionseinschränkung dieses führen. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, dass lediglich der Zuckerrest im aktiven Zentrum bindet; der überwiegende Teil ragt aus der Tasche heraus. Das Grundgerüst der Flavonoide interagiert via Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren der Neuraminidase, die das aktive Zentrum umgeben. Die Zuckerreste treten dagegen mit den Schlüsselaminosäuren (Asp149, Arg150, Glu276, Arg292 und Tyr409) des aktiven Zentrums in Wechselwirkung, die auch für die Bindung mit Oseltamivir eine wichtige Rolle spielen. Allerdings zeigen sich hier weniger Interaktionen als mit natürlichen Liganden und den davon abgeleiteten Molekülen (Arg116, Glu117, Asp149, Arg150, Ile221, Arg223, Glu276, Arg292, Arg374 und Tyr409).

Die Bindung der Glykosidreste im aktiven Zentrum könnte auch eine Erklärung sein, warum nicht, wie bei der bakteriellen Neuraminidase, die Aglyka der Polyphenole eine höhere inhibitorische Potenz entfalten. Zudem unterscheiden sich Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin allein in diesem Teil des Moleküls (Abb. 40).

Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin sind alle am Kohlenstoff der Position drei (C3) glycosyliert und unterscheiden sich lediglich in der Art der Glycosylierung; bei Hyperosid bildet Galactose, bei Isoquercitrin Glucose und bei Quercitrin Rhamnose den Zuckerrest. Als 3-O-Rhamnosid des Quercetins weist Quercitrin folglich eine Hydroxylgruppe weniger als Hyperosid und Isoquercitrin auf. Diese beiden Polyphenole besitzen die gleiche Summenformel und differieren ausschließlich in der Position einer Hydroxylgruppe und damit einer veränderten Sterik. Daraus resultieren vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe des Hyperosids mit den Aminosäuren Glu276, Arg292 und Tyr409 des aktiven Zentrums der Neuraminidase im Gegensatz zu einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Isoquercitrin und der Aminosäure Glu276. Dies würde eine geringere Stabilisierung des Moleküls in der Bindung bedeuten.

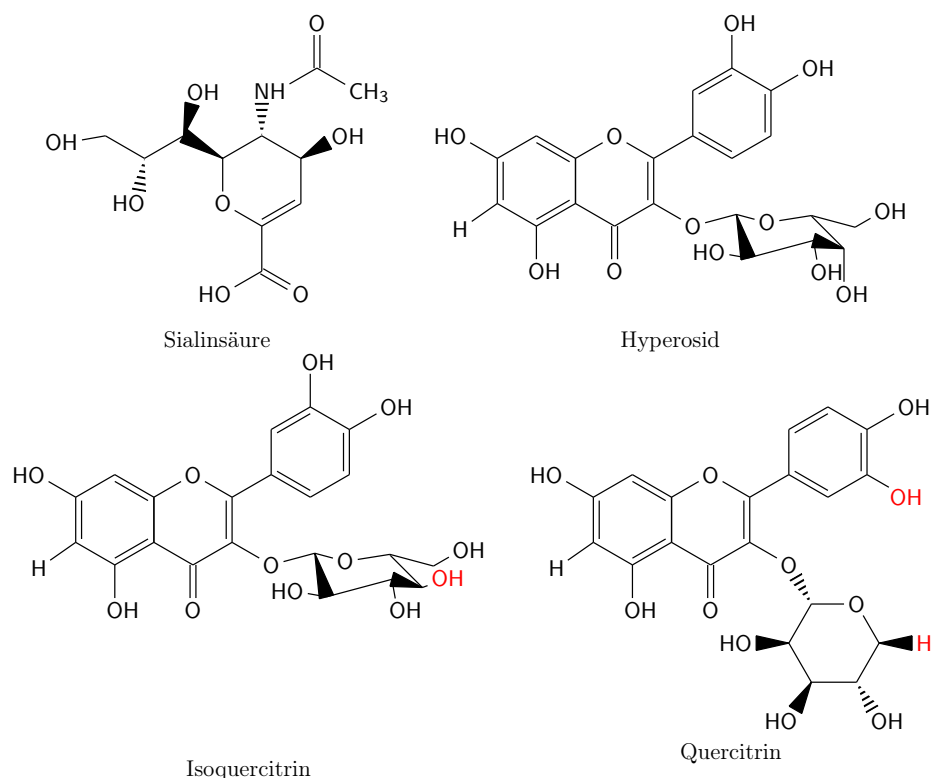


Abbildung 40. **Übersicht der Strukturformeln der Sialinsäure, von Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin.** Das Grundgerüst der drei Flavonoide ist identisch, lediglich durch Anzahl und Positionen der Hydroxylgruppen in ihren Zuckerresten differieren sie (in Rot dargestellt).

Kämpferol, Luteolin-7-glucosid und Rutin (Abb. 41) unterscheiden sich strukturell etwas stärker von Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin. Auch bei Luteolin-7-glucosid und Rutin sind Interaktionen via Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxylgruppen des Glykosidrestes und den Aminosäuren Arg116, Glu117, Arg150, Glu276, Arg292 und Tyr409 des aktiven Zentrums anzunehmen. Eine Ausnahme stellt Kämpferol dar, das als Aglykon kein Glykosidrest besitzt. Hier könnten Hydroxylgruppen des Grundgerüsts mit Asp149, Ile221, Arg292 und Arg374 interagieren. Besondere Stabilität verleiht jedoch eine  $\pi - \pi$ -Bindung mit Arg292.

Die Anzahl der Glykosylierungen scheint also nur eine geringe Rolle zu spielen, wie das doppelt glykosylierte Rutin demonstriert. Auch der Ort des Glykosidrestes scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die inhibitorische Fähigkeit des Polyphenols zu nehmen; Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Rutin besitzen am C3 ihren Zuckerrest, Luteolin-7-glucosid dagegen an C7. Da der Glykosidrest mit dem aktiven Zentrum interagiert, tritt auch die Rolle des Grundgerüsts des Polyphenols in den Hintergrund. Vielmehr scheinen die Hydroxylgruppen mit ihrer Position und der damit verbundenen Sterik über die Bindungsstärke zu entscheiden, was auch von Liu et al. postuliert wird [159].

Insgesamt führen die Hydroxylgruppen durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums der Neuraminidase zu einer Stabilisierung. Gleichzeitig könnte in den

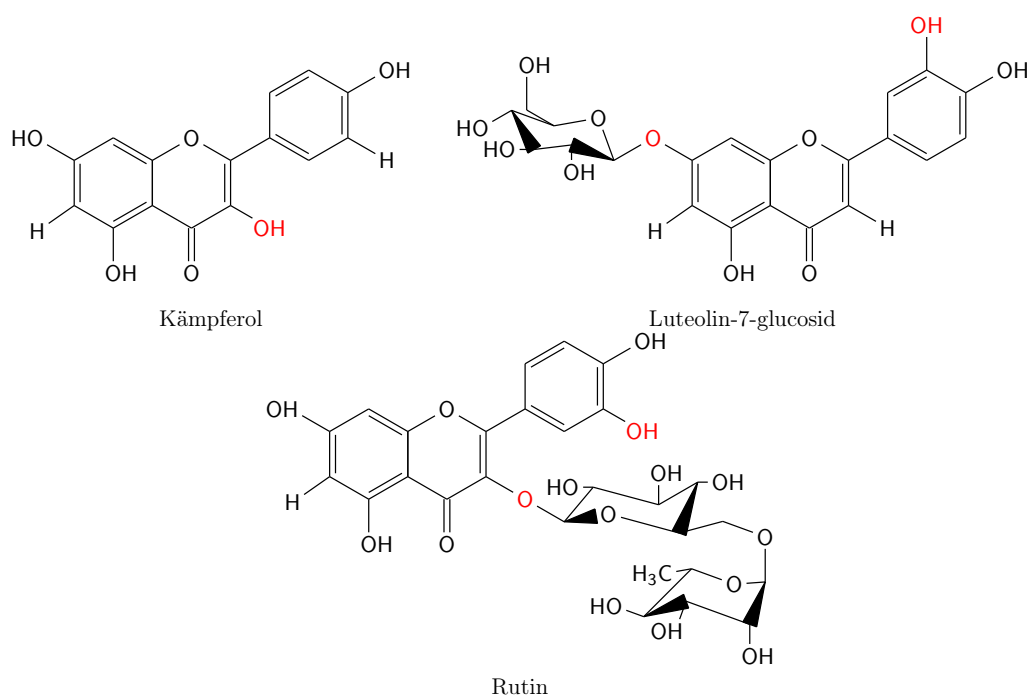


Abbildung 41. **Übersicht der Strukturformeln von Kämpferol, Luteolin-7-glucosid und Rutin.** Das Flavonoidaglykon Kämpferol zählt seinem Grundkörper nach zu den Flavonolen. Luteolin-7-glucosid und Rutin sind Flavonoidglykoside, deren Grundkörper ein Flavon bzw. Flavonol ist. Das unterschiedliche Hydroxylierungsmuster ist in Rot dargestellt.

zahlreichen Hydroxylgruppen und der damit verbundenen Hydrophilie auch ein Grund für die, im Vergleich zu Oseltamivir, hohen  $IC_{50}$ -Werte liegen. Durch sie sind die Flavonoide in ungebundenem Zustand von einer Hydrathülle umgeben. Um nun in der Tasche der Neuraminidase binden zu können, muss diese Hydrathülle gewissermaßen abgestreift, die Flavonoide also desolvieren, werden. Die Bindungseffizienz ist damit herabgesetzt, die  $IC_{50}$ -Werte sind erhöht.

## 5.2 Kämpferol zeigt einen Einfluss auf die Virusvermehrung

Obwohl die Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin, Kämpferol, Luteolin-7-glucosid, Quercitrin und Rutin im Enzymassay die Neuraminidase in zweistelligen Mikromolarkonzentrationen inhibieren konnten, ist ein Effekt im Plaquereduktionsassay auf replikationsfähige Influenzaviren ausschließlich bei Kämpferol beobachtet worden. Die Flavonoidglykoside zeigten weder einen Einfluss auf die Anzahl noch auf die Größe der Plaques. Zwischen den einzelnen Virusstämmen gab es keine Unterschiede. Als Referenz diente abermals Oseltamivir. Hier führten Konzentrationen ab  $12,5 \mu\text{M}$  zu einer Reduktion der Plaquezahl bei allen drei Virusstämmen. Bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  blieben Plaques vollständig aus. Bereits ab Oseltamivirkonzentrationen von  $1,562 \mu\text{M}$  zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle Plaques mit geringerem Durchmesser. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei A(H1N1)pdm09 zu beobachten. Im Vergleich zum Enzymassay lagen die inhibitorischen Konzentrationen eine Zehnerpotenz höher. Dieses Phänomen ist bekannt, da Viren sich in der Zellkultur, in der Zellen ihre natürliche apikale Polarität verloren haben, von

Zelle zu Zelle unter Umgehung der Neuraminidasefunktion verbreiten. Außerdem können Mutationen im HA, die phenotypisch *in vivo* zu keiner NAI-Resistenz oder Sensitivitätsabnahme führen, in Zellkulturen durch eine modifizierte Rezeptorbindungsspezifität einen Sensitivitätsverlust vorgeben [176, 177]. Auf höhere Konzentrationen bei den Flavonoidglykosiden wurde verzichtet, da dann zum einen das Löslichkeitsprodukt überschritten wird, zum anderen solch hohe Konzentrationen im Blutplasma nicht erreicht werden können und damit ein therapeutischer Einsatz nicht umsetzbar ist.

Kämpferol zeigte ab einer Konzentration von  $325 \mu\text{M}$  einen Effekt auf die Virusvermehrung. Die Wirkkonzentration liegt damit noch unter der cytotoxischen Konzentration, die im MTT-Test bei  $580 \pm 100 \mu\text{M}$  ermittelt worden ist (Tab. 18). Auch im LDH-Cytotoxizitätstest zeigten sich bis Konzentrationen von  $560 \mu\text{M}$  keine Einflüsse auf MDCK-Zellen. Eine scheinbare virusinhibierende Eigenschaft aufgrund von Cytotoxizität auf die MDCK-Zellen konnte folglich bis zu Konzentrationen von  $560 \mu\text{M}$  ausgeschlossen werden. Damit ist Kämpferol das einzige Polyphenol innerhalb der getesteten Substanzen, das eine inhibierende Eigenschaft auf Influenzaviren aufweist. Der Selektivitätsindex ( $SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$ ) lag bei 6,8 (A(H1N1)pdm09), 13,8 (A(H3N2)) und 6,4 (Flu B), für Oseltamivir sind SI-Werte  $>30$  beschrieben [160]. Kämpferol besitzt damit im Vergleich zu Oseltamivir eine sehr viel geringere therapeutische Breite.

Da bekannt ist, dass Influenzaviren in Zellkulturmodellen eingeschränkt die Neuraminidase zur Infektion benachbarter Zellen und damit zur Ausbreitung und zur Vermehrung benötigen [178, 179, 180, 181], ist der Plaque-Reduktionstest nur bedingt aussagekräftig. Daher wurden im nächsten Schritt die Virusvermehrungskurven und -kinetiken unter Zugabe von Oseltamivir und der Polyphenole untersucht (Abb. 30 und Abb. 31). In Anwesenheit von Oseltamivir ließ sich bereits ab einer Konzentration von  $0,05 \mu\text{M}$  eine geringe Reduktion des Virustiters feststellen.  $0,5 \mu\text{M}$  Oseltamivir zeigte einen deutlichen Effekt auf die Virusvermehrung und bei 5 und  $50 \mu\text{M}$  konnte überhaupt keine Virusvermehrung mehr festgestellt werden.

Wie schon beim Plaque-Reduktionstest zeigte mit Ausnahme von Kämpferol auch bei der Virusvermehrung kein getestetes Polyphenol einen inhibierenden Einfluss auf die Influenzaviren. In diesem Versuchsaufbau müssten auch andere, nicht neuraminidaseinhibierende antiinfluenzavirale Wirkmechanismen zutage treten. Für Isoquercitrin ist ein noch nicht näher identifizierter antiviraler Mechanismus in der frühen Phase der viralen Replikation beschrieben [146]. Daneben wurden auch synergistische Effekte von Isoquercitrin und Oseltamivir bzw. Amantadin bis hin zur Verhinderung von Resistenzentwicklungen beobachtet [146]. In den hier durchgeführten Experimenten konnten keine durch Isoquercitrin hervorgerufene Wirkungen festgestellt werden, die die Virusvermehrung hemmten. Apigenin, Baicalein, Biochanin A, Kämpferol, Luteolin und Naringenin reduzierten die Expression von Nucleoproteinen in H5N1. Nur für Baicalein, das in dieser Arbeit nicht untersucht worden ist, wurde eine Interaktion mit der viralen Neuraminidase gezeigt [120]. Apigenin, Luteolin und Naringenin wurden in der vorliegenden Arbeit nicht eingehender im Zellkulturmodell betrachtet, da sie im Neuraminidaseaktivitätstest nur einen

geringen Einfluss auf die virale Neuraminidase zeigten. Bis auf Kämpferol wurde in dieser Arbeit keine dieser Substanzen eingehender examiniert. Kämpferol führte ab einer Konzentration von  $70 \mu\text{M}$  zu einer Reduktion des Virustiters bei allen drei Virusstämmen. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von  $1750 \mu\text{M}$  muss allerdings von einem cytotoxischen Effekt auf die MDCK-Zellen ausgegangen werden. Dieser kann für  $350 \mu\text{M}$  Kämpferol nach den durchgeführten Cytotoxizitätsstudien ausgeschlossen werden.

### 5.3 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden

Auch bei einer effektiven Inhibierung der viralen Neuraminidase durch ein Flavonoid wird es unwahrscheinlich sein, therapeutische Konzentrationen am gewünschten Wirkort bei enteraler Applikation zu erreichen, da die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen allgemein als schlecht gilt und hier im besonderem Maße die der Flavonoidglykoside. Unter der Bioverfügbarkeit versteht man die Konzentration und Geschwindigkeit, mit der Substanzen nach oraler Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt an ihren Wirkort gelangen. Sie ist dabei von der Löslichkeit, der Hydrophobizität, Molekülgröße und der Struktur des Moleküls (u.a. Seitenketten) abhängig. Polyphenole und die dazu gehörenden Flavonoide sind eine sehr heterogene Gruppe, die sich in ihren Eigenschaften stark unterscheiden können. Es wird grob davon ausgegangen, dass von 10-100 mg aufgenommener Flavonoide eine Plasmakonzentration von  $1 \mu\text{M}$  erreicht wird [121, 182].

In einem ersten Schritt werden die Glycosidreste durch Glucosidasen von den Flavonoiden abgetrennt. Das kann zu einem geringen Teil bereits im Mund, im Lumen des Gastrointestinaltrakts, in den Zellen der Mucosa oder durch die Mikroflora des Colons erfolgen. Einige Aglyka können bereits im Magen aufgenommen werden, andere werden im Dünndarm wahrscheinlich durch aktive natriumabhängige Glucosetransporter (SGLT1 und GLUT2) aufgenommen. Absorbierte Polyphenole treten in den enterohepatischen Kreislauf ein und werden vornehmlich in den Enterozyten und der Leber durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) methyliert, die Phenol-Sulfontransferase (SULT) sulfatiert und die UDP-Glukuronyltransferase (UGT) glucuronidiert (Abb. 42). Nicht absorbierte Substanzen wandern weiter in das Colon, wo sie von Bakterien der Mikroflora metabolisiert werden. Das umfasst initial die Hydrolyse und im weiteren die Aufspaltung des C-Ringes mit Reduktion der Doppelbindungen. Als Endprodukte konnten u.a. aus dem A-Ring hervorgehend das Phloroglukinolaldehyd und entsprechend dem Hydroxylierungsmuster eine phenolische Säure, aus dem B-Ring entstehend, nachgewiesen werden. Insgesamt können sich die Abbauprodukte der individuellen Mikroflora wegen unterscheiden [121, 182, 183].

Quercetin-Glykoside sind Substrate für die Laktase-Phloridizin-Hydrolase (LPH) und können von der  $\beta$ -Glucosidase nicht umgesetzt werden. Daher erfolgt eine Hydrolyse der Quercetin-3-glukoside nicht in der Leber, sondern nur in intestinalen Zellen. Auch mit Rhamnose verknüpfte Flavonoide, wie das Rutin, stellen kein Substrat für die humane  $\beta$ -Glucosidase dar und werden daher von der mikrobiellen  $\alpha$ -Rhamnoidase im Colon hydrolysiert [121]. Folglich ist davon auszugehen, dass von den eingehender getesteten Flavonoiden kaum eine Substanz unmetabolisiert

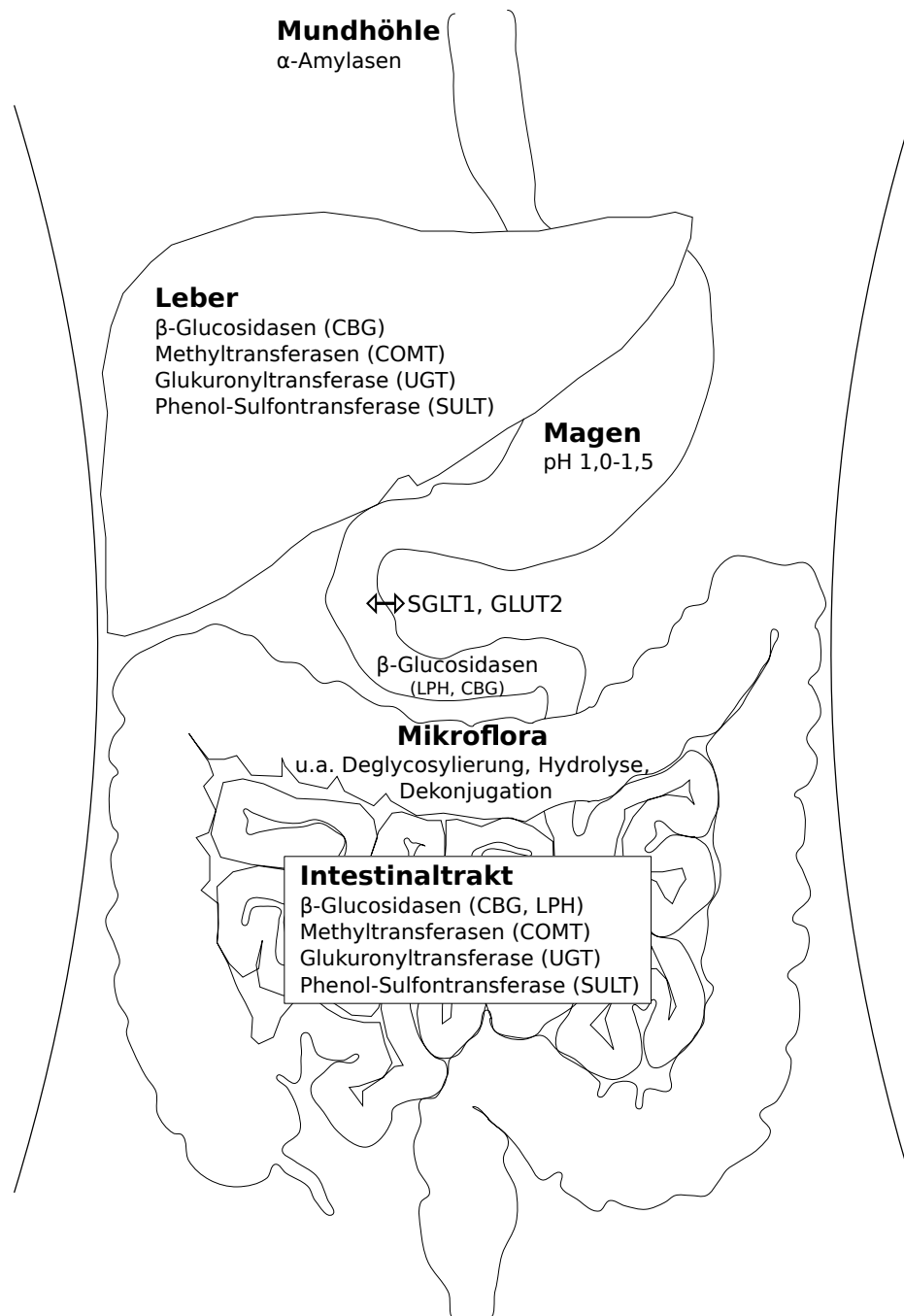


Abbildung 42. **Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden.** Flavonoide werden bereits zu einem geringen Teil durch α-Amylasen im Speichel hydrolysiert. Der niedrige pH-Wert im Magen führt in der Regel, anders als bei Proteinen, zu keiner Strukturveränderung, da Flavonoide in natürlicher Umgebung häufig im sauren Milieu vorliegen und hier am stabilsten sind. Einige Flavonoide (besonders die Aglyka, aber auch Glykoside) werden im Dünndarm durch natriumabhängige Glukosetransporter (SGLT1 und GLUT2) aufgenommen und durch intrazelluläre β-Glucosidasen (LPH, CBG) hydrolysiert. Das Flavonoidaglykon wird nun durch COMT methyliert, UGT glucuronidiert und/oder mittels SULT sulfatiert. Diese Konjugationen können sowohl in den Zellen des Interstinums als auch in der Leber (oder teilweise in den Nieren) stattfinden. LPH kommt ausschließlich in den Enterozyten des Dünndarms vor. Auch durch die Mikroflora, v.a. im Colon, ist durch Deglycosylierung und Dekonjugation am Metabolismus der Flavonoiden beteiligt. Nach [121]. CBG cytosolische β-Glucosidase, COMT Catechol-O-Methyltransferase, LPH Laktase-Phloridizin-Hydrolase, SULT Phenol-Sulfontransferase, UGT UDP-Glukuronyltransferase.



systemisch aufgenommen wird. Zwar beziehen sich die meisten Studien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen auf Konzentrationen, die durch die tägliche Nahrungsaufnahme erreicht werden. Wie bei Arzneimitteln könnte durch höhere Dosen eine Enzymsättigung erfolgen, wodurch u. U. unmetabolisierte Formen in den Blutkreislauf gelangten. Es blieben jedoch die schlechte Absorption und Beeinflussung durch die Mikroflora. Nahezu alle eingehender getesteten Flavonoide sind Glykoside, deren Aglyka eine deutlich schlechtere Inhibierung der viralen Neuraminidase im Enzymassay zeigten. Die meisten Flavonoide werden als erstes im Magen-Darm-Trakt deglykosyliert, um aufgenommen zu werden. Der Glykosidrest scheint jedoch der Teil des Moleküls zu sein, der im aktiven Zentrum der Neuraminidase bindet (5.1), d.h. dass die Substanz mit der Aufnahme nach der Hydrolyse ihre Wirkstruktur verliert.

Die Metabolite (Tab. 19) besitzen ganz andere Bioaktivitäten als die ursprünglichen Substanzen und sollten daher in einem nächsten Schritt auf ihre Fähigkeit, die virale Neuraminidase zu inhibieren, untersucht werden.

Tabelle 19. **Bis dato bekannte Metabolite der eingehender gestesteten Flavonoide.** Die Metabolite wurden dem Polyphenol-Explorer 2.0 (<http://www.phenol-explorer.eu>) nach [184] entnommen.

Typ	Name	Struktur	Metabolite
Glykosid	Hyperosid	Quercetin-3-O-galactosid	k.A. <sup>†</sup>
Glykosid	Isoquercitrin	Quercetin-3-O-glucosid	k.A. <sup>†</sup>
Aglykon	Kämpferol	Kämpferol	k.A. <sup>†</sup>
Glykosid	Luteolin-7-glucosid	Luteolin-7-O-glucosid	k.A. <sup>†</sup>
Aglykon	Quercetin	Quercetin	1,3,5-Trimethoxybenzol, 3-O-Methylgallussäure, 3-Phenylpropionsäure, 4-Ethylbenzoesäure, 4-Ethylphenol, 4-O-Methylgallussäure, Benzoesäure, Dihydro-p-Cumarinsäure, Dihydrocaffeeäure, Ferulasäure, Gallussäure, Isorhamnetin, Methoxyphenylessigsäure, Protocatechusäure, Quercetin, Vanillinsäure, (+)-Catechin
Glykosid	Quercitrin	Quercetin-3-O-rhamnosid	k.A. <sup>†</sup>
Glykosid	Rutin	Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl)-glucosid	2,4-Dihydroxybenzoesäure, 2-Hydroxy-2-phenylessigsäure, 2-Hydroxyhippursäure, 2-Hydroxyphenylessigsäure, 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, 3-Hydroxyphenylessigsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyphenylessigsäure, Benzoesäure, Ferulasäure, Hippursäure, Homovanillinsäure, Phenylessigsäure, Protocatechusäure, Sinapinsäure, Syringasäure, Vanillinsäure

<sup>†</sup> k.A. keine Angaben in der Datenbank gefunden

Da Flavonoide also im Allgemeinen eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzen [158], ist es unwahrscheinlich, dass sie in mikromolaren Konzentrationsbereichen systemisch zu Verfügung stehen. Hinzu gesellt sich, dass Flavonoide in der Magen-Darm-Passage u.a. durch Mikroorganismen und in der Leber modifiziert werden. So werden von Flavonoidglykosiden die Glykosidreste abgespalten, bevor eine Aufnahme in die Blutbahn erfolgt [185]. Um auch außerhalb der Blutbahn, z.B. dem Respirationstrakt, eine Wirkung zu entfalten sind hohe Plasmaspiegel notwendig, die Oseltamivir erreicht [98]. Influenzaviren benötigen die Neuraminidase auch, um in tiefere Bereiche des Respirationstraktes vorzudringen, da die Viruspartikel sonst am sialinsäurehaltigen Mucus haften bleiben. Vor diesem Hintergrund erscheint eine topische Anwendung vielversprechender [89]. So verbleiben nach Inhalation von 10 mg Zanamivir 78 % im Oropharynx und 13 % in den Lungen. Lediglich 10-12 % werden systemisch aufgenommen [123].

Durch eine topische Anwendung mittels Inhalation könnten neben der viralen Neuraminidase auf diese Weise auch bakterielle Neuraminidasen Ziel einer Therapie mit ein und derselben Substanz werden [42]. Es ist bekannt, dass bakterielle Neuraminidasen die Aufgaben der viralen Neuraminidase übernehmen können, wenn letztere ausgeschaltet worden ist [186]. Daher wären Ansätze interessant, dass sowohl die virale als auch die bakterielle Neuraminidase inhibiert werden.

Wenn Flavonoide systemisch zur Anwendung kommen, sollten Kombinationstherapien in Betracht gezogen werden, da es Hinweise auf synergistische Aktivitäten - u.a. auch durch Immunmodulation - gibt [187, 188] und Resistenzentwicklungen *in vitro* verhindert werden sollen [146]. So konnte zum Beispiel die Wirkung von Amantadin gegen ein H7N7-Subtypvirus durch *Verbascum thapsiforme* Schrad. potenziert werden [189]. Andere Wirkmechanismen durch Flavonoide, z.B. der Einfluss auf die Replikation, den Export von RNP oder die virusinduzierte Caspase 3 durch Biochanin A und Baicalein [120], sowie der Einfluss auf das Interferonsystem [190] wurden in dieser Arbeit nicht eingehender untersucht, scheinen jedoch unwahrscheinlich, da man dann im MDCK-Zellkulturmodell eine reduzierte Virusvermehrung erwarten würde.

#### 5.4 Untersuchte Peptide scheinen die Infektion und die Virusvermehrung nicht zu affektieren

Nachdem immer wieder Resistenzen gegenüber Neuraminidaseinhibitoren aufgetreten sind und mit weiteren Resistenzentwicklungen zu rechnen ist, lohnt eine Betrachtung anderer Mechanismen, um die Infektion, die Vermehrung und die Ausbreitung von Influenzaviren zu verhindern. Ähnlich dem Vorgehen bei der Entwicklung der NAI wurde das Hämagglutinin als vielversprechende Struktur ermittelt, um durch rationelles Drug Design Moleküle zu entwickeln, die seine Funktionen stören können. Das Fusionspeptid des HA erscheint unter mehreren Zielstrukturen als besonders interessant, da die ersten zehn bis vierzehn Aminosäuren des Fusionspeptids hoch konserviert sind und damit in allen Influenza A- und B-Virusstämmen das einzige universell konservierte Epitop bilden [60, 191]. Anders als Peptide, die die HA-vermittelte Bindung des Virus an die Zelle unterbinden und mit Antikörpern um die Bindungsstelle konkurrieren [192, 193], ist das Fusionspeptid nicht dem selektiven Druck ausgesetzt.

Das positiv geladene, 20 bis 25 Aminosäure umfassende N-terminale Ende des Fusionspeptid liegt in einer negativ geladenen Tasche, der sog. Fusionspeptidtasche [194]. Starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aspartat an den Positionen 109 und 112 der Tasche und Leucin (Pos. 2), Phenylalanin (Pos. 3), Glycin (Pos. 4) und Alanin (Pos. 5) des Fusionspeptids stabilisieren den Komplex zusätzlich [191].

Auf Computermodelle und frühere Publikationen gestützt [58] wurde angenommen, dass die Peptide entweder in die noch unbesetzte Fusionspeptidtasche des ungespaltenen HA<sub>0</sub> binden oder zu einer HA-Aggregation bei der Umlagerung des Fusionspeptids während der Ansäuerung des Endosoms und damit des Fusionsprozesses führen. Eine Verdrängung des Fusionspeptids aus der Tasche durch die Peptide scheint angesichts der starken Hydrophobizität der Sequenz und starken Bindungen eher unwahrscheinlich.

Keines der drei getesteten 12-mer Peptide konnte jedoch die Infektion und die Virusvermehrung von A(H1N1)pdm09 hemmen; die Virustiter blieben unverändert. Bei allen Peptiden handelte es sich um Analoga zum Fusionspeptid von A(H1N1)pdm09, die sich an drei Positionen voneinander unterschieden (Abb. 43).

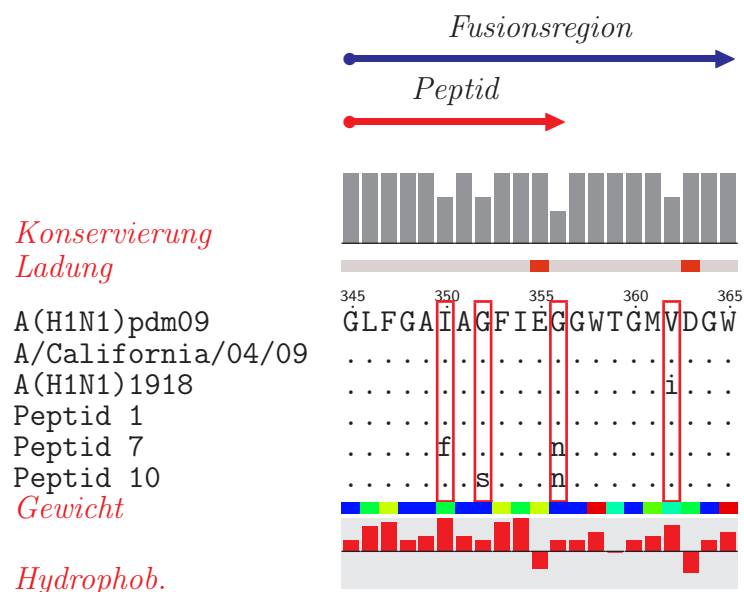


Abbildung 43. Vergleich der Fusionsregion von A/California/07/09 (A(H1N1)pdm09), A/California/04/09 und A(H1N1)1918 mit den Sequenzen der Peptide #1, #7 und #10.

HA<sub>0</sub> von H1 wird - anders als die HAs von H5 und H7 - hauptsächlich von extrazellulären Proteasen geschnitten (Vgl. 1.4) [59]. Da das Fusionspeptid und damit die 12-mer Peptide ausgesprochen hydrophob sind, um eine Verankerung in der Membran zu ermöglichen, ist es daher denkbar, dass die Peptide gar nicht in ausreichender Konzentration in wässriger Umgebung vorlagen, sondern sich in Membranen einlagerten. Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen in MDCK-Zellen stattfanden, deren Enzym- und Rezeptorausstattung sich

von der des Lungenepithels unterscheidet. Es stellt sich die Frage, ob Sialinsäuren für einen Viruseintritt in die Zelle essentiell sind [195] oder das Virus auch über andere Wege, wie die clathrinvermittelte Endocytose, das Protein Epsin 1 oder die C-Typ Lectine (L-SIGN und DC-SIGN), sein Genom in die Wirtszelle schleusen kann [180, 181, 196, 197, 198, 199, 200, 201]. Dass die Fusion zwischen Virus und Wirtszelle inhibiert werden kann, zeigen diverse Studien. Dabei kommen sowohl *in silico* entworfene und gegen die Stammregion des HA gerichtete Peptide zum Einsatz, die die Konformationsänderung verhindern [202, 203] als auch durch Phagen-Display gewonnene Antikörper, die ebenfalls gegen die Stammregion des HA gerichtet sind [60, 204].

Interessante Angriffsstrukturen scheinen die Umgebung der Fusionspeptidtasche und besonders die B-Schleife im HA zu sein, die wie ein Schanier wirkt und nach Ansäuerung aufklappt (Abb. 7). An dieser Stelle gebundene Substanzen könnten das Exponieren der Fusionspeptidsequenz aus der Tasche sterisch verhindern. Eine Inhibierung der Fusionspeptidsequenz selbst durch Bindung könnte aus sterischen Gründen nicht in der Tasche geschehen, sondern entweder beim noch nicht gespaltenen Vorläuferprotein HA<sub>0</sub> geschehen oder in der kurzen Zeit der Exposition unmittelbar vor Einlagerung in der Endosomenmembran.

Die errechneten Modelle von Peptid #1 und #10 lassen zwar eine Bindung im Bereich der B-Schleife (im HA), die von M59 bis L73 reicht, am maturierten Hämagglutinin vermuten. Die Bindungen könnten jedoch zu schwach sein, um effektiv eine Umlagerung innerhalb des HA sterisch zu inhibieren.

Auch Peptid #7, das in der Nähe der hydrophoben Tasche bindet, vermochte die Funktion des HA nicht zu inhibieren. Aus sterischen Gründen scheint eine direkte Interaktion mit der Fusionssequenz ausgeschlossen. Die errechneten Bindungen geben dazu auch keinen Anhalt.

Am Vorläuferprotein HA<sub>0</sub> banden alle drei getesteten Peptide in der globulären Domäne. An dieser Stelle kann keine Inhibierung der fusiogenen Aktivität des Hämagglutinins erfolgen. Auch die Maturierung des Proteins wird dadurch nicht beeinflusst.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Zunehmende Resistenzen von Influenzaviren gegenüber den zugelassenen Antiinfluenzaarzneimitteln, wie die fast vollständig wirkungslosen Adamantane oder die weitverbreitete H275Y Mutation mit der daraus resultierenden Oseltamaivirresistenz, und weitere zu erwartende Resistenzentwicklungen machen die Suche sowohl nach neuen Neuraminidaseinhibitoren als auch anderen Zielstrukturen zur Inhibierung von Infektion, Vermehrung und Ausbreitung der Viren notwendig. Zudem zeigen Metaanalysen, dass der Neuraminidaseinhibitor Oseltamivir in der Klinik weit weniger effektiv wirkt als ursprünglich angenommen.

Da 70 % der in den letzten 25 Jahren in den USA eingeführten Medikamente auf einen pflanzlichen Ursprung zurückzuführen sind und nach wie vor nur ein geringer Teil der ca. 400.000 bekannten Arten (weniger als 1 % der Arten in den Tropen) auf ihr therapeutisches Potential hin untersucht sind, bilden Substanzen pflanzlicher Herkunft eine große Ressource, die es zu explorieren gilt. Polyphenole stehen seit längerem im Fokus, da sie als sekundäre Metaboliten in einer Vielzahl von Pflanzen vorkommen und hier u.a. der Pathogenabwehr dienen. Neben antioxidativen und damit cytoprotektiven Eigenschaften kommen antimikrobielle und antivirale Qualitäten hinzu.

Obwohl einige der getesteten Naturstoffe die Neuraminidase im MUNANA-Enzymassay zu inhibieren vermochten, zeigte ausschließlich Kämpferol einen Einfluss auf das Viruswachstum von A(H1N1)pdm09, A(H3N2) und Flu B. Da bekannt ist, dass die Viren *in vitro* die Neuraminidase zum Infizieren, Replizieren und Ausschleusen (Budding) aus der Zelle nicht obligat benötigen, ist der Plaque-Reduktions-Test nur bedingt aussagekräftig. Allerdings konnten die in dieser Arbeit getesteten Flavonoidglykoside (Hyperosid, Isoquercitrin, Luteolin-7-glucosid, Quercitrin und Rutin) auch das Viruswachstum außerhalb des Plaque-Reduktionstests nicht beeinflussen. Die cytotoxische Konzentration von Kämpferol lag über dem doppelten Wert der 50 % inhibitorischen Konzentration, eine Cytotoxizität konnte somit ausgeschlossen werden kann. Dennoch liegt die  $IC_{50}$  des Flavonoids mit drei Zehnerpotenzen deutlich über den therapeutischen Konzentrationen der zugelassenen Neuraminidaseinhibitoren wie Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir. Ein möglicher Grund für die hohen  $IC_{50}$ -Werte könnte in der die Moleküle umgebende Hydrathülle liegen, die bei der Bindung ins aktive Zentrum „abgestreift“ werden muß.

Neben der Neuraminidase wurde auch die Fusionssequenz im HA als potentielle Zielstruktur in den Fokus gerückt. Diese Sequenz ist als Epitop für Antikörper nicht zugänglich und innerhalb der verschiedenen Virusstämme hoch konserviert. Daher könnte mit einem Arzneimittel, ohne vorherige Kenntnis des Virustyps, die Virusgrippe behandelt werden. Das Virus würde zwar endocytotisch in die Wirtszelle aufgenommen werden, könnte aber nicht die notwendige Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran vollführen. Als potentielle Inhibitoren wurden zur Fusionssequenz analoge Peptide synthetisiert, die *in vitro* jedoch keinerlei Reduktion des Virustiters beobachten ließen. Nichtsdestotrotz sollte das Fusionspeptid als Zielstruktur für eine antivirale Therapie weiter im Blick behalten werden.

Insgesamt scheinen Flavonoide zur systemischen antiviralen Monotherapie auf Grund der benötigten hohen Konzentrationen eher ungeeignet. Gleichwohl stellen sie einen interessanten Ansatzpunkt für eine topische adjuvante Therapie dar, bei der neben der Behandlung von Influenzaviren auch die von bakteriellen Superinfektionen und pathogeninduzierten cytopathischen Effekten indiziert ist. So könnte man die Strukturen modifizieren, um bessere Bindungseigenschaften zu erzielen. Zum Inhibieren der bakteriellen Neuraminidase scheinen Hydroxylgruppen an den Positionen 7, 5 und 4', eine Oxogruppe an Position 4 und eine Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 im C-Ring wichtig zu sein, wie es auch für die virale Neuraminidase postuliert worden ist. Zur potenteren Hemmung der viralen Neuraminidase wäre es sinnvoll, die Hydroxylgruppen auf ein für stabile Bindungen notwendiges Maß zu reduzieren, um die Hydrathülle so klein als möglich zu halten und damit die Energie zur Desolvierung zu reduzieren und die Bindungseffizienz zu erhöhen. In diesem Rahmen böte die Substitution von Hydroxylgruppen durch Aminogruppen eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung. Grundsätzlich sind Flavonoide in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage sowohl die virale als auch die bakterielle Neuraminidase zu inhibieren.

## 7 Abstract

Increasing resistance of influenza viruses to approved anti-influenza drugs, such as the almost completely ineffective adamantanes or widespread H275Y mutation resulting in resistance to oseltamivir, and further expected development of resistance necessitate searching for both new neuraminidase inhibitors as well as other target structures for the inhibition of infection, proliferation and spreading of viruses. Additionally meta-analyses show that the neuraminidase inhibitor oseltamivir is much less effective in a clinical environment than originally assumed. Since 70% of the drugs approved in the last 25 years in the US are of herbal origin and only a small number of the approximately 400,000 known species (less than 1% of the species in the tropics) have been tested for their therapeutic potential, substances of herbal origin form a great resource that needs to be explored. Polyphenols have been in focus for a long time since they are present in a variety of plants as secondary metabolites and, among other things, support pathogen defence. In addition to antioxidant and thus cytoprotective properties, polyphenols also have antimicrobial and antiviral qualities. Although some of the tested natural substances were able to inhibit neuraminidase in MUNANA enzyme assay, only kaempferol showed an impact on the growth of influenza virus A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and FluB. Since it is known that the virus *in vitro* does not need neuraminidase obligatory for infecting, replicating and budding from the cell, the plaque reduction assay is of limited significance. However, in this study the tested flavonoid glycosides (hyperosid, isoquercitrin, luteolin-7-glucoside, quercitrin and rutin) could not affect the viral growth outside the plaque reduction tests. The cytotoxic concentration of kaempferol was greater than twice the value of 50% inhibitory concentration. Thus cytotoxicity can be excluded. Nevertheless, the IC<sub>50</sub> of flavonoids is by three orders of magnitude significantly higher than the therapeutic concentrations of approved neuraminidase

inhibitors such as oseltamivir, zanamivir and peramivir. One possible reason for the high  $IC_{50}$  values could be the necessity of desolvation of the molecules prior to binding in the active site of neuraminidase.

In addition to the neuraminidase, the fusion sequence in HA was focused as a potential target. This sequence is not accessible as an epitope for antibodies and is highly conserved within the different virus strains. Thus the virus flu could be treated without knowing the exact virus type. The virus would be endocytosed into the host cell but would not be able to carry out the necessary fusion of the viral envelope with the host cell membrane. Analogous to the fusion sequence, synthesized peptides did not reduce the virus titer *in vitro*. Nevertheless, the fusion peptide should be kept in focus as a target for antiviral therapy.

In summary, flavonoids seem to be rather unsuitable for systemic antiviral monotherapy due to the required high concentrations. Nevertheless, they are interesting for topical adjuvant therapy which is indicated in addition to the treatment of influenza viruses and pathogen-induced cytopathic effects of bacterial superinfection. Thus the structure could be modified to achieve better binding properties. For inhibiting bacterial neuraminidase hydroxyl moieties at the positions 7, 5 and 4', an oxo moiety at position 4 and a double bond between positions 2 and 3 in C-ring seem to be important as it has been postulated for viral neuraminidase. For more potent inhibition of viral neuraminidase, the hydroxyl moieties should be reduced to an amount necessary for stable bonds, keeping the hydration as low as possible, thereby reducing the energy required for desolvation and increasing the binding efficiency. The substitution of hydroxyl moieties by amino moieties would be another possibility of modification. Basically flavonoids in varying degrees are capable of inhibiting both the viral and bacterial neuraminidase.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BSL	Biosafety level
-Ca	Carcinom
CC	Cytotoxische Konzentration
Chr.	Christus
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	Fetales Bovines Serum
HA	Hämagglutinin
HAH	Hämagglutinationshemmtest
HAP	Hämagglutinierendes Partikel
HAU	Hämagglutinationsunit
HBV	Hepatitis B-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
KBR	Komplementbindungsreaktion
kD	Kilo-Dalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MDCK	Madin Darby canine kidney
MEM	Minimum Essential Medium
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)
MUNANA	2'-(4-Methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminsäure Natriumsalz-Hydrat
NADH	Nicotinsäureamidadeninindinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamidadeninindinukleotidphosphat
NAI	Neuraminidaseinhibitor
NES	Nukleäres Exportsignal
neutr.	Neutrum
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NNRTI	Nicht nukleosidartiger Reversetranskriptase-Inhibitor



NRZ	Nationales Referenzzentrum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pfu	Plaque forming units
$pK_s$	(= $pK_a$ ) Säurekonstante
Pos.	Position
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase
RNA	Ribonucleinsäure
RNP	Ribonucleoprotein
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
TPCK	L-(tosylamido-2-phenyl)-ethyl-chloromethyl-Keton
VRNP	Virales Ribonucleinprotein

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 9 Literatur

- [1] S. Flint, L. Enquist, V. Racaniello, und A. Skalka. *Principles of Virology*. ASM, 2. Auflage, 2004.
- [2] W. Gemoll. *Griechisch-Deutsches Schul- und Handwörterbuch*St. HPT-Medien AG, 9. Auflage, 1965.
- [3] J. Stowasser, M. Petschenig, und F. Skutsch. *Stowasser, Lateinisch-deutsches Schulwörterbuch*. Oldenbourg, 2006.
- [4] S. Modrow, D. Falke, und U. Truyen. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, 2010.
- [5] P. Cantalupo, B. Calgua, G. Zhao, A. Hundesa, A. Wier, J. Katz, M. Grabe, R. Hendrix, R. Girones, D. Wang, und J. Pipas. Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio*, 2(5):e00180–11, 2011. doi:10.1128/mBio.00180-11.
- [6] WHO. Influenza Fact Sheet No. 211. online, 2011. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>. Aufgerufen am 21.05.2015.
- [7] S. Zimmer und S. Burke. Historical perspective - emergence of influenza A (H1N1) viruses. *The New England Journal of Medicine*, 361(3):279 – 285, 2009. doi:10.1056/NEJMra0904322.
- [8] J. Taubenberger und D. Morens. 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1):15 – 22, 2006. doi:10.3201/eid1201.050979.
- [9] J. Taubenberger und D. Morens. Influenza revisited. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1):1 – 2, 2006.
- [10] WHO. H1N1 in post-pandemic period, 2010. URL [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html). Aufgerufen am 12.02.2013.
- [11] K. Myers, C. Olsen, und G. Gray. Cases of Swine Influenza in Humans: A Review of the Literature. *Clin Infect Dis.*, 44(8):1084 – 1088, 2007.
- [12] W. Smith, C. Andrewes, und P. Laidlaw. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, 225:66 – 68, 1933.
- [13] D. Baltimore. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3):235–41, 1971.
- [14] G. Werner und R. Schlesinger. Morphological and quantitative comparison between infectious and non-infectious forms of influenza virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 100(2):203–16, 1954.

- [15] J. Seladi-Schulman, J. Steel, und A. Lowen. Spherical influenza viruses have a fitness advantage in embryonated eggs, while filament-producing strains are selected in vivo. *Journal of Virology*, 87(24):13343–53, 2013. doi:10.1128/JVI.02004-13.
- [16] L. Newcomb, R. Kuo, Q. Ye, Y. Jiang, Y. Tao, und R. Krug. Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *Journal of Virology*, 83(1):29–36, 2009. doi:10.1128/JVI.02293-07.
- [17] F. Baudin, C. Bach, S. Cusack, und R. Ruigrok. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *The EMBO Journal*, 13(13):3158–65, 1994.
- [18] Z. Li, T. Watanabe, M. Hatta, S. Watanabe, A. Nanbo, M. Ozawa, S. Kakugawa, M. Shimojima, S. Yamada, G. Neumann, und Y. Kawaoka. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *Journal of Virology*, 83(9):4153–62, 2009. doi:10.1128/JVI.02642-08.
- [19] S. Reich, D. Guilligay, A. Pflug, H. Malet, I. Berger, T. Crépin, T. Lunardi, M. Nanao, R. Ruigrok, und S. Cusack. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature*, 516(7531):361–366, 2014. doi:10.1038/nature14009.
- [20] E. Fodor. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virologica*, 57(2):113–22, 2013. doi:10.4149/av\_2013\_02\_113.
- [21] J. Schneider und T. Wolff. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: Do they play a role in viral mRNA export? *Vaccine*, 27(45):6312–6316, 2009. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.015.
- [22] W. Wang und R. Krug. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology*, 223(1):41–50, 1996. doi:http://dx.doi.org/10.1006/viro.1996.0453.
- [23] Y. Lu, M. Wambach, M. Katze, und R. Krug. Binding of the Influenza Virus NS1 Protein to Double-Stranded RNA Inhibits the Activation of the Protein Kinase That Phosphorylates the eIF-2 Translation Initiation Factor. *Virology*, 214(1):222–228, 1995. doi:http://dx.doi.org/10.1006/viro.1995.9937.
- [24] J. Paragas, J. Talon, R. O’Neill, D. Anderson, A. García-Sastre, und P. Palese. Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *Journal of Virology*, 75(16):7375–83, 2001. doi:10.1128/JVI.75.16.7375-7383.2001.
- [25] W. Chen, P. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O’Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. Bennink, und J. Yewdell. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine*, 7(12):1306–12, 2001. doi:10.1038/nm1201-1306.

- [26] H. Wise, A. Foeglein, J. Sun, R. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. Anderson, W. Barclay, und P. Digard. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of Virology*, 83(16):8021–31, 2009. doi:10.1128/JVI.00826-09.
- [27] Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami, R. Akkina, und Y. Kawaoka. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of Virology*, 87(5):2455–62, 2013. doi:10.1128/JVI.02656-12.
- [28] A. Vasin, O. Temkina, V. Egorov, S. Klotchenko, M. Plotnikova, und O. Kiselev. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research*, 185C:53–63, 2014. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.015.
- [29] J. Kaiser. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science*, 312(5772):380–382, 2006. doi:10.1126/science.312.5772.380.
- [30] R. Gu, L. Liu, und D. Wei. Structural and energetic analysis of drug inhibition of the influenza A M2 proton channel. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(10):571–80, 2013. doi:10.1016/j.tips.2013.08.003.
- [31] R. Pielak und J. Chou. Flu channel drug resistance: a tale of two sites. *Protein & Cell*, 1(3):246–258, 2010. doi:10.1007/s13238-010-0025-y.
- [32] A. Gregoriades, T. Christie, und K. Markarian. The membrane (M1) protein of influenza virus occurs in two forms and is a phosphoprotein. *Journal of Virology*, 49(1):229–35, 1984.
- [33] J. Zhang und R. Lamb. Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells. *Virology*, 225(2):255–66, 1996.
- [34] Q. Gao, Y. Chou, S. Doganay, R. Vafabakhsh, T. Ha, und P. Palese. The influenza A virus PB2, PA, NP, and M segments play a pivotal role during genome packaging. *Journal of Virology*, 86(13):7043–51, 2012. doi:10.1128/JVI.00662-12.
- [35] E. Monti, A. Preti, B. Venerando, und G. Borsani. Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochemical Research*, 27(7-8):649–663, 2002. doi:doi:10.1023/A:1020276000901.
- [36] R. Wiggins, S. Hicks, P. Soothill, M. Millar, und A. Corfield. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sexually Transmitted Infections*, 77(6):402–408, 2001. doi:doi:10.1136/sti.77.6.402.
- [37] P. Roggentin, R. Schauer, L. Hoyer, und E. Vimr. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9(5):915–921, 1993.

- [38] S. Schwerdtfeger und M. Melzig. Sialidasen in biological systems. *Pharmazie*, 65(8):551–561, 2010. doi:10.1691/ph.2010.0546.
- [39] E. Vimr, K. Kalivoda, E. Deszo, und S. Steenbergen. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(1):132–53, 2004. doi:10.1128/MMBR.68.1.132–153.2004.
- [40] D. Chang, D. Smalley, D. Tucker, M. Leatham, W. Norris, S. Stevenson, A. Anderson, J. Grissom, D. Laux, P. Cohen, und T. Conway. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 101(19):7427–32, 2004. doi:10.1073/pnas.0307888101.
- [41] G. Soong, A. Muir, M. Gomez, J. Waks, B. Reddy, P. Planet, P. Singh, Y. Kanetko, M. Wolfgang, Y. Hsiao, L. Tong, und A. Prince. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8):2297–2305, 2006.
- [42] D. Parker, G. Soong, P. Planet, J. Brower, A. Ratner, und A. Prince. The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infection and Immunity*, 77(9):3722–3730, 2009. doi:10.1128/IAI.00228-09.
- [43] S. Tong, Y. Li, P. Rivaille, C. Conrardy, D. Castillo, L. Chen, S. Recuenco, J. Ellison, C. Davis, I. York, A. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M. Weil, K. Tang, L. Rowe, S. Sammons, X. Xu, M. Frace, K. Lindblade, N. Cox, L. Anderson, C. Rupprecht, und R. Donis. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 109(11):4269–74, 2012. doi:10.1073/pnas.1116200109.
- [44] S. Tong, X. Zhu, Y. Li, M. Shi, J. Zhang, M. Bourgeois, H. Yang, X. Chen, S. Recuenco, J. Gomez, L. Chen, A. Johnson, C. Tao, Yand Dreyfus, W. Yu, R. McBride, P. Carney, A. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C. Davis, J. Paulson, J. Stevens, C. Rupprecht, E. Holmes, I. Wilson, und R. Donis. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 9(10):e1003657, 2013. doi:10.1371/journal.ppat.1003657.
- [45] G. Taylor. Sialidasen: structures, biological significance and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(6):830–837, 1996. doi:10.1016/S0959-440X(96)80014-5.
- [46] M. von Itzstein, W. Wu, G. Kok, M. Pegg, J. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. Smythe, H. White, S. Oliver, P. Colman, J. Varghese, D. Ryan, J. Woods, R. Bethell, V. Hotham, J. Cameron, und C. Penn. Rational design of potent sialidase-based inhibitor of influenza virus replication. *Nature*, 363:418–423, 1993. doi:10.1038/363418a0.
- [47] O. Ferraris und B. Lina. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitor resistance. *Journal of Clinical Virology*, 41(1):13–19, 2008. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.020.

- [48] R. Russell, L. Haire, D. Stevens, P. Collins, Y. Lin, G. Blackburn, A. Hay, S. Gamblin, and J. Skehel. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*, 443(7107):45–49, 2006. doi:10.1038/nature05114.
- [49] Q. Li, J. Qi, W. Zhang, C. Vavricka, Y. Shi, J. Wei, E. Feng, J. Shen, J. Chen, D. Liu, J. He, J. Yan, H. Liu, H. Jiang, M. Teng, X. Li, and G. Gao. The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nat. Struct Mol Biol.*, 17(10):1266–1268, 2010. doi:10.1038/nsmb.1909.
- [50] X. Zhu, H. Yang, Z. Guo, W. Yu, P. Carney, Y. Li, L. Chen, J. Paulson, R. Donis, S. Tong, J. Stevens, and I. Wilson. Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 109(46):18903–18908, 2012. doi:10.1073/pnas.1212579109.
- [51] Y. Wu, Y. Wu, B. Tefsen, Y. Shi, and G. Gao. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 22(4):183–191, 2014. doi:10.1016/j.tim.2014.01.010.
- [52] H. Yen, E. Hoffmann, G. Taylor, C. Scholtissek, A. Monto, R. Webster, and E. Govorkova. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *Journal of Virology*, 80(17):8787–8795, 2006. doi:10.1128/JVI.00477-06.
- [53] I. Huang, W. Li, J. Sui, W. Marasco, H. Choe, and M. Farzan. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *Journal of Virology*, 82(10):4834–4843, 2008. doi:10.1128/JVI.00079-08.
- [54] M. Matrosovich, T. Matrosovich, T. Gray, N. Roberts, and H. Klenk. Neuraminidase is important for the initiation of Influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*, 78(22):12665–12667, 2004. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004.
- [55] M. Ohuchi, N. Asaoka, T. Sakai, and R. Ohuchi. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes and Infection*, 8(5):1287–1293, 2006. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.008.
- [56] B. Chen, G. Leser, E. Morita, and R. Lamb. Influenza virus haemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *Journal of Virology*, 81(13):7111–7123, 2007. doi:10.1128/JVI.00361-07.
- [57] X. Zhu, W. Yu, R. McBride, Y. Li, L. Chen, R. Donis, S. Tong, J. Paulson, and I. Wilson. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 110(4):1458–63, 2013. doi:10.1073/pnas.1218509110.

- [58] J. Skehel und D. Wiley. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.*, 69:531–569, 2000.
- [59] E. Böttcher-Friebertshäuser, H. Klenk, und W. Garten. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathogens and disease*, 69(2):87–100, 2013. doi:10.1111/2049-632X.12053.
- [60] A. Hashem, G. Van Domselaar, C. Li, J. Wang, Y. She, T. Cyr, J. Sui, R. He, W. Marasco, und X. Li. Universal antibodies against the highly conserved influenza fusion peptide cross-neutralize several subtypes of influenza A virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(2):247–51, 2010. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.030.
- [61] R. Xu und I. Wilson. Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, 85(10):5172–82, 2011. doi:10.1128/JVI.02430-10.
- [62] T. Edinger, M. Pohl, und S. Stertz. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *The Journal of General Virology*, 95(Pt2):263–77, 2014. doi:10.1099/vir.0.059477-0.
- [63] D. Guilligay, F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crépin, P. Sehr, J. Lewis, R. Ruigrok, J. Ortin, D. Hart, und S. Cusack. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(5):500–6, 2008. doi:10.1038/nsmb.1421.
- [64] A. Dias, D. Bouvier, T. Crépin, A. McCarthy, D. Hart, F. Baudin, S. Cusack, und R. Ruigrok. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458(7240):914–8, 2009. doi:10.1038/nature07745.
- [65] S. Larsen, S. Bui, V. Perez, A. Mohammad, H. Medina-Ramirez, und L. Newcomb. Influenza polymerase encoding mRNAs utilize atypical mRNA nuclear export. *Virology Journal*, 11:154, 2014. doi:10.1186/1743-422X-11-154.
- [66] H. Goto, Y. Muramoto, T. Noda, und Y. Kawaoka. The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *Journal of Virology*, 87(21):11316–11322, 2013. doi:10.1128/JVI.01301-13.
- [67] R. Huch. *Mensch, Körper, Krankheiten*. Elsevier Urban & Fischer, 4. Auflage, 2003.
- [68] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, und K. Wesker. *Prometheus*. Thieme, Stuttgart, 1. Auflage, 2002.
- [69] E. Asan, D. von Rautenfeld, H. Braak, und B. Christ. *Taschenbuch Anatomie*. Elsevier Urban & Fischer, 2008.

- [70] K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, und Y. Kawaoka. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440(7083):435–436, 2006. doi:10.1038/440435a.
- [71] J. Couceiro, J. Paulson, und L. Baum. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research*, 29(2):155–65, 1993.
- [72] V. Weinheimer, A. Becher, G. Tönnies, M. and Holland, J. Knepper, T. Bauer, P. Schneider, J. Neudecker, J. Rückert, K. Szymanski, B. Temmesfeld-Wollbrueck, A. Gruber, N. Bannert, N. Suttorp, S. Hippenstiel, T. Wolff, und A. Hocke. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(11):1685 – 1694, 2012. doi:10.1093/infdis/jis455.
- [73] G. Herold. *Innere Medizin*. 870 - 872. Gerd Herold, 2013.
- [74] K. Müller und A. Beham. *Pathologie*. Elsevier, München, 3. Auflage, 2004.
- [75] A. Wahl, F. Schafer, W. Bardet, R. Buchli, G. Air, und W. Hildebrand. HLA class I molecules consistently present internal influenza epitopes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106(2):540–5, 2009. doi:10.1073/pnas.0811271106.
- [76] J. Schwarze und K. Mackenzie. Novel insights into immune and inflammatory responses to respiratory viruses. *Thorax*, 68(1):108 – 110, 2013. doi:10.1136/thoraxjunl-2012-202291.
- [77] W. Punpanich und T. Chotpitayasunondh. A review on the clinical spectrum and natural history of human influenza. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(10):e714 – 723, 2012. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.05.1025.
- [78] G. Cook und A. Zumla. *Manson's Tropical Diseases*. Saunders, 21. Auflage, 2002.
- [79] D. Chertow und M. Memoli. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *The Journal of the American Medical Association*, 309(3):275 – 282, 2013. doi:10.1001/jama.2012.194139.
- [80] A. Ukimura, H. Satomi, Y. Ooi, und Y. Kanzaki. Myocarditis associated with Influenza A H1N1pdm2009. *Influenza Research and Treatment*, 2012:351979, 2012. doi:10.1155/2012/351979.
- [81] S. Burda, K. Köpke, K. Prahm, B. Schweiger, M. Wedde, S. Duwe, U. Buchholz, M. an der Heiden, und W. Haas. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2013/14. 2014. URL <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>. Robert Koch-Institut.
- [82] S. Burda, K. Köpke, K. Prahm, B. Schweiger, M. Wedde, S. Duwe, U. Buchholz, M. an der Heiden, und W. Haas. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2014/15. 2015. URL <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>. Robert Koch-Institut.



- [83] F. Dawood, S. Jain, L. Finelli, M. Shaw, S. Lindstorm, R. Garten, L. Gubareva, X. Xu, C. Bridges, und T. Uyeki. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *The New England Journal of Medicine*, 360(25):2605 – 2615, 2009. doi:10.1056/NEJMoa0903810.
- [84] V. Trifonov, H. Khiabani, und R. Rabadan. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *The New England Journal of Medicine*, 361:115–119, 2009. doi:10.1056/NEJMp0904572.
- [85] P. Palese. The genes of influenza virus. *Cell.*, 10(1):1–10, 1977.
- [86] R. Belshe. The Origins of Pandemic Influenza – Lessons from the 1918 Virus. *The New England Journal of Medicine*, 353:2209–2211, 2005.
- [87] B. Cowling, S. Feng, L. Finelli, A. Steffens, und A. Fowlkes. Assessment of influenza vaccine effectiveness in a sentinel surveillance network 2010–13, United States. *Vaccine*, Seiten S0264–410X(15)01636–9, 2015. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.016.
- [88] C. Ambrose, C. Luke, und K. Coelingh. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza and other respiratory viruses*, 2(6):193–202, 2008. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x.
- [89] J. Wong, M. Christopher, S. Viswanathan, G. Schnell, X. Dai, D. Van Loon, und E. Stephen. Aerosol and nasal delivery of vaccines and antiviral drugs against seasonal and pandemic influenza. *Expert Rev Respir Med*, 4(2):171–77, 2010. doi:10.1586/ers.10.15.
- [90] R. Bright, D. Shay, B. Shu, N. Cox, und A. Klimov. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA*, 295(8):891–4, 2006. doi:10.1001/jama.295.8.joc60020.
- [91] K. Pabbaraju, K. Ho, S. Wong, S. Shokoples, X. Pang, K. Fonseca, und J. Fox. Adamantane resistance in circulating human influenza A viruses from Alberta, Canada (1970–2007). *Antiviral Research*, 79(2):81–6, 2008. doi:10.1016/j.antiviral.2007.12.006.
- [92] P. Astrahan und I. Arkin. Resistance characteristics of influenza to amino-adamantyls. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808:547–553, 2011. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.018.
- [93] E. Oberdisse, E. Hackenthal, und K. Kuschinsky. *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer-Verlag, 3. Auflage, 2002.
- [94] L. Gubareva, R. Webster, und F. Hayden. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Research*, 53(1):47–61, 2002. doi:10.1016/S0166-3542(01)00192-9.

- [95] J. McKimm-Breschkin, T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, and M. Zambon. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47(7):2264–2272, 2003. doi:10.1093/jac/dks150.
- [96] H. Ikematsu und N. Kawai. Laninamivir octanoate: a new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(10):851–7, 2011. doi:10.1586/eri.11.112.
- [97] J. Hsu, N. Santesso, R. Mustafa, J. Brozek, Y. Chen, J. Hopkins, A. Cheung, G. Hovhannisyan, L. Ivanova, S. Flottorp, I. Saeterdal, A. Wong, J. Tian, T. Uyeki, E. Akl, P. Alonso-Coello, F. Smaill, und H. Schünemann. Antivirals for treatment of influenza: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of Internal Medicine*, 156(7):512–524, 2012. doi:10.7326/0003-4819-156-7-201204030-00411.
- [98] A. Moscona. Neuraminidase inhibitors for influenza. *New England Journal of Medicine*, 353(13):1363–73, 2005. doi:10.1056/NEJMra050740.
- [99] C. Mancuso, M. Gabay, L. Steinke, und S. Vanosdol. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor for the treatment of 2009 H1N1 influenza. *The Annals of Pharmacotherapy*, 44(7-8):1240–9, 2010. doi:10.1345/aph.1P031.
- [100] S. Barik. New treatments for influenza. *BMC Medicine*, 10:104, 2012. doi:10.1186/1741-7015-10-104.
- [101] J. McKimm-Breschkin, C. Rootes, P. Mohr, S. Barrett, und V. Streltsov. In vitro passaging of a pandemic H1N1/09 virus selects for viruses with neuraminidase mutations conferring high-level resistance to oseltamivir and peramivir, but not to zanamivir. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8):1874 – 1883, 2012. doi:10.1093/jac/dks150.
- [102] M. Memoli, R. Hrabal, A. Hassantoufighi, M. Eichelberger, und J. Taubenberger. Rapid selection of oseltamivir- and peramivir-resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*, 50(9):1252 – 1525, 2010. doi:10.1086/651605.
- [103] E. Govorkova, I. Leneva, O. Goloubeva, K. Bush, und R. Webster. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10):2723–32, 2001. doi:10.1128/AAC.45.10.2723-2732.2001.
- [104] M. Rameix-Welti, V. Enouf, F. Cuvelier, P. Jeannin, und S. van der Werf. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathogens*, 4(7):e1000103, 2008. doi:10.1371/journal.ppat.1000103.

- [105] A. Hurt. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Current Opinion in Virology*, 8C:22–29, 2014. doi:10.1016/j.coviro.2014.04.009.
- [106] O. Hungnes und S. Dudman. Resistens hos influensavirus. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 128:2601–2606, 2008.
- [107] P. Kramarz, D. Monnet, A. Nicoll, C. Yilmaz, und B. Ciancio. Use of oseltamivir in 12 europeane countries between 2002 and 2007 - lack of association with the apperance of oseltamivir-resistant influenza a (H1N1) viruses. *Euro Surveillace*, 14(5):pii=19112, 2009.
- [108] A. Singer, M. Nunn, E. Gould, und A. Johnson. Potential risks associated with proposed widespread use of tamiflu. *Environmental Health Perspecitves*, 115(1):102–106, 2007. doi:10.1289/ehp.9574.
- [109] J. Fick, R. Lindberg, M. Tysklind, P. Haemig, J. Waldenström, A. Wallensten, und B. Olsen. Antiviral oseltamivir is not removed or degraded in normal sewage water treatment: implications for development of resistance by Influenza A virus. *PLoS One*, 2(10):e986, 2007. doi:10.1371/journal.pone.0000986.
- [110] D. Fleming, A. Elliot, A. Meijer, und W. Paget. Influenza virus resistance to oseltamivir: what are the implications? *European Journal of Public Health*, 19(3):238–239, 2009. doi:10.1093/eurpub/ckp012.
- [111] T. Besselaar, D. Naidoo, A. Buys, V. Gregory, J. McAnerney, J. Manamela, L. Blumberg, und B. Schoub. Widespread Oseltamivir resistance in Influenza A viruses (H1N1), South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 14(11):1809–1810, 2008. doi:10.3201/eid1411.080958.
- [112] A. Lackenby, C. Thompson, und J. Democratis. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6):626–638, 2008. doi:10.1097/QCO.0b013e3283199797.
- [113] W. Wu, S. Lau, Y. Chen, G. Wang, B. Mok, X. Wen, P. Wang, W. Song, T. Lin, K. Chan, K. Yuen, und H. Chen. The 2008-2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. *Anitviral Research*, 93(1):144–153, 2012. doi:10.1016/j.antiviral.2011.11.006.
- [114] J. Sumner. *The natural history of medicinal plants*. Timber Press Inc., 1. Auflage, 2000.
- [115] C. Kim, W. Lew, M. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. Chen, D. Mendel, C. Tai, W. Laver, und R. Stevens. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society*, 119(4):681–90, 1997.

- [116] D. Newman und G. Cragg. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3):311 – 335, 2012. doi:10.1021/np200906s.
- [117] D. Kingston. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*, 74(3):496–511, 2011. doi:10.1021/np100550t.
- [118] U. Grienke, M. Schmidtke, S. von Grafenstein, J. Kirchmair, K. Liedl, und J. Rollinger. Influenza neuraminidase: A druggable target for natural products. *Natural Product Reports*, 29(1):11 – 36, 2012. doi:10.1039/C1NP00053E.
- [119] D. J. Newman, J. Kilama, A. Bernstein, und E. Chivian. *Sustaining Life: how human health depends on biodiversity*. Oxford University Press, 1. Auflage, 2008.
- [120] P. Sithisarn, M. Michaelis, M. Schubert-Zsilavec, und J. Cinatl Jr. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalin in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Research*, 97:41 – 48, 2013. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.10.004.
- [121] A. Scalbert und G. Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl.):2073S–2085S, 2000.
- [122] P. Reece. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *Journal of Medical Virology*, 79(10):1577–1586, 2007. doi:10.1002/jmv.20951.
- [123] M. Samson, A. Pizzorno, Y. Abed, und G. Boivin. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Research*, 98(2):174–85, 2013. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.014.
- [124] S. Schwerdtfeger. *Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten und Naturstoffen auf die Aktivität der Neuraminidase*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, 2007.
- [125] G. Hirst. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chicken embryos infected with influenza virus. *Science*, 94(2427):22 – 23, 1941.
- [126] P. Marcus, J. Ngunjiri, und M. Sekellick. Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles. *Journal of Virology*, 83(16):8122 – 8130, 2009. doi:10.1128/JVI.02680-08.
- [127] A. Weight, J. Haldar, L. Álvarez de Cienfuegos, L. Gubareva, T. Tumpey, J. Chen, und A. Kilibanov. Attaching Zanamivir to a polymer markedly enhances its activity against drug-resistant strains of Influenza A virus. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(3):831–5, 2011. doi:10.1002/jps.22338.
- [128] S. Benkovic und S. Hammes-Schiffe. A perspective on enzyme catalysis. *Science*, 301(5637):1196 – 1202, 2003. doi:10.1126/science.1085515.

- [129] Y. Cheng und W. Prusoff. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099 – 3108, 1973.
- [130] M. Potier, L. Marnett, M. Bélisle, L. Dallaire, und S. Melancon. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminic) substrate. *Analytical Biochemistry*, 94:287–296, 1979.
- [131] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63, 1983.
- [132] L. Peng, B. Wang, und P. Ren. Reduction of mtt by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45:108–111, 2005. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.07.014.
- [133] T. Decker und L.-M. ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1):61 – 69, 1988.
- [134] C. Legrand, J. Bour, C. Jacob, J. Capiamont, A. Martial, A. Marc, M. Wudtke, G. Kretzmer, C. Demangel, und D. Duval. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *Journal of Biotechnology*, 25(3):231 – 243, 1992.
- [135] C. Rakers, S. Schwerdtfeger, J. Mortier, S. Duwe, T. Wolff, G. Wolber, und M. Melzig. Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(17):4312–7, 2014. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.010.
- [136] J. Maupetit, P. Derreumaux, und P. Tufféry. A fast method for large-scale de novo peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4):726–38, 2010. doi:10.1002/jcc.21365.
- [137] J. Maupetit, P. Derreumaux, und P. Tufféry. PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 37(Web Server issue):W498–503, 2009. doi:10.1093/nar/gkp323.
- [138] P. Thévenet, Y. Shen, J. Maupetit, F. Guyon, P. Derreumaux, und P. Tufféry. Pep-fold: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res.*, 40(Web Server issue):W288–93, 2012. doi:10.1093/nar/gks419.
- [139] D. Kozakov, D. Beglov, T. Bohnuud, S. Mottarella, B. Xia, D. Hall, und S. Vajda. How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(12):2159–2166, 2013. doi:10.1002/prot.24403.
- [140] D. Kozakov, R. Brenke, S. Comeau, und S. Vajda. PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*, 65(2):392–406, 2006.

- [141] S. Comeau, D. Gatchell, S. Vajda, und C. Camacho. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1):45–50, 2004.
- [142] S. Comeau, D. Gatchell, S. Vajda, und C. Camacho. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue):W96–9., 2004.
- [143] V. Sobolev, A. Sorokine, J. Prilusky, E. Abola, und M. Edelman. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, 15(4):327–32, 1999.
- [144] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402, 1997.
- [145] T. Jefferson, M. Jones, P. Doshi, C. Del Mar, C. Heneghan, R. Hama, und M. Thompson. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.*, 1(CD008965.), 2012. doi:10.1002/14651858.CD008965.pub3.
- [146] Y. Kim, S. Narayanan, und K. Chang. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*, 88(2):227–235, 2010. doi:10.1016/j.antiviral.2010.08.016.
- [147] M. Thapa, Y. Kim, J. Desper, K. Chang, und D. Hua. Synthesis and antiviral activity of substituted quercetins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(1):353 – 356, 2012. doi:10.1016/j.bmcl.2011.10.119.
- [148] D. Smee, J. Julander, E. Tarbet, M. Gross, und J. Nguyen. Treatment of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus infections in mice with antiviral agents. *Antiviral Research*, 96(1):13–20, 2012. doi:10.1016/j.antiviral.2012.07.002.
- [149] S. Udenfriend. Fluorescence assay in biology and medicine. *Academic Press*, 2:406–429, 1969.
- [150] J. Barnett, A. Cadman, D. Gor, M. Dempsey, M. Walters, A. Candlin, M. Tisdale, P. Morley, I. Owens, R. Fenton, A. Lewis, E. Claas, G. Rimmelzwaan, R. De Groot, und A. Osterhaus. Zanamivir Susceptibility Monitoring and Characterization of Influenza Virus Clinical Isolates Obtained during Phase II Clinical Efficacy Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1):78–87, 2000.
- [151] N. Wetherall, T. Trivedi, J. Zeller, C. Hodges-Savola, J. McKimm-Breschkin, M. Zambon, und F. Hayden. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: Report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2):742–750, 2003. doi:10.1128/JCM.41.2.742–750.2003.

- [152] T. Sheu, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, R. Garten, X. Xu, R. Bright, E. Butler, T. Wallis, A. Klimov, und L. Gubareva. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9):3284–3292, 2008. doi:10.1128/AAC.00555-08.
- [153] A. Hurt, I. Barr, G. Hartel, und A. Hampson. Susceptibility of human influenza viruses from australasia and south east asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antiviral Research*, 62(1):37–45, 2004. doi:10.1016/j.antiviral.2003.11.008.
- [154] S. Duwe. Mündliche Kommunikation, 2012.
- [155] S. Barrett, P. Mohr, P. Schmidt, und J. McKimm-Breschkin. Real time enzyme inhibition assays provide insights into differences in binding of neuraminidase inhibitors to wild type and mutant influenza viruses. *PLoS One*, 6(8):e23627, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023627.
- [156] R. Farrukee, J. Mosse, und A. Hurt. Review of the clinical effectiveness of the neuraminidase inhibitors against influenza B viruses. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(11):1135–45, 2013. doi:10.1586/14787210.2013.842466.
- [157] J. McKimm-Breschkin. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(Suppl 1):25–36, 2013. doi:10.1111/irv.12047.
- [158] E. Teuscher, M. Melzig, und U. Lindequist. *Biogene Arzneimittel*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 4. Auflage, 2004.
- [159] A. Liu, H. Wang, S. Lee, Y. Wang, und G. Du. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15):7141 – 7147, 2008. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.049.
- [160] H. Jeong, Y. Ryu, S. Park, J. Kim, H. Kwon, K. Park, M. Rho, und W. Lee. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(19):6816 – 6823, 2009. doi:10.1016/j.bmc.2009.08.036.
- [161] Y. Ryu, M. Curtis-Long, J. Lee, H. Ryu, J. Kim, W. Lee, und K. Park. Structural characteristics of flavanones and flavones from *Cudrania tricuspidata* for neuraminidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(17):4912–5, 2009. doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.098.
- [162] L. Gao, M. Zu, S. Wu, A. Liu, und G. Du. 3D QSAR and docking study of flavone derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(19):5964–70, 2011. doi:10.1016/j.bmcl.2011.07.071.

- [163] S. Lu und F. Chong. Combining Molecular Docking and Molecular Dynamics to Predict the Binding Modes of Flavonoid Derivatives with the Neuraminidase of the 2009 H1N1 Influenza A Virus. *International Journal of Molecular Sciences.*, 13(4):4496–507, 2012. doi:10.3390/ijms13044496.
- [164] Y. Ryu, J. Kim, S. Park, J. Chang, M. Rho, K. Bae, K. Park, und W. Lee. Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(3):971–4, 2010. doi:10.1016/j.bmcl.2009.12.106.
- [165] F. Yang, L. Jin, N. Huang, F. Chen, H. Luo, und J. Chen. Design, synthesis and activity of a new type of influenza virus N1 neuraminidase inhibitors. *Yao Xue Xue Bao (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 2011.
- [166] L. Qiu, L. Chen, D. Yan, P. Zhang, M. Tan, Z. Li, und X. Xiao. Screening based on response surface methodology of multi-fractions traditional Chinese medicine with anti-influenza virus neuraminidase activity: take shuanghuanglian injection as an example. *Yao Xue Xue Bao (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 47(4):466–471, 2012.
- [167] P. Müller und K. Downard. Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 111:222–230, 2015. doi:10.1016/j.jpba.2015.03.014.
- [168] A. Liu, B. Liu, H. Qin, S. Lee, Y. Wang, und G. Du. Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Medica*, 74(8):847 – 851, 2008. doi:10.1055/s-2008-1074558.
- [169] J. Kongkamnerd, A. Milani, G. Cattoli, C. Terregino, I. Capua, L. Beneduce, A. Gallotta, P. Pengo, G. Fassina, O. Monthakantirat, K. Umehara, W. De-Eknamkul, und S. Miertus. The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 16(7):755–64, 2011. doi:10.1177/1087057111409221.
- [170] S. Chamni und W. De-Eknamkul. Recent progress and challenges in the discovery of new neuraminidase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(4):409–23, 2013. doi:10.1517/13543776.2013.765861.
- [171] R. Amaro, X. Cheng, I. Ivanov, D. Xu, und J. McCammon. Characterizing loop dynamics and ligand recognition in human- and avian-type influenza neuraminidases via generalized born molecular dynamics and end-point free energy calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 131(13):4702–9, 2009. doi:10.1021/ja8085643.
- [172] O. Aruksakunwong, M. Malaisree, P. Decha, P. Sompornpisut, V. Parasuk, S. Pianwanit, und S. Hannongbua. On the lower susceptibility of oseltamivir to influenza neurami-



- dase subtype N1 than those in N2 and N9. *Biophysical Journal*, 92(3):798–807, 2007. doi:10.1529/biophysj.106.092528.
- [173] Z. Yang, Y. Nie, G. Yang, Y. Zu, Y. Fu, und L. Zhou. Synergistic effects in the designs of neuraminidase ligands: analysis from docking and molecular dynamics studies. *Journal of Theoretical Biology*, 267(3):363–74, 2010. doi:10.1016/j.jtbi.2010.08.029.
- [174] Y. Wang, D. Wu, D. Yu, Z. Wang, L. Tian, Y. Wang, W. Han, und X. Fang. Computational study on new natural polycyclic compounds of H1N1 influenza virus neuraminidase. *Journal of molecular modeling*, 18(8):3445–53, 2012. doi:10.1007/s00894-011-1349-0.
- [175] F. Aoki, G. Boivin, und N. Roberts. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir. *Antiviral Therapy*, 12:603–616, 2007.
- [176] L. Gubareva, M. Matrosovich, M. Brenner, R. Bethell, und R. Webster. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *The Journal of infectious diseases*, 178(5):1257 – 62, 1998.
- [177] M. Tisdale. Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors. *Reviews in Medical Virology*, 10(1):45 – 55, 2000.
- [178] M. Hughes, M. Matrosovich, M. Rodgers, M. McGregor, und Y. Kawaoka. Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. *Journal of Virology*, 74(11):5206 – 5212, 2000.
- [179] C. Liu, M. Eichelberger, R. Compans, und G. Air. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *Journal of Virology*, 69(2):1099 – 1106, 1995.
- [180] S. Londrigan, S. Turville, T. MD, Y. Deng, A. Brooks, und P. Reading. N-linked glycosylation facilitates sialic acid-independent attachment and entry of influenza A viruses into cells expressing DC-SIGN or L-SIGN. *Journal of Virology*, 85(6):2990–3000, 2011. doi:10.1128/JVI.01705-10.
- [181] E. de Vries, R. de Vries, M. Wienholts, C. Floris, M. Jacobs, A. van den Heuvel, P. Rottier, und C. de Haan. Influenza A virus entry into cells lacking sialylated N-glycans. *PNAS*, 109(19):7457–62, 2012. doi:10.1073/pnas.1200987109.
- [182] J. Peters. *Bewertung von künstlichen Verdauungssystemen in Hinblick auf die Eignung zur Prüfung der Stabilität von Polyphenolen*. Diplomarbeit, Hochschule Neubrandenburg, 2014.
- [183] F. Tomás-Barberán, M. Selma, und J. Espín. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care.*, Epub ahead of print, 2016. doi:10.1097/MCO.0000000000000314 10.1097/MCO.0000000000000314 10.1097/MCO.0000000000000314.

- [184] J. Rothwell, M. Urpi-Sarda, M. Boto-Ordóñez, C. Knox, R. Llorach, R. Eisner, J. Cruz, V. Neveu, D. Wishart, C. Manach, C. Andres-Lacueva, und A. Scalbert. Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database (Oxford)*, 2012(bas031), 2012. doi:10.1093/database/bas031.
- [185] H. Palafox-Carlos, J. Ayala-Zavala, und G. González-Aguilar. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1):R6 – R15, 2011. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x.
- [186] T. Nishikawa, K. Shimizu, T. Tanaka, K. Kuroda, T. Takayama, T. Yamamoto, N. Hanada, und Y. Hamada. Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One*, 7(9):e45371, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0045371.
- [187] L. Chen, J. Dou, Z. Su, H. Zhou, H. Wang, W. Zhou, Q. Guo, und C. Zhang. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. *Antiviral Research*, 91(3):314 – 320, 2011. doi:10.1016/j.antiviral.2011.07.008.
- [188] A. Bertelli, C. Mannari, S. Santi, C. Filippi, M. Migliori, und L. Giovannini. Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in an in vitro model. *Journal of Medical Virology*, 80(4):741 – 745, 2008. doi:10.1002/jmv.21072.
- [189] J. Serkedjieva. Combined antiinfluenza virus activity of Flos verbasci infusion and amantadine derivatives. *Phytotherapy Research*, 14(7):571–574, 2000.
- [190] K. Bedard, M. Wang, S. Proll, Y.-M. Loo, M. Katze, M. Gale, und S. Iadonato. Isoflavone Agonists of IRF-3 Dependent Signaling Have Antiviral Activity against RNA Viruses. *Journal of Virology*, 86(13):7334 – 7344, 2012. doi:10.1128/JVI.06867-11.
- [191] W. Weis, S. Cusack, J. Brown, R. Daniels, J. Skehel, und D. Wiley. The structure of a membrane fusion mutant of the influenza virus haemagglutinin. *The EMBO Journal*, 9(1):17–24, 1990.
- [192] M. Rajik, A. Omar, A. Ideris, S. Hassan, und K. Yusoff. A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6):543–548, 2009.
- [193] M. Rajik, F. Jahanshiri, A. Omar, A. Ideris, S. Hassan, und K. Yusoff. Identification and characterisation of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2. *Virology Journal*, 6:74, 2009. doi:10.1186/1743-422X-6-74.
- [194] C. Mair, K. Ludwig, A. Herrmann, und C. Sieben. Receptor binding and pH stability - How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, pii: S0005-2736(13)00357-X., 2013. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.004.

- [195] S. Stray, R. Cummings, und G. Air. Influenza virus infection of desialylated cells. *Glycobiology*, 7(10):649–58, 2000. doi:10.1093/glycob/10.7.649.
- [196] I. Nunes-Correia, J. Ranalho-Santos, S. Nir, und M. Pedroso de Lima. Interactions of influenza virus with cultured cells: detailed kinetic modeling of binding and endocytosis. *Biochemistry*, 38(3):1095–101, 1999. doi:10.1021/bi9812524.
- [197] V. Chu und G. Whittaker. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52):18153–8, 2004. doi:10.1073/pnas.0405172102.
- [198] H. Leung, O. Li, R. Chan, M. Chan, J. Nicholls, und L. Poon. Entry of influenza A Virus with a  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid binding preference requires host fibronectin. *Journal of Virology*, 86(19):10704–13, 2012. doi:10.1128/JVI.01166-12.
- [199] J. Mercer, M. Schelhaas, und A. Helenius. Virus entry by endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 79:803–22, 2010. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
- [200] M. Rust, M. Lakadamyali, F. Zhang, und X. Zhunag. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(6):567–73, 2004. doi:10.1038/nsmb769.
- [201] C. Chen und X. Zhunag. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *PNAS*, 105(33):11790–5, 2008. doi:10.1073/pnas.0803711105.
- [202] R. López-Martínez, G. Ramírez-Salinas, J. Correa-Basurto, und B. Barrón. Inhibition of influenza A virus infection in vitro by peptides designed in silico. *PLoS One*, 8(10):e76876, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0076876.
- [203] S. Fleishman, T. Whitehead, D. Ekiert, C. Dreyfus, J. Corn, E. Strauch, I. Wilson, und D. Baker. Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science*, 332(6031):816–821, 2011. doi:10.1126/science.1202617.
- [204] J. Sui, W. Hwang, S. Perez, G. Wei, D. Aird, L. Chen, E. Santelli, B. Stec, G. Cadwell, M. Ali, H. Wan, A. Murakami, A. Yammanuru, T. Han, N. Cox, L. Bankston, R. Donis, R. Liddington, und W. Marasco. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3):265–73, 2009. doi:10.1038/nsmb.1566.

**Abbildungsverzeichnis**

1	Elektronenmikroskopisches Influenzavirion . . . . .	10
2	Schematische Darstellung eines Influenzavirion . . . . .	13
3	Struktur der viralen Neuraminidase . . . . .	14
4	Phylogenie der Neuraminidase . . . . .	15
5	Primärsequenz des HA-Proteins . . . . .	16
6	Struktur des HA Monomers von Influenza . . . . .	17
7	HA Konformationsänderung . . . . .	18
8	Infektionszyklus . . . . .	20
9	Der Respirationstrakt des Menschen . . . . .	21
10	Sialinsäureverknüpfung . . . . .	22
11	Zirkulation der Influenzavirusstämme . . . . .	25
12	Entstehung der Neuen Grippe . . . . .	25
13	Reassortantenbildung . . . . .	27
14	Struktur von Amantadin und Rimantadin . . . . .	28
15	Strukturformeln der Neuraminidaseinhibitoren . . . . .	29
16	Strukturformel der N-Acetyl-Neuraminsäure . . . . .	30
17	Einteilung der Polyphenole . . . . .	34
18	Flavan als Grundstruktur der Flavonoide . . . . .	34
19	Prinzip des HA-Tests . . . . .	46
20	MTT-Test . . . . .	50
21	LDH-Test . . . . .	51
22	Einfluss von Amantadin auf die virale Neuraminidase . . . . .	56
23	Einfluss ausgewählter Flavonoide auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	59
24	Ki-Werte A/California/7/09, A/Perth/16/09 und B/Brisbane/60/08 . . . . .	62
25	Enzymkinetik von Oseltamivir . . . . .	62
26	Plaque-Reduktions-Test Oseltamivir . . . . .	65
27	Plaque-Reduktions-Test Hyperosid und Isoquercitrin . . . . .	66
28	Plaque-Reduktions-Test Luteolin-7-glucosid und Quercitrin . . . . .	67
29	Plaque-Reduktions-Test Kämpferol und Rutin . . . . .	68
30	HA- und Virustiter Oseltamivir . . . . .	69
31	Virus-Titer Flavonoide . . . . .	70
32	3D Struktur der Neuraminidase mit Oseltamivir . . . . .	71
33	Berechnete Bindung von Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin an die Neuraminidase . . . . .	72
34	Berechnete Bindung von Kämpferol, Luteolin-7-glucosid und Rutin an die Neuraminidase . . . . .	73
35	Strukturen von Peptid #1 und HA . . . . .	75
36	Strukturen von Peptid #7 und HA . . . . .	76

37	Strukturen von Peptid #10 und HA . . . . .	77
38	HA- und Virus-Titer Peptide . . . . .	78
39	Strukturformeln der Flavonoidglyka Apigenin und Quercetin . . . . .	80
40	Strukturformeln von Sialinsäure, Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin . . . . .	84
41	Strukturformeln von Kämpferol, Luteolin-7-glucosid und Rutin . . . . .	85
42	Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden . . . . .	88
43	Sequenzvergleich der Fusionsregion und Peptide . . . . .	91

## Tabellenverzeichnis

1	Systematik der <i>Orthomyxoviridae</i> . . . . .	10
2	Das segmentierte Genom von Influenzaviren . . . . .	11
3	Hämagglutininspaltende Proteasen . . . . .	17
4	Influenza-Virus-Stämme der Grippesaisons 2007 bis 2015 . . . . .	24
5	Subtypen des Hämagglutinins . . . . .	26
6	Amantadinresistenzmutationen . . . . .	28
7	Arzneimittel gegen Influenzavirusinfektionen . . . . .	30
8	Pflanzliche Arzneimittel . . . . .	33
9	Untersuchte Substanzen . . . . .	41
10	NA-Aktivitätsbestimmung . . . . .	47
11	MUNANA Testaufbau . . . . .	48
12	Oseltamivir- und Flavonoidkonzentrationen zur Enzymkinetik . . . . .	49
13	Homologiegrade der Neuraminidasen . . . . .	53
14	Sequenzvergleich des Hämagglutinins . . . . .	54
15	Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Neuraminidaseaktivität . . . . .	58
16	$K_m$ -Werte A/California/7/09, A/Perth/16/09 und B/Brisbane/60/08 . . . . .	60
17	HA-Elutions-Test . . . . .	63
18	Cytotoxizität Flavonoide . . . . .	64
19	Metabolite der eingehender getesteten Flavonoide . . . . .	89

## Rezepte gegen Grippe

Beim ersten Herannahen der Grippe, erkennbar an leichtem Kribbeln in der Nase, Ziehen in den Füßen, Hüsteln, Geldmangel und der Abneigung, morgens ins Geschäft zu gehen, gurgelt man mit etwas gestoßenem Koks sowie einem halben Tropfen Jod. Darauf pflegt dann die Grippe einzusetzen.

Die Grippe - auch «spanische Grippe» Influenza, Erkältung (lateinisch: Schnuppen) genannt - wird durch nervöse Bakterien verbreitet, die ihrerseits erkältet sind: die sogenannten Infusionstierchen. Die Grippe ist manchmal von Fieber begleitet, das mit 128° Fahrenheit einsetzt; an festen Börsentagen ist es etwas schwächer, an schwachen fester - also meist fester. Man steckt sich am vorteilhaftesten an, indem man als männlicher Grippekranker eine Frau, als weiblicher Grippekranker einen Mann küßt - über das Geschlecht befrage man seinen Hausarzt. Die Ansteckung kann auch erfolgen, indem man sich in ein Hustenhaus (sog. «Theater») begibt; man vermeide es aber, sich beim Husten die Hand vor den Mund zu halten, weil dies nicht gesund für die Bazillen ist. Die Grippe steckt nicht an, sondern ist eine Infektionskrankheit.

Sehr gut haben meinem Mann ja immer die kalten Packungen getan; wir machen das so, daß wir einen heißen Grießbrei kochen, diesen in ein Leinentuch packen, ihn aufessen und dem Kranken dann etwas Kognak geben - innerhalb zwei Stunden ist der Kranke hellblau, nach einer weiteren Stunde dunkelblau. Statt Kognak kann auch Möbelspiritrus verabreicht werden.

Fleisch, Gemüse, Suppe, Brot, Obst, Kompott und Nachspeise sind während der Grippe tunlichst zu vermeiden - Homöopathen lecken am besten täglich je dreimal eine Fünf-Pfennig-Marke, bei hohem Fieber eine Zehn-Pfennig-Marke.

Bei Grippe muß unter allen Umständen das Bett gehütet werden - es braucht nicht das eigene zu sein. Während der Schüttelfröste trage man wollene Strümpfe, diese am besten um den Hals; damit die Beine unterdessen nicht unbedeckt bleiben, bekleide man sie mit Wärme: also ein römisches Konkordats-Bad. Bei der Rückfahrt stelle man sich auf eine Omnibus-Plattform, schließe aber allen Mitfahrenden den Mund, damit es nicht zieht.

Der Schulmediziner versagt vor der Grippe gänzlich. Es ist also sehr gut, sich ein siderisches Pendel über den Bauch zu hängen: schwingt es von rechts nach links, handelt es sich um Influenza; schwingt es aber von links nach rechts, so ist eine Erkältung im Anzuge. Darauf ziehe man den Anzug aus und begeben sich in die Behandlung Weißenbergs. Der von ihm verordnete weiße Käse muß unmittelbar auf die Grippe geschmiert werden; ihn unter das Bett zu kleben, zeugt von medizinischer Unkenntnis sowie von Herzensrohheit.

Keinesfalls vertraue man dieses geheimnisvolle Leiden einem sogenannten «Arzt» an; man frage vielmehr im Grippefall Frau Meyer. Frau Meyer weiß immer etwas gegen diese Krankheit. Bricht in einem Bekanntenkreis die Grippe aus, so genügt es, wenn sich ein Mitglied des Kreises in Behandlung begibt - die anderen machen dann alles mit, was der Arzt verordnet. An hauptsächlichsten Mitteln kommen in Betracht: Kamillentee. Fliedertee. Magnolientee. Gummibaumtee. Kakteentee.

Diese Mittel stammen noch aus Großmutter's Tagen und helfen in keiner Weise glänzend. Unsere

moderne Zeit hat andere Mittel, der chemischen Industrie auszuhelfen. An Grippemitteln seien genannt:

Aspirol. Pyramidin. Bysopeptan. Ohrolax. Primadonna. Bellapholisiin. Aethyl-Phenil-Lekaryl-Parapherinan-Dynamit- Acethylen-Koollomban-Piporol. Bei letzterem Mittel genügt es schon, den Namen mehrere Male schnell hintereinander auszusprechen. Man nehme alle diese Mittel sofort, wenn sie aufkommen - solange sie noch helfen, und zwar in alphabetischer Reihenfolge, ch ist ein Buchstabe. Doppelkohlensaures Natron ist auch gesund.

Besonders bewährt haben sich nach der Behandlung die sogenannten prophylaktischen Spritzen (lac, griechisch; so viel wie «Milch» oder «See»). Diese Spritzen heilen am besten Grippen, die bereits vorbei sind - diese aber immer.

Amerikaner pflegen sich bei Grippe Umschläge mit heißem Schwedenpunsch zu machen; Italiener halten den rechten Arm längere Zeit in gestreckter Richtung in die Höhe; Franzosen ignorieren die Grippe so, wie sie den Winter ignorieren, und die Wiener machen ein Feuilleton aus dem jeweiligen Krankheitsfall. Wir Deutsche aber behandeln die Sache methodisch:

Wir legen uns erst ins Bett, bekommen dann die Grippe und stehen nur auf, wenn wir wirklich hohes Fieber haben: dann müssen wir dringend in die Stadt, um etwas zu erledigen. Ein Telefon am Bett von weiblichen Patienten zieht den Krankheitsverlauf in die Länge.

Die Grippe wurde im Jahre 1725 von dem englischen Pfarrer Jonathan Grips erfunden; wissenschaftlich heilbar ist sie seit dem Jahre 1724.

Die glücklich erfolgte Heilung erkennt man an Kreuzschmerzen, Husten, Ziehen in den Füßen und einem leichten Kribbeln in der Nase. Diese Anzeichen gehören aber nicht, wie der Laie meint, der alten Grippe an - sondern einer neuen. Die Dauer einer gewöhnlichen Hausgrippe ist bei ärztlicher Behandlung drei Wochen, ohne ärztliche Behandlung 21 Tage. Bei Männern tritt noch die sog. «Wehleidigkeit» hinzu; mit diesem Aufwand an Getue kriegen Frauen Kinder.

Das Hausmittel Cäsars gegen die Grippe war Lorbeerkrantz-Suppe; das Palastmittel Vanderbilts ist Platinbouillon mit weichgekochten Perlen.

Und so fasse ich denn meine Ausführungen in die Worte des bekannten Grippologen Professor Dr. Dr. Dr. Ovaritius zusammen:

Die Grippe ist keine Krankheit - sie ist ein Zustand -!

*(Dr. jur. Kurt Tucholsky)*

## Danksagung

Nach unzähligen Stunden ist diese Arbeit nun endlich vollbracht und es kommt ein weiterer schöner Teil, die Danksagung.

Zuallererst möchte ich meinen Dank an PD Dr. Thorsten Wolff richten, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, mich in seine Arbeitsgruppe am Robert Koch-Institut aufzunehmen, zu betreuen und ein offenes Ohr für dieses Thema hatte.

Prof. Melzig brachte mich durch meine Diplomarbeit erst auf das spannende Thema der Neuraminidase. Auch er hatte immer ein offenes Ohr und eine offene Tür für mich. Nicht zuletzt die schöne Aussicht zu jeder Jahreszeit hat die vielen Stufen wettgemacht. Vielen Dank.

Herrn Prof. Dr. Bastian Opitz sei an dieser Stelle für die aufgeschlossene und unkomplizierte Betreuung gedankt und dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Arbeit zu begutachten.

Dr. Susanne Duwe vom NRZ möchte ich ebenfalls für die sehr gute Betreuung, anregenden Diskussionen und das ein oder andere Bonbon danken.

Ute Hopf-Guevara half mir bei der Anzucht der Viren und gab mir so manchen wertvollen Tip; dafür herzlichen Dank. Mit Rat und Tat stand mir auch die ehemals P15 Gruppe mit Viola, Melanie, Matthias, Daniel, Anne, Katharina, Rocio, Jessica, Tina, Sandra, Andrea und Gudrun zur Seite. Auch sie gaben den ein oder anderen Hinweis, der zum Gelingen der Experimente beitrug. Insbesondere Andrea und Gudrun sorgten dafür, dass es immer genügend Nachschub an dem ein oder anderem Puffer gab.

Dr. Fiebig hat mein Interesse an der Mikrobiologie und Virologie durch seine einzigartige Lehre an der FU Berlin geweckt und vertieft. Dem aufmerksamen Leser dürfte ein „aberwitzig“ im Text nicht entgangen sein. Dr. Fiebig sei es an dieser Stelle gewidmet.

Bei Carl Anselm Schulz möchte ich mich für die unermüdliche Hilfe, die die Herausforderungen von L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X mit sich gebracht haben, bedanken. Es hat sich gelohnt!

Vielleicht weniger fachlich, aber nichtsdestotrotz nicht unwichtiger, war mir meine Familie in dieser Zeit eine große Hilfe, indem sie für mich da war und – wenn nötig – mich abgelenkt hat. Ohne ihren Rückhalt wäre ich nicht da, wo ich heute stehe. Vielen Dank!



„Ich, Sverre Morten Schwerdtfeger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung potentieller Inhibitoren von Influenzaviren unter besonderer Berücksichtigung der viralen Neuraminidase und des Fusionspeptids“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den